

**ESTUDIO DE PORTACION NASAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
EN ESTUDIANTES DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE  
CARTAGENA EN EL PRIMER SEMESTRE DEL AÑO 2008**

*PASANTIA REALIZADA  
EN EL GRUPO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
CARTAGENA - COLOMBIA*

**YORLAIS ALBERTO ARROYO BARRIOS**

**AREA DE PROFUNDIZACIÓN:  
Microbiología**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
SINCELEJO – COLOMBIA  
2009**

**ESTUDIO DE PORTACION NASAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
EN ESTUDIANTES DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE  
CARTAGENA EN EL PRIMER SEMESTRE DEL AÑO 2008**

*PASANTIA REALIZADA  
EN EL GRUPO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
CARTAGENA - COLOMBIA*

**YORLAIS ALBERTO ARROYO BARRIOS**

**AREA DE PROFUNDIZACIÓN:**

**Microbiología**

**DIRECTOR:**

**NIRADIZ REYES RAMOS, Ph.D.**

**CODIRECTOR:**

**JUAN MANUEL DIA SOTO, M.Sc.**

**Universidad de Sucre**

**TUTOR**

**ALFONSO BETIN MARTINEZ**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
SINCELEJO – COLOMBIA  
2009**

**“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo” artículo 12 resolución 02 de 2003.**

***Nota de aceptación***

---

---

---

---

***Firma del presidente del jurado***

---

***Firma del jurado***

---

***Firma del jurado***

**Sincelejo, 2009.**

*Lo más bello que podemos experimentar es el lado misterioso de la vida. Es el sentimiento profundo que se encuentra en la cuna del arte y de la ciencia verdadera.*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

*A toda mi familia por su apoyo incondicional en especial a mi padre y a mi madre, cuya lección de amor, fuerza y coraje me marco el camino a seguir.*

*A la directora de esta pasantía – la doctora Niradiz Reyes Ramos por la oportunidad brindada en su grupo de investigación, por su confianza y ayuda constante. Me considero afortunado por haber podido estar bajo su tutoría, siempre estaré en deuda con ella.*

*A mi codirector Juan Manuel Díaz soto por transmitir con pasión su conocimiento, por su compromiso con la ciencia y la biología por transmitir la inquietud y por su invaluable ayuda.*

*Al semillero de investigación de genética y biología molecular de la Universidad de Cartagena por su acogida, colaboración y la amistad brindada.*

*Al joven investigador Alfonso Batín por acogerme e iniciarme en el campo de la Microbiología por su predisposición permanente en aclarar mis dudas, por su paciencia y apoyo incondicional.*

*A mis compañeros de laboratorio, en especial a (guillo, jharol, Karen,) por el tiempo que hemos compartido entre largas conversaciones, divagaciones científicas, confesiones, alegrías y algunos momentos de melancolía. Creo que nos acordaremos siempre de este año.*

*A mayito a quien no solo le agradezco su plena colaboración, su simpatía, si no le doy gracia por brindarme su amistad.*

*Al personal de apoyo del área de la Microbiología de la Universidad de Cartagena (Gregorio young, la señora marta Puello, la señora Ketty Mendoza y la señora Soraya Rodríguez) por su ayuda, por su afectiva y efectiva acogida.*

*A mi "Alma Mater" la Universidad de Sucre por brindarme la formación académica que hoy me permite alcanzar el éxito profesional.*

*A la Universidad de Cartagena por facilitarnos la infraestructura para realizar este proyecto.*

*A mis amigos y compañeros de estudios en especial Wilson manchego, Jesús Anaya por disfrutar de esos pequeños momentos, por las largas conversaciones. A Jorge por su sentido del humor por sus consejos y por tantas inquietudes....*

*A Rosmy por haberle dado un sentido especial a mi vida.*

*Y a todas aquellas personas que habiéndome prestado su colaboración, de forma involuntaria haya podido omitir.*

**Gracias.**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	
OBJETIVOS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
CAPITULO 1. INFORME CRÍTICO.....	14
METODOLOGIA.....	26
POBLACION DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS.....	26
AISLAMIENTO DE CEPAS PRESUNTIVAS.....	27
ANALISIS MICROSCOPICO E IDENTIFICACION BIOQUIMICA.....	27
ANALISIS MICROSCOPICO.....	27
Tinción de gram.....	27
PRUEBAS DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA.....	28
Prueba de la catalasa.....	28
Prueba de la coagulasa.....	29
Prueba de aglutinación en látex.....	30
PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIOTICA.....	31
CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.....	32
ANALISIS ESTADISTICO.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42
CAPITULO 2. REVISIÓN.....	52
TECNICAS DE TIPIFICACION DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
METODOS FENOTIPICOS.....	54
ANTIBIOTIPIFICACION.....	54
FAGOTIPIFICACION.....	55
BIOTIPIFICACION.....	57
SEROTIPIFICACION.....	59
ANALISIS ELECTROFORETICO DE PROTEINAS.....	60

METODOS GENOTIPICOS.....	60
ANALISIS DE DNA PLASMIDICO.....	62
ANALISIS DE DNA CROMOSOMICO.....	64
Electroforesis en geles de agarosa en campo constante.....	64
Electroforesis en geles de agarosa en campo pulsante (PFGE)....	65
Ribotipificación.....	68
TECNICAS DE TIPIFICACION BASADAS EN LA PCR.....	69
Amplificación al azar de ADN polimorfo (RAPD).....	70
PCR – Ribotipia.....	72
PCR – RLFP.....	72
REC – PCR.....	73
AFLP.....	75
Tipificación de secuencias multilocus (MLST).....	75
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	79
ANEXOS.....	92
ANEXO 1. Consentimiento informado.....	93
ANEXO 2. Formato recolección de datos.....	94
ANEXO 3. Prueba de aglutinación en látex.....	95

## INTRODUCCION

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, de 0.5 a 1.5 mm de diámetro, que se presentan aislados, en pares, tétradas o cadenas cortas y en grupos irregulares. Son bacterias catalasa positivas, inmóviles, oxidasa negativas y la mayoría de las especies que lo forman son anaerobias facultativas. *Staphylococcus aureus* es de las 35 especies que tiene el género la de mayor importancia, que se distingue por ser coagulasa positiva, fermentador de varios azúcares, entre ellos, el manitol, altamente resistente al calor y la desecación y puede crecer en condiciones de salinidad (NaCl 7,5% p/v) (Banerman T, 2002).

*S. aureus* es considerado parte de la flora normal del hombre, siendo la colonización de las fosas nasales el reservorio primario y la fuente usual de infección, por lo que debe ser considerado como un patógeno oportunista (Casewell M, *et al.* 1986; Moss B, *et al.* 1948; Williams R, *et al.* 1946). Capaz de causar un amplio espectro de enfermedades asociadas con elevada morbi-mortalidad, logrando variar desde infecciones cutáneas, tales como, impétigo, infecciones de heridas, infecciones asociadas a elementos prostéticos (prótesis), hasta infecciones sistémicas con riesgo de vida (endocarditis, osteomielitis, neumonía, meningitis, bacteriemia), y enfermedades producidas por toxinas (intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada o síndrome de shock tóxico) (Morton N, 1990; Jones M, 1999). Su protagonismo ha crecido en las últimas décadas gracias al mayor aislamiento de una nueva cepa, *S. aureus* meticilino resistente (SAMR), y la aparición de cepas con multiresistencia. Hasta hace poco considerado patógeno principalmente nosocomial, hoy cobra real importancia como patógeno comunitario (Bearman G, 2004; Naimi T, *et al.* 2001).

Estudios epidemiológicos de portación nasal de *S. aureus* han estimado que el 20 - 40% de las personas adultas son portadoras, distinguiendo 3 patrones de portación diferente: persistente, intermitente y no portador (Fekety F.1964), con porcentajes que pueden ir desde el 30% de la población persistente, 50% en portadores intermitente y un 20% que nunca ha sido colonizado (Mandell G, *et al.*1997; Marjolein F, *et al.*1999). De igual forma asociados con diversos factores de riesgo entre los que podemos destacar: internación (centros asistenciales o casas de salud) reciente, enfermedades alérgicas, exposición a antibióticos, enfermedad crónica, drogas de adicción o contacto cercano con personas con los factores de riesgos anteriores (Oliveira D, *et al.* 2002; Aires De Sousa, *et al.* 2001).

Según lo descrito en la literatura, la prevalencia de portación nasal por *S. aureus* puede variar de acuerdo a la población en estudio, encontrando que el personal de salud es mas propenso a su colonización con porcentajes que pueden llegar al 56 % en contraste con 26% de la población general (Kluytmans J, *et al.*1997; Walker T, 2000), habiéndose reportado en numerosas ocasiones el rol de este personal como transmisor y reservorio de cepas epidémicas (Yu V, *et al.* 1986; Zimakoff J, *et al.*1996; Opal S, *et al.*1990). Parte de este personal de salud altamente vulnerable corresponde a los estudiantes de medicina, que viven en contacto directo no solo con el personal clínico si no también comunitario en sus diferentes prácticas y si le sumamos a esto el escaso control de las infecciones a nivel hospitalario llevan a establecerlo como un grupo en alto riesgo para la colonización de *S. aureus* (Baliga S, *et al.* 2007, Stubbs E, *et al.*1994, Werner E. *et al.*2004).

Lo descrito anteriormente genero interés en el grupo de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Cartagena y gracias al convenio interinstitucional existente entre esta institución y la Universidad de Sucre, se

brindó la oportunidad de realizar una pasantía en el primer semestre del 2008 que permitió conocer el porcentaje de estudiantes de medicina de la universidad Cartagena colonizados por *Staphylococcus aureus*, el patrón de susceptibilidad de los aislamientos y los factores de riesgo asociados a la colonización de este grupo. Esperamos que este estudio contribuya a la generación de programas que favorezcan al control de este agente infeccioso dentro de esta población.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de colonización nasal de *Staphylococcus aureus*, la susceptibilidad antibiótica y la asociación con posibles factores de riesgo, en los estudiantes de medicina de la universidad de Cartagena en el primer semestre del año 2008

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apropiar conocimientos teóricos y prácticos en los avances de la Microbiología básica y aplicada.
- Adquirir destrezas en la recolección y transporte de muestras nasales para su conservación y procesamiento en el laboratorio.
- Obtener habilidades en el manejo de cultivos *in Vitro*, para el aislamiento de *S. aureus* mediante la utilización de medios selectivos.
- Identificar cepas de *S. aureus* provenientes de muestras nasales mediante diferentes pruebas bioquímicas.
- Establecer el patrón de susceptibilidad antibiótica de cada uno de los aislamientos de *S. aureus*.
- Determinar la asociación existente entre la portación nasal y los posibles factores de riesgo evaluados en la población.

## CAPITULO 1. INFORME CRÍTICO

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. Es un coco gram-positivo, no móvil, que no forma esporas, es anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Forma parte de la familia Micrococaceae, y el género *Staphylococcus* el cual contiene más de 35 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre. Microscópicamente las colonias son de 1-3 mm, convexas, lisas, brillantes y de color blanco o dorado en medios sólidos debido a la producción de un pigmento carotenoides, la mayoría de sus cepas son beta-hemolíticas en agar sangre y suele ser identificado mediante una serie de pruebas bioquímicas entre las cuales tenemos: 1) test de catalasa positivo, que lo distingue de los estreptococos, 2) test de coagulasa positivo que lo distingue de las otras especies de estafilococos denominados por ellos coagulasa negativo (*S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, entre otros), 3) fermentación de manitol a diferencia de *S. epidermidis* y 4) sensibilidad a la novobiocina a diferencia de *S. saprophyticus* que fermenta ocasionalmente el manitol. (Waldvogel F. 2000)

*S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad que se produce al combinarse los factores de virulencia de la bacteria con una disminución de las defensas del huésped. En su accionar intervienen los componentes de la pared celular y la producción de enzimas y toxinas favorecedoras de la invasión tisular, además de su capacidad para diseminarse y multiplicarse en los tejidos del huésped (Miller M, Y B. Bassler. 2001).

## COMPONENTES DE LA PARED:

**Peptidoglicano:** Es el componente básico de la pared de *S. aureus* le confiere resistencia y tolerancia osmótica tiene importantes propiedades biológicas: presenta actividad endotoxica, desencadena la producción de interleucina -1 por los monocitos, estimula la quimiotaxis y agregación de los leucocitos, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes (Mandell G, *et al.* 2000).

**Acido teicoico o polisacárido A:** son polímeros de fosfato específicos de esta especie, pueden estar unidos covalentemente al péptidoglicano de la pared o ligados a los lípidos de la membrana celular. Su función es mediar en la unión de los estafilococos a la superficie mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. Tiene la capacidad de inducir la producción de anticuerpos (Mandell G, *et al.* 2000).

**Capsula externa o gluococalix:** Es de naturaleza polisacarida, facilita la adherencia de las bacterias y tiene capacidad antifagocitaria. Se han descrito 11 serotipos capsulares, de los cuales los serotipos 5 y 8 son los que se asocian con la mayor parte de las infecciones (Miller M, Y B. Bassler. 2001).

## ENZIMAS:

Son sustancias que producen su acción en zonas próximas al foco infeccioso. (Bannerman ,2003) Las más importantes son: **Catalasa:** degrada el peróxido de hidrogeno protegiendo al microorganismo durante la fagocitosis. **Coagulasa:** se encuentra en dos formas; el factor de agregación o coagulasa ligada, al que nos hemos referido al tratar los componentes de la pared celular y la coagulasa libre o extracelular. Ambas, intervienen en la formación de coágulos, convierten el fibrinogeno en fibrina, facilitando

procesos sépticos y permitiendo la formación de abscesos. Existe una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa. La detección de la coagulasa libre es la prueba que diferencia *S. aureus* de los estafilococos coagulasa negativos. **Hialuronidasa:** degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo y facilita la propagación de la infección. **Penicilinas:** Esta enzima en la actualidad es producida por casi todas las cepas de *S. aureus* y puede inactivar la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo betalactámico (Madigan M, *et al.* 2003)

### **TOXINAS:**

Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que producen su acción en zonas distantes del foco infeccioso. Su expresión está regulada por un gen accesorio regulador de proteínas (*agr*) y pueden ser modificadas por el ADN cromosómico o plasmídico. Las más importantes son (Dinges M, *et al.* 2000).

**Hemolisinas:** se han identificadas cuatro, denominadas, alfa, beta, gamma y delta. Son sintetizadas por la mayoría de las cepas de *S. aureus*. Poseen capacidad hemolítica y citolítica actuando sobre determinadas células eucarióticas del huésped como leucocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos. La toxina alfa es la mejor estudiada. Parece intervenir en el desarrollo de edema y daño tisular como consecuencia de los cambios de permeabilidad inducidos en las células endoteliales y los consiguientes cambios en el balance iónico.

Leucocidina de Pantón – Valentine: es sintetizada por el 2-3% de las cepas. Esta compuesta por dos subunidades proteicas la F y S sintetizadas independientemente que actúan en forma sinérgica sobre las membranas de las células fagocíticas. Se une a los fosfolípidos de la membrana de los

leucocitos y macrófagos induciendo la formación de poros que destruyen la célula al alterar la permeabilidad celular (Omoe K, *et al.* 2003).

