



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A
DESINFECTANTES EN CEPAS PRE Y POST
PANDÉMICAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS
DESDE MATRICES ALIMENTARIAS**

POR KATALINA VERÓNICA CÁRDENAS SÁNCHEZ

Trabajo de Investigación de Internado en Sector Salud presentado en la
Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título
profesional de Bioquímico

Profesional Guía

Dr. BQ. Esteban Paredes Osses
Sección Microbiología de Alimentos y Aguas
Departamento de Salud Ambiental
Instituto de Salud Pública

Profesor Patrocinante

Dr. Andrés Felipe Opazo Capurro
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Abril, 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial con fines académicos por cualquier medio o procedimiento incluyendo la cita bibliográfica del documento.

A Emilia, mi más grande amor.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1.- Resistencia antimicrobiana y mecanismos de acción	12
1.2.- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	17
1.3.- Relación entre la resistencia antimicrobiana y biocidas	18
1.4.- COVID-19 y el uso de biocidas	22
2. PROBLEMA	25
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1.- Objetivo General	28
5.2.- Objetivos específicos	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1.- Diseño de estudio	29
6.2.- Revisión bibliográfica.....	29
6.3.- Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
6.4.- Selección de cepas	33
6.5.- Extracción de ácidos nucleicos.	33
6.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	36
6.7.- Visualización producto PCR.....	37
6.8.- Análisis de la data.....	37
7. RESULTADOS	38
7.1.- Revisión bibliográfica.....	38
7.2.- Clasificación de la data seleccionada.	40

7.3.- Identificación de genes de resistencia a desinfectantes en cepas de <i>S. aureus</i> por técnica de PCR	45
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN	50
10. GLOSARIO.....	52
11. BIBLIOGRAFÍA.....	53
12. ANEXOS	57
Anexo 1. Cepas seleccionadas para análisis de genes de resistencia a desinfectantes	57
Anexo 2. Manejo de residuos biológicos.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación cepas de <i>S. aureus</i> por tipo de alimento, según código MINSAL.....	42
Tabla 2. Cepas de <i>S. aureus</i> con presencia de gen <i>pvl</i>	44

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURA 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	14
FIGURA 2. Estructura general de las familias de bombas de expulsión	16
FIGURA 3. Número de productos desinfectantes o sanitizantes con registro concedido o autorización excepcional, según año	23
FIGURA 4. Número de productos desinfectantes o sanitizantes con registro concedido o autorización excepcional, según usos autorizados.	24
FIGURA 5. Principio de extracción nucliSENS® easyMAG® de Biomérieux.....	35
FIGURA 6. Clasificación cepas de <i>S. aureus</i> por año de selección	40
FIGURA 7. Clasificación cepas de <i>S. aureus</i> por ciudad de origen	41
FIGURA 8. Clasificación cepas de <i>S. aureus</i> según enterotoxinas estafilocócicas (SEs).	43
FIGURA 9. Distribución gen <i>qacA/B</i> en cepas de <i>S. aureus</i>	45
FIGURA 10. Distribución gen <i>smr</i> en cepas de <i>S. aureus</i>	46

RESUMEN

Staphylococcus aureus es la especie más importante del género *Staphylococcus*. Se describe como un microorganismo coco Gram-positivo no formador de esporas, anaerobio facultativo, oportunista y coagulasa positivo. Se caracteriza por ser un patógeno nosocomial que coloniza la piel, nariz y/o aparato gastrointestinal de las personas provocando una gran variedad de enfermedades; y la OMS lo ha catalogado como un patógeno de prioridad alta debido a que presenta resistencia a la meticilina. Investigaciones recientes dan cuenta que a través de los años *S. aureus* no solo ha generado resistencia a antimicrobianos sino también a desinfectantes como los compuestos de amonio cuaternario. Como consecuencia a la pandemia de COVID-19, se ha aumentado notablemente el uso de estos compuestos y se desconoce el estado actual de la resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus* en nuestro país. El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de genes de resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus* pre y post pandemia aisladas desde matrices alimentarias. Para ello se seleccionaron 54 cepas comprendidas entre los años 2012 y 2023, y se identificó la presencia de los genes de resistencia a desinfectantes *qacA/B* y *smr* mediante el uso de la técnica de PCR. Solo el 1.9% presentó el gen *qacA/B* y resultados similares se obtuvieron al realizar la amplificación del gen *smr*, dando indicios de que las cepas de *S. aureus* de origen

alimentario no sufren del mismo modo la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos y/o desinfectantes que las cepas encontradas entornos hospitalarios. Sin embargo, es necesario contar con un tamaño de muestra mayor y realizar más ensayos a futuro para poder tener resultados estadísticos robustos y significativos que confirmen esta conjetura.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most important species of the genus *Staphylococcus*. It is described as a non-spore-forming, facultative anaerobic, opportunistic, coagulase-positive Gram-positive coccus microorganism. It is characterized by being a nosocomial pathogen that colonizes the skin, nose and/or gastrointestinal tract of people, causing a wide variety of diseases; and the WHO has classified it as a high priority pathogen because it presents resistance to methicillin. Recent research shows that through the years, *S. aureus* has not only generated resistance to antimicrobials but also to disinfectants such as quaternary ammonium compounds. As a consequence of the COVID-19 pandemic, the use of these compounds has increased significantly and the current state of resistance to disinfectants in strains of *S. aureus* in our country is unknown. The objective of this research was to determine the prevalence of disinfectant resistance genes in pre- and post-pandemic *S. aureus* strains isolated from food matrices. For this, 54 strains between the years 2012 and 2023 were selected, and the presence of the genes for resistance to disinfectants *qacA/B* and *smr* was identified by using the PCR technique. Only 1.9% presented the *qacA/B* gene and similar results were obtained when performing the amplification of the *smr* gene, giving indication that *S. aureus* strains of food origin, do not suffer in the same way from the selective pressure exerted by antimicrobials and/or

disinfectants than the strains found in hospital settings. However, it is necessary to have a larger sample size and perform more trials in the future in order to have robust and significant statistical results that confirm this conjecture.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Resistencia antimicrobiana y mecanismos de acción.

Un agente antimicrobiano se define como una sustancia natural o sintética que es capaz de eliminar y/o inhibir el crecimiento de microorganismos (Burnett-Boothroyd y McCarthy, 2011). Estos agentes se han usado desde la década de 1940 gracias a la introducción clínica de la penicilina, para combatir diversas infecciones tanto en seres humanos, como en animales y plantas (Giulieri *et al.*, 2020). Sin embargo, una consecuencia inherente a su uso es la resistencia, la cual según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se produce cuando las bacterias, virus, hongos y/o parásitos cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a estos agentes, haciendo más difícil el tratamiento de las infecciones e incrementando el riesgo de propagación y aparición de formas graves de enfermedades, y de muerte.

Existen dos tipos de resistencia: natural, que puede ser intrínseca o inducida, y la adquirida. En la resistencia intrínseca las bacterias son naturalmente resistentes a ciertas clases de antimicrobianos, como es el caso de *Escherichia coli* con los macrólidos; mientras que, en la inducida, los genes se encuentran naturalmente en la bacteria, pero solo se expresan después de la exposición a

cantidades clínicas de un antimicrobiano (Mancuso *et al.*, 2021). En el caso de la resistencia adquirida, esta puede ocurrir a través de dos procesos distintos: mutación que ocurre en el ADN de la bacteria durante la replicación (transferencia vertical) o transferencia de ADN mediante la transformación, transducción y/o conjugación (transferencia horizontal de genes). En la transformación la bacteria capta ADN extracelular de un donante, en la transducción el ADN pasa de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta bacterias) y en la conjugación el ADN se transfiere a la forma de plásmidos; siendo esta última la ruta más común para la transmisión de genes de resistencia.

Los mecanismos por los cuales las bacterias se vuelven resistentes varían, pero se distinguen 4 formas principales: (1) limitación de la absorción de un fármaco disminuyendo la permeabilidad de la pared celular; (2) modificar el target de un fármaco; (3) inactivar un fármaco degradándolo o transfiriéndole un grupo químico; (4) salida del fármaco activo a través de bombas de expulsión (**Figura 1**) (Reygaert, 2018).

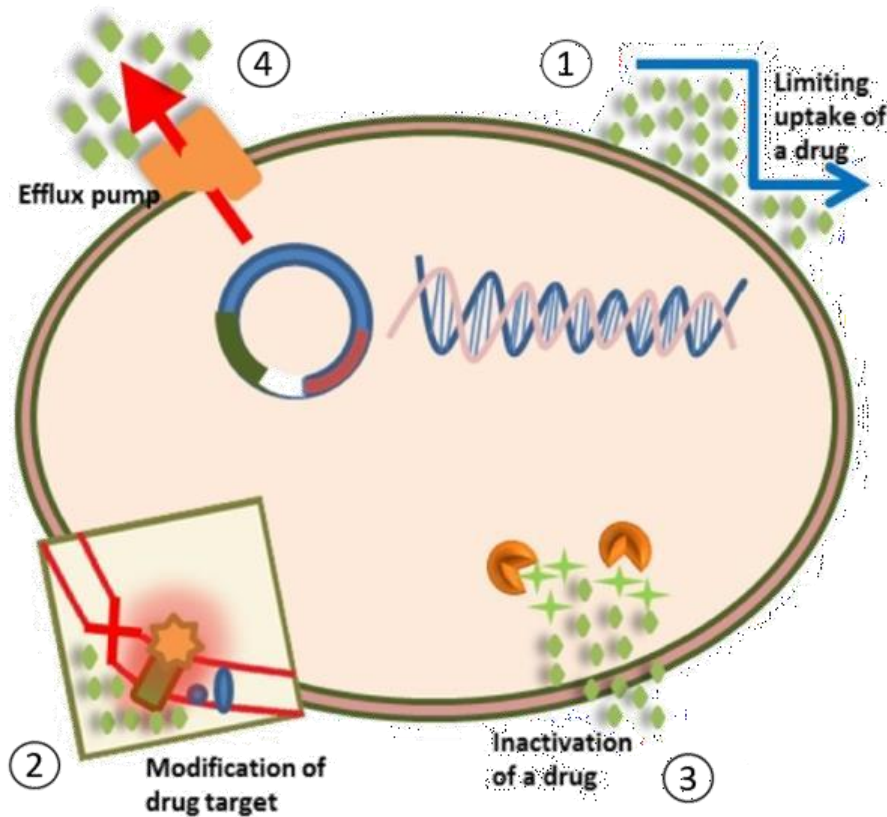


FIGURA 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana (modificado de Reygaert, 2018).

