

**Aislamiento de Bacterias Nosocomiales Circulantes en la Clínica Veterinaria
Lasallista Hermano Octavio Martínez López f.s.c.**

Trabajo de grado para optar por el título de Medicina Veterinaria

Sara Granados Acevedo

Jessica Uribe Buriticá

Asesores:

Andrés Felipe Londoño barbaran Dr.Sc.

Esteban Arroyave Sierra MSc.

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez Dr.Sc.

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias

Medicina Veterinaria

Caldas - Antioquia

2017

Tabla de contenido

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos	6
Metodología	7
Tipo de estudio epidemiológico.....	7
Área de estudio.....	7
Muestreo	7
Toma de muestras en ambientes.....	8
Toma de muestras en superficies	9
Condiciones de Bioseguridad	11
Análisis de laboratorio.....	12
Análisis del método de sedimentación para ambientes	12
Análisis del método de superficies.....	12
Aislamiento de colonias	13
Caracterización bioquímica	13
<i>Identificación de bacterias gram-negativas:</i>	14
<i>Identificación de bacterias gram-positivas:</i>	16
Conservación de aislados bacterianos	22
Resultados	23
Discusión	31
Conclusiones	35

Direcciones futuras.....	36
Bibliografía	37

Lista de tablas

Tabla 1: unidades de muestreo.	8
Tabla 2: medios de cultivo para aislamiento bacteriano.	13
Tabla 3: pruebas bioquímicas del sistema API 20 E.....	14

Lista de figuras

Figura 1: método de sedimentación.	9
Figura 2: método de hisopado.....	10
Figura 3: método de enjuague.	11
Figura 4: incubación de muestras colectadas.	12
Figura 5: interpretación resultados API 20 E.....	16
Figura 6: características morfológicas de colonias.....	24
Figura 7: distribución de los agentes en las diferentes áreas de las clínicas en el primer muestreo.....	29
Figura 8: distribución de los agentes en las diferentes áreas de la clínica en el primer muestreo.....	30

Lista de Gráficas

Gráfica 1: esquema de identificación para Bacillus sp.	20
Gráfica 2: esquema de identificación para Cocos gram-positivos.	21
Gráfica 3: porcentaje de contaminación bacteriana en las áreas muestreadas de la clínica.....	25
Gráfica 4: presencia de cocos y bacilos gram-positivos y gram-negativos durante los dos muestreos.....	26
Gráfica 5: identificación taxonómica de los microorganismos.....	27
Gráfica 6: taxones significativos en el segundo muestreo para gram negativas.....	28

Resumen

Objetivo. Este estudio se desarrolló con el objetivo de establecer la presencia de bacterias asociadas a infecciones hospitalarias en ambientes y superficies de la clínica veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez López f.s.c. **Metodología.** Se realizaron dos muestreos en el tiempo, para cada uno de ellos se evaluaron ambientes y superficies de 8 unidades diferentes de la clínica, por medio del método de sedimentación y torunda respectivamente, las muestras positivas se determinaron por presencia de microorganismos en los medios de cultivo empleados, los aislados más representativos fueron purificados y sometidos a caracterización bioquímica para determinar género y especie. **Resultados.** Se obtuvieron 270 aislados, en los dos muestreos realizados en las 8 áreas de la clínica, de este total se categorizaron por caracterización morfológica de las colonias 95 aislados, 61 pertenecían al primer muestreo y 34 al segundo. De acuerdo a la caracterización por Gram, el 47% fueron gram-negativas y 53% y gram-positivas. Estos resultados permitieron la identificación de especies bacterianas relacionadas con infecciones nosocomiales o intrahospitalarias.

Palabras clave: muestreos, bacterias, aislados, identificación, nosocomiales.

Introducción

Las enfermedades nosocomiales o más recientemente conocidas como infecciones asociadas a hospitales o HAIs (por sus siglas en inglés Hospital-associated infections), corresponden a aquellas infecciones que se presentan en un paciente en contacto con un hospital o en un establecimiento de atención de salud. Este tipo de infecciones han sido ampliamente estudiadas en hospitales humanos, donde hoy en día son el foco de la investigación y el desarrollo de estrategias de prevención y control debido a los altos costos económicos y de vidas humanas que representan. En humanos, se estima que un 5% de los pacientes hospitalizados desarrollan una infección hospitalaria, produciendo la muerte de 75.000 pacientes al año (Centers for Disease Control and Prevention, 2014), y costes médicos directos anuales globales entre \$35.7 y \$45 billones de dólares solo en los Estados Unidos (Scott, 2009,3).

Entre los microorganismos relacionados con los HAIs, las bacterias y los virus son los agentes patógenos más comunes. Respecto a estos, las bacterias son consideradas como los agentes nosocomiales de mayor importancia, ya que son responsables del 90% de las HIAs. Estas se pueden clasificar en gram-positivas y gram-negativas y dentro de los agentes comúnmente identificados se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp., y *Acinetobacter baumannii* (Sievert et al., 2013,2).

La información a nivel de clínicas veterinarias es limitada, se han realizado estudios principalmente en países desarrollados, en los que se ha podido demostrar la presencia de infecciones hospitalarias en clínicas especializadas en equinos, donde se han identificado microorganismos tales como *Clostridium difficile*, considerado como el principal agente nosocomial responsable de diarrea infecciosa en equinos adultos (Båverud, 2002,3).

En pequeñas especies (perros y gatos) se ha determinado que la frecuencia de agentes asociados a hospitales incrementa según las prácticas de cuidados intensivos y hospitalización prolongada. En estos estudios se han identificado microorganismos con evidencia de propagación nosocomial e infecciones zoonóticas tales como *Acinetobacter* sp., *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* sp. y *Salmonella* sp. los cuales a menudo se asocian con bacteremias y/o enfermedades sistémicas, infecciones de las vías urinarias, vías respiratorias, cirugía, infecciones de heridas y diarrea infecciosa (Umber & Bender, 2009,5).

El interés en el estudio de HAIs en pequeñas especies ha incrementado en los últimos años debido a factores que predisponen a la transmisión e infección en estas especies, como son, largos tiempos de hospitalización, uso prolongado de tratamientos complejos, uso común de inmunosupresores, pacientes en estado crítico, frecuencia de multirresistencia a antibióticos y el riesgo zoonótico (Boerlin, Eugster, Gaschen, Straub, & Schawalder, 2001,1).

En un estudio desarrollado en varios hospitales universitarios de referencia de los Estados Unidos, se encontró que el 16% de los perros y el 12% de los gatos presentaron

al menos un brote relacionado con un agente nosocomial mientras estuvieron hospitalizados (Ruple-Czerniak et al., 2013,1). De igual manera, en una encuesta llevada a cabo en 38 hospitales de enseñanza veterinaria de Estados Unidos y Europa, se reportó que el 82% de los encuestados reconoció haber presentado brotes de HAIs en los 5 años anteriores a la entrevista (Benedict, Morley, & Metre, 2008,1).

En Sur América se han realizado algunos trabajos enfocados principalmente en infecciones nosocomiales de animales intervenidos en clínicas veterinarias donde se identificaron agentes como *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus intermedius*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, y *Pantoea agglomerans* (Avendaño Rojas, 2006; Bahr Arias, Aiello, Battaglia, & De Freitas, 2013).

En Colombia hay dos reportes sobre este tema, uno realizado en Bogotá a partir de muestras clínicas y del ambiente de diferentes centros veterinarios, donde se encontró que 89 (55.6%) de los aislados correspondían a cepas bacterianas gram-negativas, de las que se aislaron 10 cepas multiresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (11.2%) (Bernal-Rosas, Osorio-Muñoz, & Torres-García, 2015,1). El segundo estudio fue realizado en la ciudad de Ibagué donde el objetivo fue aislar bacterias nosocomiales que circulan en ambientes de varias clínicas veterinarias, encontrando que en todas las áreas de las 10 clínicas incluidas en el estudio, existía presencia de bacterias potencialmente patógenas multiresistentes (Sánchez, Gutiérrez, Padilla, & Suárez, 2015,1).

En el área metropolitana del Valle de Aburra, hasta el momento, no se conoce ninguna publicación que haga algún acercamiento en este tema en clínicas veterinarias,

a pesar del gran número de estas en la ciudad, lo cual hace que sea indispensable realizar un primer acercamiento en esta área que permita identificar cuáles son las bacterias nosocomiales que potencialmente puedan estar circulando en la clínica veterinaria de la Corporación Universitaria Lasallista y determinar el riesgo de transmisión e infección tanto para los animales como para las personas que frecuentan este lugar.