**Toxinas exfoliativas o epidermolíticas:** la prevalencia de cepas productoras de estas toxinas varía geográficamente, pero generalmente es inferior al 5-10%. Se han identificado dos serotipos, A y B (ETA y ETB), ambas pueden producir el síndrome de la piel escaldada. La toxina esfoliativa A es termoestable y de codificación cromosómica, mientras que la B es termolábil y de codificación plasmídica. Actúa destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin citólisis, ni inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no se encuentran ni leucocitos ni estafilococos. Poseen actividad proteasa serínica, lo que desencadenaría la exfoliación (Dinges M, *et al.* 2000).

**Enterotoxinas:** son producidas por el 30- 50% de las cepas de *S. aureus* Se han descrito 8 serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, G, H, I). Siendo el serotipo A, el más común de todos ellos, son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas. Siendo responsables de intoxicaciones alimentarias con emesis y cuadros de enterocolitis. Posee las características inmunomoduladoras propias de los súper antígenos.

**Toxina 1 del síndrome del Shock tóxico:** anteriormente denominada exotoxina pirogénica C o enterotoxina F, es una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos. Actúa como un superantígeno, induciendo la liberación de citotoxinas por macrófagos y linfocitos T. A bajas concentraciones produce la extravasación de las células endoteliales, y a altas concentraciones tiene efecto citotóxico (Mandell G, *et al.* 2000).

## **ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS**

En cuanto a su epidemiología *S. aureus* es considerado un patógeno oportunista que forma parte de la microflora humana, alcanzando a estar colonizada con esta bacteria entre el 30 y 50% de la población, siendo la localización más frecuente la colonización nasal (Wenzel R, *et al.*1998). El principal reservorio de *S. aureus* lo constituye el hombre enfermo o portador. La frecuencia de colonización es mayor en el medio hospitalario, especialmente en pacientes sometidos a hemodiálisis, diabéticos tipo I, pacientes con lesiones cutáneas, sujetos infectados por el VIH y en adictos a drogas por vía parental.

El portador nasofaríngeo asintomático es también el origen mas frecuente de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Actualmente este microorganismo es reconocido como uno de los patogenos mas importantes causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo. Cuando una persona entra en contacto con una cepa de SARM puede resultar colonizada, desarrollar infección y/o convertirse en portador (Wenzel R, *et al.*1998): Así pues, se habla de colonización por SARM cuando este microorganismo es aislado de una muestra clínica en ausencia de signos de infección. Las zonas mas frecuentes de colonización son; las lesiones cutáneas, el tracto respiratorio y el tracto urinario (Coello R, *et al.* 1994). Además la colonización por SARM puede persistir durante meses o años (Sanford M, *et al.* 1994). Las infecciones causadas por SARM son las mismas que las producidas por cepas sensibles a meticilina. Las mas frecuentes son las de herida quirúrgica (10 -28%), bacteremia (10 -21%) generalmente a partir de catéter y la neumonía (15- 40%), sobre todo en enfermos ventilados (Pujol M, *et al.* 1994). En menor frecuencia se encuentran las infecciones de partes blandas, urinarias, intraabdominales, cardiovasculares y osteomielitis (Coello R, *et al.* 1994).

Finalmente se considera que una persona es portadora de SARM cuando este microorganismo se aísla en una localización, en la que no suele causar infección lo que facilita su persistencia en el microorganismo. La localización más frecuente es la nariz, donde actúa como reservorio seguido de la orofaringe y las regiones perianal, inguinal, axilar y rectal (Coello R, *et al.* 1994).

Diferentes estudios describen que los portadores nasales de SARM tienen un mayor riesgo de infección nosocomial por este microorganismo y que los pacientes infectados por SARM presentan una mayor morbi mortalidad comparada con los pacientes infectados por cepas sensibles de *S. aureus* (Romero – Vivas J, *et al.* 1995; Pujol M, *et al.*; Cosgrove S, *et al.* 2003).por lo tanto este hecho es importante a la hora de intentar mantener una prevalencia de SARM baja.

### **CARACTERISTICAS GENETICAS**

*S. aureus* se caracteriza genéticamente por poseer un genoma de un tamaño aproximado de 2800 kb, que esta formado por un único cromosoma circular en el que se encuentran elementos génicos móviles como son plasmidos, bacteriófagos, transposones y secuencias de inserción (Pattee L, *et al.* 1990). El estudio de estos elementos ha permitido explicar los mecanismos de transferencia génica entre las cepas mediante procesos de conjugación, transformación, transducción y movilización mediante plasmidos conjugativos (Archer G y Scout J. 1991; Skurray R.1997).

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de DNA circular de pequeño tamaño (2.5 kb) que contienen genes que codifican para la producción de toxinas y/o para la resistencia a antibióticos y metales

pesados; Pueden transferirse de una célula a otra mediante el proceso de conjugación.

Los transposones son fragmentos móviles de DNA generalmente flanqueados por secuencias repetidas, su longitud varia de unos cientos a unos miles de nucleótidos. La transposición tiene lugar a través de dos mecanismos: uno consiste en la escisión del elemento móvil para luego insertarse en el DNA diana, el otro consiste en un mecanismo de retrotransposicion, mediante el cual el transposon genera una copia de si mismo que se insertara en el DNA diana. Las enzimas que catalizan los cortes y las uniones de estos elementos son específicas y están codificadas en el propio transposon. Los transposones pueden transportar uno o varios marcadores de resistencia antibiótica. Se han descrito distintos transposones como el Tn551 portador del gen *ermB* de resistencia a eritromicina (Kham S y Novick R. 1980), Tn4001 portador de genes que codifican la resistencia a kanamicina, tobramicina y gentamicina (Lyón B, *et al.* 1984), Tn4003 codifica la resistencia a trimetoprin (Rouch D. 1989), Tn552 contiene el gen operon *bla* que le confiere resistencia a penicilina (Rowland S.1989) por la producción de penicilinasas y Tn554 que contiene los genes *ermA* para la resistencia a eritromicina y el gen *spc* que codifica la resistencia a espectinomicina (Murphy E, *et al.*1985). Los dos elementos utilizados en la transferencia génica son TN551 y Tn554. Tn554 se encuentra con gran frecuencia en el cromosoma de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y se ha utilizado para el seguimiento epidemiológico de clones epidémicos SARM (De lencastre H, *et al.* 1994; Domínguez M,1994).

## **RESISTENCIA ANTIBIÓTICA**

En cuanto a la resistencia antimicrobiana *S. aureus* fue el primer microorganismo en poner de manifiesto la resistencia a los antimicrobianos y

ser capaz de desarrollar múltiples mecanismos, intrínsecos o adquiridos, que le han ido confiriendo resistencia a la mayoría de los antimicrobianos adecuados para el tratamiento de la infección estafilocócica. De tal manera a que en los primeros años de la década de 1940 se introduce de forma terapéutica la penicilina en el tratamiento de las infecciones estafilococicas. Poco tiempo después, se empiezan a descubrir aislamientos de *S. aureus* con resistencia a penicilina debido a la producción de betalactamasas (barber, 1947).

Durante la década de los años 1950, a medida que se iban adquiriendo resistencia a los antibióticos conocidos, se fueron introduciendo en la práctica clínica nuevos antibióticos. Así, en 1957, muchas cepas de *S. aureus* presentaban resistencia múltiple a penicilina, estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina (Sanson, 1981).

En 1959 se introduce la meticilina, una penicilina semisintética que resiste la acción de la betalactamasa que degrada la penicilina. Esta nueva droga permite volver a tener un control sobre las infecciones de *S. aureus*; sin embargo, esta nueva situación va a demorar poco, ya que en 1961 aparecen las primeras cepas resistentes a meticilina aisladas en Inglaterra por Jevons y Knox (Jevons y Knox, 1961). Dos años después aparece el primer brote epidémico de infección nosocomial por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en el Reino Unido (Stewart, 1963). Estos aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina presentan resistencia intrínseca a todos los betalactámicos, incluidas las cefalosporinas y carbapenemes.

La resistencia de *S. aureus* a aminoglucosidos parece estar relacionada en su inicio con el uso tópico. Los primeros aislamientos resistentes a este grupo de antibióticos se detectaron en 1959 en EEUU y es en los años 70

cuando aparecen los primeros casos en Europa (Crossley, 1979). A finales de los años 80 se muestran cepas de *S. aureus* que combinan la resistencia a meticilina con la resistencia a otros muchos grupos antibióticos incluyendo cloranfenicol, tetraciclina, macrólidos, lincosamidas, amino glucósidos y fluoroquinolonas (Schaefer,1989). En la última década se han documentado casos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a glucopeptidos (Hiramatsu, 1997), y recientemente se han descrito casos en Estados Unidos de cepas de *S. aureus* con resistencia de alto nivel a vancomicina (CDC, 2002; Chang, 2003; CDC, 2004; Tenover 2004

## **MECANISMO RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS**

Los antibióticos betalactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana al unirse de forma irreversible a las enzimas peptidoglicanos-transpeptidasas, también denominadas PBP<sub>s</sub> (Penicillin- Binding- Proteins). *S. aureus* ha desarrollado tres mecanismos de resistencia a los betalactámicos. En primer lugar, la producción de betalactamasas que actúan sobre las penicilinas naturales y semisintéticas; en segundo lugar, la síntesis de PBP<sub>s</sub> modificadas con baja afinidad a los betalactámicos, que origina la denominada resistencia intrínseca a meticilina y al resto de los betalactámicos; y por último, la tolerancia al efecto bactericida de los betalactámicos. Cada cepa de *S. aureus* puede tener varios de estos mecanismos de resistencia (Imsade J .1978).

### **Producción de betalactamasas.**

Las betalactamasas son enzimas extracelulares que inactivan la penicilina mediante la hidrólisis de un enlace betalactámico. El determinante génico que determina su síntesis (gen blaZ) se localiza habitualmente en plásmidos, que también suelen conferir resistencia a otros antibióticos. Las

betalactamasas de *S. aureus* son inducibles, a diferencia de las producidas por las bacterias gramnegativas; esto significa que la producción a niveles elevados de esta enzima depende de la presencia de antibióticos betalactámicos. El mecanismo de inducción es el siguiente: la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora que, al inhibir el gen represor de la betalactamasa (gen *bla*) aumenta la síntesis de penicilinas (Imsade J. 1973).

La susceptibilidad de los distintos betalactámicos a las betalactamasas de *S. aureus* depende de su sensibilidad a la hidrólisis enzimática y del nivel de producción de betalactamasa que inducen (Cercenado E *et al.* 1997). Dicha sensibilidad se determina mediante la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada antibiótico betalactámico frente a *S. aureus*. Así, las penicilinas naturales y semisintéticas como la bencilpenicilina, que son muy sensibles a las penicilinasas, tienen CIMs que oscilan entre 0.2 y 32  $\mu\text{g/ml}$ . En cambio las llamadas penicilinas resistentes a las penicilinasas –PRP-(oxacilina y meticilina) y las cefalosporinas son resistentes a los niveles habituales de producción de betalactamasas.

### **Resistencia intrínseca.**

La resistencia intrínseca de *S. aureus* a la penicilina, también denominada resistencia a la meticilina, es un fenómeno genéticamente complejo, que tiene una expresión fenotípica variable y multifactorial. Las cepas de *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) tienen 5 tipos de PBPs (1, 2, 3, 3', 4), mientras que las resistentes (SARM) producen una PBP supernumeraria, denominada PBP2a o PBP2', que tiene menor afinidad a la meticilina y al resto de los antibióticos betalactámicos. En las cepas resistentes la PBP2' asume la síntesis de la pared bacteriana cuando las otras PBPs están

saturadas por el antibiotico, evitando así la muerte del microorganismo (Hartman B *et al.* 1986).

La resistencia de *S. aureus* a meticilina esta codificada en la región denominada“ mec” cromosomica, que esta presente únicamente en las cepas resistentes. Dicha región esta formada por el gen “mec A”, responsable de la síntesis de PBP2a y marcador genético de la resistencia y por el gen “mec R” o represor. Sin embargo, no todas las cepas con el gen “mec A” no expresan la resistencia y su grado varia una cepa a otra e incluso entre los distintos clones de una cepa. Por ello se distinguen dos tipos de resistencia intrínseca: la homogénea y la heterogenia. La base genética de estos dos tipos de resistencia es la siguiente. En las cepas con resistencia homogénea la síntesis de PBP2a es constitutiva, es decir, que no esta influenciada por otros factores.en cambio, en las cepas heterogéneas la expresión del gen “mec A” estaría regulada por otra región cromosomica desconocida a través de la producción del llamado factor X. diversos factores favorecen la síntesis de PBP2a en las cepas heterogéneas: las condiciones de incubación, un inculo elevado, la presencia de antibióticos betalactamicos. Además, los genes que codifican la producción de betalactamasas (blaI y bla R) también producen la síntesis de PBP2a (Hiramatsu K *et al.* 1990).

### **TOLERANCIA A LOS BETALACTAMICOS**

El último paso en la actuación de los antibióticos betalactamicos es la lisis de la bacteria por enzimas autolíticas intracelulares (autolisinas). La tolerancia al efecto bactericida de los antibióticos betalactamicos es un fenómeno detectado en *S. aureus* y otros microorganismos grampositivas. Las cepas tolerantes requieren para su lisis una concentración de antibiotico, denominada concentración minima bactericida (CMB), mucho mayor que la necesaria para inhibir su crecimiento (CIM).este fenómeno es debido a una

disminución de la actividad autolítica de la bacteria por la presencia de un exceso de inhibidores de las autolisinas (Sabath L and Mokhbat K. 1983).

La trascendencia clínica de este fenómeno puede ser mayor en determinadas infecciones como endocarditis, meningitis y osteomielitis, y en el huésped inmuno deprimido, en el que es imprescindible un efecto bactericida del antibiótico (Sabath L and Mokhbat K. 1983).

## **METODOLOGÍA**

### **POBLACION DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Este estudio se llevo a cabo en el periodo comprendido entre marzo y julio del 2008, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, participando en el todos los estudiantes de medicina que por voluntad propia firmaron un consentimiento informado como participante de la investigación (anexo 1). Luego a cada uno de ellos se les suministro un formulario en el que se recogía información como la edad, genero, sexo, historial medico incluyendo modificaciones anatómicas de la nariz, alergias crónicas, el uso de antibiótico y el contacto con pacientes entre otras (anexo 2). El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Cartagena, manejando como diseño experimental un estudio observacional de corte transversal.

### **RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS**

A cada voluntario le fue tomada una muestra nasal utilizando para ello un hisopo de algodón estéril por cada participante, mediante la técnica de 3 movimientos circulares en sentido de las manecillas del reloj y luego al sentido contrario, en cada uno de los orificios nasales (Karabay O, et al, 2006), inmediatamente tomada la muestra se introdujo el hisopo en un tubo de tapa rosca previamente rotulado, que contenían medio de transporte Stuart (OXOID),y refrigerados a una temperatura de 4°C, con el propósito de mantener la viabilidad de los microorganismos sin permitir la proliferación y muerte de los mismos hasta su posterior utilización (Salazar, *et al.*, 2006).