En el caso del primer mecanismo, las bacterias Gram-negativas al tener una capa de lipopolisacáridos (LPS) en su estructura tienen resistencia innata a ciertos grupos de antimicrobianos; las bacterias que carecen de pared celular son intrínsecamente resistentes a todos los antimicrobianos que tienen como target la pared celular; las bacterias que tienen membranas externas grandes reducen la cantidad de porinas que poseen o cambian su selectividad a través de

mutaciones para así evitar el ingreso de moléculas hidrofílicas y las bacterias que forman biopelículas utilizan su consistencia espesa y pegajosa (rica en polisacáridos, proteínas y ADN) para dificultar que los antimicrobianos lleguen a ellas. El objetivo del segundo mecanismo es modificar el target de un antimicrobiano y para ello las bacterias Gram-positivas, por ejemplo, alteran la estructura y/o el número de proteínas de unión a penicilina (PBP) para disminuir la unión de los antibióticos β -lactámicos, ya que estos tienen afinidad por estas transpeptidasas que participan en la formación del peptidoglicano (PG) en la pared celular. En el tercer mecanismo como ya se mencionó, las bacterias pueden inactivar un antimicrobiano transfiriéndole un grupo químico a su estructura (acetilo, fosforilo y/o adenilo) o degradándolo a través de la hidrólisis, siendo las enzimas β -lactamasas las más relevantes. Finalmente, en el cuarto mecanismo, las bombas de expulsión tienen como función principal eliminar sustancias tóxicas de la bacteria y muchas de ellas transportan una gran variedad de compuestos, llamándose bombas de expulsión multidrogas. Existen cinco familias principales: la familia de cassettes de unión a ATP (ABC), de extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE), de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR), la superfamilia de facilitadores principales (MFS) y la familia de resistencia nodulación-división celular (RND), siendo esta última la única bomba formada por tres componentes y que se encuentra casi exclusivamente en bacterias Gram-negativas (**Figura 2**). La diferencia principal entre estas familias radica en la fuente de energía que utilizan para expulsar los distintos sustratos;

las bombas de la familia ABC son dependientes de la hidrólisis de ATP para expulsar los distintos compuestos, las bombas de la familia MATE utilizan un gradiente electroquímico otorgado por Na^+ y las bombas MFS, RND y SMR utilizan la fuerza próton-motriz para ejercer su función (Opazo *et al.*, 2009).

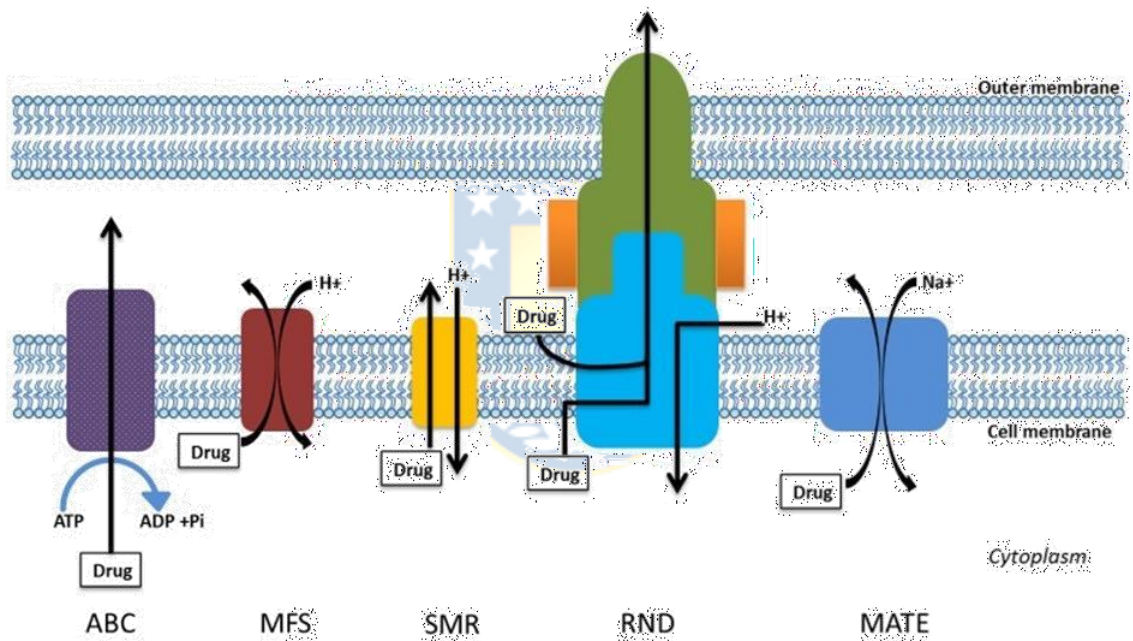


FIGURA 2. Estructura general de las familias de bombas de expulsión (Extraído de Reygaert, 2018)

De esta manera, la frecuencia con la que se ocupan estos mecanismos depende del tipo de bacteria y también del tipo de resistencia que presente, ya que aquellas que presentan resistencia intrínseca solo pueden usar los mecanismos uno, tres y cuatro.

1.2.- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

La OMS el año 2017 publicó una lista de “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos con el objetivo de promover la investigación y desarrollo de nuevos fármacos para combatirlos. Se elaboró en colaboración con la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tübingen (Alemania) y se divide en tres categorías: prioridad crítica, alta y media (WHO, 2017). En el grupo de prioridad crítica se encuentran bacterias que han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos provocando que se vuelvan especialmente peligrosas en ambientes hospitalarios, residencias de ancianos y en pacientes que necesitan de ventilación mecánica y/o catéteres intravenosos; mientras que en los grupos de prioridad alta y media se encuentran bacterias que poco a poco van aumentando su resistencia a los antimicrobianos, y que están relacionadas a infecciones comunes. Dentro del grupo de prioridad alta se encuentra *Staphylococcus aureus*, un coco Gram-positivo de aprox 1,5 μm de diámetro, anaerobio facultativo, oportunista, halotolerante y coagulasa positivo; que es capaz de sintetizar una nueva PBP (PBP2a o PBP2') que le otorga resistencia a

metilina y otros β -lactámicos (Castro, 2014 y García *et al.*, 2019). Alrededor del 30% de la población humana es portador asintomático de esta bacteria, sin embargo, puede provocar una gran variedad de enfermedades que van desde infecciones en la piel y tejidos blandos hasta bacteriemia y endocarditis infecciosa. Así mismo, las cepas de *S. aureus* resistente a metilina (SARM) se asocian con infecciones hospitalarias en las que se pueden formar biopelículas, y se caracterizan por ser persistentes, virulentas y difíciles de eliminar (Tong *et al.*, 2015 y García *et al.*, 2019)

1.3.- Relación entre la resistencia antimicrobiana y biocidas.

La comunidad científica ha observado que la aparición de la RAM no solo es consecuencia del uso/abuso de los antimicrobianos, sino también, a la exposición por parte de las bacterias a biocidas; término que se usa para englobar a desinfectantes, antisépticos y conservantes, los cuales no presentan especificidad por un grupo microbiano en particular y tienen como objetivo destruir o inhibir el crecimiento de los microorganismos hasta niveles inofensivos (Chacón y Rojas, 2020). Los biocidas más utilizados son los compuestos de amonio cuaternario, biguanidas, fenoles, alcoholes, aldehídos, compuestos halogenados y el peróxido de hidrógeno. De un modo general, los compuestos de amonio cuaternario (QAC), como el cloruro de benzalconio, funcionan como surfactantes lo que les permite unirse de forma irreversible a los fosfolípidos y

proteínas de la membrana citoplasmática de los microorganismos, alterando su permeabilidad. También causan la salida al exterior de material vital citoplasmático, inhiben la cadena respiratoria e inactivan enzimas esenciales para su desarrollo. Las biguanidas (clorhexidina) también se unen a fosfolípidos y proteínas de la membrana citoplasmática, pero a diferencia de los QAC, la unión es más fuerte lo que provoca el desplazamiento de cationes divalentes Mg^{+2} y Ca^{+2} presentes en esta estructura, teniendo como consecuencia una disminución en la fluidez de la membrana y alteraciones osmóticas en la célula. Los fenoles (triclosán) por otra parte, actúan desnaturalizando las proteínas cuando se encuentran a concentraciones bajas y son capaces de ser absorbidos por la bacteria afectando la síntesis de ácidos grasos. En el caso de los alcoholes, estos también provocan la desnaturalización de las proteínas y en presencia de agua, su eficacia es mayor y más rápida. Los aldehídos, como el formaldehído, inactivan a los microorganismos a través de la alquilación de los grupos aminos y sulfhidrilos de las proteínas, y el anillo del átomo de nitrógeno de las bases purínicas. Finalmente, los compuestos halogenados (yodo, cloro) y el peróxido de hidrógeno, actúan como oxidantes y formadores de radicales libres permitiendo la inactivación de enzimas, proteínas estructurales y ribosomas de los microorganismos. Estos productos se usan ampliamente en hospitales, granjas, industria alimentaria y en el hogar, y el primer registro de resistencia a ellos fue en 1936, en donde se identificó que *Salmonella typhi* era resistente al cloro. Sin embargo, con el pasar de los años son cada vez más los informes que

detallan que el uso frecuente de desinfectantes ha dado lugar a cepas bacterianas menos susceptibles a estos agentes, evidenciándose con la presencia de genes de resistencia a desinfectantes en bacterias multirresistentes (MDR). Un ejemplo de esto, fueron los resultados obtenidos de un estudio publicado en 2022 en la revista *American Journal of Infection Control*, en donde se recolectaron un total de 245 muestras de distintas superficies ambientales de un hospital de atención terciaria en Lahore (Pakistán) con el fin de identificar la presencia de *S. aureus*, evaluar la susceptibilidad de las cepas aisladas a tres desinfectantes e investigar las posibles asociaciones entre la presencia de genes de resistencia a los desinfectantes y la susceptibilidad reducida a estos mismos. Se lograron aislar 47 cepas de *S. aureus* de las 245 muestras ambientales, de las cuales un 85% (n=40) presentaron resistencia a la cefoxitina y se identificaron como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM). Además, se halló que los genes de resistencia *qacA*, *qacE* y *qacEΔ1* estaban presentes en el 23,4%, 29,7% y 4,2% de los aislamientos, respectivamente y que todos los aislamientos con genes *qac* tenían valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) superiores a los desinfectantes seleccionados (cloruro de benzalconio, bromuro de cetrimonio y clorhexidina) (Sarwar *et al.*, 2022).