Los resultados obtenidos en este estudio pretenden, inicialmente, crear conciencia sobre el riesgo animal y de salud pública que representan las HAIs, y a largo plazo se espera, con ayuda del laboratorio de microbiología industrial, sentar las bases para la creación de un sistema de vigilancia ambiental en la clínica lo cual conllevaría en el futuro a mejorar la toma de decisiones frente a las estrategias de prevención y control de estos agentes, permitiendo a su vez una mejor respuesta de los pacientes que ingresan a la clínica, por consiguiente se vería reflejado en menos gastos por parte de los propietarios y en la salud del personal que circula alrededor de las instalaciones.

Adicionalmente, este trabajo abre las puertas para afianzar el conocimiento de los médicos veterinarios con aspectos asociados a infecciones hospitalarias y su importancia, además, aporta información valiosa para el desarrollo de un programa de vigilancia en la clínica, y crea las bases para futuros trabajos de investigación, tanto de pregrado como de posgrado, dirigidos hacia la búsqueda de factores de virulencia en las cepas aisladas, resistencia a antibióticos y epidemiología molecular.

Objetivos

Objetivo general

Establecer la presencia de bacterias asociadas a infecciones hospitalarias en ambientes y superficies de la clínica veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez López f.s.c.

Objetivos específicos

- Cultivar y aislar bacterias asociadas a ambientes y superficies de la clínica veterinaria.
- Seleccionar morfológicamente las colonias más representativas.
- Identificar bioquímicamente las colonias que fueron previamente seleccionadas.
- Determinar los sitios de mayor riesgo de contraer una infección nosocomial en la clínica veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez.

Metodología

Tipo de estudio epidemiológico

Este es un estudio de tipo observacional descriptivo, donde específicamente se busca determinar la frecuencia y distribución de los HAIs en el sitio de estudio.

Área de estudio

El estudio se realizó en la clínica veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez López f.s.c. la cual se encuentra ubicada en el municipio de Caldas (Antioquia) ($6^{\circ}05'59.1''N$ $75^{\circ}38'18.8''W$). Este es un centro de atención de servicios integrales en salud animal para grandes y pequeñas especies, que ofrece servicios de medicina interna, cirugía, imagenología y ayudas diagnósticas, laboratorio clínico diagnóstico y asesorías en problemas de medicina y salud animal.

Muestreo

Se realizaron dos muestreos, el primero en septiembre de 2016 y el segundo en abril de 2017. Cada visita para la toma de muestras fue hecha sin previo aviso al personal médico y en horas laborales.

Durante cada actividad se tomaron muestras de ambientes y superficies en cada una de las ocho unidades de estudio (ver tabla 1), por cada sitio se tomaron 8 muestras de ambientes y 8 de superficies para un total de 16 muestras. Cada recipiente fue rotulado y codificado, de forma tal que permitió garantizar la trazabilidad de los análisis.

Tabla 1: unidades de muestreo.

UNIDAD DE MUESTREO	CANTIDAD
Consultorio veterinario	2
Cuarto de infecciosos	2
Área de cirugía	1
Cuarto de preparación- recuperación	1
Hospitalización	1
Urgencias	1

En todas las unidades de muestreo se evaluó la calidad microbiológica de ambientes y superficies. Se tomaron muestras en mesones y en los sitios de hospitalización y cuarto de infecciosas se evaluaron las superficies de las jaulas, adicionalmente, se tomaron muestras de superficies vivas como las manos del personal médico que se encontraba laborando en el momento del muestreo.

Las muestras recolectadas fueron almacenadas en neveras de polipropileno, bajo condiciones de refrigeración ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) hasta su llegada al laboratorio de microbiología Industrial de la Corporación Universitaria Lasallista, donde se llevaron a cabo los análisis microbiológicos propuestos.

Toma de muestras en ambientes

La evaluación de la carga poblacional microbiana en el ambiente de las diferentes unidades propuestas, se llevó a cabo a través de la implementación del método de

sedimentación, el cual consiste en la exposición al ambiente de las cajas de Petri, que contienen diferentes medios de cultivo (selectivos y diferenciales), durante un tiempo de 15 min (ver figura 1).



Figura 1: método de sedimentación.

Toma de muestras en superficies

Para superficies inertes como mesones y jaulas, se empleó la metodología de hisopado (González, 2014), para la cual se utilizaron hisopos médicos multiusos y estériles.

Durante el muestreo, se tomó el hisopo estéril, y se hizo un barrido sobre la superficie a evaluar, cada una en dirección opuesta a la anterior y finalmente se almacenó en la solución diluyente, que consiste en agua peptonada buferada, para luego sembrar las muestras en los agares selectivos (ver figura 2). El agua peptonada con la

muestra al interior se llevaba al laboratorio y se sembraba directamente sobre los medios de cultivo, para el caso de esporulados como *Clostridium sp* y *Bacillus sp*, se calentaban a 80°C durante 10 minutos para eliminar biota acompañante y liberar esporas; luego se inoculaban en agar sangre para permitir el crecimiento de clostridiales (anaeróticamente) y agar nutritivo para bacilos esporulados (aeróticamente).

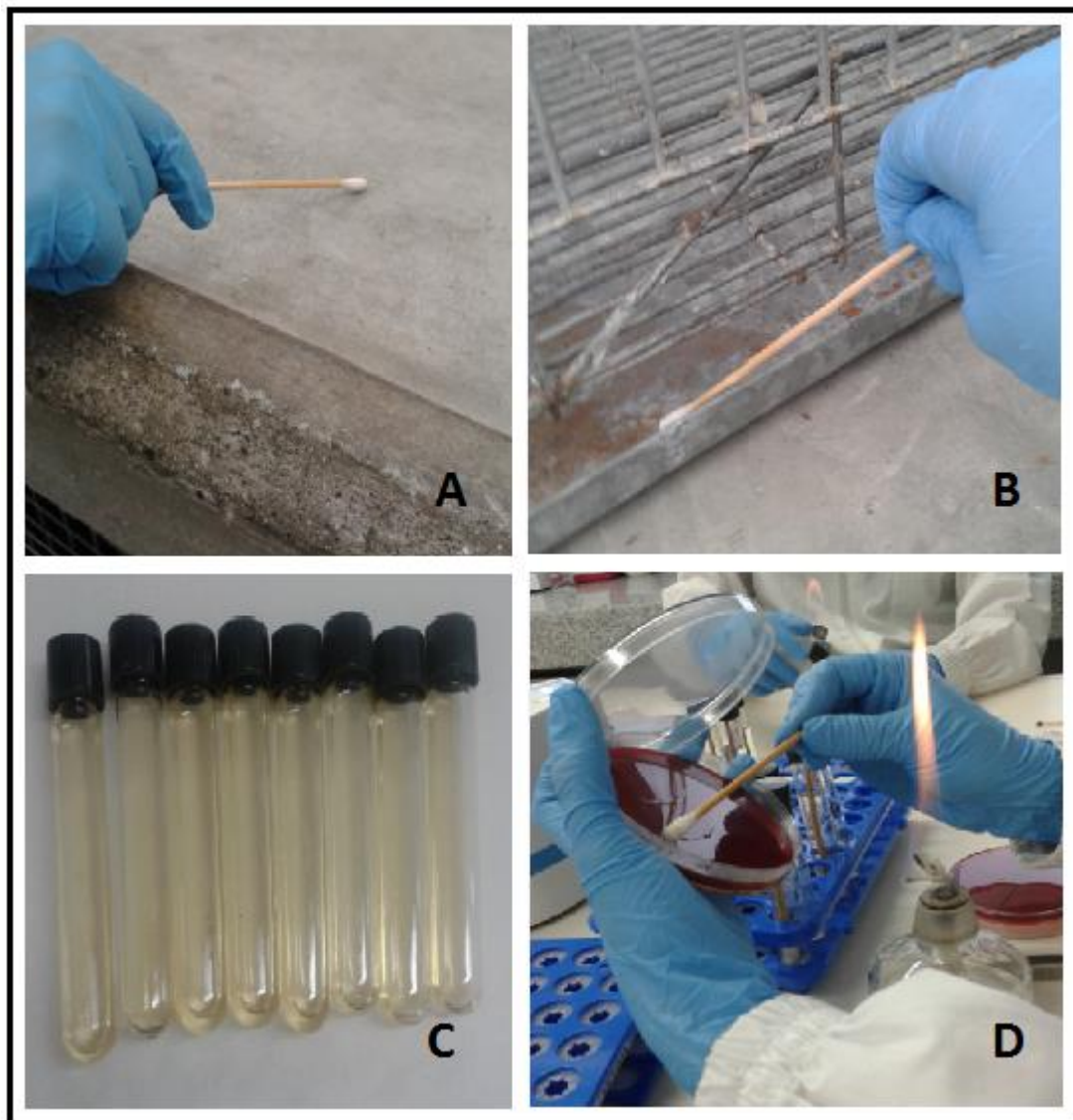


Figura 2: método de hisopado; A: hisopado de mesones; B: hisopado de jaulas; C: agua peptonada; D: siembra de muestras.

