



DISEÑO DE UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINA RESISTENTES AISLADOS EN ESTUDIANTES DEL ÚLTIMO CURSO DEL GRADO EN VETERINARIA Y EL GRADO EN ENFERMERÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (2020-21)

Design of a research project for microbiological and epidemiological characterization of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated in the final year students of the Veterinary Medicine Degree and Nursing Degree at the Cordoba University (2020-21)

Trabajo Fin de Máster realizado por
María de los Ángeles Mena Rodríguez

y dirigido por
Profa. Dra. Belén Huerta Lorenzo
Dpto. Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba

para la superación del **Máster en Salud Pública Veterinaria**
del Instituto de Estudios de Posgrado (IdEP) de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 7 de Septiembre de 2020

ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN	4
2. OBJETIVOS	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS DEL TFM	5
4. MEMORIA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	7
4.1. Título del proyecto.....	7
4.2. Resumen.....	7
4.3. Antecedentes.....	8
4.4. Objetivos.....	13
4.5. Hipótesis del trabajo.....	14
4.6. Metodología.....	14
4.6.1. Tipo de estudio.....	14
4.6.2. Objetivo 1.....	14
4.6.3. Objetivo 2.....	17
4.6.4. Objetivo 3.....	19
4.6.5. Objetivo 4.....	20
4.6.6. Objetivo 5.....	22
4.7. Limitaciones del estudio.....	22
4.8. Aspectos éticos y legales.....	23
4.9. Recursos e instalaciones necesarios para el estudio.....	25
4.10. Cronograma.....	25
4.11. Difusión de los resultados.....	25
4.12. Agradecimientos.....	26
5. ANEXO 1	27
6. ANEXO 2.1	31
7. ANEXO 2.2	34
8. ANEXO 3	37
9. ANEXO 4	39
10. ANEXO 5	40
11. BIBLIOGRAFÍA	41

ABREVIATURAS

ACS	Infección nosocomial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y Laboratorio (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO	Infección adquirida en la comunidad
ECAC	Ensayo clínico aleatorio controlado
EGCP O PGEF	Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
LPV	Leucocidina de Panton-Valentine
MLS _B	Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas del tipo B
MLS _{Bc}	Resistencia de tipo constitutiva al complejo MLS _B
MLS _{Bi}	Resistencia de tipo inducible al complejo MLS _B
MLST	Tipificación de Secuencias Multilocus (<i>Multilocus Sequence Typing</i>)
MS _B	Macrólidos y Estreptograminas del tipo B
PBP2a o PBP2'	Proteína de unión a la penicilina 2a
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SARM-CO	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirido en la comunidad
SARM-ACS	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina nosocomial
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> (Casete Cromosómico Estafilocócico)
ST	Tipo de secuencia (<i>Sequence Type</i>)
TFM	Trabajo Fin de Máster
UCO	Universidad de Córdoba



JUSTIFICACIÓN

Las personas en contacto estrecho con animales (ganaderos, criadores, veterinarios) y aquellas dedicadas a profesiones sanitarias constituyen un colectivo de alto riesgo para la adquisición de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y, por tanto, una fuente de transmisión de esta bacteria para la población general. Las cepas de SARM procedentes de la comunidad (SARM-CO), entre las que se incluyen aquellas de origen animal, presentan características microbiológicas distintas que los aislados hospitalarios (SARM-ACS), destacando una alta tasa de multiresistencia y fracaso terapéutico como consecuencia del uso irracional de los antimicrobianos en medicina veterinaria. Como consecuencia de ello y de la posibilidad de un intercambio de genes de resistencia entre las cepas comunitarias y las cepas nosocomiales, muchos países han realizado cambios en los protocolos de ingreso hospitalario, de forma que todos los individuos relacionados profesionalmente con los animales deben ser aislados y descartados como portadores de SARM-CO antes de ser ingresados.

OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster era **diseñar un proyecto de investigación** para:

1. Determinar la prevalencia de portadores nasales de SARM en los alumnos del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba en el curso 2020-2021.
2. Determinar el perfil fenotípico y genotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas de SARM aisladas, con especial interés en la resistencia inducida a clindamicina.
3. Determinar la relación genética de las cepas aisladas mediante la observación del perfil genotípico de las mismas a través de la técnica de campo pulsado.
4. Comparar las características microbiológicas y epidemiológicas de los casos positivos aislados en ambas poblaciones.
5. Determinar los posibles factores de riesgo asociados al estado de portador en ambas poblaciones de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS DEL TFM

Revisión bibliográfica

Para establecer los antecedentes del tema, seleccionar los objetivos y establecer la metodología del estudio epidemiológico, se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva en las siguientes fuentes:

- Bases de datos: Pubmed, Web Of Science (WoS), Scopus, Scientific Electronic Library Online (SciELO), Repositorio Institucional de la Universidad de Córdoba (Helvia), Google Scholar.
- Páginas gubernamentales: www.isciii.es (Instituto de Salud Carlos III), <https://www.ecdc.europa.eu/en> (Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC)), <https://www.aetsa.org/> (Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA)), <https://seimc.org/> (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)), <https://clsi.org/> (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)), <https://eucast.org/> (Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST)), <http://www.cfsph.iastate.edu/> (Centro de Seguridad Alimentaria y Salud Pública (CFSPH)), <https://www.boe.es/> (Agencia Estatal del Boletín Oficial del Estado (BOE)), <https://www.sempsph.com/> (Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene (SEMPSPH)).
- Presentaciones a congresos: II International Conference on Antimicrobial Research (ICAR) (Lisboa-Portugal).

Como palabras de búsqueda se utilizaron: "SARM", "*Staphylococcus aureus*", "prevalence", "risk factors", "veterinary students", "nurse students" (en castellano e inglés), unidos por los conectores "OR" y "AND" con el fin de abarcar el mayor número de datos e información.

Salvo casos excepcionales, se obtuvo copia completa de todos los artículos que cumplieran con los criterios de selección, aprovechando su lista de referencias bibliográficas para buscar nuevas fuentes de información. Los artículos se seleccionaron en base a los siguientes criterios:



Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Idioma: castellano e inglés.	Editoriales y artículos de opinión.
Fecha de publicación: últimos 20 años.	Estudios no relacionados específicamente con los objetivos del trabajo.
Objetivo del estudio: preferentemente estudios de prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana.	Contenido repetido.
Población de estudio: estudiantes de veterinaria o enfermería > profesionales sanitarios > población general.	Comunicaciones de fuentes no fiables.

Dada su repercusión en el diseño del estudio, se realizó una lectura crítica de los resultados publicados en los artículos obtenidos sobre prevalencia y factores de riesgo, utilizando para ello las plantillas de la red CASPE (Critical Appraisal Skills Programme Español) (<http://www.redcaspe.org/herramientas/instrumentos>).

Tabla. Resumen de las fuentes consultadas.

TIPO DE FUENTE	Nº de referencias seleccionadas			
Libros/capítulos de libro	9			
Artículos indexados	ECAC*	Cohortes	Casos-control	Descriptivo
	3	3	2	50
Comunicaciones a congreso	1			
Organismos oficiales	12			

*ECAC: Ensayo clínico aleatorio controlado

Dada la naturaleza del sujeto de estudio, la realización de este TFM exigiría su aprobación por el Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Córdoba. Por este motivo, el planteamiento del trabajo se realizó según el modelo establecido para tal fin por la Junta de Andalucía, incluyendo en los anexos los documentos de autorización exigidos (<https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/>):

- Documento de confidencialidad (Anexo 3).
- Anonimización (Anexo 4)
- Autorización del Centro y del Departamento (Anexo 5).



MEMORIA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título del Proyecto: Caracterización microbiológica y epidemiológica de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes aislados en estudiantes del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba (2020-21).

Código del estudio: SARM-2021

Investigadora principal/Tutora académica: Profa. Dra. Belén Huerta Lorenzo

Alumna: María de los Ángeles Mena Rodríguez

RESUMEN:

Las personas en contacto estrecho con animales (ganaderos, criadores, veterinarios) y aquellas dedicadas a profesiones sanitarias constituyen un colectivo de alto riesgo para la adquisición de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SARM) y, por tanto, una fuente de transmisión de esta bacteria para la población general. Las cepas de SARM procedentes de la comunidad (SARM-CO), entre las que se incluyen aquellas de origen animal, presentan características microbiológicas distintas que los aislados hospitalarios (SARM-ACS), destacando una alta tasa de multiresistencia y fracaso terapéutico, como consecuencia del uso irracional de los antimicrobianos en medicina veterinaria. Como consecuencia de ello y de la posibilidad de un intercambio de genes de resistencia entre las cepas comunitarias y las cepas nosocomiales, muchos países han realizado cambios en los protocolos de ingreso hospitalario, de forma que todos los individuos relacionados profesionalmente con los animales deben ser aislados y descartados como portadores de SARM-CO antes de ser ingresados.

En base a ello, este proyecto pretende realizar una caracterización microbiológica y epidemiológica de las cepas aisladas en ambas poblaciones a partir de portadores nasales sanos.

TITLE: Microbiological and epidemiological characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the final year students of the Veterinary Medicine Degree and Nursing Degree at the Cordoba University (2020-21).

**SUMMARY:**

People in close contact with animals (ranchers, breeders, veterinarians) and those dedicated to the health professions constitute a high-risk group for the acquisition of infections by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and therefore, a source of transmission of this bacteria for the general population. The community-acquired MRSA strains (CA-MRSA), including those of animal origin, present different microbiological characteristics than hospital-acquired isolates (HA-MRSA), highlighting a high rate of multidrug resistance and therapeutic failure as a consequence of the irrational use of antimicrobials in veterinary medicine. As a consequence of this and of the possibility of an exchange of resistance genes between community strains and nosocomial strains, many countries have made changes in hospital admission protocols, so that all individuals professionally related to animals should be isolated and discarded as carriers of CA-MRSA before being admitted.

Based on this, this project aims to carry out a microbiological and epidemiological characterization of the isolated strains in both populations from healthy nasal carriers.