Los genes *qac* (quaternary ammonium compound resistance/transporter) codifican proteínas pertenecientes a dos familias de bombas de expulsión multidrogas: la superfamilia de facilitadores principales (MFS) y la familia de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR); y en general, otorgan resistencia a compuestos de amonio cuaternario (Wassenaar *et al.*, 2015). La mayoría de estos genes están localizados en plásmidos, a excepción del gen *qacE* (o su variante defectuosa *qacEΔ1*) que se encuentra localizado en integrones clase I; subtipo de integrones hallados con mayor frecuencia en entornos clínicos y uno de los principales contribuyentes al problema de la diseminación de la resistencia antimicrobiana. En líneas generales, los integrones son elementos genéticos móviles que contienen un sistema de recombinación sitio específica capaz de integrar, expresar e intercambiar elementos de ADN específicos, llamados cassettes de genes; constan de tres elementos: un gen que codifica una integrasa (*intI*), un sitio de recombinación adyacente (*attI*) y un promotor (P_c); y se clasifican en distintas clases según la secuencia de la integrasa (Sabaté y Prats, 2002 y Domingues *et al.*, 2012).

1.4.- COVID-19 y el uso de biocidas.

La pandemia de COVID-19 producida por SARS-CoV2 ha provocado no solo el fallecimiento de 6.908.554 personas hasta el 19 de Abril de 2023 (WHO, 2020), sino también, el aumento significativo del uso de biocidas, particularmente desinfectantes, en la población. En Chile, esto se puede evidenciar en el último boletín de registro de desinfectantes y sanitizantes de uso sanitario y doméstico emitido por el Instituto de Salud Pública (ISP) el año 2022, en donde se indica que entre los años 2019 y 2021, la Unidad de Plaguicidas, Desinfectantes y Sanitizantes del Departamento de Salud Ambiental del ISP, realizó un total de 704 registros concedidos o autorizaciones excepcionales de productos desinfectantes y sanitizantes. De este total, el 89,1% (627/704) correspondieron a registros concedidos y un 10,9% (77/704) a autorizaciones excepcionales; la frecuencia más elevada se observó el año 2021 con un 53,6% (377/704), seguido por el año 2020 con un 31,8% (224/704) y finalmente el año 2019 con un 14,6% (103/704) (**Figura 3**). Este boletín también indica que en este mismo período de tiempo los principios activos más frecuentes para desinfectantes y sanitizantes con registro concedido o autorización excepcional correspondieron a: Hipoclorito de Sodio (n=138), seguido por Amonios Cuaternarios (n=207) y Peróxido de Hidrógeno (n=39); en donde el uso principal más frecuente fue “superficies, pisos y ambientes” (n=436), categoría que aumentó desde un 39,8% (41/103) el 2019 a un 65,3% (246/377) el año 2021 (**Figura 4**).

Debido a los vínculos entre la resistencia a los desinfectantes y la resistencia a los antibióticos descritos anteriormente, es preciso insistir en la realización de más investigaciones en esta área, ya que existe un riesgo evidente de que el uso exagerado de biocidas pueda aumentar la ya preocupante tendencia hacia una mayor resistencia a los antimicrobianos en microorganismos relevantes.

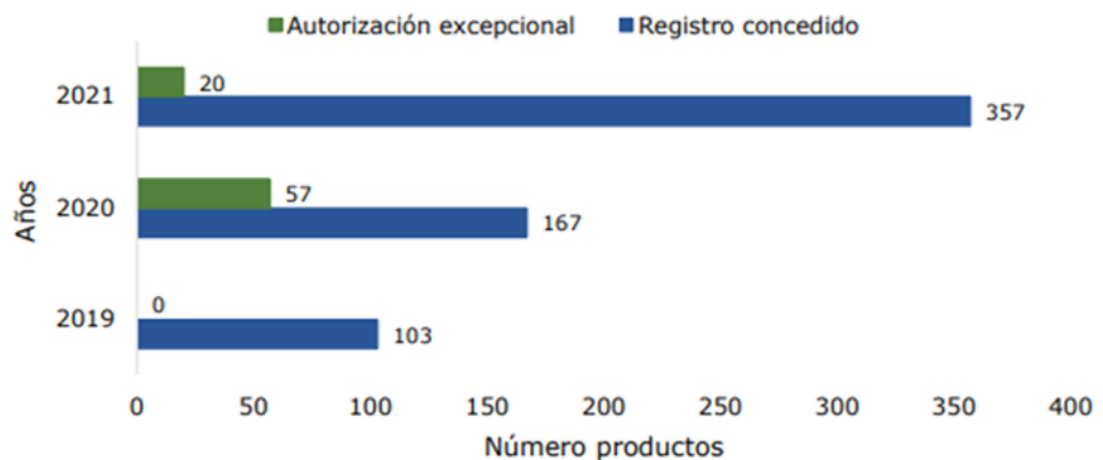


FIGURA 3. Número de productos desinfectantes o sanitizantes con registro concedido o autorización excepcional, según año.

En el año 2019 se realizó un total de 103 registros; en el año 2020 un total de 224 registros, en donde 167 correspondieron a registros concedidos y 57 a autorizaciones excepcionales; y en el año 2021 un total de 377 registros, en donde 357 correspondieron a registros concedidos y 20 a autorizaciones excepcionales. (Fuente: Unidad de plaguicidas y desinfectantes. Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile).

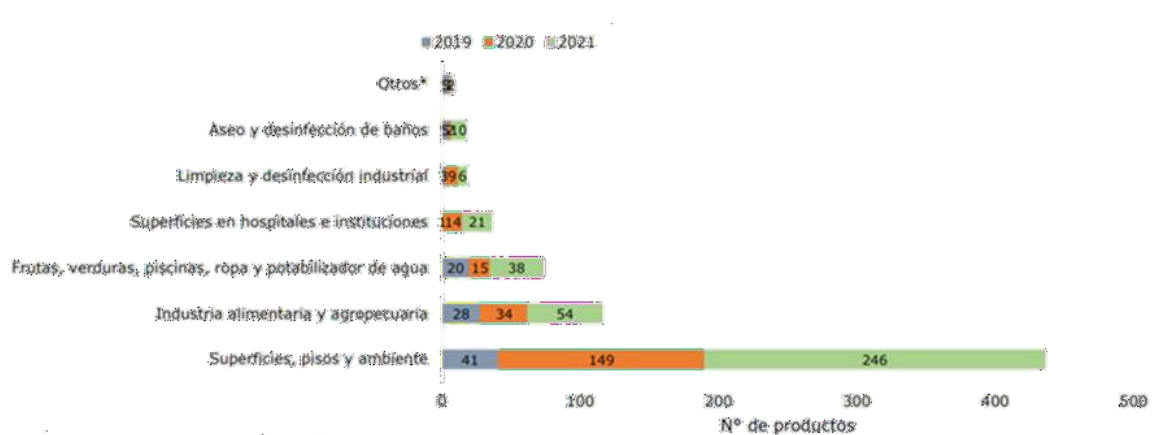


FIGURA 4. Número de productos desinfectantes o sanitizantes con registro concedido o autorización excepcional, según usos autorizados.

El uso principal más frecuente entre los años 2019 y 2021 correspondió a “superficies, pisos y ambientes”, observándose un aumento en el año 2021 en la cantidad de productos destinados a este fin. (Fuente: Unidad de plaguicidas y desinfectantes. Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile).

2. PROBLEMA

El problema de la presente investigación radica en que se desconoce el estado actual de la presencia de genes de resistencia a desinfectantes en microorganismos de relevancia clínica como *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria presenta niveles críticos de resistencia a antimicrobianos y por su elevada exposición a superficies podría ser blanco de presentar genes de resistencia a desinfectantes. La pandemia ha incrementado la utilización de desinfectantes en el mundo, por lo tanto, un estudio que realice la investigación de cepas de *S. aureus* pre y post pandémicas aisladas desde matrices alimentarias, es necesario para conocer al respecto de esta situación en nuestro país.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentan genes de resistencia a desinfectantes las cepas de *S. aureus* pre y post pandémicas aisladas desde matrices alimentarias en nuestro país?

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *S. aureus* aisladas desde matrices alimentarias tanto pre y post pandémicas presentan genes de resistencia a desinfectantes.

5. OBJETIVOS

5.1.- Objetivo General

Determinar la prevalencia de genes de resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus* pre y post pandemia aisladas desde matrices alimentarias.

5.2.- Objetivos específicos

- 1) Identificar mediante búsqueda bibliográfica los genes de resistencia a desinfectantes para el estudio en cepas de *S. aureus*.
- 2) Optimizar la metodología de PCR seleccionada para la detección de genes de resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus* desde matrices alimentarias.
- 3) Determinar la prevalencia de los genes de resistencia a desinfectantes en las cepas de *S. aureus* pre y post pandemia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Diseño de estudio.