Para las superficies vivas como las manos del personal médico, se utilizó la metodología de enjuague, donde el personal presente en el momento del muestreo introduce sus manos en el medio de cultivo nutritivo, el cual posteriormente se llevó a incubación a 37°C por 24 horas. (ver figura 3)



Figura 3: método de enjuague.

Condiciones de Bioseguridad

Durante todo el procedimiento los analistas utilizaron bata de laboratorio, guantes de látex, cofia, tapa bocas y zapatos cubiertos. Adicionalmente, se empleó una cabina de flujo laminar para la siembra de los cultivos.

Análisis de laboratorio

Análisis del método de sedimentación para ambientes

Una vez recolectadas las muestras, las cajas fueron incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ver figura 4), con lecturas a las 24 y 48 horas. Las cajas con Agar sangre que no reportaron crecimiento a las 32 horas, se dejaron en incubación durante otras 24 a 48 horas, con seguimiento de los cambios aparentes en el medio de cultivo, lo anterior con el fin de minimizar el reporte de falsos negativos en las muestras.



Figura 4: incubación de muestras colectadas.

Análisis del método de superficies

Una vez realizado el muestreo, se agitaron los tubos con las muestras de forma vigorosa y se incubaron durante 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, posteriormente, se inoculó la

muestra en cajas de Petri, con medios de cultivos selectivos descritos en la tabla 2 y se realizaron lecturas a las 24 y 48 horas. Las cajas que no reportaron crecimiento se dejaron en incubación durante 24 o 48 horas más, con seguimiento diario.

Tabla 2: medios de cultivo para aislamiento bacteriano.

Medio de cultivo	Agente o Indicador
Agar Sangre	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Clostridium</i> sp.
Agar Mac-Conkey	Enterobacterias.
Agar M17	Bacterias ácido lácticas.
Agar Baird-Parker	<i>Staphylococcus</i> sp.
Agar Manitol sal	<i>Staphylococcus</i> sp.
Agar EMB	<i>Escherichia coli</i>
Agar Cetrimide	<i>Pseudomonas</i> sp.
Agar nutritivo	Mesofilos

Aislamiento de colonias

Las colonias caracterizadas morfológicamente de cada una de las poblaciones obtenidas a partir de los análisis microbiológicos en ambientes y superficies, fueron purificadas a través del método de agotamiento en superficie empleando para ello agar nutritivo y se hizo lecturas 24 horas después. Adicionalmente, se realizó una tinción diferencial de gram para diferenciar las colonias entre gram-negativos y gram-positivos.

Caracterización bioquímica

Una vez purificadas las colonias fueron caracterizadas bioquímicamente por pruebas bioquímicas como API20E para bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae* y bacilos gram-negativos (108 especies), la lectura se hizo según

los criterios del fabricante (Tovar, 2016). Para la identificación de cocos y bacilos gram positivos se realizaron pruebas bioquímicas convencionales.

Identificación de bacterias gram-negativas:

La batería de pruebas API 20 E es un sistema de identificación rápido para bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otras bacterias gram-negativas. Básicamente consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados que se leen mediante una base de datos, los microtubos compuestos por un pocillo y una cúpula, contiene distintos sustratos bioquímicos deshidratados (“APÉNDICE G,” n.d.).

Tabla 3: pruebas bioquímicas del sistema API 20 E.

PRUEBA	ENZIMA
ONPG	Beta galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina
ODC	Ornitina
URE	Urea
CIT	Citrato sódico
H ₂ S	Tiosulfato sódico
GEL	Gelatina de Kohn
GLU	Glucosa
MAN	Manitol
INO	Inositol
RHA	Ramnosa
SAC	Sacarosa
MEL	Melibrosa
AMY	Amigdalina
ARA	Arabinosa

Inicialmente se realizó la preparación de la suspensión bacteriana, tomando cada una de las colonias aisladas, se suspendió homogéneamente en 5 ml de solución salina,

posterior a esto, se siembra en la galería API 20 E, llenando con la suspensión bacteriana cada pocillo de la galería.

Los microtubulos CIT VP, GEL, se llenaron completamente hasta la cúpula. Las cúpulas de los microtubulos ADH, LDC, ODC, URE, H₂S, se llenaron con parafina líquida para obtener anaerobiosis. Posteriormente se deposita la galería en una cámara húmeda, para incubar a 37°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas se revisaron las galerías, aquellas que no contaban con más de tres pruebas positivas se incubaron 24 horas más. A las galerías que presentaban más de tres pruebas positivas, se les realizó la lectura de los resultados inmediatamente al salir de la incubadora (figura 1) y se revelaron las reacciones correspondientes de la siguiente manera:

En el microtubo TDA, se añadió una gota del reactivo fenilalanina (FeCl₃) al 10 %, se realizó la lectura inmediatamente después de la adición de este en el microtubo, la reacción de esta se consideró positiva en presencia de coloración marrón-rojiza.

En el microtubo VP se añadió una gota de KOH al 40% y una gota de alfa naftol, se esperaron 10 minutos para leer la prueba, y se determinaron positivas las reacciones que generaron un color rosa fuerte o roja.

En el microtubo IND se añadió una gota del reactivo Kovac's, se esperaron dos minutos para leer el resultado de las pruebas y se determinaron positivas las reacciones que generaron un anillo rosa-rojo o una coloración roja uniforme por toda la cúpula.

Se realizó la prueba para reducción de nitritos a nitratos en el microtubo GLU, añadiendo una gota del reactivo de Griess; una coloración rojiza indica una reacción positiva, las reacciones negativas de esta prueba se confirmaron con polvo de zinc, en

los casos en que luego de la adición, no se generaba una coloración roja, se determinó la prueba como negativa (Martinez, 2015).

Luego de esto, se realizó la prueba de oxidasa, añadiendo tres gotas del reactivo oxidasa en un cultivo reciente, se consideró positivo el resultado tras la aparición de una coloración azulada.

Para la identificación bacteriana se usó el software de identificación api web.



Figura 5: interpretación resultados API 20 E.

Identificación de bacterias gram-positivas:

La identificación de las bacterias gram-positivas se realizó por medio de pruebas bioquímicas convencionales.

Para la implementación de las diferentes pruebas bioquímicas se utilizaron los fundamentos, medios de cultivo y condiciones de incubación que recomienda Álzate, 2009 (Alzate Tamayo, 2009). Con el fin de identificar las especies de bacilos y cocos gram- positivos, se desarrollaron las siguientes pruebas:

La prueba de la Catalasa, se llevó a cabo por el método de portaobjetos, donde se tomó una colonia obtenida de agar Nutritivo, se puso sobre un portaobjetos, y se

adiciono una gota de H_2O_2 al 30%. La presencia de un burbujeo inmediato indica formación de O_2 , considerándose como prueba catalasa positiva.

La Hidrolisis de Almidón, se verifico, mediante el uso de agar almidón donde se sembró haciendo una estría central sobre la superficie del medio y se incubo a $35^\circ C$ durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se cubrió completamente el medio de cultivo con Lugol, el almidón intacto forma un complejo purpura o azul oscuro con el Lugol, cuando se genera hidrolisis se observa la formación de un halo transparente alrededor de la línea de crecimiento.

El medio RM/VP, inoculado e incubado, a $37^\circ C$ por 24 horas, fue utilizado para la determinación de las pruebas Rojo de Metilo (RM) Y Voges Proskauer (VP). Para la prueba de RM se usó, como reactivo revelador, una solución indicadora de rojo de metilo, se consideró como positivas las muestras que después de la adición de la solución conservaron un color rojo brillante estable en la superficie del medio. Para la prueba VP, se usaron como reactivos reveladores, Alfa Naftol al 5% y KOH al 40%, las reacciones que generaron un color rojo, fueron consideradas positivas.

La prueba Citrato, se verificó mediante el uso del medio Citrato Simmons, se inoculó sola la superficie inclinada del agar, por estría, con un inculo escaso, se incubó a $37^\circ C$ por 72 horas. Las pruebas que luego del periodo de incubación manifestaron un viraje azul oscuro, se consideraron positivas.