ANTECEDENTES

Staphylococcus aureus es un patógeno de gran importancia en medicina humana y la principal especie patógena dentro de su género. Es un microorganismo comensal de las fosas nasales, piel, periné y superficies mucosas capaz de producir bacteriemias severas con neumonía y meningitis, endocarditis y septicemias que pueden conllevar la muerte (Duquette & Nuttall, 2004; Frana *et al.*, 2013; Mensa *et al.*, 2013). La tasa de letalidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* varía desde el 11% al 43%, según el órgano afectado y la presencia de complicaciones (Tibavizco *et al.*, 2007).

Existen dos tipos de infección por estafilococos, las *infecciones nosocomiales* (ACS) y las *infecciones adquiridas en la comunidad* (CO). Las infecciones nosocomiales son enfermedades infecciosas adquiridas en instalaciones sanitarias que aumentan el riesgo de mortalidad en los pacientes. Por su parte, las infecciones adquiridas en la comunidad son aquellas ocurridas en pacientes sanos sin contacto previo con establecimientos sanitarios, cuya infección proviene de una fuente no hospitalaria (Otto, 2013). En el caso de estafilococos, el principal mecanismo de transmisión de las cepas comunitarias es por contacto directo con personas portadoras y animales, de compañía o granja. En consecuencia, suelen afectar a personas que frecuentan lugares de alta concentración de



individuos, como reclusos, soldados o deportistas, así como veterinarios, matarifes y ganaderos (Echevarria & Iglesias, 2003; Harbarth *et al.*, 2005; LaPlante *et al.*, 2007; Tibavizco *et al.*, 2007).

La meticilina es un antibiótico β -lactámico, descubierto en 1959, eficaz frente a los estafilococos resistentes a la penicilina, si bien, tan sólo dos años después de su descubrimiento, ya se empezaron a aislar cepas de *S. aureus* resistentes a la misma (SARM). Estos primeros aislamientos tuvieron lugar en el Reino Unido, propagándose posteriormente por el resto de países europeos hasta llegar, finalmente, a Australia, Japón y Estados Unidos (Enright *et al.*, 2002). En España, los primeros brotes de SARM aparecieron a finales de los 80. La tasa media de portadores en la población general era entonces de un 1,5%, cifra que en cuestión de 10 años aumentó hasta un 23%, detectando algunos estudios tasas superiores al 30% en los años 90 (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008).

A nivel hospitalario, la tasa de infección por SARM entre el personal sanitario llega a alcanzar, según el país, el 20%, teniendo el personal de enfermería un riesgo dos veces mayor que los médicos y tres veces mayor que el resto de sanitarios por su mayor contacto con los pacientes (Albrich & Harbarth, 2008; Efa *et al.*, 2019; Szymanek-Majchrzak *et al.*, 2019). Entre los estudiantes de enfermería, se han descrito prevalencias de hasta el 10%, sobre todo entre aquellos que cursan sus últimos años de estudio, en los cuales mantienen un contacto estrecho con los pacientes durante sus prácticas (Conceição *et al.*, 2017).

Como ya hemos comentado, SARM no sólo resulta un grave problema a nivel hospitalario. El carácter zoonótico de esta infección y su relevancia en sanidad animal, como patógeno oportunista, hace que exista una creciente preocupación por la transmisión de cepas de SARM-CO entre animales y humanos (Singh *et al.*, 2013; Frana *et al.*, 2013). En este sentido, las investigaciones realizadas han demostrado el aislamiento de SARM en animales domésticos, tanto de compañía (perros y gatos) como ganado (vacas, cerdos, pollos, caballos) (Duquette & Nuttall, 2004; Yamamoto *et al.*, 2010; Van Duijkeren *et al.*, 2010; Frana *et al.*, 2013; Aklilu *et al.*, 2010; Aklilu *et al.*, 2013). A partir de dichos estudios se concluyó que las personas en contacto estrecho con animales portadores, especialmente cerdos y vacas, tenían un riesgo hasta tres veces mayor de contraer SARM-CO (Yamamoto *et al.*, 2010; Van Rijen *et al.*, 2018).



Además, los autores aislaron las mismas cepas en las familias y personas relacionadas con estos criadores, demostrándose así la transmisión entre personas y no sólo de animales a personas (Yamamoto *et al.*, 2010).

Dentro del colectivo veterinario, las tasas de infección por SARM halladas a nivel de granja (8-37%) permiten catalogarlo como un problema emergente (Bravo & Gil, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018). Las encuestas en estudiantes de veterinaria, aunque escasas, revelan prevalencias de hasta el 23% en países como Malasia y superiores al 14% en zonas de Europa, como Países Bajos y Portugal (Van Duijkeren *et al.*, 2010; Aklilu *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2018). En España, el único trabajo abordado, entre los veterinarios del Hospital Clínico de la Universidad de Extremadura reflejó una tasa de infección por SARM del 36,8% (Bravo & Gil, 2017).

Como consecuencia de todo ello, se ha hecho mucho énfasis en la importancia de medidas, como la identificación rápida de los sujetos colonizados, su aislamiento y tratamiento con antimicrobianos eficaces, para reducir las posibilidades de contagio (Mongensen *et al.*, 2018).

La resistencia de *S. aureus* a las penicilinas resistentes a la penicilinas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, etc.) y cefalosporinas se asocia en general a la síntesis de una proteína fijadora de la penicilina 2a (PBP2a o PBP2'), codificada por el gen de resistencia a la meticilina (*mecA*), que no puede ser inactivada por los antibióticos betalactámicos, ya que presenta una baja afinidad por los mismos (Tibavizco *et al.*, 2007). Se cree que dicho gen ha sido adquirido a partir de una especie lejana y no relacionada con *S. aureus*, es decir se cree que ha sido por medio de transmisión de genes de resistencia intra- o inter- especies (Enright *et al.*, 2002). Dicho gen *mecA* forma parte de lo que se conoce como casete cromosómico estafilocócico (SCCmec: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) integrado en el genoma de *S. aureus*. Además, de resistencia a los β -lactámicos, la presencia del SCCmec también puede conferir, de manera variable, resistencias a otras familias de antimicrobianos, como tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglicósidos, quinolonas y glicopéptidos (Tibavizco *et al.*, 2007).

La expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina es compleja, diferenciándose inicialmente dos tipos de cepas: 1) cepas con resistencia homogénea, cuando la mayor parte de la población presenta resistencia y 2) cepas con resistencia heterogénea, solo

una pequeña parte de la población sobrevive a altas concentraciones de oxacilina, mientras que la mayor parte es sensible a bajas concentraciones. Este último tipo es el más habitual. Se ha descrito, además, la existencia de un tercer tipo de resistencia, denominada de bajo nivel o borderline, caracterizada por concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en el punto de corte de resistencia o una dilución por encima de éste (4-8 mg/L). Estas cepas borderline se pueden dividir en dos categorías en función de la presencia o ausencia del gen *mecA*. Si contienen el gen *mecA* son cepas extremadamente heterorresistentes que producen la PBP2a. Si no contienen el gen *mecA*, ni por tanto la PBP2a, esta resistencia puede deberse a la hiperproducción de betalactamasa o a mecanismos mediados por otros genes. Las cepas que hiperproducen betalactamasa son sensibles a las asociaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam) (Ardanuy *et al.*, 2011).

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B, son muy utilizados en infecciones causadas por estafilococos, siendo la clindamicina el antimicrobiano de elección para el tratamiento de las infecciones de piel y tejidos blandos causadas por estos microorganismos. Aunque los tres tipos de antibióticos presentan una estructura química distinta actúan de forma similar, inhibiendo la síntesis proteica bacteriana mediante la unión a la subunidad 50S del ribosoma (Tamariz *et al.*, 2009).

La resistencia de los estafilococos a estos antimicrobianos puede ser debida a varios mecanismos, destacando la expulsión activa (mecanismo que sólo ocurre en macrólidos y estreptograminas -fenotipo MS_B-), y la modificación de la diana en el ribosoma (fenotipo MLS_B) por acción de una metilasa codificada por una variedad de genes *erm*. Este último mecanismo es el más frecuente y confiere resistencia cruzada a los 3 grupos de antimicrobianos (Steward *et al.*, 2005). Esta resistencia puede ser *constitutiva* (MLS_{Bc}) o *inducible* (MLS_{Bi}) por el uso prolongado de compuestos como la propia clindamicina (inductor débil) o la eritromicina (inductor fuerte). Como consecuencia, las cepas con resistencia MLS_{Bi} pueden ser susceptibles a clindamicina en las pruebas rutinarias de difusión por disco y, al ser usada clínicamente, producirse la inducción de resistencia a largo plazo, con el consiguiente fracaso terapéutico (Tamariz *et al.*, 2019). Desde el año 2000, la resistencia a la clindamicina ha ido en aumento, con tasas próximas al 30% en cepas SARM, frente al 6% detectado en cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (Yamamoto *et al.*, 2010; Renushri & Nagaraj, 2011). Es por esto, que numerosos autores recomiendan incluir el D-test entre las pruebas de laboratorio, a



fin de comprobar la aparición de resistencia inducida a la clindamicina en presencia de eritromicina (Levin *et al.*, 2005).

Por su parte, la *vancomicina*, un glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular, ha sido, durante más de cuatro décadas, el antibiótico de primera línea en el tratamiento de las infecciones graves causadas por SARM. En los últimos años, sin embargo, ha aumentado a nivel mundial la preocupación por la emergencia de cepas de estafilococos con sensibilidad disminuida a la vancomicina, el fracaso del tratamiento en infecciones causadas por aislamientos sensibles con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) cercanas al punto de corte, y la aparición de efectos secundarios, particularmente insuficiencia renal aguda (Rincón *et al.*, 2014).

La disminución de la sensibilidad a la vancomicina se debe a un engrosamiento de la pared celular bacteriana por incremento de la síntesis del peptidoglucano, como consecuencia del cual el antibiótico es atrapado en las capas superficiales de la pared celular. La resistencia a la vancomicina en altos niveles se presenta por la adquisición de grupos de genes *vanA* productores de precursores de peptidoglucano (terminados en D-Ala-D-Lac) con reducida afinidad por el antibiótico (Rincón *et al.*, 2014).