## **AISLAMIENTO DE CEPAS PRESUNTIVAS**

Para el aislamiento primario de *S. aureus*, cada una de las muestras fue cultivada en medio agar manitol sal (OXOID). Por ser un medio altamente selectivo para el crecimiento de *S. aureus*, Luego se incubaron en aerobiosis a 37°C durante un periodo de 24 a 48 horas (Incubator Automatic, Presición Scientific Inc, model (1020)). Transcurrido el periodo de incubación se procedió a la selección de las colonias presuntivas, teniendo en cuenta características como la pigmentación que puede variar desde amarillo hasta amarillo naranja, que es indicativa de fermentación del manitol (virando el color del medio de rojo a amarillo), presencia de bordes lisos, apariencia, ligeramente convexas y con diámetro entre 1 - 2 mm (Joklik W, et al. 1986. p 518 - 523).

Una vez seleccionadas fenotípicamente las colonias presuntivas de *S. aureus*. Se procedió a la obtención de colonias puras. Para esto fueron subcultivadas en agar nutritivo (DIFCO) mediante el método de siembra por agotamiento, e incubadas a 37°C durante 24 horas, para su posterior identificación bioquímica.

## **ANALISIS MICROSCOPICO E IDENTIFICACION BIOQUIMICA**

### **ANALISIS MICROSCOPICO**

El examen microscópico fue utilizado como criterio de exclusión, para separar las bacterias de nuestro interés (cocos gram positivos) de las que no eran de interés (gram negativas), para lo cual fue utilizada la coloración de gram descrita por Koneman (Koneman, *et al*, 1999. p. 84 - 86).

### **Tinción de gram.**

Para llevar a cabo esta técnica primero se escogía la colonia bacteriana de interés proveniente de un cultivo en agar nutritivo de 24 horas y se realizaba

un extendido bacteriano delgado sobre un portaobjeto, se fijaba al calor y luego se cubría la superficie con el colorante cristal violeta por un minuto; trascurrido este periodo se lavaba con abundante agua y se le agregaba lugol por el mismo tiempo del paso anterior. Después de un enjuague con agua y una decoloración con alcohol acetona por mas o menos 30 segundos, se lavaba el preparado con agua y se le agregaba safranina, se esperaba un minuto y se volvía a lavar, se secaba al ambiente y se examina el extendido bajo un microscopio óptico (Microscopio Olympus, Olympus Corporación, MODEL CX3IBSFA) en el objetivo de 100X.

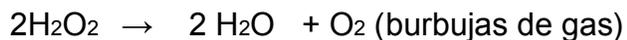
Se escogieron aquellas colonias que al monitorearse las placas se observaban como cocos gram positivos en racimos como lo reporta la literatura para la identificación microscópica de *S. aureus*.

## **PRUEBAS DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA**

Para la identificación bioquímica de las cepas presuntivas de *S. aureus* se realizaron las siguientes pruebas: test de catalasa, seguido de la Prueba de coagulasa y finalmente un test de aglutinación en látex. Se utilizó en cada uno de estos ensayos la cepa control ATCC 25923 la cual es MSSA  $\beta$ -lactamasa-negativa.

### **Prueba de la catalasa.**

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resultaría letal para las células bacterianas. Como un mecanismo de evasión se produce la enzima catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno según la siguiente reacción:



De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta prueba se usa con mucha frecuencia para diferenciar miembros de la familia *Micrococcaceae* de miembros de la familia *Streptococcaceae* (Lutz B, 1992).

Para la determinación de esta enzima en primera instancia se transfiere una porción de colonia proveniente de un cultivo de 24 horas sobre la superficie de un portaobjetos, luego se realiza un frotis y posteriormente se le agrega una gota de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 3% y se observa la reacción. La aparición de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva, aclarando que la observación de unas pocas burbujas pequeñas después de 20 o 30 segundos no se considera un resultado positivo.

#### **Prueba de la coagulasa.**

El criterio más ampliamente utilizado y de aceptación general para la identificación de *S. aureus* se basa en la confirmación de la enzima coagulasa por ser esta la única especie dentro del género que produce esta enzima (Kloos, W. et al. 1999).

La coagulasa es una enzima que tiene actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinogeno en fibrina dando como resultado la coagulación del plasma. *S. aureus* produce dos tipos de coagulasa: fija y libre. La fija (prueba en portaobjetos) permanece unida a la pared celular y actúa directamente sobre el fibrinógeno provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado. Y la coagulasa libre (prueba en tubo) que actúa sobre la protrombina en el plasma para producir un producto semejante a la trombina

el cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina (Pezzlo, M, 1994).

La determinación de la coagulasa libre o prueba en tubo fue realizada utilizando el kit BD BBL coagulase plasma, Rabbit with EDTA de acuerdo con las especificaciones técnicas de la casa comercial descrita a continuación: Con una asa bacteriológica estéril tomar de 2 – 4 colonias del día anterior y emulsionarlas en un tubo de prueba con 0,5 ml de plasma de conejo. Luego se incubaba a 35 - 37 ° C durante un máximo de 4 horas, examinando los tubos periódicamente inclinándolos con suavidad evitando sacudirlos para prevenir la desintegración del coagulo. Cualquier nivel de coagulación transcurrido en el periodo de 4 horas es considerado como un resultado positivo. Si en ese momento no se observa cambio aparente se reincuba a temperatura ambiente y se procede a su lectura a las 24 horas, por existir cepas productoras de enzimas débiles que producirán coagulación del plasma en este tiempo.

### **Prueba de aglutinación en látex**

Las colonias que resultaron ser cocos gram positivos, catalasas positivas y productoras de la enzima coagulasa, se les complemento su identificación bioquímica con el kit de aglutinación en látex (Staphaurex). Este consiste de partículas de látex de poliestireno recubiertas de fibrinogeno e inmunoglobulina G (IgG), Que al mezclarse con una suspensión de organismos de *S. aureus* reacciona la proteína A de la bacteria con las IgG causando una rápida e intensa aglutinación de las partículas de látex. (Langone, J. 1982; Essers, L. *et al.* 1980). Para su determinación se procedió de acuerdo a las siguientes indicaciones.

Inicialmente se debe agregar una gota de látex en uno de los círculos de la tarjeta de reacción, con previa agitación del reactivo, luego recoger con el bastoncillo una cantidad más o menos de 6 colonias de tamaño medio proveniente de un cultivo de 24 horas y emulsionarla en la gota de látex con la parte plana del bastoncillo por unos segundos, luego se desecha el bastoncillo y se agita manualmente con movimientos circulares por 20 segundos. Las reacciones positivas se corroboran por el desarrollo de una aglutinación de las partículas de látex con el fondo claro casi inmediatamente iniciada la agitación indicando la presencia de la proteína A (anexo 3).

### **PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIOTICA**

Cada aislamiento identificado bioquímicamente como *S. aureus* le fue realizado un análisis de susceptibilidad por el método de difusión en disco, utilizando los siguientes antibióticos: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), vancomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina 15 µg), clindamicina (2 µg), y rifampicina (5 µg), siguiendo las guías del instituto de estándares clínicos y de laboratorios (CLSI, 2006)

Para su ejecución primero se realizó una suspensión de cuatro o cinco colonias bacterianas provenientes de un cultivo en placa de agar nutritivo de 18 a 24 horas de incubación en agua destilada hasta alcanzar una densidad óptica comparable con el patrón 0,5 de McFarland (equivalente a  $1 \times 10^8$  bacterias / mL); luego se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión bacteriana y se hace rotar por las paredes laterales del tubo para eliminar el exceso de líquido. Inmediatamente se procede a inocular la placa de agar Müeller Hinton estriando el hisopo tres veces sobre la totalidad de la superficie del agar rotando la placa aproximadamente 60° para asegurar una distribución uniforme del inóculo en toda la superficie del agar. Después de transcurrido 10 a 15 min de la inoculación, se colocan los sensidiscos sobre

la superficie del agar presionando suavemente y se incuban por 18 -24 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se procede a realizar la lectura del antibiograma midiendo con regla milimetrada el diámetro de los halos de inhibición de los discos. Posteriormente se comparan las lecturas con las tablas de la CLSI realizando el reporte del resultado como: R = resistente, S = susceptible, I = intermedio.

### **CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS**

Todas las cepas de *S. aureus* aisladas fueron almacenadas en medio tioglicolato al 20% de glicerol y refrigerados en revco a - 40 ° C para estudios posteriores.

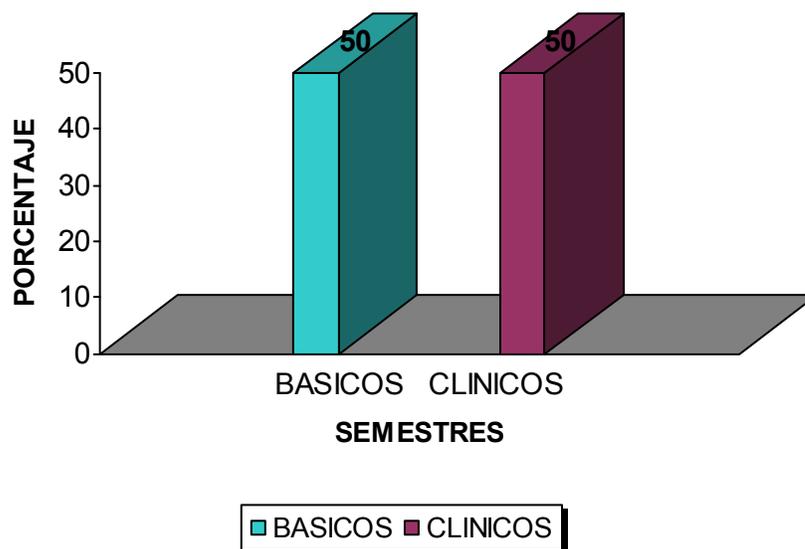
### **ANALISIS ESTADISTICO**

Los datos suministrados por las pruebas bioquímicas sobre los portadores nasales de *S. aureus* y los obtenidos de la encuesta realizada a los estudiantes fueron registrados y procesados en hojas de cálculo de Excel Windows XP y en el paquete estadístico Epi-info, para determinar la prevalencia de colonización nasal de *S. aureus* y los factores de riesgo asociados a esta colonización. Fue utilizada la prueba Ji cuadrado ( $\chi^2$ ) como medida de significancia estadística con un nivel de significancia del 5%.

## RESULTADOS

Durante el periodo comprendido entre marzo y julio del año 2008, se colectaron un total de 372 muestras nasales provenientes de los estudiantes de Medicina de la Universidad de Cartagena que participaron voluntariamente en el estudio; de las cuales 101 muestras resultaron positivas para *Staphylococcus aureus* y 271 resultaron negativas, representando una prevalencia de portadores nasales del 27.15%. Igualmente se encontró que el porcentaje de cepas *S. aureus* resistentes meticilina (SAMR) en los aislamientos positivos fue de 3.96% (4/101) y en la población general fue del 1,075% (4/372), la cual fue dividida en dos grupos; los de semestres básicos (I – V) y los de semestres clínicos (VI - X) con el fin de determinar en cual de estos se presentaba con mayor frecuencia las cepas resistentes. Sin embargo no se obtuvo ninguna diferencia como se muestra en la figura 1 por ser los porcentajes iguales para cada grupo.

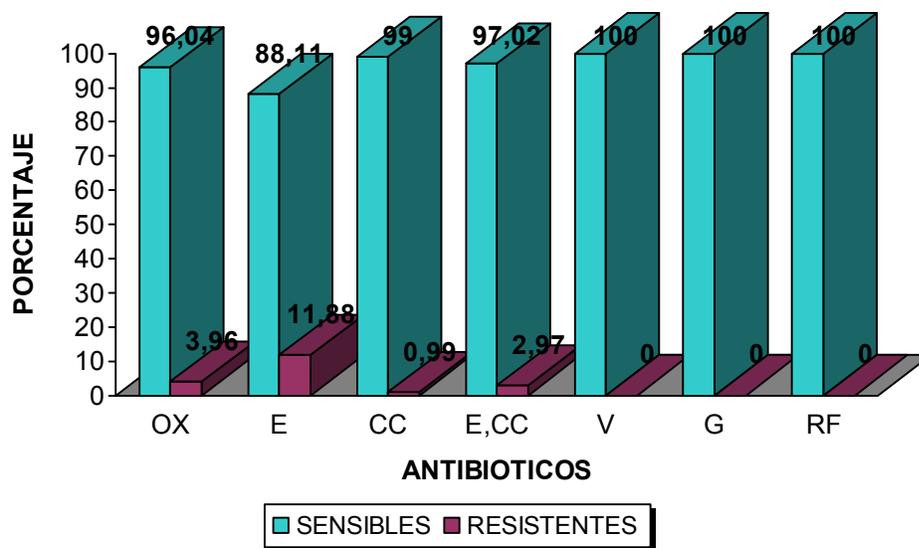
**FIGURA 1.** Distribución de la portación nasal de las cepas SARM en semestres básicos y clínicos



## PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las pruebas de susceptibilidad antibióticas realizadas a los 101 aislamientos de *S. aureus*, establecieron que 4 cepas (3.96%) presentaron resistencia al antibiótico oxacilina, 12 cepas (11.88%) resistentes a eritromicina, 1 (0.99%) fue resistente a clindamicina, y 3 (2.97%) resistentes tanto a eritromicina como a clindamicina. Todas las cepas aisladas de *S. aureus* fueron sensibles a vancomicina, gentamicina y rifampicina como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Patrón de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos de *S. aureus*.



OX: Oxacilina , E: Eritromicina, CC: Clindamicina, V: Vancomicina, G: Gentamicina, RF: Rifampicina.

## ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO

Al considerar las variables posiblemente implicados con la portación nasal de *S. aureus*, del total de voluntarios mostraron las siguientes características, 194 fueron del género masculino, 178 del femenino, 46 mostraron sufrir de

asma, 94 padecieron de rinitis, 50 sufren de dermatitis, 129 tuvieron acné, 40 presentaron sinusitis, 28 expusieron cambios anatómicos en la nariz, 35 referenciaron haber tomado antibiótico en el pasado mes y 36 lo hicieron en los pasados 3 meses, 9 reportaron haber estado hospitalizado en el pasado mes, 163 refirieron haber tenido contacto con pacientes, 171 reseñaron el habito de fumar y 10 refirieron el uso de spray nasal. El análisis estadístico fue realizado con el programa Epi-info 2005 y como medida de significancia estadística la prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) arrojando que ninguna variable puede ser asociada significativamente como un factor de riesgo ni causal ni protectorio para la portación nasal de *S. aureus* para este grupo en estudio. La Tabla 1 muestra las principales características de los voluntarios en relación con el estado de portación o no de *S. aureus*.