La prueba de reducción de nitratos se llevó a cabo con el medio Nitrato Movilidad, que permitió determinar simultáneamente movilidad y reducción de nitratos. Se inoculó con el asa de aguja en el agar a 5 mm antes del fondo, se incubó a $37^\circ C$ por 24 horas.

Para la movilidad se puso en manifiesto la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor de la línea de inoculación. Para los nitritos se utilizó reactivo de Griess, la aparición de una coloración rosada o roja fue el indicador de prueba positiva. Para la verificación de la reducción hasta N_2 , se agregó una pizca de Zinc.

La capacidad de crecimiento de los microorganismos en presencia de NaCl, se verificó mediante el uso de agar nutritivo, enriquecido con NaCl al 6.5%, el crecimiento de colonias en este, se consideró como resultado positivo.

La prueba de fermentación de los hidratos de carbono: Glucosa, Arabinosa, Manitol y Xilosa, se llevó a cabo utilizando el medio básico Caldo Rojo de Fenol, al que se le adicionó cada uno de los carbohidratos. Se sembraron cada uno de los tubos y se incubaron a 37°C por 24 horas. El cambio de color rojo a amarillo y la producción de gas se consideraron resultados positivos.

Para determinar la estabilidad de los microorganismos a una temperatura de 55°C (ver Gráfica 1), se realizó cultivo de cada cepa en agar nutritivo, se incubó a 55°C por 24 hora. Se evaluó la estabilidad, dependiendo si se observaba crecimiento o no de cada cepa.

La verificación del crecimiento y licuefacción de la gelatina se realizó con el medio de cultivo gelatina. Se inoculó la muestra por punción, se incubó a 37° por 72 horas, pasado este tiempo, se refrigeró por treinta minutos, al sacar los tubos de la nevera, los medios que permanecieron líquidos después de esto se consideraron positivos a licuefacción.

La verificación del hemolisis se realizó por medio de agar sangre. Se determinó como hemolisis Gama, cuando el microorganismo no generaba hemolisis del agar; hemolisis Beta, cuando se presentaba una hemolisis completa del agar, observándose completamente transparente alrededor del crecimiento; y hemolisis Alfa, cuando se presentaba una hemolisis incompleta, no se observaba transparencia total.

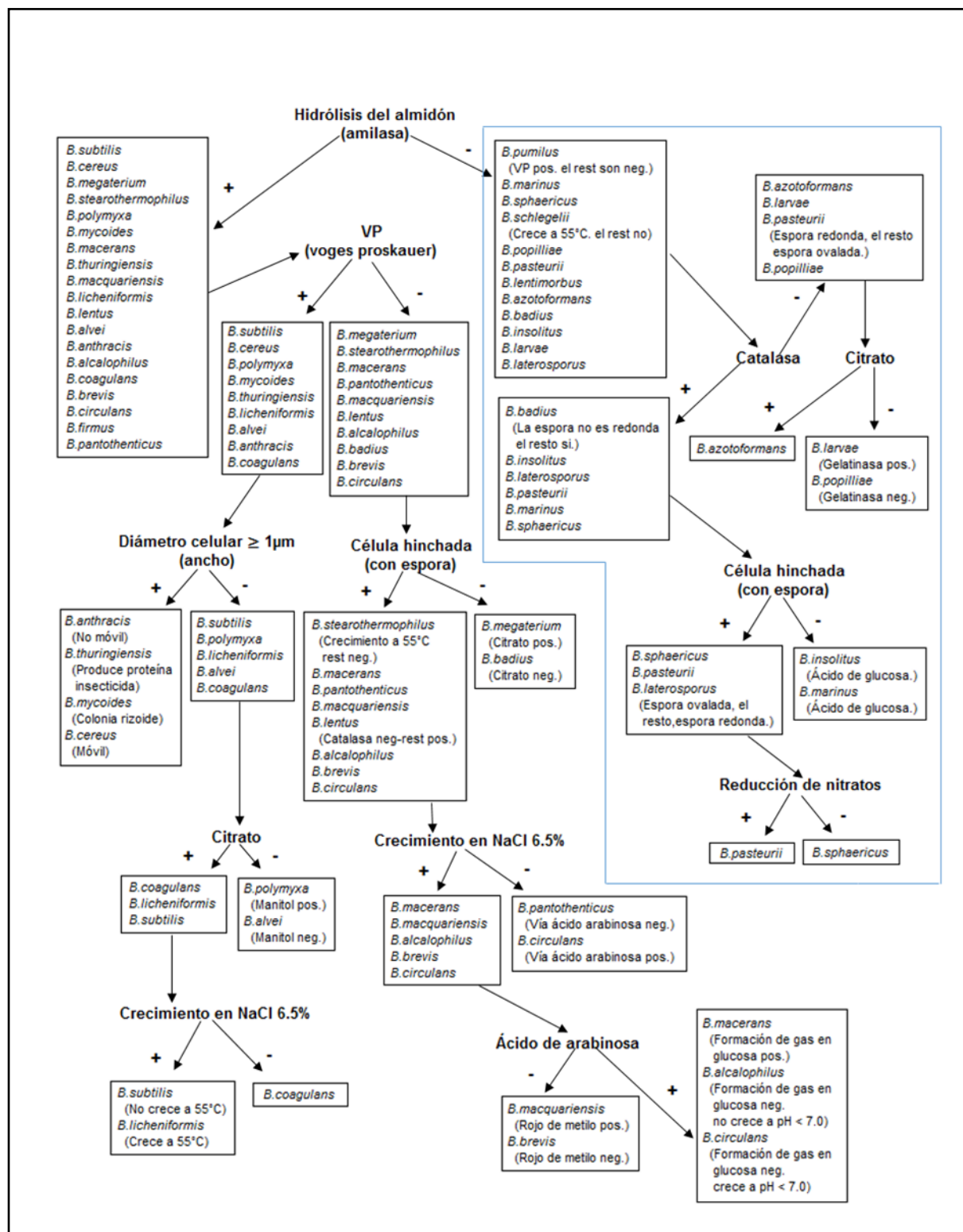
Para la realización de la prueba de la esculina se utilizó el medio de cultivo, agar Bilis Esculina, que permite leer la hidrolisis de la esculina por la presencia de un color negro o castaño oscuro en la superficie del medio.

La verificación de crecimiento en medio de telurito se realizó utilizando agar Baird Parker enriquecido con telurito. El crecimiento de colonias en este, se consideró como un resultado positivo.

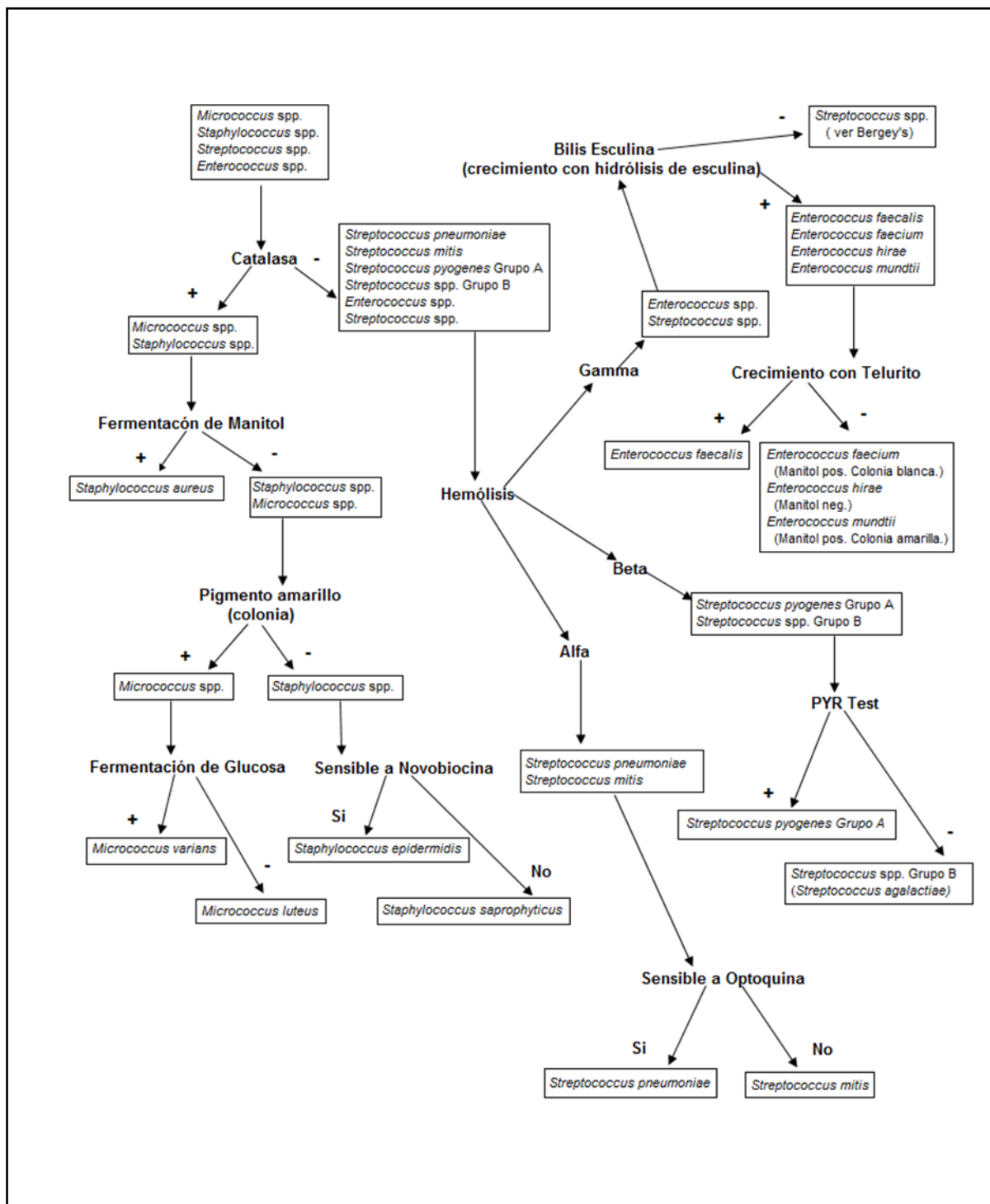
Para la prueba de TSI y verificación de la producción de SH₂, se utilizó el agar triple azúcar y el medio Hugh-Leifson fue utilizado para la prueba de oxidación-fermentación.