La ceftarolina, el linezolid, la daptomicina y la tigeciclina son algunas de las alternativas aprobadas en los últimos años para tratar las infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina y vancomicina, si bien su eficacia no supera a las penicilinas antiestafilocócicas (Tibavizco *et al.*, 2007, Rincón *et al.*, 2014; Sharma & Hammerschlag, 2019).

Desde un punto de vista microbiológico, las cepas de SARM comunitarias presentan una serie de características que permiten diferenciarlas de los aislados hospitalarios:

- poseen patrones genotípicos diferenciados en la electroforesis en campo pulsado (PGEF) y en el *multilocus sequence typing* (MLST);
- contienen los genes *lukF-PV* y *lukS-PV* que codifican la leucocidina de Pantone-Valentine (LPV), asociada a la destrucción de los leucocitos y necrosis tisular;
- presentan un cassette cromosómico estafilocócico (*SCCmec*) de tipo IV, V o VT21, y
- carecen de otros genes de resistencia, por lo que sólo son resistentes a los antibióticos betalactámicos; si bien, pueden adquirir resistencia a múltiples



antimicrobianos mediante la adquisición de plásmidos (Cercenado & de Gopegui, 2008).

De esta forma, tradicionalmente se ha considerado que las cepas extrahospitalarias eran más sensibles al resto de antibióticos que las cepas nosocomiales y se ha utilizado la expresión fenotípica de los perfiles de sensibilidad antibiótica para clasificar las cepas según su origen (Echevarria & Iglesias, 2003). Sin embargo, la posibilidad de un intercambio de genes de resistencia desde las cepas comunitarias a las cepas nosocomiales determinó, en el año 2006, un cambio en los protocolos de ingreso hospitalario en algunos países europeos, de forma que todos los individuos relacionados profesionalmente con los animales debían ser aislados y descartados como portadores de SARM-CO antes de ser ingresados. Paralelamente, diversos organismos y asociaciones sanitarias propusieron una serie de recomendaciones para controlar la difusión de la infección por SARM incluida la vigilancia microbiológica, la detección activa de pacientes colonizados o infectados y la aplicación de medidas de control, el tratamiento de descolonización, el uso de medidas de limpieza y desinfección personal y ambiental, la reducción del consumo de antimicrobianos y las actuaciones en pacientes no hospitalizados (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

1. Determinar la prevalencia de portadores nasales de SARM en los alumnos del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba en el curso 2020-2021.
2. Determinar el perfil fenotípico y genotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas de SARM aisladas, con especial interés en la resistencia inducida a clindamicina.
3. Determinar la relación genética de las cepas aisladas mediante la observación del perfil genotípico de las mismas a través de la técnica de campo pulsado.
4. Comparar las características microbiológicas y epidemiológicas de los casos positivos aislados en ambas poblaciones.
5. Determinar los posibles factores de riesgo asociados al estado de portador en ambas poblaciones de estudio.



HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. La prevalencia de portadores nasales de SARM en los alumnos del último curso del Grado en Veterinaria y del Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba será significativamente diferente, alcanzando valores del 15-23% y del 5-11%, respectivamente.
2. El perfil fenotípico y genotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas de SARM aisladas en los estudiantes de Veterinaria y Enfermería será diferente. Se espera encontrar un mayor porcentaje de multiresistencia y resistencia inducida a clindamicina entre los aislados de origen hospitalario.
3. Las características microbiológicas, epidemiológicas y genéticas de las cepas de SARM aisladas en los estudiantes de Veterinaria y Enfermería serán diferentes, predominando las cepas adquiridas en la comunidad en el primer caso y las cepas nosocomiales, en el segundo.
4. Se espera encontrar una correlación entre el tipo de cepa predominante en cada población y los factores de riesgo asociados por otros autores a cada tipo de infección, destacando el contacto estrecho con animales en las cepas adquiridas en la comunidad y la asistencia a centros sanitarios en las cepas nosocomiales.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Se realizará un estudio observacional transversal, diseñado para medir la prevalencia de la enfermedad en una población definida y un determinado momento en el tiempo, en el que se recogerá además información sobre diversos factores de riesgo a fin de determinar posibles relaciones causa-efecto.

Objetivo 1. Determinar la prevalencia de portadores nasales de SARM en los alumnos del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba en el curso 2020-21.

- Las poblaciones en estudio son:
 - A. Alumnos de 5º curso del Grado en Veterinaria de la Universidad de Córdoba.Criterios de inclusión:
 - Haber cursado las prácticas de tercero y cuarto, ya que se incluyen asignaturas

como propedéutica, enfermedades infecciosas y medicina interna, entre otras.

- No haber recibido tratamiento antibiótico en los últimos 7 días.
- Firmar el consentimiento informado para la toma de muestra y la encuesta epidemiológica (Anexo 1 y Anexo 2.1).

B. Alumnos de 4º curso del Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba.

Criterios de inclusión:

- Haber cursado todos los “*Practicum*” del Grado.
- No haber recibido tratamiento antibiótico en los últimos 7 días.
- Firmar el consentimiento informado para la toma de muestra y la encuesta epidemiológica (Anexo 1 y Anexo 2.2).

Usamos estos criterios de selección considerando que en estas asignaturas los alumnos rotarán por diferentes tipos de prácticas en las que existirá contacto estrecho con animales de compañía y ganado, en el caso de veterinaria, y con pacientes hospitalizados, en el caso de enfermería, lo que constituye un importante factor de riesgo para el contagio por SARM.

Quedarán excluidos del estudio aquellos individuos en los que el muestro nasal no era posible por motivos anatómicos y/o quirúrgicos.

▪ *Muestreo, consentimiento informado y encuesta epidemiológica*

En base a la información proporcionada por los profesores de cada Grado se estima que, del total de alumnos que se matriculan de media en el último curso, unos 100 en veterinaria y 80 en enfermería cumplirán los criterios de selección. Para este censo y considerando una prevalencia esperada del 23% en Veterinaria y del 10% en Enfermería (Aklilu *et al.*, 2013; Frana *et al.*, 2013; Conceição *et al.*, 2017), la muestra necesaria en cada población para realizar los cálculos con un nivel de confianza del 95% y un error máximo aceptado del 7,5%, sería de 55 estudiantes en veterinaria y 35 en enfermería. Para contactar con los alumnos se dará difusión al trabajo a través de los profesores y los grupos de redes sociales de cada facultad y a partir de ahí se seguirá un muestreo no probabilístico “en bola de nieve” (los primeros individuos en ser seleccionados reclutarán a los siguientes participantes entre sus conocidos).

Previamente a la toma de muestras, se entregará a todos los participantes un documento explicativo del estudio, la metodología de muestreo y los beneficios y riesgos de



participar en él, a fin de obtener su consentimiento informado, así como un cuestionario de recogida de información para el estudio descriptivo de los casos positivos (Anexos 1, 2.1 y 2.2).

Siguiendo el protocolo de identificación rápida de SARM para el cribado de portadores, editado por la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía y el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2011), se introducirá una torunda estéril en las fosas nasales anteriores y se rotará a lo largo de la membrana mucosa para la toma de exudado nasal. Esta muestra puede conservarse durante un máximo de 24 horas a temperatura ambiente o en nevera, entre 2-8 °C. De acuerdo a las directrices del Comité de Ética de la Investigación Biomédica, el muestreo será realizado por la Profa. Belén Huerta Lorenzo (Doctora en Veterinaria e investigadora principal del proyecto).

Las muestras, correctamente identificadas, serán procesadas en el departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

- *Estudio microbiológico*

Previamente a su siembra, las torundas se sumergirán en 3 ml de caldo infusión cerebro corazón estéril suplementado con NaCl al 6,5%. Tras incubar en aerobiosis a 35 ± 2 °C /24 h, los caldos se congelarán a -70 °C hasta su análisis.

El aislamiento e identificación bacteriana se realizará en medio selectivo ChromiD® MRSA SMART, Biomerieux, España (Ref. 413050), suplementado con oxacilina. Este medio incorpora, además, un sustrato cromogénico que permite diferenciar las colonias de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (SARM) por su aspecto rosado. Las placas se incubarán en aerobiosis a 35 °C durante 48 h, y se realizarán dos lecturas, la primera a las 24 h y la segunda a las 48 h (Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, 2011). Como control de calidad se utilizará una cepa de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente procedente de un caso clínico confirmado del Hospital Reina Sofía de Córdoba y como control negativo la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 (sensible a meticilina).

Tras la incubación, todas las colonias compatibles con estafilococos meticilina resistentes formadas por cocos grampositivos en racimo se sembrarán en agar sangre y se incubarán 24 horas a 37 °C en aerobiosis, para su posterior identificación mediante las pruebas de la catalasa, oxidasa, coagulasa en tubo, ureasa, siembra en agar manitol



salado, ADNasa, siembra en medio SIM e incubación en caldo MR-VP (Bergey's Manual, 2015). La identificación definitiva se realizará en la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba mediante el sistema MALDI-TOF/MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Este método obtiene el perfil proteico característico de una cepa microbiana a partir del análisis de sus proteínas ribosomales, lo que permite la identificación del microorganismo por comparación con los perfiles incluidos en una base de datos de referencia. Para este análisis, se disolverán 5-10 mg de un cultivo puro de 24 h en 300 microlitros de agua mili Q y 900 microlitros de etanol (grado LC/MS).

La resistencia a la metilina se confirmará mediante el método de difusión por disco con cefoxitina (30µg), un potente inductor de la producción de PBP2a, responsable de la resistencia a la metilina. Se trata de un método más precoz que la propia oxacilina en la detección de resistencias, cuya lectura es más fácil (CLSI, 2017).

Todas las cepas de SARM aisladas en este estudio se conservarán en criobolas, suplementadas con glicerol, – 70 °C, en la colección de cultivos del departamento de Sanidad Animal (UCO).

- *Análisis estadístico*

Se realizará con los paquetes estadísticos *SPSS 15.0* y *WinEpi*. A partir de los resultados del estudio microbiológico se determinará la frecuencia de portadores nasales (%) en cada una de las poblaciones de estudio, con su correspondiente intervalo de confianza (95%), utilizando la corrección de Montecarlo para una sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico del 94,4% y el 99,7%, respectivamente. Las prevalencias obtenidas se compararán mediante la prueba no paramétrica de chi² y el test exacto de Fisher, considerando un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$).