**TABLA 1. Características estudiadas de los participantes en función del estado de portador o no- portador nasal de *Staphylococcus aureus*.**

CARACTERISTICA	PORTADORES NASALES DE <i>S. aureus</i> (101)	NO PORTADORES NASALES DE <i>S.aureus</i> (270)	RR	IC95	P*
EDAD MEDIA	19,479	19,447	-----	-----	-----
GENERO (M / F)	48 / 53	146 / 125	0.88	0.70 - 1.11	0.275
	SI / NO	SI / NO			
ASMA	11 / 90	35 / 236	0.84	0.45 - 1.60	0.597
RINITIS	26 / 75	68 / 203	1.03	0.69 - 1.52	0.897
DERMATITIS	13 / 88	37 / 234	0.94	0.52 - 1.70	0.844

ACNE	36 / 65	93 / 178	1.04	0.76 - 1.42	0.811
SINUSITIS	10 / 91	30 / 241	0.89	0.45 - 1.76	0.746
USO DE ANTIBIOTICOS					
MES PREVIO	7 / 94	28 / 243	0.67	0.30 - 1.49	0.317
3 MESES PREVIOS	13 / 88	23 / 248	1.52	0.80 - 2.88	0.203
CONTACTO CON PACIENTES	51 / 50	112 / 159	1.22	0.96 - 1.55	0.113
USO DE SPRAY NASAL	5 / 96	5 / 266	2.68	0.79 - 9.07	0.099
HABITO DE FUMAR	4 / 97	13 / 258	0.83	0.28 - 2.47	0.721
CAMBIOS ANATOMICOS EN LA NARIZ	8 / 93	20 / 251	1.07	0.49 - 2.36	0.860
HOSPITALIZACION PASADO MES	2 / 99	7 / 264	0.77	0.16 - 3.63	0.736
CATEGORIA ETNICA					
BLANCA	13 / 88	41 / 230	0.85	0,48 - 152	0.582
NEGRA	8 / 93	17 / 254	1.26	0.56 - 2.83	0.572
MESTIZA	80 / 21	213 / 58	1.01	0.90 - 1.13	0.898

\*Chi-cuadrado fue utilizada como prueba de significancia estadística, RR= Riesgo relativo, IC95= intervalo de confianza del 95%

## DISCUSION

*Staphylococcus aureus* es un patógeno Gram positivo que puede estar presente en la piel y membranas mucosas del ser humano, siendo las fosas nasales el sitio de colonización más frecuente donde se adhiere a la mucosa y se multiplica con facilidad (Kluytmans. *et al* .1997). A pesar de la gran cantidad de estudios realizados, hasta el momento no se ha identificado el mecanismo preciso de la interferencia bacteriana en la colonización nasal. Pero sí se ha establecido que el transportar en la mucosa nasal *S. aureus*, es un factor de riesgo importante para el desarrollo de infecciones por este microorganismo, ya que los portadores tienen mayor incidencia de infección que los no portadores (Carreño. *et al*. 2006) La prevalencia de portación nasal de *S. aureus* encontrada en este estudio fue del 27.15% muy parecida con la prevalencia del 27.1% obtenida en Chile en este mismo grupo por Ortega y col. (Ortega. *et al*. 2001 ) y entra en el rango de 19% - 37% previamente reportado en este mismo grupo por Werner y Kingdom (Werner. *et al*. 2004, Kingdom. *et al* .1983) los que sugieren su control y vigilancia por considerar que pueden actuar como posible fuente de infección tanto intrahospitalaria como comunitaria (Wagner G.1990).

En cuanto a la resistencia de *S. aureus* a meticilina que es extrapolable al resto de los  $\beta$ -lactámicos, el 1.075% obtenido en este estudio es un valor bastante inferior al ser comparado con otros estudios en este mismo grupo, como el 20% reportado Céspedes y col (Céspedes C, *et al*, 2002) pero también es bastante similar al 0.8% reportado por la CDC de Atlanta en el 2006 (Graham, *et al*, 2006). Al correlacionar estas cepas resistente a meticilina en los estudiantes que están en semestres básicos y semestres clínicos, habríamos esperado según lo publicado en la literatura una mayor resistencia a meticilina en el grupo de los semestres clínicos al atribuirse

posiblemente al contacto permanente que estos tienen con personas enfermas (Castillo L. *et al* ,200). Sin embargo, los porcentajes obtenidos fueron igual para ambos grupos, poniendo de manifiesto que el contacto con pacientes en este trabajo no influencio el estado portador o no de *S. aureus*.

Con respecto a la resistencia a otros antibióticos, habríamos esperado según lo reportado en la literatura, una mayor resistencia antimicrobiana. En el caso de la eritromicina el porcentaje encontrado del 11.88% es bajo en comparación con otros estudios realizados en otras partes del mundo (Misko M. *et al*. 1995, Cobo. *et al* .2002) donde encuentran valores promedios entre un 30 y 40% de resistencia ante este antibiótico. La oxacilina con un porcentaje del 3.96% en este estudio también es un valor muy pequeño al compararlo con otros estudios como el de Cobo *et al* (2002) donde se encontraron porcentaje de resistencia ante este antibiótico del 25.89%. De igual manera el porcentaje de resistencia a clindamicina determinado en este estudio del 0.99% es muy inferior al ser comparado con otros estudios donde reportan valores de resistencia cercanos al 20% (Cobo. *et al* .2002, Serrano N. *et al* .2000). Colocando nuestros porcentajes de resistencia antibiótica muy por debajo del promedio de la gran mayoría de investigaciones en este microorganismo en diferentes áreas geográficas. Es importante destacar que no encontramos cepas resistentes a rifampicina, gentamicina ni a vancomicina. Este ultimo es considerado en la actualidad el mejor antimicrobiano disponible para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* resistentes a las penicilinas (Michel M.1997). Diversos estudios han encontrado asociación entre la portación nasal de *S. aureus*, y diversos factores de riesgo en estudiantes de medicina (Solayde *et al* .2007, Kingdom J *et al*.1983, Wagner G.1990). Uno de los factores que ha sido identificado como determinante en estos trabajos, ha sido la edad (Bischoff W, *et al*. 2004). Aunque en este estudio no se evaluó su significancia estadística sino

se comparó su promedio con el encontrado por Lu y su equipo de investigación en el 2005, (Lu PL, *et al* ,2005) en los que encontraron individuos con edades entre 11-20 años estaban colonizados con un porcentaje del 27.3% coincidiendo con el porcentaje de colonización de 27.15% y el promedio de edad de 19.45 encontrado en este grupo estudiantil. También el sexo se informó en varios estudios como un factor de riesgo para el transporte nasal de *S. aureus* (Ayliffe. *et al* .1977, Riewerts, *et al*. 1995), sin embargo en nuestro estudio fue considerada como no significativa por tener una  $p > 0.05$ . En contra posición a Bischoff (Bischoff W, *et al*. 2004) el cual reporta que los varones se encuentran colonizados en mayor proporción que las mujeres no obstante las razones de esta asociación siguen sin estar claros. Otra característica que algunos autores han descrito como un factor de riesgo para la colonización de *S. aureus* ha sido la sinusitis crónica (Boyce JM. *et al* ,1993), Sin embargo el estudio realizado por Kremer y colaboradores (Kremer B. *et al*,2001) en el que compararon la flora de individuos sanos con la de individuos con sinusitis crónica no muestra diferencia significativa en los porcentajes de colonización por *S. aureus*, equivalente a los resultados obtenidos en este estudio, en el que no puede considerarse la sinusitis como factor de riesgo por carecer de significancia estadística en el análisis. Sin embargo, lo que si se ha establecido es que la enfermedad en un portador es un factor que predispone la transmisión del microorganismo (Bischoff W, *et al*. 2004).

Podemos concluir el análisis de los factores de riesgo afirmando que este estudio no revalidó la variedad de factores de riesgo previamente identificados para el transporte nasal de *S. aureus* en características como: rinitis, acné, anomalías anatómicas de la nariz, uso de spray nasal, el hábito de fumar, la hospitalización en el pasado mes, el uso de antibióticos, el contacto con pacientes y las condiciones crónicas de la piel como la dermatitis, asociándolos no significativamente con el estado de portador.

Esto puede deberse a que la población voluntaria estaba conformada por individuos con buen estado general de salud, en los cuales las enfermedades graves o crónicas no fueron frecuentes, por lo tanto, podrían carecer de la significancia estadística necesaria para ser valorados como factor de riesgo.

## CONCLUSIONES

- la prevalencia de *S. aureus* detectada en este estudio esta dentro del rango previamente reportado de 19 - 37% para este grupo de edad; sin embargo es preocupante la emergencia y posible riesgo de diseminación de cepas MRSA dentro del personal de la salud, al considerarlos como posibles fuentes de infección en ambientes hospitalarios y/o comunitarios.
- las cepas de MRSA aisladas en este estudio posiblemente fueron adquiridas a nivel comunitario ya que sus perfiles de resistencia antimicrobiana solo están asociados a la meticilina.
- Alrededor del 12 %, 1 % y 3% de las cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina MSSA fueron resistentes a los antibióticos eritromicina (E), clindamicina (CC), y a ambos respectivamente.
- El uso de antibióticos en la población estudio fue al rededor del 9,4%. Y se debe tener en cuenta que el uso indiscriminado de antibióticos es uno de los factores que facilitan la aparición y diseminación de cepas multirresistentes en todo tipo de ambientes.
- No se encontraron asociaciones significativas entre los factores de riesgo analizados y el estado de portación nasal de *S. aureus* en la población estudio. Lo que nos podría estar indicando que otros factores tales como el estado inmunológico del huésped y la misma capacidad de virulencia de la bacteria determinen la etapa final de la portación y posterior infección por *S. aureus* .

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aires De Sousa M, Miragaia M, Sanches I, Avila S, Adamson i, Casagrande ST, Brandileone MC, Palacio R, Dell'acqua I, Hortal M, Camou T, Rossi A, Velazquez-meza Me, Echaniz-aviles G, Solorzano-santos F, Heitmann I, De Lencastre H. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus áureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. J Clin Microbiol. (2001) . 39(6):2197-205.
- Archer G, and Scout J. Conjugate transfer genes in staphylococcal isolated from the United States. Agents and Chemother. (1991). 35:2500-2504.
- Ayliffe G, Brightwell K, Collins B, Lowbury E, Goonatilake P, Etheridge RA. Surveys of hospital infection in the Birmingham region: I. Effect of age, sex, length of stay and antibiotic use on nasal carriage of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* and on postoperative wound infection. Journal of Hygiene. (1977). 79:299-314.
- Barber M. Staphylococcal infection due to penicillin – resistant strain. Br Med J.1947. 2:863-865.
- Baliga S, Bansil R, Suchitra U, bharati B, *et al.* Nasal carriage of meticillin- Resistant *Staphylococcus Aureus* in medical students. The Hospital Infection Society. (2007). 91- 92.
- Bannerman T. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other Catalasa positive cocci that grow aerobically. A: manual of clinical microbiology. 8<sup>VA</sup> ED. Editor: P:R. Murray. ASM press.Washintog DC (EEUU). 2002. 48-55.
- Bearman G, Edmond M. *Staphylococcus aureus*. In: Wenzel R, Brewer T, Butzler JP, ed. A guide to infection control in the hospital. 3 ed. Boston: ISID, (2004). 204-208.

- Bischoff W, Wallis M, Tucker K, Reboussin B, Sherertz R. *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage in a Student Community: Prevalence, Clonal Relationships, and Risk Factors. *Infect Control Hosp Epidemiol.* (2004). 25:485.
- Boyce J, Opal S, Potter-Bynoe G, Medeiros A. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital after exposure to a health care worker with chronic sinusitis. *Clin Infect Dis.* (1993).17:496-504.
- Carreño J, Gaona M, Peña M, Ríos D, Rivera C, Infecciones recurrentes por *Staphylococcus aureus* en paciente con piercing nasal asociado al estado de portador: estudio de caso. *Rev. Ciencias Salud. Bogotá (Colombia)* ,(2006). 4 (2): 116-122.
- Castillo L, Espinoza R, Castro J, Sepúlveda E, Crovetto M, Galvez M, *et al.* Portación nasal de *Staphylococcus aureus* en personal de salud y su sensibilidad a oxacilina y mupirocina. XVII Congreso Chileno de Microbiología, Hospital Mutual de Seguridad, CHC. (2000). 93.
- Casewell MW, and Hill RLR. Elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* with mupirocin (pseudomonic acid) a controlled trial. *J Antimicrob Chemother* (1986). 17: 365-372.
- CDC NNIS system: National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, Data Summary from January 1992, June 2002, issued august 2002. *Am J infection control:* 30-75.
- Cercenado E, Sanchez C, Alcalá L y grupo de trabajo para el estudio de Estafilococos. Situación actual de la resistencia de Estafilococos en España. Cuarto estudio nacional (1996). *Enferm Infec Microbiol Clin.* (1997). 197.12-26.
- Cespedes C, Miller M, Quagliarello B, Vavagiakis P, Klein R, Lowy F. Differences between *S. aureus* isolates from medical and nonmedical hospital personnel. *J Clin Microbiol.* (2002). 40: 2594-97.

- Chang S, Sievert D, Hageman J. *et al.* Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* investigative Team. 2003. with Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* containing the van A resistance gene. N Eng J Med.348:1342-7.
- CLSI. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Métodos de difusión en discos para determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Norma Aprobada, Novena Edición. Documento del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio M2-A9 (ISBN 1-56238-586-0). 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. . Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006).
- Cobo M, Manchado M, Porras B y Cárdenas M. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina Prevalencia actual en un área del sur de España, Rev Especializada en Quimioterapia, Septiembre. (2002). Vol.15 (Nº 3): 264-267.
- Coello R, Jiménez J, Garcia M, Arroyo P, Fernández C, *et al* . Prospective study of infection, colonization and carriage of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in a outbreak affecting 990 patients. EUR J CLIN Microbiol Infect Dis. (1994).74-81.
- Cosgrove S,Sacoulas G. *et al* . Comparison of mortality associated with meticillin resistant and meticilin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia : A meta analisis Clin infect Dis. (2003). 36(1):53-59.
- De lencastre H, De Jorje B, Matthews P, Tomasz A. Molecular aspects of meticillin resistance in *Staphylococcus aureus* . J Antimicrob Chemother. 1994. 33. 7,24..
- Dinges M, Orwin P, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol.Rev. (2000). 13; 16-34.

- Domingues M, De lencartre H, Liñares J. Spread and maintenance of a dominant meticillin resistant *S. aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in Spanish hospital. J Clin Microbiol.1994. 32 : 2081, 2087
- Essers, L. and Radebold, K. Rapid and Reliable identification of *Staphylococcus áureus* by a latex Agglutination test. J. clin. Microbiol. (1980).12, 641.
- Fekety FR Jr. The epidemiology and Prevention of Staphylococcal infection. Medicine (1964). 43:593.
- Graham III P, Lin S, Larson E. A US population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. Ann Intern Med. (2006). 144:318-25.
- Hartman B, Tomasz A. Expresion of meticillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother.(1986).29.85-92.
- Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H. Role of penicillinase plasmid in the stability of the mec A gene in meticillin resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother.(1990).34.600-604.
- Howe R, Brown N, Spencer R. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. J Clin Pathol. (1996). 49:444-9.
- Imsade J. Genetic regulation of penicillinase synthesis in gram-positive bacteria. Microbial. Rev. (1978).42: 67-83.
- Imsade J. Repressor and antirepressor in the regulation of staphylococcal penicillinase synthesis. Genetics. (1973). 75. 1-17.
- Jevons M. celbenin – resistant Staphylococi . Br Med J 1961:1:124-125.
- Joklik W, Willett H, Amos B . zinsser Microbiología. Editorial médica panamericana S. A. 18 va edición. (1986). P .518 - 523.