Los esquemas de identificación usados se observan en las gráficas 1 (*Bacillus* sp.) y 2 (cocos gram-positivos).

Gráfica 1: esquema de identificación para *Bacillus* sp. (Adaptado del libro Bergey's manual of determinative bacteriology).



Gráfica 2: esquema de identificación para Cocos gram-positivos (adaptado del libro Bergey's manual of determinative bacteriology).



Conservación de aislados bacterianos

Con el fin de garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad de las colonias aisladas a través del tiempo, se empleó la técnica de conservación a -80°C , la cual permite el almacenamiento adecuado de los aislados y la recuperación efectiva de los mismos.

Durante la conservación se empleó glicerol al 15%, como compuesto crioprotector, con el fin de reducir la cantidad de hielo que se produce y evitar el aumento de la concentración iónica. El glicerol ha demostrado ser un buen protector ya que sus características moleculares le permiten simular una vitrificación alrededor de la bacteria, lo cual impide que las formaciones de cristales de hielo lesionen las membranas citoplasmáticas. (Leal & Ramírez, 2005).

Resultados

La clínica veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez López f.s.c. aceptó que los muestreos se realizaran sin previo aviso en sus instalaciones y al personal que se encontraba en la clínica al momento de la toma de muestras.

Durante los dos muestreos realizados (septiembre de 2016 y abril del 2017); se obtuvo un total de 270 aislados correspondientes a 8 áreas de la clínica (ver tabla 1), usando un total de 16 medios de cultivos por área, entre ellos medios selectivos, para el crecimiento de poblaciones bacterianas específicas. Se utilizó 8 medios de cultivo para microorganismos ambientales y 8 para microorganismos existentes en superficies (ver tabla 2), y un total de 14 medios básicos o de aislamiento primario como agar nutritivo para las manos del personal.

Se pudo determinar la presencia de colonias bacterianas en cada uno de los agares selectivos y diferenciales empleados durante los 2 muestreos. Los análisis fueron determinados por el crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo así: cocos gram positivos como *Micrococcus* sp y *Staphylococcus* sp. en agar Manitol sal y Baird Parker, β hemolíticos anaerobios como *Streptococcus* sp y *Clostridium* sp en agar sangre, *Pseudomona aeruginosa* en agar Cetrimide y gram negativas en agar MacConckey y EMB. Para el género *Bacillus* sp, las muestras se procesaron previamente a la siembra mediante el calentamiento a 80°C, de la misma forma se seleccionó los microorganismos clostridiales.

El número total de aislados obtenidos fue de 270, en los dos muestreos realizados en las 8 áreas evaluadas de la clínica, de este total se categorizaron 95 aislados por caracterización morfológica de las colonias como color (blanca, amarillosa, negra o morada), forma (circular, puntiforme o irregular), textura (seca o viscosa), elevación y presencia de halo (ver figura 6)

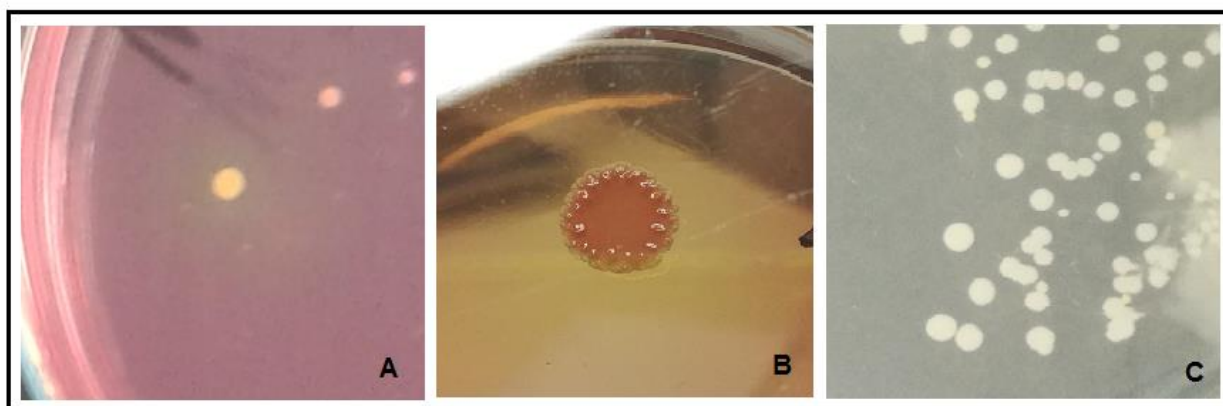
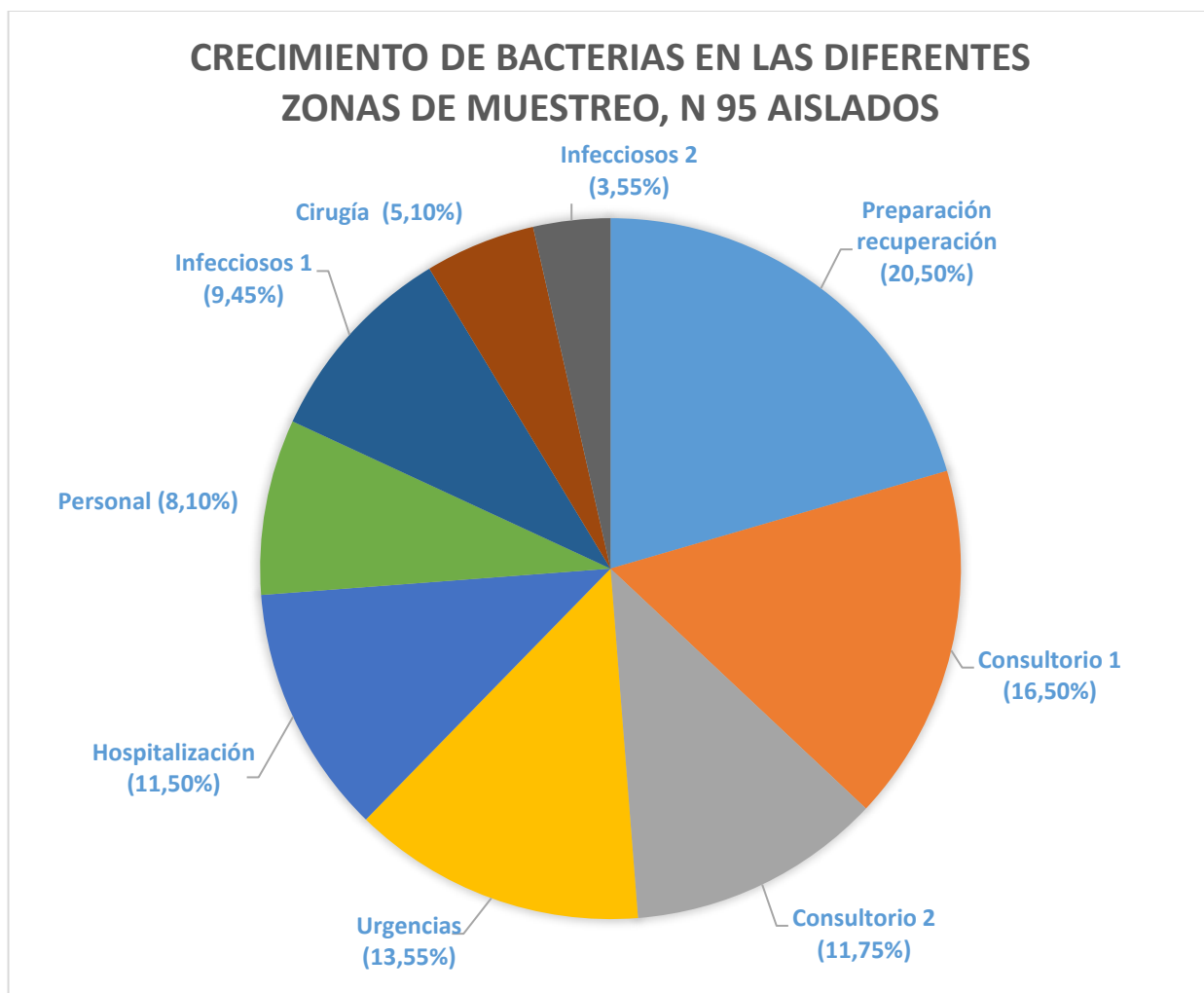