Se realizó un estudio de corte transversal. Para ello se analizaron cepas de *S. aureus* facilitadas por el Instituto de Salud Pública (ISP), las cuales fueron aisladas desde matrices alimentarias que incluyeron platos preparados, productos lácteos, carnes y productos cárnicos obtenidos desde distintas ciudades de nuestro país (**Anexo 1**).

6.2.- Revisión bibliográfica.

Para determinar los genes de resistencia a desinfectantes a evaluar en las cepas de *S. aureus* se realizó una búsqueda sistemática de documentos en las plataformas PubMed y ScienceDirect; y como ecuación de búsqueda se utilizaron palabras claves como ***Staphylococcus aureus*, susceptibilities, antiseptic resistance genes, prevalence**.

6.3.- Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*.

El aislamiento se realizó siguiendo el protocolo del Manual Analítico Bacteriológico (BAM) de la FDA.

En una primera etapa, las muestras pasaron por un proceso de pre-enriquecimiento en caldo nutritivo en una proporción 1:10 (25g alimento en 250 ml caldo). Posteriormente para cada dilución que se sembró en placas, se transfirió asépticamente 1 ml de suspensión de muestra a 3 placas de agar de Baird-Parker, distribuyendo 1 ml de inóculo equitativamente en 3 placas (p. ej., 0,4 ml, 0,3 ml y 0,3 ml). Se esparció el inóculo sobre la superficie de la placa de agar, utilizando una varilla de rayado de vidrio curvado estéril y se mantuvieron las placas en posición vertical hasta que el agar absorbió el inóculo (alrededor de 10 minutos en placas debidamente secas). Las placas que no lograron absorber el inóculo se colocaron en posición vertical en la estufa durante aproximadamente 1 hora. Luego se invirtieron las placas y se incubaron 45-48 h a 35-37°C. Se seleccionaron las placas que contenían entre 20 a 200 colonias con la apariencia típica de *S. aureus*. Las colonias de *S. aureus* son circulares, lisas, convexas, húmedas, de 2-3 mm de diámetro en placas despobladas, de color gris a negro azabache, frecuentemente con un margen de color claro (blanquecino), rodeadas por una zona opaca y frecuentemente con una zona exterior clara; las colonias tienen una consistencia mantecosa a gomosa cuando se tocan con la aguja de

inoculación. Ocasionalmente, en varios alimentos y productos lácteos, se pueden encontrar cepas no lipolíticas de apariencia similar, excepto que no hay zonas opacas y claras circundantes. Las cepas aisladas de alimentos congelados o desecados que se han almacenado durante períodos prolongados suelen desarrollar una coloración menos negra que las colonias típicas y pueden tener una apariencia áspera y una textura seca.

En una segunda etapa, se analizó la producción de coagulasa como prueba confirmatoria de *S. aureus*. Para ello se transfirió una pequeña cantidad de la colonia sospechosa a pequeños tubos que contenían 0,2- 0,3 ml de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) y se emulsionaron bien. Posteriormente se inoculó un agar inclinado con un medio de mantenimiento adecuado (TSA, por ejemplo) con un asa llena de suspensión BHI y se incubaron ambos (suspensión de cultivo BHI y cultivos inclinados) de 18 a 24 horas a 35 a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se conservaron los cultivos inclinados a temperatura ambiente para pruebas auxiliares o repetidas en caso de que los resultados de la prueba de coagulasa sean cuestionables y se agregaron 0,5 ml de plasma coagulasa reconstituido con EDTA (B-4, arriba) al cultivo BHI teniendo cuidado de mezclar bien. Se incubó a 35-37 °C y examinó periódicamente durante un período de 6 h para detectar la formación de coágulos. Solo el coágulo firme y completo que permanece en su lugar cuando el tubo se inclina o se invierte se

consideró positivo para *S. aureus*. La coagulación parcial, anteriormente reacciones de coagulasa 2+ y 3+, deben confirmarse mediante otras pruebas, como la fermentación anaeróbica de glucosa, la sensibilidad a la lisostafina y la producción de termonucleasa (Sperber y Tatini, 1975).

Finalmente, como segunda prueba confirmatoria de *S. aureus* se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una secuencia del gen *spa* que codifica para la proteína A, la cual es una proteína de superficie y que se encuentra tanto en cepas sensibles a meticilina como en cepas resistentes. Para ello, se realizó la extracción de ADN utilizando el extractor automático nucliSENS® easyMAG® de Biomérieux siguiendo las indicaciones del fabricante y la detección del gen *spa* se llevó a cabo siguiendo la metodología de (Majeed *et al.*, 2012) con algunas modificaciones. Se utilizaron los partidores *spa* F 5'- AGCACCAAAGAGGAAGACAA-3' y *spa* R 5'-

GTTTAACGACATGTACTCCGT-3'. En la alícuota de 20 µL de la reacción se agregaron 2 µL de buffer para PCR de 10X, 2 µL de MgCl₂ 25mM, 4 µL dNTP's 2mM, 0,5 U de Taq polimerasa (5 U/µL), 2 µM de cada partidor al 0,5 mM, 2 µL de la plantilla de ADN y 6,8 µL de ddH₂O; y las condiciones del ciclo fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C por 30 s, anillado a 55 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio (EtBr) en tampón 1X TBE (Tris-borato-EDTA) durante 80 min y a 120V.

6.4.- Selección de cepas.

Para llevar a cabo la identificación de genes de resistencia a desinfectantes en *S. aureus*, se seleccionaron 54 cepas comprendidas entre los años 2012 y 2023 (debidamente preservadas); siendo los criterios de selección: lugar de origen y tipo de alimento.

6.5.- Extracción de ácidos nucleicos.

Para realizar la extracción de ADN de las cepas de *S. aureus* en estudio, se utilizó el extractor automático nucliSENS® easyMAG® de Biomérieux, el cual tiene capacidad para 24 muestras. El procedimiento fue el siguiente:

- Hacer click en “Daily Use” en el software easyMAG®, luego en “Define Extraction Request” e ingresar información como: protocolo específico, volumen de muestra, volumen de eluido y tipo de matriz. Posteriormente

hacer click en “Create Run”, seleccionar las muestras y luego en “Load Run”.

- Hacer click en “Install Reagents” y cargar el equipo con los reactivos necesarios para su funcionamiento, escaneando primero el código de barra de la posición a instalar y luego el código del reactivo.
- Instalar los cartuchos de muestra en el equipo de la misma forma que en el paso anterior.
- Luego hacer click en “Dispense Lysis” para agregar buffer de lisis (tiocianato de guanidina) al cartucho de muestra. Equipo realiza una incubación de 10 min.
- Durante la incubación se preparan las perlas magnéticas. Para ello se agregan 550 µL de agua libre de nucleasas a cada vial y luego se agitan en vortex para suspender las perlas. Una vez terminada la incubación se agregan 100 µL a cada pocillo de muestra y en el software se escanean y asignan a cada muestra, el número de lote de las perlas magnéticas ocupadas.
- Equipo vuelve a realizar una incubación. Aquí todo el ADN liberado es capturado por las perlas magnéticas. Luego el imán incorporado en el equipo atrae todas las perlas, permitiendo purificar el ADN a través de varios pasos de lavado. Finalmente, el equipo se calienta para liberar el

ADN de las perlas magnéticas y estas son nuevamente retenidas por imanes (**Figura 5**).

- Luego de 40 min aprox la extracción esta completa y se puede transferir el eluido (contiene el ADN) a tubos eppendorf previamente rotulados.

Para evaluar la concentración de ADN en los eluidos se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000.

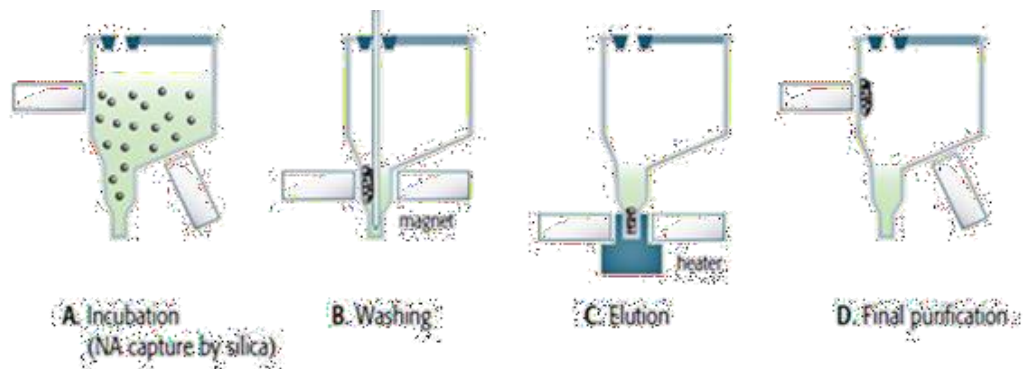


FIGURA 5. Principio de extracción nucliSENS® easyMAG® de Biomérieux.

A) Durante la incubación de las muestras lisadas, todo el ácido nucleico es capturado por perlas magnéticas de sílice. **B)** El imán incorporado en el equipo atrae las perlas magnéticas, lo que permite que el sistema purifique los ácidos nucleicos mediante pasos de lavado. **C)** La etapa de calentamiento permite liberar los ácidos nucleicos de las perlas magnéticas. **D)** En el paso final, el imán separa las perlas magnéticas del eluido. (Extraído de Biomérieux, s.f.)

6.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los genes de resistencia a desinfectantes *qacA/B* y *smr* fueron detectados en las cepas de estudio por la técnica de PCR.

Para la amplificación del gen *qacA/B* se siguió la metodología de (Anthonisen *et al.*, 2002), se utilizaron los partidores *qacA/B* F 5'-GCTGCATTTATGACAATGTTTG-3' y *qacA/B* R 5'-AATCCCACCTACTAAAGCAG-3'; y las condiciones del ciclo fueron las siguientes: desnaturalización del ADN a 95 °C durante 60 s y 30 ciclos de 95 °C durante 60 s y 40 °C durante 30 s, seguido de 72 °C durante 60 s.