Objetivo 2. Determinar el perfil fenotípico y genotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas, con especial interés en la resistencia inducida a clindamicina.

- *Perfil fenotípico*

Siguiendo las indicaciones del Instituto de Salud Carlos III (datos obtenidos de colaboraciones previas en otros proyectos), se determinará, mediante la prueba de



microdilución en caldo (CLSI, 2017), la Mínima Concentración de antibiótico capaz de Inhibir (CMI) el crecimiento visible del inóculo de ensayo (5×10^5 UFC/ml) de los siguientes antimicrobianos: ampicilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, rifampicina, teicoplanina y vancomicina.

Posteriormente, se determinará la distribución de frecuencias de las CMI obtenidas y se estimará el porcentaje de resistencia en base a los puntos de corte clínicos establecidos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2020), que permiten clasificar los antibióticos en 3 categorías: 1) sensible, régimen de dosificación estándar (**S**), cuando utilizando un régimen de dosificación estándar del agente, lo más probable es alcanzar el éxito terapéutico; 2) sensible, cuando se incrementa la exposición (**I**), cuando se debe aumentar la exposición al agente para alcanzar el éxito terapéutico, ya sea por el ajuste del régimen de dosificación o por su concentración en el lugar de la infección; y 3) resistente (**R**), cuando a pesar de incrementar la exposición, lo más probable es que se produzca un fracaso terapéutico. En el caso de la oxacilina, permitirá, además, detectar cepas con resistencia borderline.

Finalmente, para identificar si existe resistencia inducida a la clindamicina se realizará la prueba de difusión de doble disco, *D-test*, en la que los discos de eritromicina y clindamicina se colocarán a una distancia de 12 mm de borde a borde. Tras su incubación a 37 °C durante 16-18 horas, un aplastamiento del halo de la clindamicina por el lado más próximo al disco de eritromicina (quedando dicho halo con forma de D) indicará que existe resistencia inducida a la clindamicina.

▪ *Perfil genotípico*

La resistencia a la metilina se confirmará mediante la detección del gen *mecA* y de un promotor asociado a su expresión, debido a que ambos contienen regiones altamente bien conservadas entre las diferentes especies de *Staphylococcus*. Siguiendo el protocolo de Black *et al.* (2011), se adaptarán *primers* (cebadores) de oligonucleótidos específicos del promotor de *mecA* de *S. intermedius* (acceso a *GenBank* n° FJ544922.1) (hacia delante 5'-CGGACGTTTCAGTCATTCTACTTC-3' y a la inversa 5'-ACACCTTCTACACCTCCATATCAC-3'). Los cebadores de oligonucleótidos específicos para *mecA* de *S. aureus* se diseñarán utilizando la aplicación *Primer3Plus* (Untergasser *et al.* 2007) basada en el gen *mecA* (acceso a *GenBank* n° BA000018.3) (hacia delante



5'-CCCAATTTGTCTGCCAGTTT-3' y a la inversa 5'-
AATGGCAATATTAACGCACCTC-3').

Objetivo 3. Determinar la relación genética de las cepas aisladas mediante la observación del perfil genotípico de las mismas a través de la técnica de campo pulsado.

La electroforesis en campo pulsado se realizará en el Instituto de Salud de Carlos III (ISCIII, Madrid) mediante una modificación del protocolo descrito por Murchan *et al.* (2003), digiriendo el ADN incluido en bloques de agarosa con *SmaI* y cargándolos en geles de agarosa al 1% peso/volumen. La electroforesis se realiza en un tampón Tris-Borato 0,5X en el sistema *CHEF-DRII* (Bio-Rad Lab., Reino Unido) bajo las siguientes condiciones: pulsos de 0,1 a 30 s, 6 V/cm durante 24 h a una temperatura de 12-14 0C. Los geles son teñidos con bromuro de etidio, visualizados con luz ultravioleta y fotografiados. Los patrones de los fragmentos serán interpretados según la descripción de Tenover *et al.* (1995) y representados gráficamente mediante dendogramas:

1. Idénticos (mismo número de bandas y mismo tamaño): significaría que pertenecen a la misma cepa.
2. Genéticamente relacionados (un solo cambio genético o mutación que se traduce en un máximo de 3 diferencias): una cepa es un subtipo de la otra o bien ambas proceden de un ancestro común.
3. Posiblemente relacionados (suele atribuirse a 2 hechos genéticamente independientes, pudiendo encontrar hasta 6 diferencias): indicaría que pudieran pertenecer a la misma línea evolutiva, sin ser su relación genética muy cercana, por lo que es menos probable su relación epidemiológica. Se puede producir en aislamientos que están separados por largos períodos de tiempo (más de 6 meses), en aislamientos de brotes que han afectado a un gran número de personas o en aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas.
4. No relacionados (3 o más variaciones genéticas independientes, con un número de diferencias superior a 6): cepas de clones diferentes y sin relación epidemiológica.



Para evitar la duplicación de datos, si en una muestra se obtuviese más de un aislamiento de SARM sólo se incluirían en el estudio aquellos pertenecientes a distintos clones.

Objetivo 4. Comparar las características microbiológicas y epidemiológicas de los casos positivos aislados en ambas poblaciones.

▪ *Características microbiológicas*

Para diferenciar microbiológicamente las cepas de SARM aisladas en ambas poblaciones tendremos en cuenta las siguientes características:

- Los patrones genotípicos obtenidos mediante la electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP) y la tipificación de secuencias multilocus (MLST).
- Presencia de los genes *lukF-PV* y *lukS-PV* que codifican la leucocidina de *Panton-Valentine* (LPV), asociada a la destrucción de los leucocitos y necrosis tisular.
- Presencia de un cassette cromosómico estafilocócico (*SCCmec*) de tipo IV, V o VT21.

Para la técnica biomolecular MLST se seleccionarán al azar 5 de los aislamientos de SARM obtenidos en cada población. Además, se tipificarán en función de la región polimórfica del gen de la proteína A (*spa*). Ambas pruebas se realizarán siguiendo la metodología descrita por Enright *et al.* (2000) y Aklilu *et al.* (2013). Se amplificarán mediante PCR las secuencias parciales (de 450 a 500 pares de bases) de 7 genes constitutivos (“housekeeping”), utilizando una mezcla para cada par de cebadores que contendrá 3 µl de ADN genómico, dNTP 200 µM, 1,25 UI de *Taq* polimerasa, 0,25 µM de cada cebador, 5 µl de 10x tampón de PCR, 5 µl de MgCl₂ 1,5 mM. A dicha mezcla se le añadirá agua destilada para alcanzar un volumen de reacción de 50 µl. La PCR consistirá en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 55 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1 minuto y un paso de extensión final de 72 °C durante 5 min. Los productos obtenidos se purificarán con el kit de purificación *QIAquick PCR* (Qiagen) y se enviarán a *MACROGEN* (Corea del Sur) para su secuenciación. Las secuencias que se obtengan introducirán en la base de datos MLST (<http://saureus.mlst.net>), donde se compararán con secuencias de genes constitutivos conocidas y se le asignarán números a los alelos (cada secuencia diferente) que se



obtengan. Los patrones alélicos que resulten se ingresarán en la base de datos para asignar los tipos de secuencia (ST). Para analizar a qué complejo clonal pertenecen las ST obtenidas se utilizará el programa *e-BURST* (<http://eburst.mlst.net>). La secuenciación de *spa* se realizará utilizando los cebadores: directo: *spa*-1113f (5'-AAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'), e inverso: *spa*-1514r (5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'). Los tipos de *spa* se asignarán utilizando el sitio web de *SPA Searcher* (<http://seqtools.com>) y, posteriormente, los tipos de *spa* Ridom serán asignados con ayuda del sitio web de referencia desarrollado por *Ridom GmbH* (<http://www.spaserver.ridom.de/>).

Para la detección de los genes que codifican la PVL y tipificación de las cepas de SARM aisladas en función de ello se realizará una PCR múltiple siguiendo la metodología descrita por Hesje *et al.* (2011). En primer lugar se amplificará una región de 945 pares de bases de los genes *lukF-PV* y *lukS-PV* de cada uno de los aislados. Como cebadores se emplearán: *lukS* 5'-CCCATTAGTACACAGTGGTTTCAATC-3' y *lukF* 5'-GTCCAGCATTAAAGTTGCTTTGTC-3', diseñados a partir de la cepa USA300 de *S. aureus* (nº de acceso de GenBank NC_007793) con el software de análisis *Clone Manager 9.0* (Sci-Ed). La PCR se llevará a cabo en un termociclador *MyCycler™* (BioRad, Hercules, California, EEUU) en un volumen de 25 µl, con un ciclo inicial de desnaturalización de 10 minutos a 94 °C, seguido de 33 ciclos de desnaturalización de 0,5 minutos a 94 °C, 0,5 minutos de recocido a 57 °C, 1 minuto de extensión a 72 °C y un ciclo de extensión de 10 minutos a 72 °C.

El tipo de cassette cromosómico estafilocócico (*SCCmec*) de los aislados de SARM se detectará mediante PCR múltiple, siguiendo el método descrito por Ho *et al.* (2015). Utilizaremos los cebadores: directo: 5'- GAACATTGTTACTTAAATGAGCG-3', e inverso: 5'- TGAAAGTTGTACCCTTGACACC-3'. Para la amplificación primero calentaremos durante 1 minuto a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C para la desnaturalización, 60 segundos a 55 °C para el cebador y 60 segundos a 72 °C para la extensión, terminando con 5 minutos a 72 °C para la extensión final.

- *Características epidemiológicas*

La caracterización epidemiológica de los casos positivos detectados en cada colectivo se basará en el estudio descriptivo de las variables independientes recogidas en el



cuestionario, expresados en forma de media \pm desviación estándar, en el caso de las variables numéricas, y en forma de porcentaje para las variables nominales.

Objetivo 5. Determinar los posibles factores de riesgo asociados al estado de portador en ambas poblaciones de estudio.