Figura 6: características morfológicas de colonias; A: colonia amarilla de forma circular; B: colonia rosada de apariencia irregular; C: colonias blancas de formas circulares.

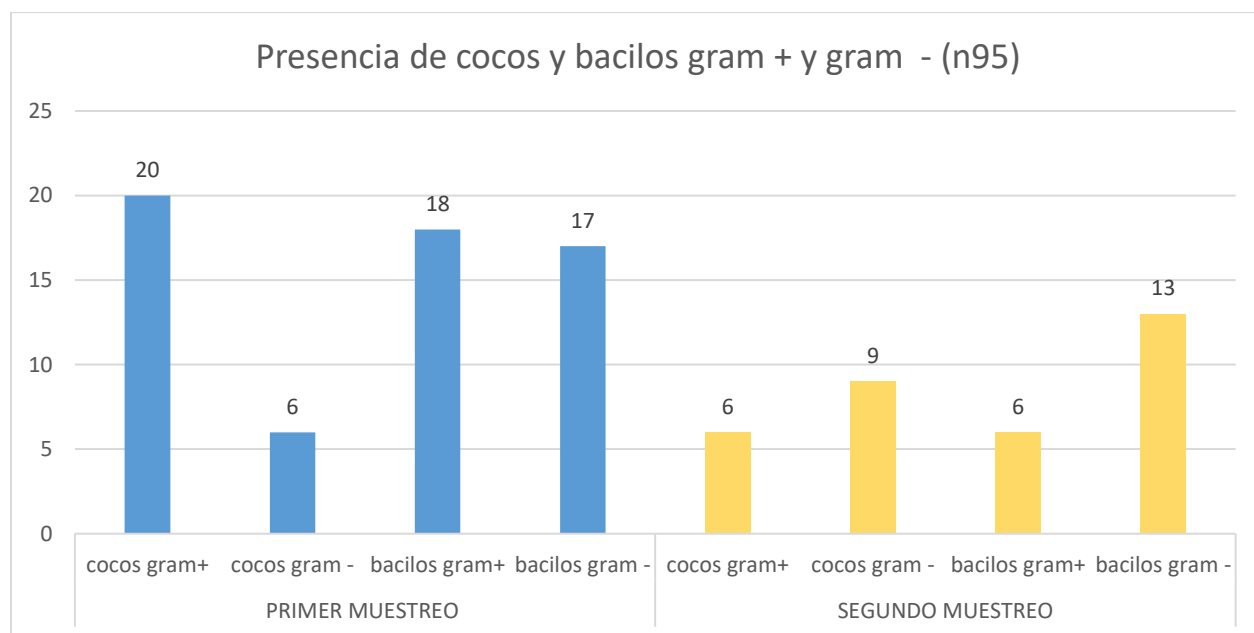
En todas las áreas muestreadas de la clínica se evidenció crecimiento de microorganismos, encontrando en algunas zonas mayor contaminación que en otras, como es el caso del consultorio 1 y de la zona de preparación -recuperación, los datos se muestran en la gráfica 5. El porcentaje más bajo de contaminación se encontró en la zona de infecciosos 2.



Gráfica 3: porcentaje de contaminación bacteriana en las áreas muestreadas de la clínica.

De los 95 aislados obtenidos, 61 corresponden al primer muestreo y 34 al segundo. El total de colonias fueron diferenciadas y clasificadas como gram-positivas y gram-negativas a través de la tinción de Gram, donde se pudo determinar que el 47% de los organismos cultivados correspondían a bacterias gram-negativas y el 53% a bacterias gram-positivas. A su vez el método de tinción permitió determinar las formas bacterianas como cocos y bacilos y colibacilos gram negativos como es el caso de algunas coliformes

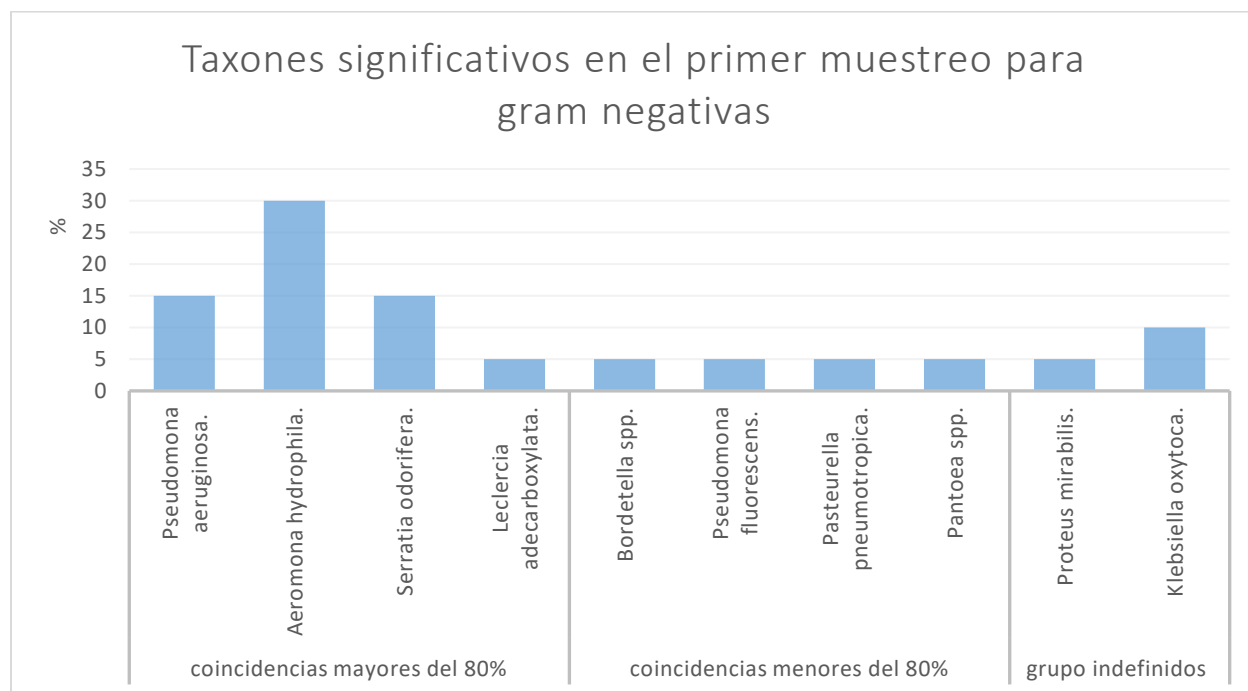
(ver Gráfica 6), siendo útil para la realización de las pruebas bioquímicas que ayudan en la identificación taxonómica, luego con esta determinación taxonómica se puede definir si tienen potencia nosocomial.



Gráfica 4: presencia de cocos y bacilos gram-positivos y gram-negativos durante los dos muestreos.