- Jones M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. (1999). European Network for Antimicrobial Resistant (ENARE). Eijkman-Winkler Institute. University Hospital Utrecht. The Netherlands. En:<http://www.ewi.med.uu.nl/enare/topics/mrsa.html>.
- Kanafani Z, Fowler V. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. (2006).24:182-93.
- Karabay O, Otkun MT, Yavuz MT and Otkun M. Nasal carriage of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in nursing home residents in Bolu Turkey. *West Indian Med J* (2006).55:1837.
- Kham S, and novick R. Terminal nucleotide sequences of Tn551 a transposon specific erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: homology with tn3. *Plasmid*. 1980. 4:148-154.
- Knox R. celbenin – resistant *Staphylococci* . *Br Med J* 1961;1:124-126.
- Kingdom JC, Joyce SM, Bradley FL, Jauch W, Falkiner FR, Keane CT. *Staphylococcal* nasal carriage in medical students with varying clinical Exposure. *J Hosp Infect*. (1983). 4:75-79.
- Kloos, W. E., and T. L. Bannerman. *Staphylococcus and Micrococcus*, (1999) p. 264 - 268. *In* P. R., E. J. Baron, M.A. Pfaller, F.C.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated Risks. *Clin. Microbiol. Rev*. (1997). 10: 505-520.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Diagnostico microbiologico*. Editorial Panamericana. Quinta edición. (1999). p. 84 - 86.
- Kremer B, Jacobs JA, Soudijn ER, Van der Ven AJAM. Clinical value of bacteriological examinations of nasal and paranasal mucosa in

patients with chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* (2001). 258:220-225.

- Langone, J. J. Protein A of *Staphylococcus áureus* and related immunoglobulin receptors produced by *Streptococci and pneumococci*. *Advances In Immunology*, (1982). 32, 157.
- Lu PL, Chin LC, Peng CF, Chiang YH et al. Risk Factors and Molecular Analysis of Community Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage. *J Clin Microbiol.* (2005).132-139.
- Lutz B. catalase tests. En: en isenberg HD, (Ed): *clinical microbiology Procedure Handbook, Mycobacteriology Sección*. Washington DC, American Society for microbiology, (1992).
- Lyon BR, May JW, and skurray RA. TN4001 a gentamicin a kanamycin resistant transposon in *Staphylococcus aureus*. *mol. gen. genet.* (1984). 193:554-556.
- Madigan M, J Martinko, and J Parker. *Brock. Biología de los microorganismos* . Pearson 10ª Edition. Practice Hall. Madrid España .(2003).
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas Principios y Prácticas*. 4 ed. New York: Churchill Livingstone; (1997). p. 1754-77.
- Mandell G, J Bennett, and R Dolin (Ed) *Bennett- principles and practice of infection diseases* 5<sup>th</sup>ed. Churchill Livingstone (phyladelphia, Pennsylvania. (2000).
- Marjolein F, Vandenberg Q, Yzerman F, Belkum A, Boelens H, Sijmons M, Verbrugh H. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: Redefining the persistent carrier state. *J of Clin Microb* (1999). 3133-3140.
- Michel M. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y enterococos resistentes a la vancomicina: realidades y posibilidades terapéuticas. *Lancet* (ed ). (1997). 31(5):185-8.

- Miller M, and B Bassler. Quorum Sensing in bacteria .Ann. Rev. Microbiol. (2001). 55:165-199.
- Misko M, Terracina J and Diven D. The frequency of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* in impetiginized dermatoses. *Pediatr Dermatol.* (1995). 12:12-15.
- Morton N. Swartz. Infecciones de la piel y de los tejidos blandos. En: Mandell G., Douglas R.G, Bennett J. E. Enfermedades infecciosas. Principio y prácticas., 3ra. ed, (1990). Editorial Panamericana.
- Moss B, Squire JR and Topley. Nose and skin carriage of *Staphylococcus aureus* in patients receiving penicillin. *Lancet* (1948). I : 320-325.
- Murphy E, Huwyler L. et al. Transposon TN554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition- defective and antibiotic-sensitive mutans. *EMBO J.*1985. 4:3357-3365.
- Naimi T, LeDell K, Boxrud D, Groom A, Steward C, Johnson S. Epidemiology and clonality of community- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996–1998. *Clin Infect Dis* (2001). 33: 990–6.
- Oliveira Dc, Tomas z and Lencastre H. Secrets of success of human pathogens: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* (2002) 2, 180-189.
- Omoe K, D Hu, H Takahashi, et al. Identification and Characterization of a new staphylococcal enterotoxin- related putative toxin encoded by two kinds of plasmid. *Infect. Immunology.* (2003).71.6088-6094.
- Opal SM, Mayer KH, Stenberg MJ et al. Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by health care workers in an endemic hospital environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* (1990).11: 479-484.

- Ortega C, González L, Yaquich P, Alfaro M, Cares C, Navia M. Del Canto Ema., Urbina R. *Clínica y Ciencia*.(2001). Vol 1 No 1, 10-14.
- Pattee P, Lee C, and bannantine JP. Genetical and physical mapping of the chromosome of *Staphylococcus aureus* P. 41-48 A: molecular of biology of Staphylococci. Editor: Novick RP. VCH publisher. New York (EEUU). (1990).
- Pezzlo, M. (Ed). Aerobic bacteriology, p. 1.0.0- 1.20.47. *In* H.D. Isenberg (Ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol.1. (1994). American society for microbiology, Washington, D.C.
- Pujol M, Peña C, Pallares R. *et al* . nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriage of methicillin resistant and methicillin susceptible starting. *AM J Med*. 100(5). (1994). 267-272.
- Riewerts E, Esperen F, Thamdrup R, Jensen K. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol. Infect*. (1995). 115:51-60.
- Romero – Vivas j, Rubio M, Fernández C, picazo J . Mortality asociated with nosocomial bacteremia due to methicillin resistant of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. (1995). 21(6); 1417-1423.
- Rouch D, Messerotti L. *Et al*. Trimethoprin resistance transposon TN4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductasa and thimidilate syntetase flanked dy three copies of IS 257. *MOL. microbiol*. (1989). 3(2):161-175.
- Rowland S, DYke K. Characterization of staphylococcal b- lactamasa transposon TN 552, *EMBO J*. (1989). 8:2761-2773.
- Sabath L and Mokhbat K. Whats is the clinical significance of tolerance to beta-lactam antibiotics?. *In*: *Current Clinical Topics In Infections Diseases*. J Remington and M Swartz (ed). Mc Graw-Hill Book company. New York. (1983). p. 348.

- Salazar R. Toma de muestras en microbiología. Bristol- Myers squibb. Modulo 3. (2006).
- Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ. *Et al.* Efficient defection and long-term persistent of carriage of methicillin resistant of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. (1994). 19: 1123-1128.
- Serrano N, Carvajal Z, Salaverría C, García, E. y Urrestarazu M. Resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* aislados de lesiones de piel y tejidos blandos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. (2000). v.20 n.1.
- Skurray RA, Firth N. Molecular evolution of multiple antibiotic resistant Staphylococci. 167-191.A: antibiotic resistance: origin evolution, selection and spread. Editor: Willy J. Ciba foundation Symposium 207. (1997).
- Solayide A. Adesida, Olusegun A. Abioye, Babajide S. Bamiro, *et al.* Associated Risk Factors and Pulsed Field Gel Electrophoresis of Nasal Isolates of *Staphylococcus aureus* from Medical Students in a Tertiary Hospital in Lagos, Nigéria The Brazilian Journal of Infectious Diseases .(2007).11(1):63-69.
- Stubbs E, Pegler M, Vickery A, Harbour C. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Australian (pre-clinical and clinical) medical students. *J Hosp Infect* (1994). 27:127-134.
- Tenover and R. H. Yolken, Manual of clinical microbiology, 7<sup>th</sup> ed. American society for Microbiology, Washington, D.C. (1998).
- Tenover F, Weigel L, Appelbaum P. *Et al.* 2004. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. 48: 275 -80.
- Wagner G. Staphylococci, Streptococci and other gram-positive cocci. En: The National Medical Series for Independent Study, Microbiology. Editorial Jhon Wiley and Sons, (1990). 81-86.

- Waldvogel F. A. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome), P. 1513-2539. in G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed), principles and practices of infectious Diseases, 5th edition. Churchill Livingston, New York, USA. (2000).
- Walker TS. Microbiología. 1ed. México: Mc Graw Hill Interamericana; (2000). p. 112-40.
- Wenzel R, Reagan D, Bertino J. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel definition and guidelines .AM J. Infect control. 1998. 26:110-110.
- Werner E. Bischoff, MD, Michelle L. Wallis, Keith B. Tucker, Beth A. Reboussin, Robert J. Sherertz. *staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community: prevalence, clonal relationships, and risk factors. infection control and hospital epidemiology,(2004).Vol. 25, (485-491).
- Williams REO. Skin and nose carriage of bacteriophage types of *Staphylococcus aureus*. J. Pathol. Bacteriol (1946). 58: 259-268.
- Yu V, Goetz A, Wagnener M, Smith P, Rihs J, Hanchett J. et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis: efficacy of antibiotic prophylaxis. N Engl J Med (1986).315:91-96.
- Zimakoff J, Pedersen F, Bergen, L, Baago-Nielsen J, Dalparph B, Espersens F. et al. *Staphylococcus aureus* carriage and infections among patients in four haemo-and peritoneal-dialysis centers in Denmark. J Hosp Infect (1996). 33:289-300.

## **CAPITULO 2. REVISIÓN.**

### **TECNICAS DE TIPIFICACION DE *Staphylococcus aureus***

*Yorlais Arroyo Barrios*

*Staphylococcus aureus* ha sido una de las primeras bacterias que ha requerido una diferenciación intraespecífica o establecer la clonalidad de los aislamientos, para ello se han desarrollado diferentes métodos de tipificación. La necesidad de tipificación ha estado en relación directa con su implicación en epidemias o brotes por fuente común en infecciones hospitalarias, comunitarias y de igual forma en intoxicaciones alimentarias. La aplicación de tales métodos proporciona información sobre la cadena epidemiológica (rutas de transmisión y reservorios), las posibles medidas de control, así como datos relevantes acerca de la evolución del patógeno en el espacio y el tiempo. Aislamientos bacterianos con idénticos resultados en varios métodos de tipificación se dice que pertenece a la misma línea clonal, grupo geonómico o linaje, aunque hayan sido obtenidos en diferente momento y lugar (Orskov. F y Orskov. I 1983).

Los métodos de tipificación de microorganismos patógenos, aplicados a estudios epidemiológicos permite el establecimiento de los linajes o las líneas clonales prevalentes y endémica frente a los esporádicos y emergentes de una determinada especie microbiana en una determinada comunidad, país o región geográfica. Los sistemas de tipificación y los caracteres que rastrean (o marcadores epidemiológicos) deben cumplir una serie de condiciones (Struelens *et al.* 1996, Mendoza y landeras. 1999)

**Criterios de realización o primarios.** Estabilidad de las marcas o caracteres rastreados, incluso cuando el patógeno pasa de un hospedador a otro. Alta capacidad de tipificación (preferentemente el 100%). reproducibilidad de los resultados en repetidas tipificaciones o ensayos, alto poder de

discriminación, siendo lo suficientemente sensible para distinguir organismos similares pero no idénticos y presentar un alto índice de discriminación (ID): probabilidad de que dos organismos no relacionados de una población se sitúen en dos grupos distintos. Fácil interpretación de los resultados.

**Criterios de conveniencia o secundarios.** Aplicación amplia, a diferentes especies bacterianas. Equipo, materiales y reactivos disponibles y baratos, rapidez, flexibilidad y facilidad de aplicación.

Estos métodos se pueden clasificar en **fenotípicos y genotípicos**. Los métodos fenotípicos se basan en la caracterización del género, especie, perfil bioquímico o biotipo, serogrupo, fagotipo, sensibilidad a bacteriocinas y el patrón de sensibilidad antibiótica de un microorganismo. Estos siguen siendo de gran utilidad en la investigación microbiológica por su disponibilidad, aunque en general tienen un poder de discriminación escaso.

Los métodos genotípicos se basan en el análisis de las estructuras genéticas de un microorganismo, por lo que son más discriminatorios, gozan de una alta reproducibilidad y están menos sujetos a variaciones que los métodos fenotípicos. Los estudios de los perfiles plasmídicos y del DNA cromosómico o plasmídico mediante enzimas de restricción, son algunos de estos métodos (Tenover y Robert .1997). El empleo de estos métodos ha demostrado que cepas de *S. aureus* pueden estar muy cercanas o distantes genéticamente (Tenover *et al.*, 1995; Wey y yang., 2000; Nagase *et al.*, 2002; Murchan *et al.*, 2003). A continuación describiremos los métodos de tipificación de *S. aureus* (Archer y Mihall. 1981).

## **1. METODOS FENOTIPICOS.**

### **1.1. ANTIBIOTIPIFICACION:**

La determinación del patrón de sensibilidad de una cepa es una forma práctica y sencilla de expresar la resistencia de una cepa ante un panel escogido de antibióticos. Es el reflejo fenotípico de la adquisición de genes que expresan mecanismos de resistencia de las bacterias, permitiendo realizar una primera aproximación a la homología de los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) aislados o detectar la introducción de una nueva cepa (Gillespie y Lyon.1990; Goetz *et al*, 1992).

Los SARM suelen presentar, además de la resistencia a la meticilina, que lo definen, resistencia a múltiples antibióticos que pueden incluir aminoglucosidos, fluorquinolonas, macrolidos, lincosamidas y tetraciclinas. Sin embargo, pueden observarse diferencias entre las cepas procedentes de distintas áreas geográficas, de centros diferentes del mismo país o incluso del mismo hospital (Domínguez *et al*, 1994). Además distintas cepas de SARM pueden presentar antibiogramas iguales o similares e incluso algunas cepas pueden modificar su antibiograma con el tiempo (Cookson y Phillips, 1988).

Aunque es una técnica sencilla y esta disponible en todos los centros clínicos y de investigación, tiene un poder de discriminación más bajo que la fagotipificación y los métodos genómicos por ende es recomendable complementarse en la mayoría de los casos con otras pruebas más discriminativas (Collins ,1984).No obstante, cuando se estudian cepas procedentes de distintas áreas geográficas puede tener un poder de discriminación más elevado y una buena correlación con los métodos moleculares (Struelens *et al*,1992).

## 1.2. FAGOTIPIFICACION:

La fagotipificación es una técnica de tipificación basada en el espectro de susceptibilidad de las cepas bacterianas a la lisis, seleccionado por su capacidad de identificar y subclasificar bacterias dentro de una misma especie.

Para la fagotipificación de *S. aureus*, se dispone de un set de fagos Standard que consta de varios grupos fágicos: I, II, III, IV conteniendo de 4 a 5 fagos por cada grupo (ICSB, 1987), a los que se les ha incorporado en los últimos años un grupo de fagos experimentales suplementarios ante la aparición de cepas de SARM no tipificables con los fagos convencionales (tabla.2) (Richardson *et al*, 1988).