Como ya hemos mencionado, todos los participantes rellenarán un cuestionario de recogida de información (Anexos 2.1 y 2.2), que nos servirá para realizar el estudio descriptivo de los casos positivos y el estudio analítico de los posibles factores de riesgo. El cuestionario se centra en diversos aspectos que pueden influir en el estado de portador de SARM en estas poblaciones, como:

- Datos personales: Grado que estudia, sexo.
- Contacto con animales o personas infectadas: prácticas desarrolladas, asistencia a gimnasios, residencias, etc.
- Antecedentes de infección o enfermedad compatible con SARM.
- Intervenciones sanitarias recientes con cirugía, drenajes o intubaciones.

▪ *Análisis estadístico de los datos*

Para el estudio de los posibles factores de riesgo, se comparará la frecuencia de portadores nasales de SARM (variable dependiente) en las diferentes categorías de las variables independientes, mediante las pruebas no paramétricas de chi cuadrado y el test exacto de Fisher, considerando significativa una diferencia del 5% ($p < 0,05$). Si los resultados lo permiten, se realizará además un análisis multivariante mediante regresión logística binaria, incluyendo todas las variables con un valor $p < 0,25$. La fuerza y sentido de la asociación se estimará con la Odds Ratio (IC95%).

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El estudio se centrará exclusivamente en los estudiantes del último curso de cada Grado para maximizar la posibilidad de contagio a lo largo de la carrera, por contacto estrecho con animales portadores, en el caso de Veterinaria, y con pacientes hospitalarios, en Enfermería. Como consecuencia, los resultados obtenidos podrían tener menos validez en alumnos de cursos inferiores, en función del contacto mantenido con las fuentes de contagio.



Debido al tamaño de las poblaciones en estudio, el número de cepas de SARM aisladas puede ser reducido, por lo que los datos deben considerarse preliminares, siendo preciso aumentar el número de cepas (150-300) para tener una descripción más detallada de SARM en cada una de las poblaciones.

El sistema de muestreo “en bola de nieve” está especialmente indicado para poblaciones de baja incidencia y/o difícil acceso en las que el rasgo distintivo de la población que queremos estudiar (curso del Grado) tiende a agrupar a dichos individuos, a favorecer su contacto social. Sin embargo, este sistema no siempre garantiza la representatividad de la muestra.

Para el estudio de los factores de riesgo se realizará un estudio transversal comparativo. Por su diseño este tipo de estudio sólo permite demostrar la relación causal para factores cuya presencia en el animal sea constante e invariable, como la raza o el sexo. Debemos recordar, además, que en el caso de infecciones con una baja prevalencia y/o factores con una baja frecuencia de exposición puede ocurrir que la frecuencia esperada en alguno de los grupos sea inferior a 5 y, por tanto, no se pueda realizar el estudio estadístico. Este problema se solucionaría aumentando el tamaño de la muestra, lo que no se descarta como continuación de este trabajo, o incluso anidar este Transversal Comparativo con un estudio de Casos-Control para aumentar la evidencia científica de los resultados.

Finalmente, indicar que algunas de las preguntas del cuestionario hacen referencia a sucesos ocurridos en los últimos 6-12 meses por lo que pudiera existir cierto sesgo de memoria que pudo influir en la potencia estadística del estudio.

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

Referentes a la toma de muestras

En general, cualquier actuación médica tiene riesgos, si bien en este caso no suelen materializarse, y la intervención no suele producir daños o efectos secundarios indeseables.

EL MÁS FRECUENTE: una sensación de sequedad o irritación de la mucosa nasal que desaparece transcurridos unos segundos.

EL MÁS GRAVE: el contagio con microorganismos presentes en las manos o los exudados nasales de la persona encargada de tomar la muestra, lo que resulta prácticamente imposible con la utilización de guantes y mascarilla.

***Referentes a la protección de datos***

Para cumplir con la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, la alumna del TFM, María de los Ángeles Mena Rodríguez, NO tendrá acceso a la información personal de los estudiantes antes de ser codificada. Para ello, el cuestionario estará identificado con un número y, una vez cumplimentado, el sujeto de estudio lo introducirá en un sobre, marcado con el mismo número, junto con el consentimiento informado y otro sobre lacrado (sin marcar) que contendrá el nº del cuestionario, su identidad y un correo electrónico de contacto. El sobre con toda la documentación será entregado directamente a la Dra. Belén Huerta Lorenzo (investigadora principal del proyecto), quien la codificará en dos bases de datos independientes para asegurar en todo momento el anonimato de los participantes. Toda la información recogida será custodiada por la Dra. Huerta hasta la finalización del trabajo y/o su publicación, momento en el que será destruida. El análisis estadístico de los datos personal será realizado, a ciegas, por la alumna del TFM y supervisado por una persona ajena al proyecto.

Los participantes podrán solicitar en cualquier momento su exclusión del trabajo y la eliminación de las muestras y sus datos. A aquellos que lo deseen se les comunicará, de forma personal y confidencial, el resultado del análisis por si desean ponerlo en conocimiento de su médico.

Referentes al análisis microbiológico de las muestras

Todo el personal implicado en el estudio microbiológico del TFM cumplirá con las normas y buenas prácticas establecidas en el Plan de Bioseguridad del Departamento de Sanidad animal, que se pondrá en conocimiento de la alumna antes del inicio del TFM.

RECURSOS E INSTALACIONES NECESARIOS PARA EL ESTUDIO

Congelador -80 °C

Cámara de bioseguridad de flujo laminar

Contenedores para la recogida de residuos biológicos

Material fungible: torundas estériles con medio Amies, antibióticos, medios de cultivo microbiológico, placas microtiter, puntas para pipeta, etc.).

Estufa de incubación 35 ± 2 °C

Frigorífico

Lector de ELISA

Material bioseguridad (guantes de látex y mascarilla)

CRONOGRAMA

Duración estimada: 6 meses.

El estudio se haría coincidir en cada Grado con las clases teóricas del último curso (primer cuatrimestre en Veterinaria y 2º cuatrimestre en Enfermería).

	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
Toma de muestras	V	V		E	E				
Encuesta y codificación de datos	V	V		E	E				
Aislamiento e identificación de las cepas de SARM	V	V				E	E		
Estudio perfil de resistencia			V	V		E	E		
Análisis estadístico								x	x

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados que se obtengan de la realización de este proyecto serán publicados y difundidos en congresos nacionales e internacionales y en revistas de divulgación científica internacionales con revisión por pares.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha elaborado con la ayuda e información cedida por parte del personal y profesorado del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, por ello mi agradecimiento a todos ellos, en especial a la profesora Belén Huerta Lorenzo, directora de mi TFM, que ha hecho posible que pudiera finalizar este trabajo y además ha contribuido a mi formación investigadora y profesional en el campo de la Salud Pública y Sanidad Animal.



ANEXO 1. FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

CENTRO

FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

1. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL TRABAJO FIN DE MÁSTER TITULADO: *“Diseño de un proyecto de Investigación para la caracterización microbiológica y epidemiológica de Staphylococcus aureus metilina resistentes aislados en estudiantes del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba (2020-21).”*

Este documento sirve para que usted, o quien le represente, dé su consentimiento para participar en el estudio epidemiológico mediante la toma de una muestra de exudado nasal. Eso significa que nos autoriza a realizarla.

Puede usted retirar este consentimiento cuando los desee. Firmarlo no le obliga a hacerse la intervención. De su rechazo no se derivará ninguna consecuencia adversa respecto a la calidad de la atención recibida por el animal. Antes de firmar, es importante que lea despacio la información siguiente.

Díganos si tiene alguna duda o necesita más información. Le atenderemos con mucho gusto.

1.1. LO QUE USTED DEBE SABER:

EN QUÉ CONSISTE. PARA QUÉ SIRVE:

El procedimiento consiste en tomar una muestra de la mucosa nasal para determinar la presencia de la bacteria conocida como estafilococo, en concreto las cepas resistentes a los antibióticos β -lactámicos (metilina, penicilinas y cefalosporinas).

CÓMO SE REALIZA:

La toma de muestras se realizará raspando la mucosa nasal con un hisopo de algodón estéril, por parte del personal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

En ningún caso, la toma de muestras podrá ser realizada por la alumna responsable del TFM.

QUÉ EFECTOS LE PRODUCIRÁ:

El alumno puede sentir cierta molestia durante la toma de muestras al introducir la torunda en la cavidad nasal.



QUÉ RIESGOS TIENE:

En general cualquier actuación médica tiene riesgos, si bien en este caso no suelen materializarse, y la intervención no suele producir daños o efectos secundarios indeseables.

EL MÁS FRECUENTE: sensación de sequedad o irritación de la mucosa nasal que desaparece transcurridos unos segundos.

EL MÁS GRAVE: contagio con microorganismos presentes en las manos o los exudados nasales del personal encargado de tomar la muestra, lo que queda prácticamente descartado con la correcta utilización por parte de dicho personal de guantes y mascarilla.

QUÉ SUCEDERÁ CON LA MUESTRA NASAL UNA VEZ TERMINADO EL ESTUDIO

Se procederá a su destrucción según las normas del centro.

EN QUÉ LE BENEFICIARÁ:

El estudio (bioquímico, citológico, microbiológico, etc.) de estas muestras biológicas puede aportar información muy útil sobre el diagnóstico o la evolución de su estado de portador de estafilococos, y, en caso de presentar un cuadro cínico causado por dicha bacteria, permitirá un tratamiento más eficaz, seleccionando el antibiótico más adecuado.

OTRAS CUESTIONES PARA LAS QUE PEDIMOS SU CONSENTIMIENTO:

- Las cepas que se aíslen de su muestra serán conservadas en la Colección de Cultivos del Departamento de Sanidad Animal de la UCO y utilizadas para realizar investigaciones sobre el perfil de resistencia a diversos antimicrobianos. En el caso de que se requiera su caracterización molecular, las cepas podrían ser remitidas al Instituto de Salud Carlos III, protegiendo en todo momento su identidad.

- Para caracterizar la población de estudio necesitamos que rellene usted un **pequeño formulario**. Los datos que en él se recojan se tratarán de acuerdo con la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, es decir, se codificarán y conservarán de forma que nadie pueda asociar su identidad con la información ofrecida. Es posible que estos datos se utilicen en un estudio posterior para determinar los factores de riesgo asociados a esta infección pero una vez finalice dicho estudio serán destruidos. Usted podrá ejercer en todo momento su derecho de acceso, rectificación, cancelación y oposición de los datos.