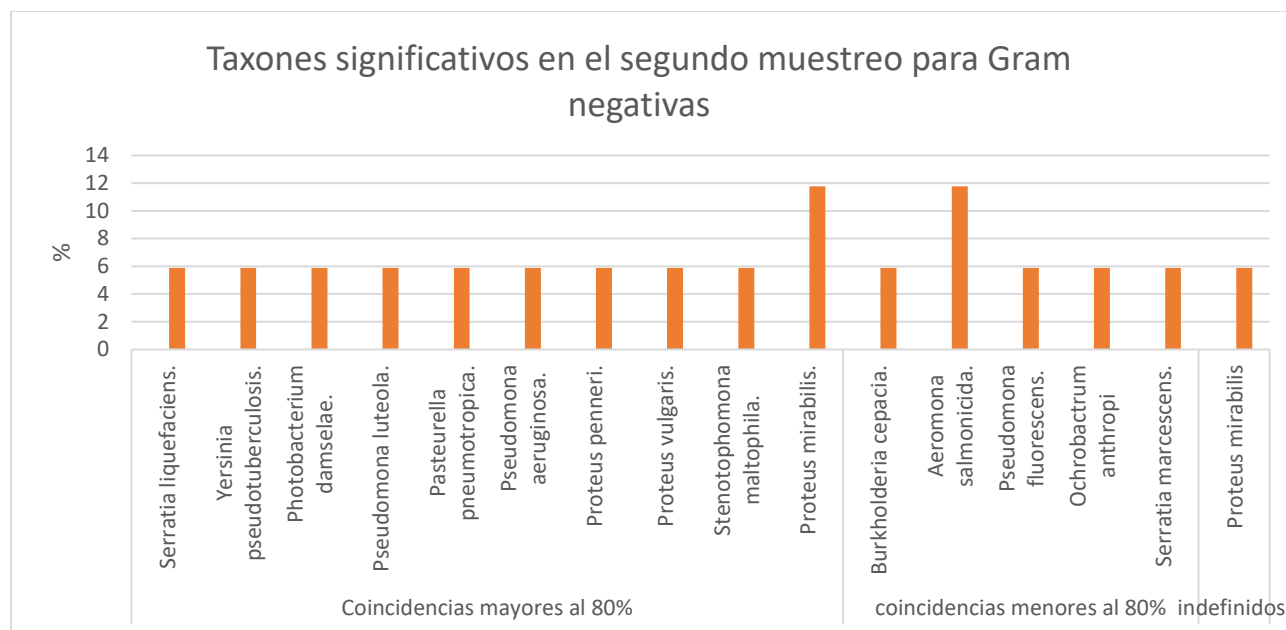
Para la identificación taxonómica de los microorganismos gram-negativos se realizó la prueba bioquímica basada en el índice analítico de perfil (API 20E), logrando identificar 25 especies bacterianas tal cual como se encuentra en la gráfica 5, encontrando grupos taxonómicos con coincidencias superiores al 80%. *Aeromona hydrophyla* es una de las bacterias con los porcentajes más altos encontrados en los muestreos 30%, seguida de *Pseudomonas aeruginosa* (15%) y *Serratia odontifera* (1.5%). Se encontraron taxones con coincidencias en el software APIweb, menores al 80%, donde se encontraron microorganismos como *P.fluorescens*, *Bordetella* sp. *Pausterella pneumotropica* y *Pantoea* sp. Los grupos no definidos fueron categorizados como

Proteus mirabilis y *Klebsiella oxytoca*. Estos resultados fueron descritos para el primer muestreo.



Gráfica 5: identificación taxonómica de los microorganismos.

Para el segundo muestreo se encontraron microorganismos como *Proteus mirabilis* y *Aeromonas salmonicida* con porcentajes de contaminación del 11% cada uno, distinguiéndose como los más altos del muestreo. Es importante anotar que se presentó mayor diversidad bacteriana que en los hallazgos encontrados en el muestreo (ver Gráfica 6).



Gráfica 6: taxones significativos en el segundo muestreo para gram negativas.

En el caso de las bacterias gram-positivas, la caracterización bioquímica se realizó a través de los métodos convencionales, donde se logró aislar e identificar 8 colonias las cuales correspondían a las especies *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*/*Streptococcus mitis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, y *Bacillus alvei*.

Para cada sitio de la clínica se pudo determinar que al menos un agente nosocomial potencial fue identificado en cada uno de los muestreos (ver figuras 7 y 8). De otro lado, se pudo evidenciar que el área de preparación/recuperación fue la que registró una mayor presencia de indicadores microbianos, en tanto que el área de cirugía reportó la menor presencia de microorganismos.

PLANO CLINICA MUESTREO 1

Infeciosos 2 <i>Serratia odorifera</i>	Hospitalización <i>Leclercia adecarboxylata</i>	Preparación/Recuperación <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Aeromona hydrophila</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Serratia odorifera</i>		Cirugía <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Bordetella spp.</i>
		Infeciosos 1 <i>Pseudomona aeruginosa</i>		
Personal <i>Aeromona hydrophila</i>	Urgencias <i>Pseudomona aeruginosa</i>			
	Consultorio 2 <i>Pasteurella pneumotropica</i> <i>Basillus cereus</i>			
	Consultorio 1 <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Aeromona spp.</i> <i>Pseudomona fluorescens</i>			

Figura 7: distribución de los agentes en las diferentes áreas de la clínica en el primer muestreo (en rojo los agentes nosocomiales).

PLANO CLÍNICA MUESTREO 2

Infeciosos 2 <i>Burkholderia cepacia</i>	Hospitalización <i>Proteus penneri</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Serratia marcescens</i>			
Infeciosos 1 <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i>		Preparación/Recuperación <i>Photobacterium damsela</i> <i>Proteus penneri</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Aeromona salmonicida</i> <i>Pseudomona luteola</i>		Cirugía <i>Pseudomona aeruginosa</i>
Personal <i>Aeromona hydrophila</i>	Urgencias <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i>			
	Consultorio 2 <i>Proteus mirabilis</i> <i>Achromobacter anthopi</i>			
	Consultorio 1 <i>Pseudomona fluorescens</i> <i>Aeromona salmonicida</i> <i>Pasteurella pneumotropica</i> <i>Proteus Mirabilis</i>			

Figura 8: distribución de los agentes en las diferentes áreas de la clínica en el segundo muestreo (en rojo los agentes nosocomiales).

Discusión.

Los microorganismos llegan a diferentes espacios en forma transitoria, ya sea directamente por animales o por el hombre e indirectamente por el aire, estableciéndose y colonizando como microbiota natural normal. Tal es el caso de los agentes bacterianos encontrados en la clínica veterinaria Lasallista Hermano Octavio Martínez López f.s.c., donde la población de patógenos intrahospitalarios llegaron como parte de las actividades propias de atención a los animales de la clínica y se establecieron como microorganismos intrahospitalarios, autores como Alpuche y Daza (2002) y Otero (2002) soportan el hecho de encontrar poblaciones representativas de patógenos intrahospitalarios nativas de los animales y/o de las personas que llegan a consulta u hospitalización (Alpuche C, 2002; Morfin R, Hernandez J, Arredondo J, 2002)

Estudios realizado por Marcelo (Avendaño Rojas, 2006) encontró que en el área de hospitalización se estableció la población más representativa de microorganismos con propiedades patógenas, resultados similares fueron hallados en esta investigación donde en el área de preparación-recuperación se presentaron los mayores niveles de contaminación; hecho que se explica por los procedimientos pre quirúrgicos y post quirúrgicos realizados en esta zona; además que en algunas ocasiones se dejan allí pacientes hospitalizados.

Otro hallazgo interesante es el nivel de contaminación del consultorio 1; es probable que esto se deba a la exposición ambiental que tiene el consultorio, por la circulación de pacientes y sus agentes causantes de enfermedad.

En relación a la identificación bacteriana a través del índice analítico de perfil API20E, según lo señalado en la tabla 4, las bacterias que se encontraron con mayor frecuencia fueron *Pseudomona aeruginosa*, *Pasteurella pneumotropica*, *Proteus mirabillis*, *Aeromonas* sp. las cuales se aislaron en los 2 muestreos, otra bacteria frecuente fue *Serratia odorífera* que se encontró en más de una de las áreas evaluadas, siendo estos asociados a infecciones hospitalarias que podrían poner en riesgo la salud humana y animal, estos hallazgos son soportados con los estudios realizados por Riveros y Ochoa en 2015, donde se determinó que bacterias de los géneros *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Pseudomona*, *Aeromonas*, *Yersinia* sp., entre otros, son los responsables de los casos más severos de infecciones intrahospitalarias, además de que podrían considerarse un proxy de mortalidad (Riveros & Ochoa, 2015).