Para la amplificación del gen *smr* se siguió la metodología de (Bjorland *et al.*, 2001) y se utilizaron los partidores 5'-ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT-3' y 5'-TTCCGAAAATGTTTAACGAACTA-3'. Se agregaron 50 ng de muestra aprox a 49 µL de una mezcla que contenía 1X de buffer de reacción con 0.7 U de *Taq* polimerasa, 10 pmol de cada partidor y 200 µM de dNTP's; y las condiciones del ciclo fueron: desnaturalización del ADN a 95 °C durante 60 s y luego 30 ciclos a 95 °C durante 60 s, 48 °C durante 45 s y 72 °C durante 60 s.

6.7.- Visualización producto PCR.

Los productos de PCR de las amplificaciones de los genes de resistencia a desinfectantes *qacA/B* y *smr* se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% por 50 min a 100V.

6.8.- Análisis de la data.

El análisis de la información y la construcción de gráficos de distribución de genes de resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus* estudiadas, se realizó a través del software GraphPad Prism 9.5.1.

7. RESULTADOS

7.1.- Revisión bibliográfica.

De los variados documentos encontrados al aplicar las ecuaciones de búsqueda en las plataformas PubMed y ScienceDirect, se consideraron como relevantes 5 investigaciones (Nakipoğlu *et al.*, 2012; El Sayed Zaki *et al.*, 2019; Noguchi *et al.*, 2005; Ghasemzadeh-Moghaddam *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2011) debido al año de publicación y a que cumplían con todos los criterios de búsqueda. En todas estas investigaciones, destacaba la presencia de los genes *qacA/B* y *smr* por sobre otros genes asociados a resistencia a desinfectantes como *qacE*, *qacG*, *qacH* o *qacJ*.

Las proteínas codificadas por estos genes como ya se mencionó, pertenecen a dos familias de bombas de expulsión multidrogas: la superfamilia de facilitadores principales (MFS) y la familia de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR). La proteína QacA (codificada por el gen *qacA*) tiene una longitud de 514 aminoácidos aproximadamente y otorga resistencia a varios sustratos: compuestos de amonio cuaternario (QAC), colorantes intercalados como acriflavina y bromuro de etidio, diamidinas como el isotionato de propamidina o clorhexidina; mientras que la proteína QacB (codificada por el gen *qacB*) solo

otorga resistencia a QAC y colorantes intercalados. Ambas proteínas pertenecen a la familia de bombas de expulsión MFS, solo difieren en seis aminoácidos, en donde el cambio de Asp por Ala en la posición 323 es responsable de la diferencia en especificidad y son denominadas colectivamente QacA/B. La proteína QacC (codificada por el gen *qacC*, actualmente denominado *smr*) tiene una longitud de 107 aminoácidos, pertenece a la familia de bombas de expulsión SMR y otorga resistencia a QAC y al bromuro de etidio, pero no a la acriflavina. Así mismo, se ha visto que las proteínas QacE, QacG, QacH y QacJ también otorgan resistencia al bromuro de etidio y/o cloruro de benzalconio, sin embargo, en *S. aureus* se han encontrado en un bajo porcentaje (Wassenaar *et al.*, 2015).

De esta manera y en base a la evidencia encontrada en las 5 investigaciones, se determinó identificar los genes de resistencia a desinfectantes *qacA/B* y *smr* en las 54 cepas de *S. aureus* seleccionadas para este estudio.

7.2.- Clasificación de la data seleccionada.

De las 54 cepas de *S. aureus* seleccionadas para este estudio, el 37% (20/54) correspondieron a cepas del año 2022, seguido por el año 2020 con un 13% (7/54) (**Figura 6**). A su vez, provinieron mayoritariamente de las ciudades de Iquique (n=17) y Viña del Mar (n=11) (**Figura 7**); y de comidas y platos preparados (n=37), según el código de clasificación de alimentos del MINSAL (**Tabla 1**).

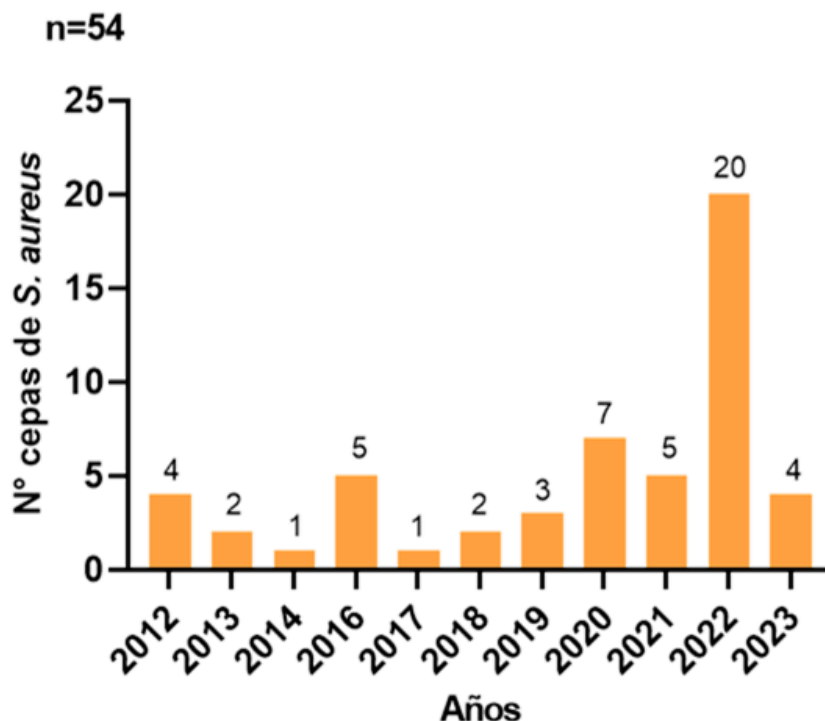


FIGURA 6. Clasificación cepas de *S. aureus* por año de selección.

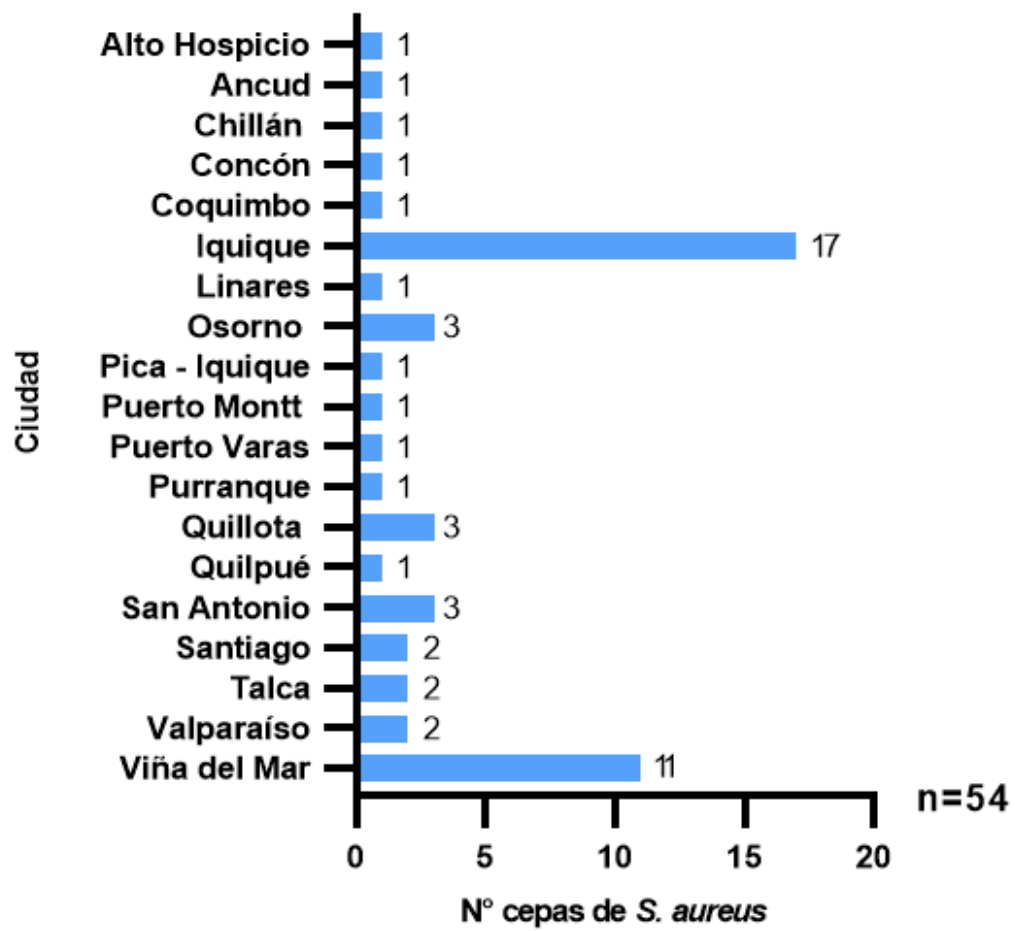


FIGURA 7. Clasificación cepas de *S. aureus* por ciudad de origen.

Tabla 1. Clasificación cepas de *S. aureus* por tipo de alimento, según código MINSAL.

Tipo de alimento	N° de cepas
Carne y productos cárneos (CPC)	4
Comidas y platos preparados (PPR)	37
Frutas y verduras (FRV)	3
Helados y mezclas para helados (HMH)	3
Leche y productos lácteos (LPL)	5
Pescados y productos de la pesca (PPP)	1
Salsas, aderezos, especias y condimentos (SAE)	1
Total	54

Así mismo, un 81.5% (44/54) de las cepas de *S. aureus* presentó enterotoxinas estafilocócicas (Staphylococcal Enterotoxins: SEs), destacándose la presencia conjunta de SEG y SEI (n=20), seguido por SEA (n= 6) (**Figura 8**). La totalidad de las cepas de *S. aureus* seleccionadas no presentaron los genes *mecA* y *mecC*, responsables de la expresión de la resistencia a meticilina (**Anexo 1**); y el 9.3% (5/54) presentó el gen *pvl*, que codifica la leucocidina Panton-Valentine (PVL) (**Tabla 2**).