- La persona responsable de la conservación y tratamiento estadístico de sus datos es la Profa. Belén Huerta Lorenzo de la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva de la Facultad de Veterinaria de Córdoba. Puede dirigirse a ella para realizar cualquier consulta o modificación de sus datos en el teléfono **957 212 635** o en la dirección electrónica **sa2hulob@uco.es**.

2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

2.1. DATOS DEL PACIENTE

APELLIDOS Y NOMBRE	DNI
--------------------	-----

2.2. PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO

APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA

2.3. CONSENTIMIENTO

Yo, _____ D./Dña.

.....,
manifiesto que estoy conforme con la intervención que se me ha propuesto. He leído y comprendido la información anterior. He podido preguntar y aclarar todas mis dudas. Por eso he tomado consciente y libremente la decisión de autorizarla. También sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.

(Marque con una cruz)

SI NO autorizo la conservación y posterior utilización de las cepas de estafilococos aisladas de mi muestra para cualquier investigación relacionada directamente con la infección que se estudia.

SI NO autorizo la realización del cuestionario epidemiológico y el tratamiento estadístico de mis datos para el estudio de factores de riesgo.



En a de de 20.....

EL PACIENTE

Fdo.:

2.4. RECHAZO DE LA INTERVENCIÓN

Yo, D./Dña., no autorizo la toma de muestra y asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

En..... a..... de.....de 20.....

EL PACIENTE

Fdo.:

2.5. REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña., de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para esta toma de muestra. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

En..... a..... de.....de 20.....

EL PACIENTE

Fdo.:

**ANEXO 2.1. CUESTIONARIO DE RECOGIDA DE DATOS PARA
ESTUDIANTES DE VETERINARIA**

ESTUDIO PARA LA CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y
EPIDEMIOLÓGICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINA
RESISTENTES AISLADOS EN ESTUDIANTES DEL ÚLTIMO CURSO DEL
GRADO EN VETERINARIA Y EL GRADO EN ENFERMERÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (2020-21).

CENTRO: FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Código de identificación: Fecha:-.....- 20.....

RESPONDA A LAS SIGUIENTES CUESTIONES O MARQUE CON UNA CRUZ:

1. EDAD (años):

2. SEXO:

Hombre Mujer

3. HA CURSADO LAS PRÁCTICAS DE LAS SIGUIENTES ASIGNATURAS:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Propedéutica | <input type="checkbox"/> Enfermedades infecciosas |
| <input type="checkbox"/> Medicina Interna | <input type="checkbox"/> Medicina Preventiva |
| <input type="checkbox"/> A.P.S. | <input type="checkbox"/> Producción Animal e Higiene |
| <input type="checkbox"/> Reproducción y Obstetricia | <input type="checkbox"/> Ninguna de las anteriores |

4. HA REALIZADO PRÁCTICAS O HA SIDO ALUMNO
INTERNO/COLABORADOR EN:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Explotaciones de animales | <input type="checkbox"/> Clínicas Veterinarias |
| <input type="checkbox"/> Hospital Clínico Veterinario UCO | <input type="checkbox"/> Otros Hospitales Veterinarios |
| <input type="checkbox"/> Mataderos | <input type="checkbox"/> Perreras |
| <input type="checkbox"/> Otro/s: | |



5. ¿HA TENIDO CONTACTO DURANTE LOS ÚLTIMOS 6 MESES CON PERSONAL QUE TRABAJE EN HOSPITALES, CENTROS DE SALUD O RESIDENCIAS PARA MAYORES?

No Hospital/Centro Salud Residencia No lo recuerdo

6. ¿HA VISITADO DURANTE LOS ÚLTIMOS 6 MESES ALGUNA RESIDENCIA PARA MAYORES?

Sí No No lo recuerdo

7. ¿HA ESTADO DURANTE EL ÚLTIMO AÑO INGRESADO/A EN ALGÚN HOSPITAL/CENTRO SANITARIO?

Sí No No lo recuerdo

8. ¿HA SIDO SOMETIDO DURANTE EL ÚLTIMO AÑO A ALGUNA DE ESTAS INTERVENCIONES?

Cirugía invasiva Drenajes Intubaciones Curas No lo recuerdo

9. ¿ACUDE A GIMNASIOS O PISCINAS PÚBLICAS?

No 1 vez/semana 2 o más veces/semana Alguna vez al mes

a. ¿Se suele duchar en casa o en los vestuarios?

Casa Vestuarios

b. ¿Utiliza chanclas para ducharse?

Sí No

10. ¿TIENE CONSTANCIA DE HABER PADECIDO DURANTE EL ÚLTIMO AÑO ALGUNA INFECCIÓN POR ESTAFILOCOCOS?

Sí No No lo sé

11. ¿CONVIVE CON ANIMALES?

No

Perro Gato Conejo Reptil Otro/s:



12. ¿SU FAMILIA TIENE GANADO?

- No
- Vacas Caballos Cerdos Ovejas/cabras Conejos
- Gallinas Otro/s:

a. ¿Colabora en su cuidado? Sí No

b. ¿Qué medidas de bioseguridad mantiene cuando está en la granja?

- Ninguna
- Guantes Calzas Mascarilla Bata/mono
- Otro/s:

13. ¿SUELE LAVARSE LAS MANOS DESPUÉS DE TOCAR A LOS ANIMALES?

- Sí No

14. POR SUS AFICIONES MANTIENE CONTACTO HABITUAL CON OTROS ANIMALES QUE NO SEAN LOS SUYOS:

- No Perros Gatos Caballos Cerdos Vacas
- Otro/s:

Indique las aficiones:



ANEXO 2.2. CUESTIONARIO DE RECOGIDA DE DATOS PARA ESTUDIANTES DE ENFERMERÍA

ESTUDIO PARA LA CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINA RESISTENTES AISLADOS EN ESTUDIANTES DEL ÚLTIMO CURSO DEL GRADO EN VETERINARIA Y EL GRADO EN ENFERMERÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (2020-21).

CENTRO: FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Código de identificación: Fecha:-.....- 20.....

RESPONDA A LAS SIGUIENTES CUESTIONES O MARQUE CON UNA CRUZ:

1. EDAD (años):

2. SEXO:

Hombre Mujer

3. HA REALIZADO PRÁCTICAS O HA SIDO ALUMNO INTERNO/COLABORADOR EN:

- Hospital Universitario Reina Sofía
 Otro hospital, indique cuál:
 Centros de salud
 Residencias para mayores
 Otro centro sanitario, indique cuál:

4. ¿HA TENIDO CONTACTO DURANTE LOS ÚLTIMOS 6 MESES CON PERSONAL QUE TRABAJE EN HOSPITALES, CENTROS DE SALUD O RESIDENCIAS PARA MAYORES?

No Hospital/Centro Salud Residencia No lo recuerdo



5. ¿HA VISITADO DURANTE LOS ÚLTIMOS 6 MESES ALGUNA RESIDENCIA PARA MAYORES?

Sí No No lo recuerdo

6. ¿HA ESTADO DURANTE EL ÚLTIMO AÑO INGRESADO/A EN ALGÚN HOSPITAL/CENTRO SANITARIO?

Sí No No lo recuerdo

7. ¿HA SIDO SOMETIDO DURANTE EL ÚLTIMO AÑO A ALGUNA DE ESTAS INTERVENCIONES?

Cirugía invasiva Drenajes Intubaciones Curas No lo recuerdo

8. ¿ACUDE REGULARMENTE A GIMNASIOS O PISCINAS PÚBLICAS?

No 1 vez/semana 2 o más veces/semana Alguna vez al mes

c. ¿Se suele duchar en casa o en los vestuarios?

Casa Vestuarios

d. ¿Utiliza chanclas para ducharse?

Sí No

9. ¿TIENE CONSTANCIA DE HABER PADECIDO DURANTE EL ÚLTIMO AÑO ALGUNA INFECCIÓN POR ESTAFILOCOCOS?

Sí No No lo sé

10. ¿CONVIVE CON ANIMALES?

No
 Perro Gato Conejo Reptil Otro/s:

11. ¿SU FAMILIA TIENE GANADO?

No
 Vacas Caballos Cerdos Ovejas/cabras Conejos
 Gallinas Otro/s:



a. ¿Colabora en su cuidado? Sí No

b. ¿Qué medidas de bioseguridad mantiene cuando está en la granja?

Ninguna

Guantes Calzas Mascarilla Bata/mono

Otro/s:

12. ¿SUELE LAVARSE LAS MANOS DESPUÉS DE TOCAR A LOS ANIMALES?

Sí No

13. POR SUS AFICIONES MANTIENE CONTACTO HABITUAL CON OTROS ANIMALES QUE NO SEAN LOS SUYOS:

No Perros Gatos Caballos Cerdos Vacas

Otro/s:

Indique las aficiones:

ANEXO 3. DOCUMENTO DE CONFIDENCIALIDAD Y DECLARACIÓN RESPONSABLE

D./D^a (Alumno/a): María de los Ángeles Mena Rodríguez

Título del trabajo: *Caracterización microbiológica y epidemiológica de Staphylococcus aureus metilina resistentes aislados en estudiantes del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba (2020-21).*

Centro: Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba

DECLARO que he sido informado/a de mi obligación de respetar en todo momento la confidencialidad de todos los datos de carácter personal sobre personas participantes en el estudio, sus familias y los profesionales a los que tenga acceso en el desarrollo de mi proyecto (TFM).

ME COMPROMETO a tratar todos estos datos, así como los contenidos en los documentos del centro / unidad o servicio, tal y como estipula la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, guardando su estricta confidencialidad y su no acceso a terceros no autorizados.

Añadir en el caso de estudios realizados en centros sanitarios:

DECLARO que conozco y acepto el *Protocolo mediante el que se determinan pautas básicas destinadas a asegurar y proteger el derecho a la intimidad del paciente por los alumnos y residentes en Ciencias de la Salud*, acordado por la Comisión de Recursos Humanos del Sistema Nacional de Salud (Orden SSI/81/2017 de 19 de enero).