Según el estudio de Bernal y col en 2015, las cepas de *Pseudomona aeruginosa* han mostrados resistencia a diferentes antibióticos; este microorganismo tuvo una alta frecuencia de aislamiento en este estudio con un 11.2% de 89 aislados gram-negativos (Bernal-Rosas et al., 2015). Este patógeno produce enfermedades recurrentes en los animales y los humanos, particularmente en los perros y gatos generando otitis, infección del tracto urinario y pioderma (Hariharan, Coles, Poole, Lund, & Page, 2006; Papich, 2013).

Pasteurella pneumotropica fue otro de los patógenos encontrados en esta investigación, Casas y col en 1995, caracterizaron este patógeno como un agente resistente a las condiciones medio ambientales permaneciendo por largos periodos de tiempo, afectando a pacientes inmunocomprometidos, tanto humanos como animales, y

están ligados a infecciones como conjuntivitis, rinitis, otitis y linfadenitis (Casals, Almela, Marco, & Sort, 1995)..

P. mirabilis, otro patógeno caracterizado en esta investigación, tiene predilección por el tracto urinario, su aparición y proliferación, en pacientes cateterizados y con neoplasias malignas, podría representar una amenaza por la resistencia antibiótica que presenta (Nagano, Shibata, Saitou, Nagano, & Arakawa, 2003).

Nagano y col en 2003 obtuvieron aislamientos multirresistentes de *P. mirabilis* de pacientes internados y ambulatorios, encontrando que las cepas presentaban multirresistencia a antibióticos (Nagano et al., 2003).

Serratia odorifera se ha documentado que es una causa de infección nosocomial, se asocia a casos de osteomielitis crónica y de shock séptico secundarios a infecciones por catéteres (Antonette B Climaco, 2017)

En cuanto a la identificación bacteriana de las gram-positivas por medio de pruebas bioquímicas convencionales se lograron agrupar 22 *Bacillus* sp. y 26 cocos gram-positivos. Se logró identificar taxonómicamente las especies *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*/*Streptococcus mitis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, y *Bacillus alvei*.

Los estudios realizados por Kuroki y col en 2009 indicaron que existen varios tipos de especies de *Bacillus* en entornos hospitalarios y que las cepas pueden causar bacteriemia nosocomial por infección vía catéter (Kuroki et al., 2009).

Los cocos son bacterias oportunistas que se convierten en patógenas cuando colonizan nichos donde normalmente no se encuentran, estos se han convertido en la principal causa de infecciones nosocomiales, especialmente de la circulación sanguínea, tracto urinario y sitios quirúrgicos (Olawale, Fadiora, & Taiwo, 2011).

Aunque no se tiene evidencia de presentación de infecciones hospitalarias en la clínica, la presencia de potenciales IAH encontradas en este estudio constituye un factor a tener en cuenta para minimizar los riesgos asociados a la salud de los pacientes y del personal de la clínica.

Conclusiones

Se pudo determinar la presencia de colonias bacterianas tanto en ambientes como en superficies durante los 2 muestreos, se lograron aislar 95 cepas de las cuales el 53% fueron bacterias gram-positivas y 47% gram-negativas.

Se identificaron taxonómicamente 21 cepas potenciales nosocomiales en ambos muestreos correspondientes a bacterias gram-negativas y 8 cepas correspondientes a gram-positivas

Esto muestra que las clínicas veterinarias se enfrentan a un gran desafío en materia de prevención, control y tratamiento de las infecciones por estos microorganismos, similares a las situaciones en hospitales humanos, por otro lado, la posibilidad de propagación del ser humano al animal o viceversa requiere atención especial.

Direcciones futuras

Este estudio pionero en Antioquia apunta a la necesidad de investigación en control de infecciones en animales de compañía.

Se requieren estudios retrospectivos en donde se cuantifique la frecuencia de infecciones asociadas a hospitales.

Además, con este estudio se pretende crear un programa de monitoreo y control en la clínica; también se recomienda la creación de un programa de vigilancia y control evaluando los diferentes agentes biosidas empleados para la limpieza y desinfección de la clínica.

Con esta investigación se puede crear un estudio de resistencia a antibióticos.

Bibliografía

- Alpuche C, D. C. (2002). Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 22(4), 192–199.
Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2002/ei024d.pdf>
- Alzate Tamayo, L. maria. (2009). *Identificación de Microorganismos que afectan la calidad de los Alimentos*. caldas: editorial Lasallista.
- Antonette B Climaco, M. (2017). Serratia: Background, Pathophysiology, Epidemiology.
Recuperado de <http://emedicine.medscape.com/article/228495-overview>
- APÉNDICE G. (n.d.). Recuperado de
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/API20E_18841.pdf
- Avendaño Rojas, P. (2006). identificación y estudio de sensibilidad antimicrobiana de bacterias nosocomiales aisladas en recintos hospitalarios veterinarios de la universidad de chile. *Director*.
- Bahr Arias, M. M., Aiello, G., Battaglia, L. de, & De Freitas, J. J. (2013). Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33(6), 771–779.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600014>
- Båverud, V. (2002). *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to

the horse. A review. *Veterinary Quarterly*, 24(4), 203–219.

<https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695137>

Benedict, K. M., Morley, P. S., & Metre, D. C. Van. (2008). Characteristics of biosecurity and infection control programs at veterinary teaching hospitals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233(5), 767–773.

<https://doi.org/10.2460/javma.233.5.767>

Bernal-Rosas, Y., Osorio-Muñoz, K., & Torres-García, O. (2015). Pseudomonas aeruginosa: an emerging nosocomial trouble in veterinary. *Revista MVZ Cordoba*, 20(Supl), 4937–4946.

Boerlin, P., Eugster, S., Gaschen, F., Straub, R., & Schawalder, P. (2001).

Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital.

Veterinary Microbiology, 82(4), 347–359. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00396-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00396-0)

Casals, C., Almela, M., Marco, F., & Sort, P. (1995). Pasteurella pneumotropica sepsis. *Medicina Clinica*, 104(9), 358–359.

Centers for Disease Control and Prevention. (2014). HAI Data and Statistics.

Recuperado de <https://www.cdc.gov/hai/surveillance/>

González, H. et al. (2014). Análisis bacteriológico de superficies inertes. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*.

- Hariharan, H., Coles, M., Poole, D., Lund, L., & Page, R. (2006). Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J*, 47. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1371054/pdf/cvj47pg253.pdf>
- Kuroki, R., Kawakami, K., Qin, L., Kaji, C., Watanabe, K., Kimura, Y., ... Watanabe, H. (2009). Nosocomial Bacteremia Caused by Biofilm-Forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Internal Medicine*, 48(10), 791–796. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.48.1885>
- Leal, L. C. S., & Ramírez, L. C. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, 3(4), 21–29. [https://doi.org/ISSN: 1794-2470](https://doi.org/ISSN:1794-2470)
- Martinez, C. (2015). api 20 E. Retrieved June 9, 2017, from <https://fytam.blogspot.com.co/2015/12/api-20-e.html>
- Morfin R, Hernandez J, Arredondo J, S. D. (2002). Infecciones nosocomiales por bacterias grampositivas multirresistentes. La actividad de nuevos antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia*, 22(2), 55–61. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2002/ei022d.pdf>
- Nagano, N., Shibata, N., Saitou, Y., Nagano, Y., & Arakawa, Y. (2003). Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5530–6.

<https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5530-5536.2003>

Olawale, K. O., Fadiora, S. O., & Taiwo, S. S. (2011). Prevalence of hospital-acquired enterococci infections in two primary-care hospitals in osogbo, southwestern Nigeria. *African Journal of Infectious Diseases*, 5(2), 40–6. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23878706>

Papich, M. G. (2013). Antibiotic Treatment of Resistant Infections in Small Animals. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 43, 1091–1107. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.04.006>

Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2015). Enteropatógenos De Importancia En Salud Pública. *Relevant Public Health Enteropathogens.*, 32(1), 135–142.

Ruple-Czerniak, A., Aceto, H. W., Bender, J. B., Paradis, M. R., Shaw, S. P., Van Metre, D. C., ... Morley, P. S. (2013). Using syndromic surveillance to estimate baseline rates for healthcare-associated infections in critical care units of small animal referral hospitals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1392–1399. <https://doi.org/10.1111/jvim.12190>

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

Scott, R. D. (2009). The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. *Cdc*, (March), 13.

https://doi.org/http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf

Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., ...

Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 1–14. <https://doi.org/10.1086/668770>

Tovar, M. (2016). Api, Biomérieux. *bioMérieux*.

Umber, J. K., & Bender, J. B. (2009). Pets and Antimicrobial Resistance. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 39(2), 279–292.

<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.10.016>