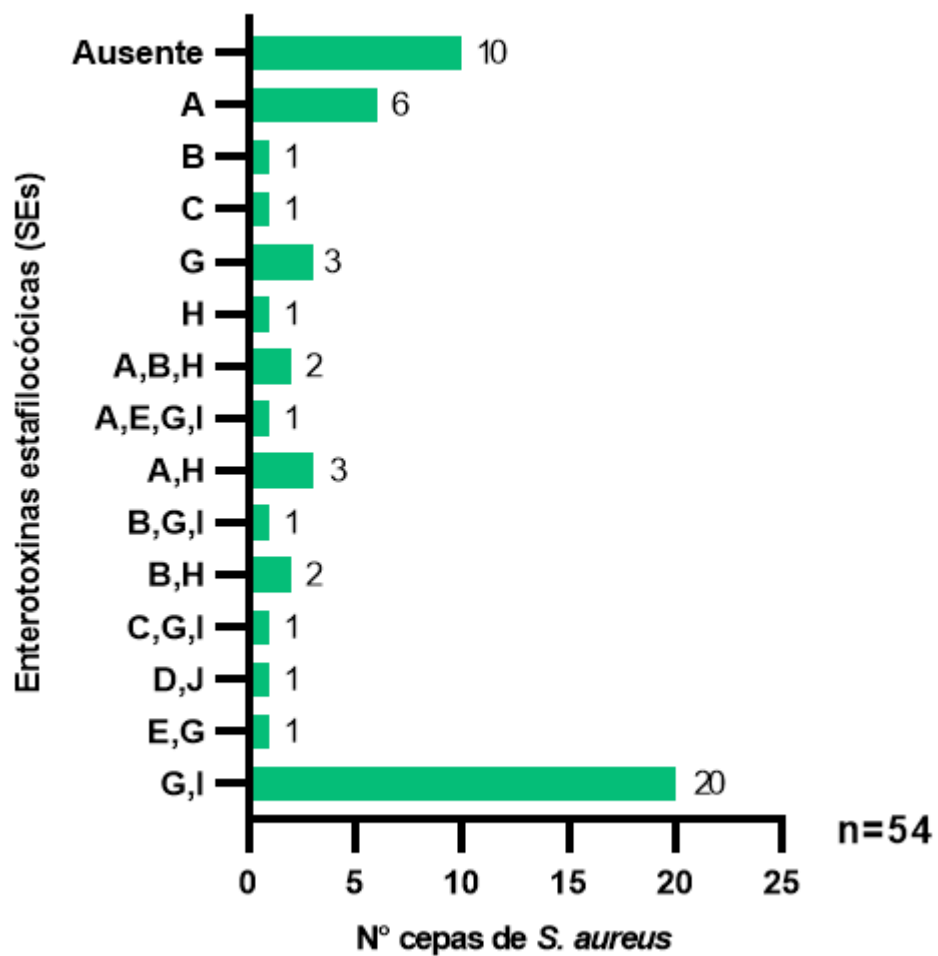


FIGURA 8. Clasificación cepas de *S. aureus* según enterotoxinas estafilocócicas (SEs).

Tabla 2. Cepas de *S. aureus* con presencia de gen *pvl*.

Cepa	Ciudad	Año	Tipo de alimento (Código MINSAL)
SA-12-090	Iquique	2012	Carne y productos cárneos (CPC)
SA-16-247	Quillota	2016	Comidas y platos preparados (PPR)
SA-20-415	Iquique	2020	Comidas y platos preparados (PPR)
SA-22-431	Viña del Mar	2022	Comidas y platos preparados (PPR)
SA-22-435	Iquique	2022	Leche y productos lácteos (LPL)

7.3.- Identificación de genes de resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus* por técnica de PCR.

Al realizar la amplificación de los genes de resistencia a desinfectantes en las 54 cepas de *S. aureus*, solo el 1.9% (1/54) presentó el gen *qacA/B* (**Figura 9**) y resultados similares se obtuvieron al realizar la amplificación del gen *smr* (**Figura 10**).

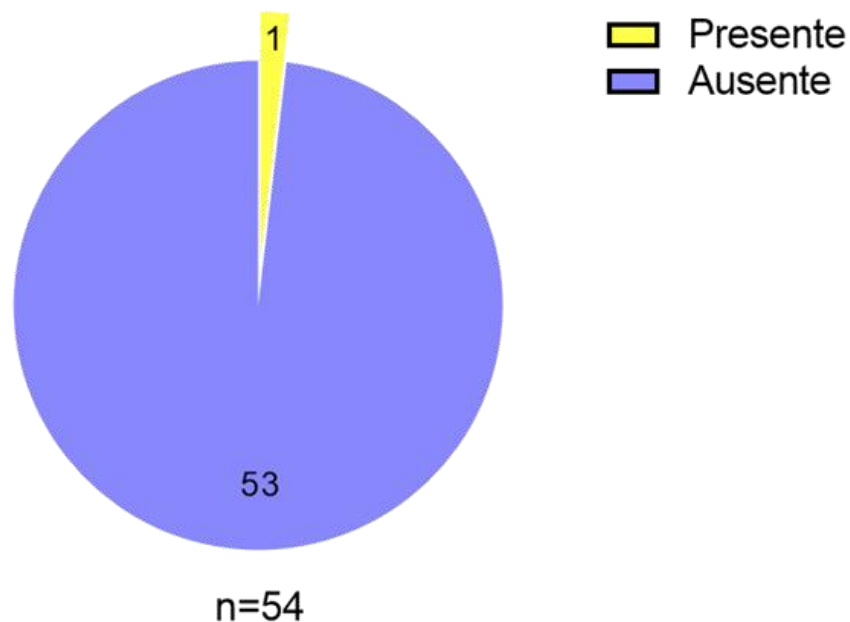


FIGURA 9. Distribución gen *qacA/B* en cepas de *S. aureus*.

La presencia del gen *qacA/B* se identificó en la cepa SA-12-053, proveniente del año 2012, de la ciudad de Viña del mar y según código MINSAL de salsas, aderezos, especias y condimentos (SAE).

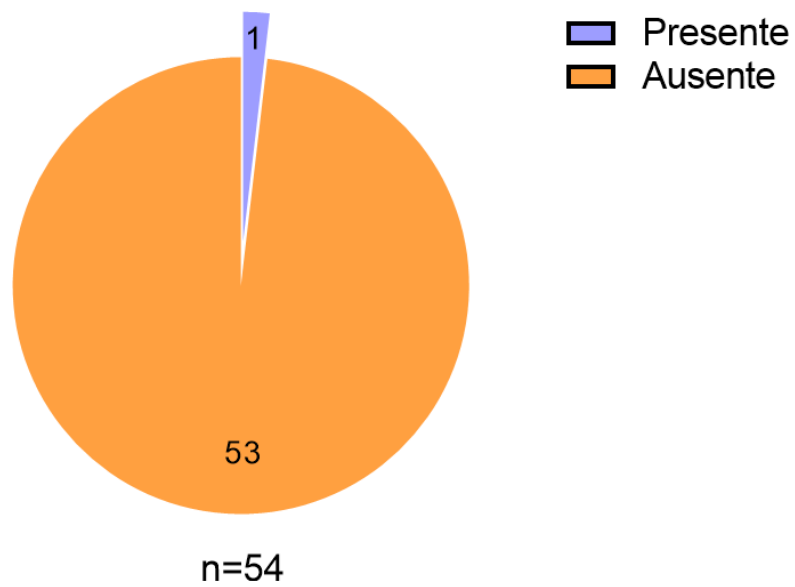


FIGURA 10. Distribución gen *smr* en cepas de *S. aureus*.

La presencia del gen *smr* se identificó en la cepa SA-16-247, proveniente del año 2016, de la ciudad de Quillota y según código MINSAL de comidas y platos preparados (PPR).

8. DISCUSIÓN

Staphylococcus aureus posee un alto grado de patogenicidad, siendo responsable de una gran variedad de enfermedades tales como lesiones cutáneas, endocarditis infecciosa, neumonía e intoxicaciones alimentarias. Esto se debe a que es capaz de producir una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad de colonización y/o evasión del sistema inmune; llamados factores de virulencia (Bustos-Martínez *et al.*, 2006). Dentro de estos factores de virulencia se encuentran las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) y la leucocidina Pantón-Valentine (PVL). Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por algunas cepas de *S. áureas*, son termoestables, resistentes a ciertas condiciones ambientales y a enzimas proteolíticas humanas, causan gastroenteritis y se han descrito 23 tipos de SEs distintos basados en su antigenicidad, ordenándose desde SEA a SEIY (Denayer *et al.*, 2017). Por otra parte, la leucocidina Pantón-Valentine (PVL), codificada por el gen *pvl* (*lukS*-PV y *lukF*-PV) es una citotoxina bicomponente que crea poros en la membrana plasmática de los leucocitos, provocando un aumento en la permeabilidad y posterior lisis de la célula; y se asocia a infecciones adquiridas en la comunidad producidas tanto por cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM-AC) como por cepas sensibles a meticilina, aunque en estas últimas la prevalencia es de menos del 5% (Yildirim *et al.*, 2022 y Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

Por otra parte, la resistencia a los β -lactámicos en *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es conferida por la adquisición de un elemento genético móvil llamado cassette cromosómico estafilocócico (SCC*mec*), el cual porta el gen *mecA*, que codifica una PBP alterada (PBP2a) que tiene afinidad reducida por los antibióticos β -lactámicos. Generalmente, para la confirmación de SARM se realiza la detección del gen *mecA* mediante PCR y pruebas de susceptibilidad usando oxacilina y/o cefoxitina, en donde se espera que una cepa resistente a meticilina presente el gen *mecA* y presente resistencia a ambos antibióticos. Sin embargo, se han reportado casos en donde los resultados de ambos procedimientos son incongruentes; observándose ausencia del gen *mecA*, sensibilidad a oxacilina pero resistencia a cefoxitina. Esto se debe a que la resistencia a β -lactámicos en SARM no solo es responsabilidad del gen *mecA*, sino también de un gen homólogo descubierto en el año 2007 llamado *mecC*. Este gen localizado de igual manera en *SSmec*, es un 69% idéntico al convencional *mecA* a nivel de ADN y la PBP2a codificada es un 63% idéntica a nivel de aminoácidos. Esta diferencia le otorga una mayor afinidad relativa para oxacilina que para cefoxitina, dando lugar a niveles más altos de resistencia a cefoxitina que a oxacilina; y se ha asociado predominantemente a infecciones de piel y tejidos blandos (Paterson *et al.*, 2014).