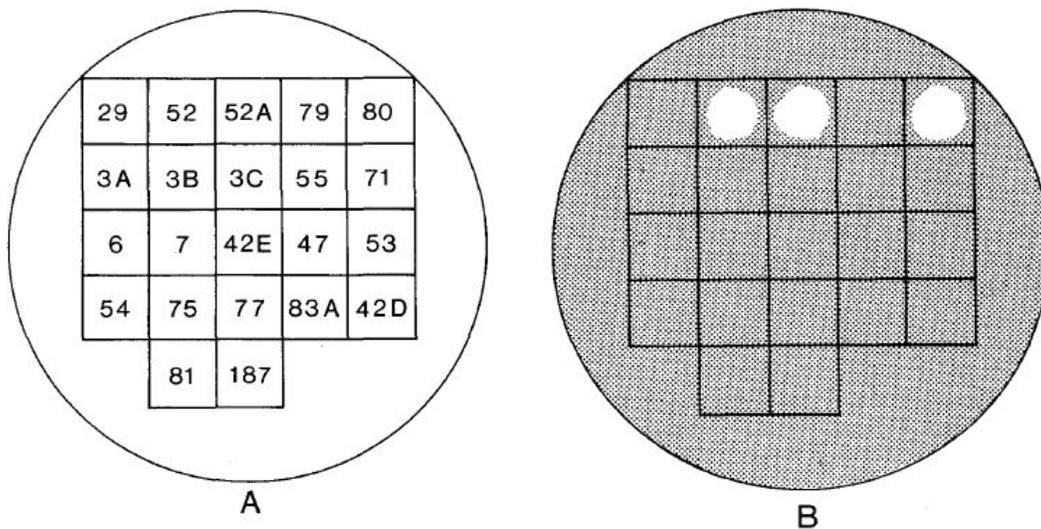
**Tabla 2.** Clasificación en fagogrupos y lista de fagos seleccionados para la fagotipia de *staphylococcus aureus*. (Adaptado de Pumarola et al, 1995)

Grupo	Fago									
I	29	52	52A	79	80					
II	3A	3B	3C	55	71					
III	6	7	42E	47	53	54	75	77	83A	
IV	42D									
No clasificados			81	187						

La determinación del fagotipo se efectúa en una placa de cultivo previamente cuadrículada e inoculada con el cultivo bacteriano puro. Depositando en cada una de las cuadrícula una gota de los fagos o la combinación de estos (figura .3). Después de la incubación a 37°C se determina el fagotipo, que estará dado por las zonas claras denominadas placas, que indican la infección y lisis celular, debido a la diferencias en los fagoreceptores de la pared de cada cepa.

La fagotipificación ha sido el método mas empleado en el estudio de brotes epidémicos de SARM durante varias décadas por su simplicidad. Sin embargo, en la actualidad ha sido sustituida por otros métodos debido a que solo se dispone de ella en algunos centros de referencia, esta poco estandarizada, es poco reproducible y es difícil el mantenimiento del set. Además solo el 50–60% de las cepas son tipables por los fagos disponibles, tiene un poder de discriminación relativamente bajo, mayor que los métodos fenotipicos pero menor que los genómicos (Akatok et al, 1991).

**Figura. 3.** fagotipia de *S. aureus*. A) Ejemplo de colocación de los fagos, B) fagotipo o lisotipo hipotético. (Adaptado de Pumarola et al, 1995)



La mayoría de las cepas de SARM causantes de brotes epidémicos en el mundo pertenecen a los fagogrupos III, I – III o son no tipables (NT) (Marple et al, 1986; Kerr et al, 1990). Vindel y colaboradores (Vindel y Sáez, 1992), analizaron las cepas de SARM causantes de 29 brotes en 20 hospitales entre los años 1978- 1992. Las anteriores al año 1989 pertenecían a los fagogrupos III, I – III, pero no estaban relacionadas epidemiológicamente entre si ni con las cepas actuales por pertenecer a diferente fagotipo. En

cambio a partir del año 1989 la mayoría de las cepas implicadas pertenecían al fagogrupo III o eran no tipables (cepas NT). En este segundo periodo se definían por fagotipificación dos cepas con similares características y capacidad epidémica.

### **1.3. BIOTIPIFICACION:**

La biotipificación es una técnica basada en el comportamiento diferencial de distintas cepas frente a una serie de reacciones bioquímicas específicas. La producción de estas enzimas que metabolizan diversos sustratos suministra una información parcial de las características genéticas de las cepas bacterianas.

Estas enzimas han sido usadas principalmente como marcadores para diferenciar grupos de especies, de tal forma que si un microorganismo posee una enzima dada, y es capaz de utilizar un sustrato, podrá formar un producto final capaz de modificar el pH del medio, lo que podrá visualizarse por el cambio de color de un indicador de pH, por aumento de la turbidez, la presencia de colonias en la superficie del medio, o por la fermentación de diversos azúcares (Mahon *et al.* 2000).

Tradicionalmente *S. aureus* es identificado presuntamente antes de tener una caracterización definitiva, basándose fundamentalmente en la demostración de la producción de coagulasa libre (tabla. 3) y la fermentación del manitol, pruebas que generalmente se presentan asociadas, pues solo el 2 % de estafilococos manitol-positivos son coagulasa- negativos. Se consideran pruebas suplementarias la producción de hemolisina a, fibrinolisisina, fosfatasas y DNAsas termoestables (Coia *et al.* 1990).

**Tabla. 3.** *S. aureus* (caracteres diferenciales) (Adaptado de Pumarola et al, 1995).

Caracteres	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulasa	+	-	-
Fermentación manitol	+	-	-
Toxina $\alpha$	+	-	-
ADNasas termoestables	+	-	-
Proteína A	+	-	-
Acidos teicoicos			
Fosfato de ribitol	+	-	+
Fosfato de glicerol	-	+	$\pm$
Sensibilidad a la novobiocina	+	+	-

Aunque existen en la actualidad otras investigaciones como las realizados en 1994 por Janda y Ristow en las que se probó un nuevo método para la identificación del *S. aureus*, basado en la detección fluorogénica de la coagulasa mediante la incorporación en el medio de cultivo de substratos cromogénicos para la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -galactosidasa, el RAPIDEC-Staph como se le denominó se evaluó con 303 cepas de *Staphylococcus*. Al hacer la comparación con varios métodos convencionales evidenció el reconocimiento del 100 % de las cepas *S. aureus*, observando que la especificidad y sensibilidad del método varió en relación de la especie a identificar. Recientemente *Gaillot et al.* Ensayaron un método cromogénico altamente específico para la identificación de *S. aureus* basados en la formación de colonias malvas posterior a las 18 h de incubación. El método presentó una excelente sensibilidad y especificidad, superiores a otros métodos convencionales y permite el recobrado o aislamiento de muestras clínicas que no fueron detectadas en el medio agar sangre. Pero a pesar de la sencillez, rapidez y disponibilidad de este método, su utilidad es escasa en estudios epidemiológicos y de tipificación de SARM por su limitado poder de discriminación entre distintas cepas circulantes (Coia et al, 1990).

#### **1. 4. SEROTIPIFICACION:**

La tipificación serológica es un conjunto de reacciones llevadas a cabo para conocer el serotipo al que pertenece un determinado microorganismo, utilizando una serie de anticuerpos que detectan los distintos determinantes antigénicos presentes en la superficie bacteriana, las reacciones incluyen agrupamiento flagelar, aglutinación celular y reacciones capsulares que se observan a simple vista o al microscopio (Karakawa y Vann, 1992).

Al principio de las investigaciones en esta área con *S. aureus* existieron algunos inconvenientes debido a la gran complejidad de su pared, que dificultó la determinación de su composición antigénica exacta, pero al día de hoy se sabe que la especie se caracteriza por la presencia de ácidos teicoicos, polímeros de fosfato de ribitol (polisacárido A) y proteína A, concibiendo la subdivisión en 18 serotipos, mediante el empleo de sueros de conejo tipo específicos. Además se ha determinado que los serotipos capsulares son los predominantes en cepas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas (Arbei, 1984), que los serotipos 1, 2 y 3 se corresponden en líneas generales con los fagogrupos I, II y III, y que el serotipo 5 permite identificar las cepas de SARM por ser el serotipo predominante entre estas cepas resistentes (Fournier *et al*, 1987).

En la actualidad existen varios juegos comercializados a base de látex como soportes sólidos, los cuales surgieron en la década del 80 y muestran todavía que son métodos rápidos y prácticos para la identificación del *S. aureus* (Persson *et al*, 1997; Wilkerson *et al*, 1997) por mostrar una alta sensibilidad y especificidad, y que aparte de esto permiten la detección de otras especies de estafilococos coagulasa positiva como (*S. intermedius* y *S. lycus*) (Quinn, 1994). No obstante, se han observado falsos positivos en el uso de alguno de éstos lo que lleva a la conclusión que es una técnica sencilla y disponible,

pero que tiene un poder de discriminación bajo desde el punto de vista epidemiológico (Emmerling *et al*, 1983).

### **1.5. ANALISIS ELECTROFORETICO DE PROTEINAS:**

El análisis electroforetico de proteínas incluye varias técnicas que detectan variaciones en las características fisicoquímicas de las proteínas de *Staphylococcus aureus* (Gaston *et al*, 1988). El análisis electroforetico de extractos celulares, seguido de tinción específica, determina la actividad de algunas enzimas como la esterasa, que permitiría distinguir entre las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) de las cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM) (Branger y Goulet, 1987). Son técnicas con un poder de discriminación bastante alto, pero de realización específicamente compleja.

El **inmunoblotting** es otra técnica electroforetica en que tras la electroforesis de las proteínas totales o de proteínas excretadas al medio, se realiza una transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se incuba con anticuerpos específicos y se detecta el complejo antígeno – anticuerpo que se forma, mediante un anticuerpo marcado. El patrón electroforetico que se obtiene es mas difícil de interpretar que en la electroforesis convencional de proteínas. Esta técnica es bastante reproducible y tiene un poder de discriminación elevado (Mulligan *et al*, 1988); sin embargo, solo esta disponible en pocos laboratorios y su utilización requiere experiencia.

## **2. METODOS GENOTIPICOS**

El advenimiento y desarrollo de la tecnología molecular nos permite contar con nuevos métodos que colaboran con la epidemiología de las infecciones dado su gran poder de tipificación de microorganismos.

Los fundamentos de estas técnicas son variables: estudios de restricción del ADN cromosómico o extracromosómico, análisis del número de copias de determinadas secuencias de inserción o repetitivas a lo largo del cromosoma o de las regiones entre secuencias de inserción o repetitivas adyacentes (REP-PCR) o amplificación arbitraria de fragmentos genéticos (AP-PCR). La mayor ventaja de estos métodos radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la posibilidad de aplicarlos universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos (Tabla 4) (Domínguez M. *et al.* 2005).

**Tabla 4.** Características de los marcadores moleculares más utilizados (modificada de van Belkum *et al.* 2001).

	Tipabilidad	Reproducibilidad	Poder de discriminación	Facilidad técnica	Interpretación	Costo
Perfil plasmídico	Variable	Regular	Variable	Regular	Buena	Medio
Ribotipado	Excelente	Excelente	Buena	Buena	Buena	Alto
PFGE	Excelente	Excelente	Excelente	Buena	Buena	Alto
PCR	Excelente	Regular	Excelente	Buena	Regular	Medio
AFLP	Excelente	Buena	Excelente	Buena	Regular	Alto
MLST	Óptima	Excelente	Excelente	Difícil	Excelente	Alto

**PFGE:** Electroforesis en gel de campo pulsante, **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa **AFLP:** Amplificación de fragmentos de longitudes polimórficas, **MLST:** Tipificación de secuencias multilocus.

En todas estas aplicaciones el objetivo es el de definir la relación existente, clonal o no, entre los aislamientos estudiados. El término **clon o grupo clonal** en epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común, esto es, por formar parte de una cadena de replicación y transmisión. Las cepas relacionadas provienen, pues, de la expansión clonal de un precursor único y poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no

relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente (Soll D *et al* .2003, Coll P y Prats G.2006).

A continuación se exponen los métodos moleculares que más se han utilizado para estudios epidemiológicos en bacteriología, en cada uno de ellos se comentan sus fundamentos básicos incluyendo criterios para la interpretación de los resultados.

### **2.1. ANALISIS DE DNA PLASMIDICO:**

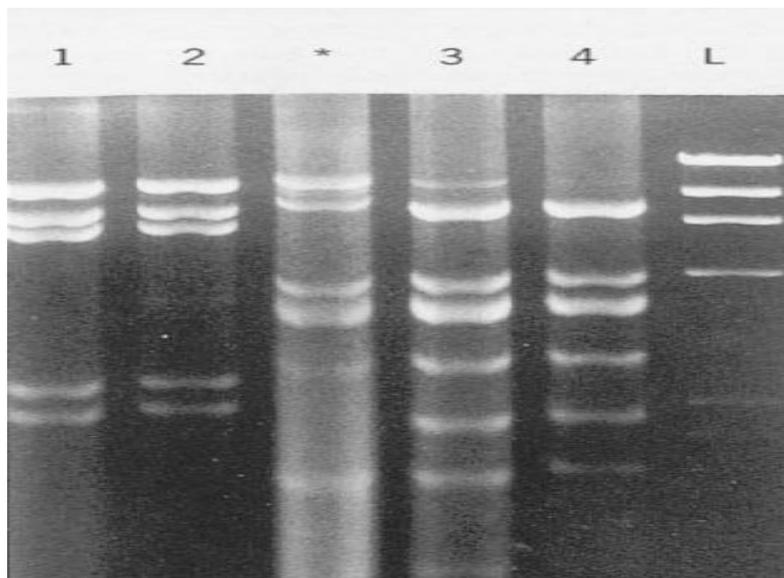
Los plásmidos son descritos como elementos de DNA circular extra cromosomales hereditarios móviles, los cuales pueden replicarse autónomamente y contener al menos un origen de replicación. Aunque ellos no son esenciales para la vida de las bacterias, cuando la célula bacteriana se divide, copias de los plásmidos residentes se distribuyen entre las células hijas, por lo que es de esperar que miembros de la misma línea clonal contengan los mismos plásmidos (Sloos J *et al* .2000).

Fue el primer método molecular que se utilizó como herramienta epidemiológica de tipificación bacteriana basándose en el reconocimiento y comparación en el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo a la coincidencia de sus bandas (Farrar, 1983).

La determinación de los perfiles plasmidicos puede realizarse por procedimientos relativamente simples de extracción y separación de DNA plasmídico del cromosómico, seguido de la separación de los plásmidos por electroforesis en un gel de agarosa gracias a su migración diferencial según el peso molecular. Habitualmente se comparan dos cepas examinando el número y tamaño de sus plasmidos. Sin embargo, si estas poseen un único plasmido con peso molecular similar como en algunas cepas de *S. aureus*,

es necesario confirmar la identidad entre sus plasmidos mediante el análisis por restricción con endonucleasas del DNA plasmídico (Figura 4). Estas enzimas reconocen secuencias de bases específicas y las cortan en una posición determinada, de forma que dos plasmidos iguales presentaran el mismo perfil de restricción de DNA plasmídico (Tenover ,1985).