Asimismo, **ME COMPROMETO** a actuar de acuerdo con las normas de buena práctica clínica en todo contacto con las personas participantes en el estudio o relacionadas con el mismo y a respetar el derecho a la intimidad, conforme a lo dispuesto en la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.



Los abajo firmantes refrendan y suscriben los compromisos anteriores, declarando que actuarán respetando la confidencialidad y la protección de datos junto con las normativas aplicables a la investigación biomédica.

Firmado en: Córdoba, a de 20 ____.

D^a María de los Ángeles Mena Rodríguez DNI: 31009624N

Alumna

Fdo:

D^a Belén Huerta Lorenzo DNI: 52756051P

Tutora académica

Fdo:

ANEXO 4. ANONIMIZACIÓN

Yo, D./Dña. (**por determinar**), como supervisor del estudio estadístico del Trabajo titulado “**Caracterización microbiológica y epidemiológica de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes aislados en estudiantes del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba (2020-21)**” realizado por la alumna Dña. María de los Ángeles Mena Rodríguez, confirmo que dicha alumna no accederá a datos de carácter personal de los sujetos implicados en el estudio, habiendo sido desagregados los datos para asegurar en todo momento el anonimato de los pacientes. La anonimización se realizará de la siguiente manera: *el cuestionario estará identificado con un número y, una vez cumplimentado, el alumno lo introducirá en un sobre marcado con el mismo número, con el consentimiento informado y otro sobre lacrado (sin marcar) que contendrá el n° del cuestionario, la identidad del paciente y su correo electrónico. El sobre con toda la documentación será cerrado por el alumno y entregado directamente a la tutora académica del trabajo (Dra. Belén Huerta Lorenzo), quien codificará la información recogida y la identidad del paciente en dos bases de datos independientes para asegurar su anonimato. La alumna no tendrá en ningún momento acceso a la identidad de los alumnos. La información será custodiada por la Dra. Huerta hasta la finalización del trabajo y/o su publicación, momento en el que será destruida. Los participantes podrán solicitar en cualquier momento su exclusión del trabajo y la eliminación de las muestras y sus datos.*

En Córdoba, a de de 20____

Firmado:



ANEXO 5. AUTORIZACIÓN Y CONFORMIDAD DEL CENTRO DONDE SE REALIZA EL TRABAJO DE CAMPO (CENTRO SANITARIO U OTRO)

Centro donde se realiza el trabajo de campo:	Departamento de Sanidad animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba
Investigador/a Principal/ Tutor/a del Centro:	Profa. Dra. Belén Huerta Lorenzo
Alumno/a:	María de los Ángeles Mena Rodríguez
Instituto de investigación:	Departamento de Sanidad animal. UCO

Para su participación en el Trabajo:

Título del trabajo	<i>Diseño de un proyecto de investigación para la caracterización microbiológica y epidemiológica de Staphylococcus aureus meticilina resistentes aislados en estudiantes del último curso del Grado en Veterinaria y el Grado en Enfermería de la Universidad de Córdoba (2020-21).</i>
Código del estudio*	SARMVET-2021
Fechas previstas de inicio y fin del estudio	Noviembre 2020-Junio 2021

SE HACE CONSTAR:

- Que la realización del trabajo no interfiere en el funcionamiento del Servicio/UGC implicado ni de otros Servicios/UGCs no incluidos en este documento.
- Que tras evaluar los procedimientos necesarios para la realización del trabajo se da la conformidad para su puesta en marcha en el Centro. **La realización de este trabajo quedará condicionado al Informe favorable de un Comité de Ética de Investigación acreditado.**
- El estudio se realizará tal y como se ha planteado, respetando la normativa legal aplicable y siguiendo las normas éticas internacionales aceptadas.

Relacionar los recursos e instalaciones necesarias para el desarrollo del Trabajo):

(A cumplimentar por el/la alumno/a, con el visto bueno de el/la tutor/a, antes de presentar a la firma del responsable del centro del trabajo de campo)

- | | |
|--------------------------------------|--|
| • Estufa de incubación ± 37 °C | • Congelador -80 °C |
| • Frigorífico | • Cámara de flujo laminar |
| • Lector de ELISA | • Material bioseguridad (guantes látex y mascarilla) |
| • Torundas estériles con medio Amies | • Material fungible (antibióticos, medios de cultivo microbiológico, puntas pipetas, etc.) |

Fdo: D. Pedro N. Gutiérrez Palomino
Director del Departamento de Sanidad animal de la Universidad de Córdoba.

Vº Bueno
Dña. Rosario Moyano Salvago
Decana de la Facultad de Veterinaria.
UCO

Fecha:

Fecha:

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, R., Rodríguez-Álvarez, C., Lecuona, M., Castro, B., González, J. C., Aguirre-Jaime, A., & Arias, Á. (2019). Increased antimicrobial resistance of MRSA strains isolated from pigs in Spain between 2009 and 2018. *Veterinary Sciences*, 6(2), 38.
- Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (2011). Identificación rápida de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. Recuperado de: https://www.aetsa.org/download/publicaciones/antiguas/AETSA_2011_2_5_MRSA.pdf
- Aklilu, E., Zunita, Z., Hassan, L., & Chen, H. C. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from dogs and cats at University Veterinary Hospital, Universiti Putra Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 27(3), 483-492.
- Aklilu, E., Zunita, Z., Hassan, L., & Cheng, C. H. (2013). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among veterinary students and personnel at a veterinary hospital in Malaysia. *Veterinary Microbiology*, 164(3-4), 352-358.
- Albrich, W. C., & Harbarth, S. (2008). Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *The Lancet Infectious Diseases*, 8(5), 289-301.
- Almeida, S. T., Nunes, S., Paulo, A. C. S., Faria, N. A., de Lencastre, H., & Sá-Leão, R. (2015). Prevalence, risk factors, and epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by adults over 60 years of age. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(3), 593-600.
- Anderson, M. E., Lefebvre, S. L., & Weese, J. S. (2008). Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Veterinary Microbiology*, 129(3-4), 410-417.
- Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M. I., & Torres, C. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39, 1-41.
- Black, C. C., Eberlein, L. C., Solyman, S. M., Wilkes, R. P., Hartmann, F. A., Rohrbach, B. W., Bemis, D. A. & Kania, S. A. (2011). The role of *mecA* and *blaZ*



- regulatory elements in *mecA* expression by regional clones of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*, 151(3-4), 345-353.
- Bravo, M., & Gil, M. (2017). Prevalencia de estafilococos resistentes a meticilina en el personal trabajador del Hospital Clínico Veterinario de la UEX. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 11(Especial), 78.
- Cano, M. E., Domínguez, M. A., Ezpeleta, C., Padilla, B., de Arellano, E. R., & Martínez-Martínez, L. (2008). Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26, 1-48.
- Cantón, R., García, J. E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., & García, J. A. (2000). Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. Procedimientos en microbiología clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 11, 1-54.
- Carbonero, A. (2019). Estudios epidemiológicos básicos y determinación de los estimadores de riesgo. *Temario de la asignatura "Epidemiología y estadística avanzadas" del Máster en Salud Pública Veterinaria (2019-2020)*. Instituto de Estudios de Posgrado (IdEP) de la Universidad de Córdoba.
- Carbonero, A. (2019). Estudios epidemiológicos avanzados. *Temario de la asignatura "Epidemiología y estadística avanzadas" del Máster en Salud Pública Veterinaria (2019-2020)*. Instituto de Estudios de Posgrado (IdEP) de la Universidad de Córdoba.
- Cardoso-Toset, F., Gómez-Gascón, L., Vega, J.L., Maldonado, A., Pérez, A., Pérez-Écija, A., Mendoza, J., Calderón, J.M., Huerta, B. (2012). Occurrence, species distribution and antimicrobial resistance of staphylococci in the nasal cavity of horses and horse personnel in Andalusia. *II International Conference on Antimicrobial Research (ICAR)*. Lisbon (Portugal).
- Cercenado, E., & de Gopegui, E. R. (2008). *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26, 19-24.
- Chávez, M., Erazo, N. C., Reina, D. A., & Esparza, M. (2015). Métodos de tipificación y epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina. *Revista Biosalud*, 14(2), 81-90.



- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th edition. *CLSI supplement M100*.
- Conceição, T., Coelho, C., Silva, I. S., de Lencastre, H., & Aires-de-Sousa, M. (2015). *Staphylococcus aureus* in former Portuguese colonies from Africa and the Far East: missing data to help fill the world map. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(9), 842-e1.
- Conceição, T., de Lencastre, H., & Aires-de-Sousa, M. (2017). Carriage of *Staphylococcus aureus* among Portuguese nursing students: a longitudinal cohort study over four years of education. *PloS one*, 12(11).
- Cuevas, Ó., Cercenado, E., Goyanes, M. J., Vindel, A., Trincado, P., Boquete, T., Marín, M. & Bouza, E. (2008). *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(5), 269-277.
- Da Costa, R. C. (2018). Portación nasal de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en personal de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. (*Tesis de maestría*). *Universidad de Chile*.
- Dodémont, M., Verhulst, C., Nonhoff, C., Nagant, C., Denis, O., & Kluytmans, J. (2015). Prospective two-center comparison of three chromogenic agars for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening in hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(9), 3014-3016.
- Duquette, R. A., & Nuttall, T. J. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? *Journal of Small Animal Practice*, 45(12), 591-597.
- Echevarria Zarate, J., & Iglesias Quilca, D. (2003). Estafilococo meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Médica Herediana*, 14(4), 195-203.
- Efa, F., Alemu, Y., Beyene, G., Gudina, E. K., & Kebede, W. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among medical students of Jimma University, Southwest Ethiopia. *Heliyon*, 5(1), e01191.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008-1015.



- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7687-7692.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. *Stockholm: ECDC*.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versión 2.0, 2017. Recuperado de: <https://www.eucast.org>.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2020). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. Recuperado de: <https://www.eucast.org>.
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. (2018). Guidance of the 2019 modifications of susceptibility categories S, I, and R categories (22 October, 2018). Recuperado de: <http://www.eucast.org>.
- Frana, T. S., Beahm, A. R., Hanson, B. M., Kinyon, J. M., Layman, L. L., Karriker, L. A., Ramirez, A. & Smith, T. C. (2013). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students. *PloS one*, 8(1).
- Harbarth, S., François, P., Schrenzel, J., Fankhauser-Rodriguez, C., Hugonnet, S., Koessler, T., Huyghe, A. & Pittet, D. (2005). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 962.
- Hesje, C. K., Sanfilippo, C. M., Haas, W., & Morris, T. W. (2011). Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from the eye. *Current Eye Research*, 36(2), 94-102.
- Ho, C. M., Ho, M. W., Li, C. Y., & Lu, J. J. (2015). Fine typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates using direct repeat unit and staphylococcal interspersed repeat unit typing methods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(4), 370-375.
- Huerta, B. (2019). Ensayo clínico aleatorio controlado. Medidas de la eficacia de un tratamiento. *Temario de la asignatura "Epidemiología y estadística avanzadas" del Máster en Salud Pública Veterinaria (2019-2020). Instituto de Estudios de Posgrado (IdEP) de la Universidad de Córdoba*.



- Huerta, B., Maldonado, A., Ginel, P. J., Tarradas, C., Gómez-Gascón, L., Astorga, R. J., & Luque, I. (2011). Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. *Veterinary Microbiology*, 150(3-4), 302-308.
- Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Graviss, E. A., Naidich, S., Musser, J. M., & Kreiswirth, B. N. (2004). spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro-and macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 792-799.
- LaPlante, K. L., Rybak, M. J., Amjad, M., & Kaatz, G. W. (2007). Antimicrobial susceptibility and staphylococcal chromosomal cassette mec type in community-and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 27(1), 3-10.
- Levin, T. P., Suh, B., Axelrod, P., Truant, A. L., & Fekete, T. (2005). Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1222-1224.
- Ley Orgánica 3/2018, de 5 de Protección de Datos personales y garantía de los derechos digitales. (2018). *Boletín Oficial del Estado*, 294, de 6 de diciembre de 2018, 119788 a 119857.
- Louie, L., Goodfellow, J., Mathieu, P., Glatt, A., Louie, M., & Simor, A. E. (2002). Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2786-2790.
- Maldonado García, A. & Huerta Lorenzo, B. (2012). Tema 7: Estudios epidemiológicos. En: *Epidemiología. Volumen I. Grado en Veterinaria. Universidad de Córdoba*. (pp. 73-83). Córdoba, España: DON FOLIO S.L.
- Maldonado García, A. & Huerta Lorenzo, B. (2012). Tema 8: Metodología de la investigación: diseño de estudios epidemiológicos. En: *Epidemiología. Volumen II. Grado en Veterinaria. Universidad de Córdoba*. (pp. 3-20). Córdoba, España: DON FOLIO S.L.
- Maldonado García, A. & Huerta Lorenzo, B. (2012). Anexo I: Modelo de un formulario de consentimiento informado. En: *Epidemiología. Volumen II. Grado en Veterinaria. Universidad de Córdoba*. (pp. 21-25). Córdoba, España: DON FOLIO S.L.



- Maldonado García, A. & Huerta Lorenzo, B. (2012). Anexo II: Principales estadísticos de contraste. En: *Epidemiología. Volumen II. Grado en Veterinaria. Universidad de Córdoba*. (p. 26). Córdoba, España: DON FOLIO S.L.
- Maldonado García, A. & Huerta Lorenzo, B. (2012). Tema 9: Técnica muestral: conceptos básicos y Técnicas de muestreo. En: *Epidemiología. Volumen II. Grado en Veterinaria. Universidad de Córdoba*. (pp. 27-35). Córdoba, España: DON FOLIO S.L.
- Martínez, L., Cano, M. E., Domínguez, M. A., Ezpeleta, C., Padilla, B., & Ramírez, E. (2007). Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Procedimientos de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.
- Mensa, J., Soriano, A., Llinares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M., Alvarez-Rocha, L., Maseda, E., Moreno, A., Pasquau, J., Gómez, J., Parra, J., Candel, J., Azanza, J. R., García, J. E., Marco, F., Soy, D., Grau, S., Arias, J., Fortún, J., Aristides de Alarcón, C. & Picazo, J. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(1), 1-84.
- Mogensen, C. B., Skjøt-Arkil, H., Lassen, A. T., Johansen, I. S., Chen, M., Petersen, P., Andersen, K. V., Ellermann-Eriksen, S., Møller, J. M., Ludwig, M., Fuglsang-Damgaard, D., Nielsen, F., Petersen, D. B., Jensen, U. S. & Rosenvinge, F. S. (2018). Cross sectional study of multiresistant bacteria in Danish emergency departments: prevalence, patterns and risk factors for colonization (AB-RED project). *BMC Emergency Medicine*, 18(1), 25.
- Montoya, I., Álvarez, I., Cofre, J., Cohen, J., & Donoso, G. (2009). Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Revista Chilena de Pediatría*, 80(1), 48-53.
- Morosini, M. I., Cercenado, E., Ardanuy, C., & Torres, C. (2012). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(6), 325-332.
- Murchan, S., Kaufmann, M. E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C. E., Fushing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P. T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Lijequist, B., Ransjö, U., Coombes,



- G. & Cookson, B. (2003). Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1574-1585.
- O'Mahony, R., Abbott, Y., Leonard, F. C., Markey, B. K., Quinn, P. J., Pollock, P. J., Fanning, S. & Rossney, A. S. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Veterinary Microbiology*, 109(3-4), 285-296.
- Orlin, I., Rokney, A., Onn, A., Glikman, D., & Peretz, A. (2017). Hospital clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are carried by medical students even before healthcare exposure. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), 15.
- Otto, M. (2013). Community-associated MRSA: what makes them special? *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 324-330.
- Parvez, M. A. K., Ferdous, R. N., Rahman, M. S., & Islam, S. (2018). Healthcare-associated (HA) and community-associated (CA) methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Bangladesh—Source, diagnosis and treatment. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 473-478.
- Renushri, A. S., & Nagaraj, V. K. (2011). Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from nursing and pharmacy students. *Journal of Laboratory Physicians*, 3(2), 89.
- Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L. P., Reyes, J., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, 34(01), 191.
- Rodrigues, A. C., Belas, A., Marques, C., Cruz, L., Gama, L. T., & Pomba, C. (2018). Risk Factors for nasal colonization by methicillin-resistant staphylococci in healthy humans in professional daily contact with companion animals in Portugal. *Microbial Drug Resistance*, 24(4), 434-446.
- Rodríguez-Baño, J., Bischofberger, C., Alvarez-Lerma, F., Asensio, A., Delgado, T., García-Arcal, D., García-Ortega, L., Hernández, MJ., Molina-Cabrillana, J., Pérez-Canosa, C. & Pujol, M. (2008). Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-



- SEIMC y SEMPSPH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(5), 285-298.
- Sharma, R., & Hammerschlag, M. R. (2019). Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in children: a reappraisal of vancomycin. *Current Infectious Disease Reports*, 21(10), 37.
- Siberry, G. K., Tekle, T., Carroll, K., & Dick, J. (2003). Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clinical Infectious Diseases*, 37(9), 1257-1260.
- Simor, A. E., Loeb, M., & CIDS/CAMM Guidelines Committee. (2004). The management of infection and colonization due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A CIDS/CAMM position paper. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 15(1), 39-48.
- Singh, A., Walker, M., Rousseau, J., Monteith, G. J., & Weese, J. S. (2013). Methicillin-resistant staphylococcal contamination of clothing worn by personnel in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Surgery*, 42(6), 643-648.
- Skjøt-Arkil, H., Mogensen, C. B., Lassen, A. T., Johansen, I. S., Chen, M., Petersen, P., Andersen, K. V. Ellermann-Eriksen, S., Møller, J. M., Ludwig, M., Fuglsang-Damgaard, D., Nielsen, F. E., Petersen, D. B., Jensen, U.S. & Rosenvinge, F. S. (2020). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Danish emergency departments—evaluation of national screening guidelines. *Journal of Hospital Infection*, 104(1), 27-32.
- Steward, C. D., Raney, P. M., Morrell, A. K., Williams, P. P., McDougal, L. K., Jevitt, L., McGowan, J. E., Jr. & Tenover, F. C. (2005). Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1716-1721.
- Szymanek-Majchrzak, K., Kosiński, J., Żak, K., Sułek, K., Młynarczyk, A., & Młynarczyk, G. (2019). Prevalence of methicillin resistant and mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among medical students of Medical University in Warsaw. *Przegląd Epidemiologiczny*, 73, 39-48.
- Tamariz Ortiz, J. H., Cruz Quintanilla, J., Atencia Porras, A., Figueroa Tataje, J., Horna Quintana, G., & Guerra Allison, H. (2009). Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú. *Acta Médica Peruana*, 26(1), 12-16.



- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233.
- The Center for Food Security and Public Health. (2011). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Recuperado de: <http://www.cfsph.iastate.edu/>
- Tibavizco, D., Rodríguez, J. Y., Silva, E., Cuervo, S. I., & Cortés, J. A. (2007). Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, 27(2), 294-307.
- Tomatis, C., Baroni, M. R., Mendosa, M. A., Nagel, A., Mollerach, A., Alvarez, C., Zurbriggen, M. L., Cristobal, S., Segovia, G. & Méndez, E. D. L. A. (2018). Tipos de spa no reportados en nuestro país en *Staphylococcus aureus* de pacientes adultos de un hospital escuela, Santa Fe, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(3), 244-248.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W71-W74.
- Van Duijkeren, E., Moleman, M., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. S., Mullem, J., Troelstra, A., Fluit, A. C., van Wamel, W. J. B., Houwers, D. J., de Neeling, A. J. & Wagenaar, J. A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 141(1-2), 96-102.
- Van Rijen, M. M. L., Van Keulen, P. H., & Kluytmans, J. A. (2008). Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 261-263.
- Vindel, A., & Cercenado, E. (2016). *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina portadores del gen mecC: ¿ un problema emergente?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(5), 277-279.
- Whitman, W. B., Bergey's Manual Trust. (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Arche and Bacteria*. New Jersey. Wiley.
- Yamamoto, T., Nishiyama, A., Takano, T., Yabe, S., Higuchi, W., Razvina, O., & Shi, D. (2010). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 16(4), 225-254.