Las cepas de *S. aureus* seleccionadas para este estudio al ser de origen alimentario en su gran mayoría presentaron enterotoxinas estafilocócicas de diversos tipos, muy pocas cepas presentaron el gen *pvl* y en ninguna se identificó la presencia de los genes *mecA* y *mecC*; características que tienen concordancia con la literatura.

En cuanto a los resultados obtenidos tras el procesamiento de las 54 cepas de *S. aureus* mediante la técnica de PCR:

La baja frecuencia de los genes *qacA/B* y *smr* fue esperable y es congruente con la literatura existente, ya que en gran parte de las investigaciones las cepas de estudio son de origen clínico y presentan resistencia a meticilina. Aun así, se ha visto que la prevalencia del gen *smr* por lo general es baja (Nakipoğlu *et al.*, 2012; El Sayed Zaki *et al.*, 2019; Noguchi *et al.*, 2005; Ghasemzadeh-Moghaddam *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2011; Sidhu *et al.*, 2002).

9. CONCLUSIÓN Y PROYECCIÓN

El hecho de que las cepas positivas para los genes de resistencia a desinfectantes *qacA/B* y *smr* hayan provenido de años distintos y previos a la pandemia por COVID-19 sumado a que ninguna fue portadora de los genes *mecA* y *mecC*, da indicios de que las cepas de *S. aureus* de origen alimentario no sufren del mismo modo la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos y/o desinfectantes que las cepas encontradas entornos hospitalarios. Sin embargo, es necesario contar con un tamaño de muestra mayor y realizar más ensayos para poder tener resultados estadísticos robustos y significativos que confirmen esta conjetura.

De esta manera, la presente investigación abre las puertas a futuros proyectos en los cuales sería ideal poder determinar la resistencia a metilicina por método de difusión con disco de cefoxitina y/o oxacilina en paralelo con la detección de los genes *mecA* y *mecC* mediante PCR. También poder realizar ensayos de susceptibilidad a distintos antimicrobianos (ej. eritromicina, gentamicina, tetraciclina) y desinfectantes (ej. cloruro de benzalconio, clorhexidina) ya sea de forma cualitativa mediante antibiogramas (difusión en agar) o cuantitativa, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima

bactericida (CMB) mediante diluciones seriadas o epsilometría; para así correlacionar lo fenotípico con lo genotípico de una manera óptima.

10. GLOSARIO

Cepa: Grupo de microorganismos que pertenecen a la misma especie y que comparten características que no se encuentran en otros miembros de la especie. Dicho de otro modo, se trata de un cultivo puro que proviene de un progenitor determinado.

Patógeno oportunista: Microorganismo con el potencial de producir una enfermedad sólo cuando la resistencia del hospedador es deficiente.

Prevalencia: Proporción de individuos en una población que tienen una enfermedad o característica. Concepto estadístico que hace referencia al número de casos de una enfermedad que están presentes en una población particular en un momento determinado.

Patogenicidad y virulencia: Capacidad de un agente infeccioso para causar enfermedad; mientras que la virulencia es la cuantificación de dicha capacidad.

Factores de virulencia: Proteínas u otras moléculas producidas por patógenos que le permiten colonizar, adaptar y evadir la respuesta inmune del huésped; y producir daño.

Genotipo: La constitución genética (genoma) de una célula, un individuo o un organismo. Puede referirse a todos los genes o a un gen específico.

Fenotipo: Características expresadas de una célula, individuo u organismo.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Anthonisen, I. L., Sunde, M., Steinum, T. M., Sidhu, M. S., & Sørum, H. (2002). Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and Tn552-related beta-lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 3606–3612. doi:<https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3606-3612.2002>
- Biomérieux. (s.f.). *Biomérieux: NucliSENS® easyMAG®*. Obtenido de <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/nuclisensr-easymagr>
- Bjorland, J., Sunde, M., & Waage, S. (2001). Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 3999–4004. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3999-4004.2001>
- Castro, A. M. (2014). Capítulo 5: Enfermedades bacterianas de piel y tejidos blandos. En *Bacteriología médica basada en problemas* (págs. 157-200). Obtenido de <https://cpncampus.com/biblioteca/files/original/78531a87565ef0f92c3af050c08c58ea.pdf>
- Chacón-Jiménez L., Rojas-Jiménez K. (2020). Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. *Acta Médica Costarricense*, 7-12.
- Clinical Info. (2020). (Department of Health and Human Services, USA.) Obtenido de Clinical Info : <https://clinicalinfo.hiv.gov/es>
- Denayer, S., Delbrassinne, L., Nia, Y., & Botteldoorn, N. (2017). Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of *Staphylococcus aureus* Strains and Importance of Toxin Detection. *Toxins*. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins9120407>
- Domingues, S., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile genetic elements*, 211-223. doi:<https://doi.org/10.4161/mge.22967>
- El Sayed Zaki, M., Bastawy, S., & Montasser, K. (2019). Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *Journal of global antimicrobial resistance*, 94-97. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.022>

FDA. (1998). Chapter 12: Staphylococcus aureus. En *Bacteriological Analytical Manual* (8th ed.). Obtenido de <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>

García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. D. R., & Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de Staphylococcus aureus y Staphylococcus coagulasa negativa en México. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 513–523. doi:<https://doi.org/10.7705/biomedica.4131>

García-Rodríguez J. y Picazo J. (1999). Tema 7: Relación hésped-bacteria. En *Compendio de Microbiología Médica*.

Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Azimian, A., Bayani, G., Dashti, V., Nojoomi, S., Shirazi, N., Solati, A., & Belkum, A. V. (2022). High prevalence and expression of antiseptic resistance genes among infectious t037/ST239 methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains in North Khorasan Province, Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*, 775-780. doi:<https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.63780.14055>

Giulieri, S. G., Tong, S. Y. C., & Williamson, D. A. (2020). Using genomics to understand methicillin- and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Microbial genomics*. doi:<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000324>

Heathman LS, Pierce GO, Kabler P. (1936). Resistance of Various Strains of E. Typhi and Coli aerogenes to Chlorine and Chloramine. *Public Health Rep*, 1896-1970. doi:10.2307/4581964

Instituto de Salud Pública de Chile. (2022). Boletín de registro de desinfectantes y sanitizantes de uso sanitario y doméstico. Chile, 2019-2021. 12 (3).

Jaime A Bustos-Martínez, Aída Hamdan-Partida, Marcia Gutiérrez-Cárdenas. (2006). Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica*, 287-305.

Jawetz, Melnick & Adelberg. (s.f.). Capítulo 9: Patogenia de la infección bacteriana. En *Microbiología Médica* (27 ed.). Obtenido de <https://bibliotecaia.ism.edu.ec/Repo-book/m/MicrobiologiaMedica.pdf>

Majeed, Z., Arafat, Y., Ajab, Z., Akbar Malik, S., Shehzad Abbasi, W., & Ajab, H. (2012). Caracterización genotípica de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina prevalente hospitales de Pakistán. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 257-269. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53523257011>

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (12 de Octubre de 2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. doi:doi:10.3390/pathogens10101310

MedicineNet. (2021). *Medical Definition of Prevalence*. Obtenido de <https://www.medicinenet.com/prevalence/definition.htm>

Montserrat Sabaté, Guillem Prats. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 341-345. doi:[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(02)72813-9).

Nakipoğlu, Y., İğnak, S., Gürler, N., & Gürler, B. . (2012). The prevalence of antiseptic resistance genes (qacA/B and smr) and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Mikrobiyoloji bulteni*, 180-189.

Noguchi, N., Suwa, J., Narui, K., Sasatsu, M., Ito, T., Hiramatsu, K., & Song, J. H. (2005). Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes qacA/B and smr of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *Journal of medical microbiology*, 557–565. doi:<https://doi.org/10.1099/jmm.0.45902-0>

Opazo C, Andrés, Mella M, Sergio, Domínguez Y, Mariana, Bello T, Helia, & González R, Gerardo. (2009). Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Revista Chilena de Infectología*, 499-503. doi:doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000700002>

Paterson, G. K., Harrison, E. M., & Holmes, M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 42-47. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, 482-501. doi:doi:10.3934/microbiol.2018.3.482

S.C. Burnett-Boothroyd, B.J. McCarthy. (2011). 13 - Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications: an industrial perspective. *Textiles for Hygiene and Infection Control*, 196-209. doi:<https://doi.org/10.1533/9780857093707.3.196>

Sarwar, S., Saleem, S., Shahzad, F., & Jahan, S. (2022). Identifying and elucidating the resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from hospital environment to conventional disinfectants. *American journal of infection control*, 178-183. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.05.018>

Sidhu, M. S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., & Holck, A. (2002). Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon

Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2797-2803. doi:<https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2797-2803.2002>

Sperber, W. H., & Tatini, S. R. (1975). Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied microbiology*, 502-505. doi:<https://doi.org/10.1128/am.29.4.502-505.1975>

Thermo Fisher Scientific Inc. (2010). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual*.

Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 603-661. doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

Wassenaar, T. M., Ussery, D., Nielsen, L. N., & Ingmer, H. (2015). Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *European journal of microbiology & immunology*, 44-61. doi:<https://doi.org/10.1556/EUJMI-D-14-00038>

WHO. (2017). Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.