**Figura. 4.** Análisis del ADN extracromosómico de dos cepas de *Staphylococcus aureus* tras el empleo de endonucleasas de restricción. Recorridos 1 y 2: digestión con Eco RI; recorrido\*: cepa control; recorridos 3 y 4: digestión con Hin dIII; recorrido L: marcador de peso molecular. (adaptado de Trilla A.1993)



El análisis de DNA plasmídico es una técnica rápida que se correlaciona muy bien con otros métodos fenotípicos, como el perfil bioquímico y el patrón de resistencia a antibióticos. Sin embargo, su poder de discriminación es limitado por varios motivos (Shales *et al.*1986). En primer lugar, solo el 90% de las cepas presentan plasmidos. En segundo lugar, se puede producir variaciones en los perfiles plasmídicos por deleción y recombinación de secuencias del DNA en el mismo plasmido o entre plasmidos, o bien por adquisición de DNA nuevo. Además los plásmidos pueden presentarse en

diferentes conformaciones que varían con el grado de superenrollamiento, produciendo a partir de una misma variedad de plásmido diferentes patrones de movilidad electroforética. Una cepa también puede adquirir o perder plasmido a lo largo del brote epidemiológico, o durante el subcultivo. Por ello, se recomienda que el análisis debería realizarse en bacterias con el menor número de subcultivos posibles (Zuccarelli *et al*, 1990). Por último, algunos factores técnicos como la variación de los métodos de extracción o de las condiciones de electroforesis también pueden influir en el perfil plasmídico obtenido. Debido a estas limitaciones se ha definido la tipificación por perfiles plasmídicos como una herramienta de gran ayuda en estudios epidemiológicos limitados temporal y geográficamente, y que puede tener más valor si es complementada con otras técnicas genotípicas que involucren estudios cromosómicos.

## **2.2. ANALISIS DE DNA CROMOSOMICO:**

El análisis de DNA cromosómico consiste en la ruptura del mismo en fragmentos mediante una o varias enzimas de restricción y su separación posterior por electroforesis en gel de agarosa, obteniendo un patrón de bandas característicos de cada cepa. A diferencia del análisis del DNA plasmídico puede utilizarse en aquellas bacterias que carecen de plásmidos, y tiene una mayor estabilidad. Por ello, se considera el método más sensible para el estudio epidemiológico de SARM (Jordens y Hall, 1985; Venezia *et al* ,1992). Se distinguen varios tipos de análisis de DNA cromosómico:

### **2.2.1. Electroforesis en geles de agarosa en campo constante:**

Se obtienen un perfil numeroso de fragmentos de DNA de 25 a 0.5 Kb difícil de interpretar, por lo que tiene menor poder de discriminación que otras técnicas electroforéticas como el inmunoblotting (Burnie *et al* ,1989). Su capacidad de discriminación puede mejorar utilizando southern blot para

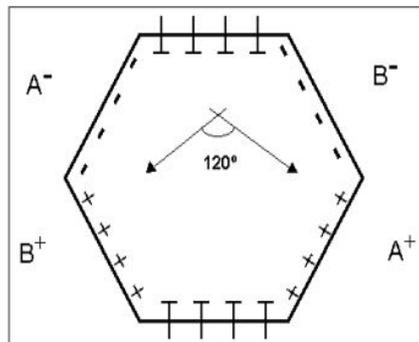
identificar fragmentos de DNA concretos mediante su hibridación con sondas específicas (Mulvey et al, 1986).

### 2.2.2. Electroforesis en geles de agarosa en campo pulsante (PFGE):

La electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE por sus siglas en inglés) fue descrita en 1984 como una herramienta para examinar el ADN cromosómico de organismos eucariotas. Ha sido uno de los progresos más útiles de la epidemiología molecular en las décadas pasadas; emerge en los 90's como una técnica de la huella dactilar considerada el estándar de oro para la tipificación molecular de microorganismos, por tener un poder de discriminación entre distintas cepas y una estabilidad superiores al del DNA plasmídico y a la fagotipificación. (Maslow *et al*, 1993; Goering, 1993; Tenover *et al.*, 1994; Struelens y MESGEM, 1996; Tenover *et al.*, 1997; Warner y Onderdonk, 2003).

En esta técnica, el genoma bacteriano es digerido con una enzima de restricción que es relativamente de pocos sitios de reconocimiento y que genera aproximadamente de 10 a 30 fragmentos de restricción que van de 10 a 800 kb. Todos estos fragmentos pueden ser separados como un patrón de distintas bandas por PFGE, usando una cámara diseñada especialmente que cambia de posiciones en el gel de agarosa entre tres juegos de electrodos que forman un hexágono alrededor del gel (Figura. 5) (Tenover *et al.*, 1997; Warner y Onderdonk, 2003).

**Figura. 5.** Distribución de los electrodos en la electroforesis en gel de campo pulsante.



Los cambios de orientación periódica de los campos eléctricos, permiten la separación y determinación del tamaño de los fragmentos de macrorestricción. Al mismo tiempo la PFGE escanea más del 90% del cromosoma para reordenar fragmentos de gran tamaño tales como duplicaciones, cancelaciones, o inserciones de secuencias que se detectan como un cambio en el tamaño o número del fragmento. Por último se comparan los patrones de restricción para determinar sus relaciones. Algunos resultados con esta técnica pueden llevar a conclusiones diferentes entre laboratorios, por lo que deben seguirse unas guías para analizar la correlación entre los aislados como la propuesta de Tenover y Cols (Tenover *et al*, 1995), el cual considera que los aislados que difieren en menos de tres bandas o fragmentos pueden presentar variantes genotípicas de una misma clona, mientras que los que difieren en tres o más bandas tienen un origen clonal diferente.

Esta técnica ha demostrado ser altamente efectiva para muchas especies bacterianas tanto gram-positivas como los *Staphylococcus* y gram-negativas como las *Enterobacteriaceae*. En *S. aureus* se han hecho esfuerzos a gran escala para establecer las relaciones epidemiológicas de los SARM. Como el estudio realizado por Olivera *et al* publicados en el 2001, en el cual se pudieron analizar los genotipos de 3067 cepas de SARM consiguiendo incluir aislamientos de Europa, América Latina, EUA, Japón, Taiwán, China y los primeros aislamientos del SAMR recuperados en Dinamarca e Inglaterra. Esta tipificación molecular dio como resultado: 1) la identificación de cinco clonas pandémicas mundiales: Clona Ibérica, Clona Brasileña, Clona Húngara, Clona Nueva York/Japón, y Clona Pediátrica y que el 68% de los aislamientos podían englobarse en alguno de estos cinco clones.

El **clon ibérico** se detecto por primera vez en 1989 como el responsable de un brote de SARM en el Hospital Universitario de Bellvitge y se diseminó a otros países como Francia, Bélgica, Portugal, Escocia, Italia, Alemania, Holanda, República Checa, Polonia, Suecia y Estados Unidos. **El clon brasileño** fue descrito en 1992 en Brasil y se extendió a países de Suramérica como Argentina, Uruguay y Chile y a países europeos como Portugal, República Checa, Grecia, Finlandia, Alemania, Irlanda, Holanda, Polonia, Suecia, el Reino Unido y recientemente en India. **El clon húngaro** se ha expandido por los Hospitales de este país y recientemente se ha reportado en hospitales de Taiwán, China e India. **El clon New York/Japón** fue identificado en los Hospitales de New York, Nueva Jersey y Pensilvania, en Canadá, Florida y en Hospitales de Tokio también en países europeos como Finlandia, el Reino Unido, Irlanda y más recientemente en México. **Y el clon pediátrico** fue descrito en 1992 en un hospital pediátrico de Portugal y posteriormente se ha encontrado en Polonia, Estados Unidos, Argentina, Francia, Reino Unido y Colombia.

Las principales dificultades asociadas con esta técnica son las relacionadas a las demandas técnicas del procedimiento y costos iniciales del equipo. La preparación de ADN genómico apropiado requiere de 1 a 3 días, dependiendo de los organismos a examinar, y los costos del equipo requerido (incluyendo el aparato de electroforesis y el transiluminador) varía entre 10,000 y 20,000 dólares. Sin embargo, el método es operacional en el laboratorio, y puede ser aplicado a un amplio rango de especies con solo un mínimo de modificaciones (Tenover *et al.*, 1997).

### **2.2.3. Ribotipificación:**

La ribotipificación es una técnica de hibridación, el cual un determinado gen referencial (el ADN ribosomal) se unirá a las secuencias complementarias ubicadas en el ADN genómico del microorganismo evaluado. En casos

aplicados como el presente, cada una de las señales producidas por la hibridación representa una copia del gen referencial ubicado en el genoma del microorganismo evaluado. Por lo tanto el número y la ubicación de las copias serán representativos para cada aislamiento y para cada especie, proporcionando un perfil característico (Calderón E *et al.* 2002).

El análisis de ribotipificación se fundamenta en la diversidad de los genes que codifican el ARN ribosomal entre las especies. Estos genes se encuentran presentes en el genoma bacteriano en múltiples copias, cuyo número y localización depende de la especie. Sin embargo, existen especies que tienen un número de copias muy limitado, para las cuales este sistema de tipificación no está recomendado (Ejemplo: *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Borrelia burgdorferi*) (Aparicio *et al.*, 1992).

Al igual que el análisis plasmídico, el análisis del perfil ribotípico se basa en examinar y comparar el número y tamaño de bandas entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo a la coincidencia de sus bandas. La cantidad de información genética existente entre y dentro de los genes ribosomales es heterogénea; en diferentes aislamientos a lo largo de un período de tiempo, se pueden perder o insertar copias de los genes ribosomales o secuencias diferentes, lo que genera que los perfiles sean similares o distintos, según sea el caso. Todo ello explica la posibilidad de diferenciar aislamientos epidemiológicamente relacionados mediante la ribotipificación, lo cual se resume en la gran diversidad inter y extra especies que existen entre los genes ribosomales (Calderón E *et al.* 2002).

Finalmente, el procedimiento de la ribotipificación consiste en purificar el ADN total o genómico de cada aislamiento bacteriano para subsecuentemente digerirlo con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos de ADN son separados por electroforesis en gel de campo

punsante (PFGE) y luego transferidos a una membrana de nylon. Después, la membrana conteniendo el ADN es hibridizada con una sonda de ADN ribosomal marcado, para finalmente revelar las uniones de la sonda mediante reacciones quimioluminiscentes, permitiendo el desarrollo de un patrón que será característico y similar en aquellos aislamientos bacterianos epidemiológicamente relacionados. Este es un marcado muy estable, dado que los genes que codifican el ARN ribosomal están altamente conservados, pero presenta menor poder de discriminación que otros métodos cromosómicos (Aparicio *et al*, 1992, Prevost *et al*, 1992). Algunas de las ventajas de esta técnica son: la proporciona resultados ampliamente reproducibles, Para algunas especies, su moderado poder discriminativo, y su aplicabilidad a cualquier tipo de microorganismo bacteriano. Entre sus desventajas destacamos: Su alto costo frente a otras metodologías, y su dependencia del marcaje de la sonda por lo que normalmente no se encuentra disponible en muchos centros de investigación.

### **2.3. TECNICAS DE TIPIFICACION BASADAS EN LA PCR:**

La PCR ha sido definida como un proceso de amplificación de secuencias de ADN específicas, basado en el mecanismo de replicación del ADN celular. Desde su aparición ha sido adaptada en varios campos, incluyéndola como herramienta de tipificación, permitiendo producir millones de copias de un segmento de ADN con alta fidelidad. Su procedimiento requiere de un molde de ADN, dos oligonucleótidos que flanquean la secuencia a ser amplificada, y una ADN polimerasa estable al calor. Un ensayo de PCR típicamente requiere de unas 3 horas para completar 30 ciclos, cada uno de los cuales consiste en una fase de desnaturalización (en donde las dos hebras de ADN se separan), una fase de hibridación (en la que los oligonucleótidos se hibridan con las secuencias complementarias en el molde) y una fase de extensión (en donde la polimerasa sintetiza nuevas hebras de DNA a partir

de las secuencias determinadas por los oligonucleótidos), generándose por ciclo dos nuevas copias de DNA doble cadena a partir del molde original (Jones y Bej, 1994).

Existen en la actualidad muchas variantes de la PCR pero todas se fundamentan en el mismo principio general: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación (van Benkum 1994; Olive y Bean, 1999). En general existen tres grupos de variantes de la PCR. 1). Aquellas en las que utilizando cebadores arbitrarios o con cierta especificidad, se amplifican regiones del genoma localizadas entre dos cebadores adyacentes separados por una distancia no superior a la que la *Taq* polimerasa puede amplificar, 2) Variantes en las que previa o posterior a la amplificación génica se somete el genoma o producto amplificado a digestión con enzimas de restricción, y 3) Aquellas que amplifican regiones internas de ciertos genes y posterior secuenciación.

Por lo general, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas, y permiten trabajar con un mayor número de muestras que la PFGE (van Benkum 1994; Olive y Bean, 1999).

### **2.3.1. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)**

La amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, randomly amplified polymorphic DNA) es una de las técnicas más utilizadas para la tipificación de microorganismos, tanto patógenos (Tansel *et al.*, 2003; Betancor *et al.*, 2004) como de interés tecnológico (Cocconcelli *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2001; Di María *et al.*, 2002). Es una técnica sencilla y rápida que presenta un gran número de ventajas. Se diferencia de la PCR convencional en que los cebadores utilizados presentan secuencias de nucleótidos aleatorias de

corta longitud (8-12 nucleótidos) y se hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja Astringencia (temperatura de hibridación a 30- 45° C y concentraciones de MgCl<sub>2</sub> superiores a 2mM) (Welsh y Mccelland, 1990). Generalmente se utiliza un solo cebador que puede, teóricamente, tener muchos sitios complementarios en el genoma y dado que las condiciones son poco astringentes pueden unirse en diferentes sitios, aun cuando la homología no sea completa. Cuando se dan dos uniones adecuadas, aunque sean imperfectas, en sitios separados entre 200 y 2000 pb entre si y en la orientación perfecta (5' → 3') en cadenas opuestas del ADN, la secuencia comprendida entre ambos sitios puede ser amplificada. (Farber y Addison, 1996). Cada fragmento de ADN amplificado dará lugar a la aparición de una banda en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las diferencias en los patrones de bandas o polimorfismo entre cepas puede ocurrir como resultado de la delección de un sitio de unión del cebador, por la inserción de ADN que desplaza el sitio de unión demasiado lejos como para que se de la amplificación o a inserciones o delecciones de ADN que cambian el tamaño de un segmento de ADN sin impedir su amplificación.

Aunque existan muchas ventajas en la utilización del RAPD para el genotipado de microorganismos, uno de los mayores inconvenientes de esta Técnica es su baja reproducibilidad. Esto se debe a que es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción del ADN, el tipo de termociclador, la concentración de ADN, la temperatura de hibridación de los cebadores, la concentración de los iones Mg<sub>2+</sub>, etc. (Tyler *et al.*, 1997) . No obstante el método puede ser reproducible si se trabaja bajo condiciones cuidadosamente controladas (Farber y Addison, 1996). En general la Técnica del RAPD tiene un poder de discriminación inferior al de la PFGE, aunque puede incrementarse con la utilización de

varios cebadores y mediante la optimización de las condiciones de PCR (Fernández – Cuenca, 2004).