WHO. (2020). *WHO COVID-19 Dashboard*. Obtenido de <https://covid19.who.int/>

Yildirim, F., Sudagidan, M., Aydin, A., Akyazi, I., Bayrakal, G. M., Yavuz, O., & Gurel, A. (2022). In Vivo Pathogenicity of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains Carrying Pantone-Valentine Leukocidin Gene. *Life*. doi:<https://doi.org/10.3390/life12122126>

Zhang, M., O'Donoghue, M. M., Ito, T., Hiramatsu, K., & Boost, M. V. (2011). Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *The Journal of hospital infection*, 113-117. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.02.018>

12. ANEXOS

Anexo 1. Cepas seleccionadas para análisis de genes de resistencia a desinfectantes.

Cepas seleccionadas para análisis de genes de resistencia a desinfectantes										Genes			
Corr.	Bacteria	Gen spa (confirmación S. aureus)	Cepa	Ciudad	Alimentio	Clasificació n Alimentos MINSAL	Año	Enterotoxinas	mea	pvf	gac	A/Bsmr	
1	S. aureus	Positivo	SA-12-050	Iquique	Cherqui, chicho y papa	OPC	2012	B, G, I	0	1	0	0	
2	S. aureus	Positivo	SA-12-035	Vina del mar	Ensalada chilena	PPR	2012	A	0	0	0	0	
3	S. aureus	Positivo	SA-12-053	Vina del mar	Mayonesa	SAE	2012	A, B, H	0	0	1	0	
4	S. aureus	Positivo	SA-12-058	Chillán	Cherqui	OPC	2012	A, H	0	0	0	0	
5	S. aureus	Positivo	SA-13-097	Vina del Mar	Queso cabra	LPL	2013	B, H	0	0	0	0	
6	S. aureus	Positivo	SA-13-127	Puerto Montt	Ensalada Mixta	PPR	2013	B	0	0	0	0	
7	S. aureus	Positivo	SA-14-180	Ancud	Ensalada tomate	PPR	2014	A, G	0	0	0	0	
8	S. aureus	Positivo	SA-16-247	Quilicura	Tonete con cebolla	PPR	2016	A, H	0	1	0	1	
9	S. aureus	Positivo	SA-16-256	Vina del Mar	Churrasco con ensalada	PPR	2016	E, G	0	0	0	0	
10	S. aureus	Positivo	SA-16-257	Iquique	Lechuga picada	PPR	2016	A, E, G, I	0	0	0	0	
11	S. aureus	Positivo	SA-16-273	Couminto	Arroz/carne/salsa	PPR	2016	A, H	0	0	0	0	
12	S. aureus	Positivo	SA-16-274	Vina del Mar	Ceviche	PPP	2016	0	0	0	0	0	
13	S. aureus	Positivo	SA-17-343	Santiago	Nuggets pollo	PPR	2017	G, I	0	0	0	0	
14	S. aureus	Positivo	SA-18-393	Santiago	Ensalada	PPR	2018	G, I	0	0	0	0	
15	S. aureus	Positivo	SA-18-395	Puerto Varas	Canapa	PPR	2018	G, I	0	0	0	0	
16	S. aureus	Positivo	SA-22-423	Osoorno	Longaniza	OPC	2022	B, H	0	0	0	0	
17	S. aureus	Positivo	SA-22-425	Iquique	Pescado Cebolla Cliente	PPR	2022	C	0	0	0	0	
18	S. aureus	Positivo	SA-22-426	Linares	Quesillo Fresco	LPL	2022	A	0	0	0	0	
19	S. aureus	Positivo	SA-22-431	Vina	Ceviche	PPR	2022	A	0	1	0	0	
20	S. aureus	Positivo	SA-22-435	Iquique	Lecche reconstruida	LPL	2022	G, I	0	1	0	0	
21	S. aureus	Positivo	SA-22-447	Concón	Sushi	PPR	2022	A	0	0	0	0	
22	S. aureus	Positivo	SA-22-448	San Antonio	Completo	PPR	2022	G, I	0	0	0	0	
23	S. aureus	Positivo	SA-22-449	San Antonio	Hamburguesas con queso	PPR	2022	G, I	0	0	0	0	

Códigos MINSAL	Alimentos
1	Leches y productos lácteos
2	Hielados y mezclas para helados
3	Productos grasos
4	Caldos, sopas, cremas y mezclas deshidr.
5	Productos elaborados a partir de cereales
6	Alcoholes y miel
7	Productos de confitería
8	Productos de panadería y pastelería
9	Alimentos de uso infantil
10	Carnes y Productos cárneos
11	Pescados y Productos de la pesca
12	Huevos y otoproductos
13	Salsas, aderezos, especias y condimento SAE
14	Fruitas y verduras
15	Condidas / platos preparados
16	Bebidas
17	Estimulantes y frutivos
18	Conservas.

Códigos MINSAL Alimentos	
1 Leches y productos lácteos	LPL
2 Helados y mezclas para helados	HMH
3 Productos grasos	PGS
4 Caldos, sopas, cremas y mezclas deshidr.	CSC
5 Productos elaborados a partir de cereal	CER
6 Aderezos y miel	AZM
7 Productos de confitería	COF
8 Productos de panadería y pastelería	PNP
9 Alimentos de uso infantil	INF
10 Carnes y Productos cárneos	CPC
11 Pescados y Productos de la pesca	PPP
12 Huevos y ovoproductos	HOP
13 Salsas, aderezos, especias y condimento	SAE
14 Frutas y verduras	FRV
15 Comidas y platos preparados	PPR
16 Bebidas	BBB
17 Estimulantes y frutivos	ESF
18 Conservas.	CSV

24	S. aureus	Positivo	SA-22-450	Quilicha	Queso de Murcia	LPL	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
25	S. aureus	Positivo	SA-22-451	San Antonio	Completto tomate mayo	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
26	S. aureus	Positivo	SA-22-455	Valparaiso	Pizza	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
27	S. aureus	Positivo	SA-22-456	Valparaiso	Ensalada Pollo	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
28	S. aureus	Positivo	SA-22-457	Quilicha	Churrasco	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
29	S. aureus	Positivo	SA-22-463	Iquique	Spagueti con albondiga	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
30	S. aureus	Positivo	SA-22-464	Vina del Mar	Salad Bauli	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
31	S. aureus	Positivo	SA-21-416	Alto Hospicio	Sushi	PPR	2021	0	0	0	0	0	0	0			
32	S. aureus	Positivo	SA-21-417	Iquique	Aji de Gallina con arroz	PPR	2021	0	0	0	0	0	0	0			
33	S. aureus	Positivo	SA-21-419	Osorno	Longeniza	CPC	2021	H	0	0	0	0	0	0			
34	S. aureus	Positivo	SA-21-420	Osorno	Sushi	PPR	2021	G,I	0	0	0	0	0	0			
35	S. aureus	Positivo	SA-21-421	Iquique	Hamburquesa	PPR	2021	G,I	0	0	0	0	0	0			
36	S. aureus	Positivo	SA-20-401	Iquique	Helado de Mango con lec	HLH	2020	0	0	0	0	0	0	0			
37	S. aureus	Positivo	SA-20-403	Iquique	Helado de Mango con lec	HLH	2020	A	0	0	0	0	0	0			
38	S. aureus	Positivo	SA-20-405	Iquique	Jugo de Mango leche	FRV	2020	G,I	0	0	0	0	0	0			
39	S. aureus	Positivo	SA-20-409	Talca	Ceviche de Salmón	PPR	2020	A	0	0	0	0	0	0			
40	S. aureus	Positivo	SA-20-410	Talca	Marscal	PPR	2020	0	0	0	0	0	0	0			
41	S. aureus	Positivo	SA-20-411	Iquique	Ensalada Lechuga manz	PPR	2020	0	0	0	0	0	0	0			
42	S. aureus	Positivo	SA-20-415	Iquique	Ensalada Choco lechuga	PPR	2020	D,J	0	1	0	0	0	0			
43	S. aureus	Positivo	SA-22-465	Vina del Mar	Bowl Simple Ensalada	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
44	S. aureus	Positivo	SA-22-468	Vina del Mar	Burrito Mechada	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
45	S. aureus	Positivo	SA-22-470	Vina del Mar	Completo Italiano	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
46	S. aureus	Positivo	SA-22-471	Quiliché	Burrito Mechada	PPR	2022	G,I	0	0	0	0	0	0			
47	S. aureus	Positivo	SA-22-474	Purranque	Queso Chanco	LPL	2022	0	0	0	0	0	0	0			
48	S. aureus	Positivo	SA-23-475	Iquique	Shawarma	PPR	2023	A	0	0	0	0	0	0			
49	S. aureus	Positivo	SA-23-476	Iquique	Shawarma	PPR	2023	A,B,H	0	0	0	0	0	0			
50	S. aureus	Positivo	SA-23-477	Iquique	Jugo de Mango	FRV	2023	0	0	0	0	0	0	0			
51	S. aureus	Positivo	SA-23-478	Iquique	Ceviche	PPR	2023	C,G,I	0	0	0	0	0	0			
52	S. aureus	Positivo	SA-19-397	Iquique	Helado	HLH	2019	G	0	0	0	0	0	0			
53	S. aureus	Positivo	SA-19-398	Pica - Iquique	Pajpa Mango	FRV	2019	G	0	0	0	0	0	0			
54	S. aureus	Positivo	SA-19-400	Vina del Mar	Ceviche Reina	PPR	2019	0	0	0	0	0	0	0			

Anexo 2. Manejo de residuos biológicos.

Uso de delantal de bioseguridad, guantes y gabinete de bioseguridad. Los desechos biológicos, material corto punzante y de vidrio producido en el proceso analítico, se eliminaron de acuerdo con las instrucciones establecidas por la Unidad de Salud Laboral y Prevención de Riesgos (SALPRI) del Instituto de Salud Pública de Chile.