### **2.3.2. PCR - Ribotipia**

La PCR -RIBOTIPIA aprovecha la heterogeneidad de las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales 16s y 23s (van benkul 1994; olive y bean, 1999). En los organismos procariotes las tres subunidades del operon *rrn* (16s, 23s y 5s) están separadas por regiones espaciadoras que pueden presentar una gran variabilidad tanto en la secuencia como en el tamaño a nivel de genero y especie (Campbell et al., 1993; Swaminathan y Matar, 19993). De esta forma, tras la amplificación de ADN, se obtienen múltiples bandas que corresponde al distinto tamaño de las regiones espaciadoras de los diferentes operones *rrn* que presenta las bacterias (Farber y Addison, 1996). En este método, en lugar de utilizar cebadores arbitrarios se utilizan cebadores para amplificar los genes que codifican ARNr. Esta técnica es reproducible aunque tiene un poder de discriminación bajo, que puede incrementarse con la utilización de enzimas de restricción (Farber y Addison, 1996). En el estudio realizado por Vila *et al.* (1996) se observo que el análisis de los patrones de restricción de los amplificados de los genes ribosomales (ARDRA) y/o las regiones espaciadoras que separan los genes 16s y 23s es una técnica con un poder de discriminación bastante inferior a las técnicas de RAPD y PFGE.

### **2.3.3. PCR – RLFP**

La Técnica de PCR – RLFP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas (Van Benkul 1994; Olive y bean, 1999). Con esta Técnica se estudia una región muy limitada del genoma con frecuencia genes de virulencia (Samadpour *et al*, 1995), por lo que su poder de discriminación y

reproducibilidad suelen ser algo inferiores al de los métodos de tipificación ya mencionados.

En este método se realiza una PCR utilizando cebadores que amplifican una región de virulencia en particular. El amplicon resultante se digiere con endonucleasa de restricción, que se escogen en función de la composición conocidas de bases de la región diana, los productos obtenidos se separan electroforéticamente en un gel de agarosa que se tiñe con bromuro de etidio. Las principales ventajas de esta Técnica son su rapidez, su simplicidad y su reproducibilidad. El poder de discriminación es inferior al de la PFGE aunque puede aumentarse utilizando varias enzimas de restricción.

#### **2.3.4. REC – PCR**

La amplificación de fragmentos repetidos (REC – PCR, repetitive element PCR fingerprinting) es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep) o presentes en múltiples copias en los genomas de la mayoría de bacterias Gram - negativas y Gram – positivas (Lupski y Weinstoc, 1992). Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas: las secuencias repetitivas palindromicas extragenicas (secuencias REP) de unas 35 – 40 pb, las secuencias consenso repetitivas ínter génicas de enterobacterias (secuencias ERIC) de 124- 127 pb y los elementos box de unos 154 pb (Versalovic *et al.*, 1994). Estas secuencias están localizadas en diferentes regiones antigénicas a lo largo de todo el genoma y en ambas orientaciones, dependiendo de la especie o cepa que se trate. Amplificación por PCR de las regiones genómicas situadas entre los elementos repetidos genera fragmentos de varios tamaños, dependiendo de la longitud de la región genómica comprendida entre las diferentes secuencias repetitivas. Los

productos de PCR pueden ser separados electroforéticamente en un gel de agarosa para obtener diferentes patrones de bandas.

La técnica de REC – PCR (amplificación de secuencias REP) se caracteriza por su simplicidad (no requiere de enzimas de restricción ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 horas) y su relativo bajo costo, una vez que se disponga de un termociclador.

Los patrones de bandas suelen ser sencillos aunque en algunos microorganismos la interpretación de los patrones puede dificultarse debido a la proximidad existente entre algunas bandas y al mayor número de bandas (Fernández – Cuenca, 2004). Esta Técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferior a los de la PFGE, aunque para algunas bacterias, se ha visto que a REP-RCR presenta un poder de discriminación similar al de la PFGE (Vila *et al.*, 1996). Estudios realizados por Tenover *et al.* (1995) y Van Belkum *et al.* (1995) indican que la rep-PCR es tan discriminativa como RAPD y PFGE para tipificar *Staphylococcus aureus*.

La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR) es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal de diferentes bacterias. Los patrones de bandas que se obtienen suele ser menos complejos que los generados mediante la REP-PCR (Fernández – Cuenca, 2004).

La rep-PCR además de permitir el estudio de la diversidad intraespecífica, también tiene utilidad en la identificación y clasificación de microorganismos y en estudios epidemiológicos de microorganismos patógenos (Van Belkum *et al.*, 1995; Lowis *et al.*, 1994; Versalovit *et al.*, 1997; Deplano *et al.*, 2000; Dasen *et al.*, 2003).

### **2.3.5. AFLP**

El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) es un método de reciente desarrollo para el genotipado de microorganismos. Esta técnica se fundamenta en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción (generados a partir de ADN cromosómico) a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos (Vos *et al.*, 1995). Existen variaciones metodológicas del AFLP dependiendo del número de cebadores (normalmente se utilizan 1 o 2), del tipo de marcaje de los cebadores (radiactivo o fluorescente) y del número de enzimas de restricción utilizadas (1 o 2). Los protocolos de AFLP más utilizados suelen emplear dos enzimas de restricción y cebadores fluorescentes. Las ventajas más interesantes de este método son su elevada sensibilidad y su excelente poder de discriminación. La técnica de AFLP suele ser menos discriminativa que la PFGE, aunque para algunos microorganismos es muy similar su poder de discriminación (Antonishyn *et al.*, 2000).

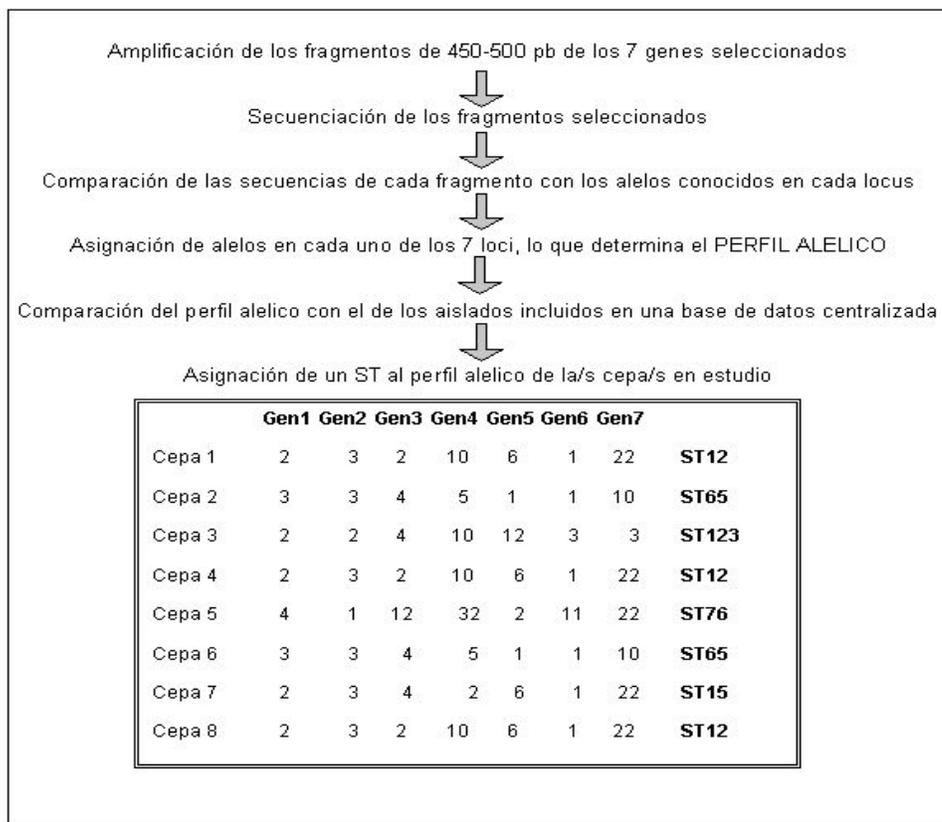
Entre los principales inconvenientes de esta técnica hay que destacar su laboriosidad, el elevado costo del equipo, la obtención de patrones de bandas complejos (entre 30 y 50 fragmentos de tamaños diferentes) y el análisis de los mismos con programa informático adecuado (Fernández – Cuenca, 2004). Todo esto hace que el AFLP se utilice fundamentalmente en centros de referencia.

### **2.3.6. Tipificación de secuencias multilocus (MLST)**

La tipificación de secuencias multilocus (*multilocus séquense typing*, MLST) es una técnica de tipificación basada en la amplificación y secuenciación de genes constitutivos (housekeeping), generalmente genes ribosomales y/o genes relacionados con factores de virulencia (Vásquez y Berron, 2004). El

MLST esta basado en los principios de los análisis de isoenzimas (*multilocus enzyme electrophoresis*), pero difiere en que detecta variaciones en diferentes *locus* de forma directa por secuenciación de ADN de fragmentos internos (de aproximadamente 500 pb de 7 genes constitutivos. Para cada gen, las diferentes secuencias existentes en una misma especie bacteriana son asignadas como alelos distintos y, para cada aislado, los alelos de cada uno de los 7 loci definen el perfil alelico o secuenciación tipo (ST) (Maidel *et al.*, 1998). Esto permite caracterizar de modo inequívoco los diferentes aislados de una especie con la ventaja adicional que la secuenciación de ADN es un dato objetivo fácilmente intercambiable entre diferentes laboratorios (figura 6).

**Figura. 6.** Procedimiento MLST. (adaptado de Van Leeuwen *et al.* 2003)



El principio del desarrollo del MLST se encuentra en algunos trabajos de genética de poblaciones que intentaron correlacionar la información obtenida mediante secuenciación de los genes analizados (Smith *et al.*, 1980; Feit *et al.*, 1999). En este proceso se observó que algunas regiones específicas de los genes analizados eran responsables de la mayor variabilidad observada, mientras que el resto de los *locus* presentaba un alto grado de conservación. Así se decidió analizar en cada gen un solo fragmento interno de entre 450 - 500 pb cuyo nivel de variabilidad, combinado, entre los genes analizados, proporcionaba un alto grado de discriminación.

Desde que esta técnica se describió en 1998 hasta nuestros días (Maiden, 1998), el método se ha desarrollado para 11 especies diferentes de bacterias. Para el seguimiento de clones y/o líneas clonales, consiguiendo trazar procesos de dispersión, identificando con gran precisión grupos poblacionales específicos con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente. Por tanto, es un marcador molecular indicado en lo que se conoce como epidemiología global a largo plazo. Ofrece resultados de gran precisión y puede, identificar la presencia de líneas clonales hipervirulentas, prediciendo con cierta antelación la llegada de ondas epidémicas. Asimismo, es un marcador que permite el seguimiento de clones resistentes prediciendo la evolución a medio plazo de los niveles de resistencia en el microorganismo analizado. Este análisis ha ofrecido buenos resultados en el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con un patrón de multirresistencia a varios antimicrobianos. En el caso específico de *Staphylococcus aureus*, MLST se aplicó por primera vez en el año 2000 en un estudio de tipaje y caracterización de 155 aislamientos invasivos de *S. aureus* (Enright, 2000). Posteriormente esta técnica se ha aplicado a numerosos estudios, llegando a la conclusión de que las cepas de SARM tienen una estructura clonal conservada en comparación con los *S.*

*aureus* sensible a meticilina, y que un número pequeños de clones son los que tienen la capacidad de diseminarse (Oliveira, 2001; Johnson, 2001). También se han obtenido datos por MLST que indican que *S. aureus* tiene un bajo nivel de recombinación genética y que la diversidad clonal se produce más frecuentemente por mutaciones puntuales que por procesos de intercambio de material genético (Fey, 2003)

Como ya se menciona; MLST ha sido utilizado para dar respuesta a los típicos interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc). Sin embargo, su poder de discriminación es muy inferior al que se obtiene con la aplicación de otros marcadores como el análisis del ADN mediante electroforesis en campo pulsante, técnicas de tipificación por PCR, AFLP, etc.

Para cada cepa deben realizarse 7 reacciones de amplificación y 14 reacciones de secuenciación, lo que hace que sea una técnica costosa, laboriosa y que precisa de tecnología de secuenciación automática. Su aplicación queda, por el momento restringida a laboratorios de referencia. En estos, el análisis de un alto número de cepas, racionaliza su aplicación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akatok AK, Zueva VS, Dmitrenko OA: A new approach to establishing the set of phages for typing Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Chemother (1991).3(5):275-278.
- Antonishyn NA, MacDonald RR, Chan EL, Horsman G, Woodmansee CE, *et al.* Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed – field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. J Clin. Microbiol. (2000).38.4058-4065.
- Aparicio P, Richardson J, Martin S, Vindel AS, Marples RR, Cookson BD. An epidemic Methicillin resistant strain of *Staphylococcus aureus* In Spain. Epidemiol infect (1992); 108(2):287-298.
- Arbei RD, Karakawa WW, Vann WF, Robbins JB, Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagnostic Microbiol Infect Dis (1984); 2:85-91.
- Archer GI, Mihall GC. Comparison of epidemiological markers used in the investigation of an outbreak of Methicillin- resistant *staphylococcus aureus* infections. J Clin Microbiol (1981).13:754-759.
- Betancor J, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodriguez M, Vignoli R, Y Chabalgoity J. Random Amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of salmonella entérica serovar enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J Clin Microbiol. (2004). 42:1152- 1165.
- Branger C, Goulet P. Esterase electrophoretic polymorphism of Methicillin sensitive and Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol (1987). 23:275-281.

- Burnie P, Matthews RC, Lee w, Murdoch D.A. Comparison of Immunoblot and DNA restriction patterns in characterizing Methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol (1989). 29:255-261.
- Calderón E, Roger I ; Moscoso Y, Martín J. Manual de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante métodos de biología molecular /Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. 29 Pág. 30 cm. - (Serie de Normas Técnicas; 35)
- Campbell KD, East AK, Thompson DE y Collins MD. Studies of the large subunit ribosomal RNA genes and intergenic spacer regions of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F. Res. Microbiol. (1993).144.171-180.
- Cocconcelli, PS., parisi, MG. Senini, L., Cappa, F., Y Botazzi, V. Use of RAPD and 16s rDNA sequencing of the study of *Lactobacillus* populations dynamics in natural whey culture. Lett. Appl. Microbiol. (1997).24, 8-12.
- Coia JE, Thompson- Cartaeer f, Baird D, Platt DJ. Characterization of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by biotyping, immunoblotting and restrictions enzyme fragmentation patterns. J Med Microbiol. (1990). 31:125-132.
- Coll P, Prats G. Epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. En: Ausina V, Moreno S . (Ed). Tratado SEIMC De enfermedades infecciosas y de Microbiología Clínica. Ed. medica panamericana. Madrid. 2006. Pág. 71-83.
- Collins JK, Smith Js, Kelly MT. Comparison of phage typing mapping and antibiotic resistance patterns an epidemiological marker and nosocomial outbreak and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. Diagnostic microbial infect Dis. (1984). 2:233-246.

- Cookson BD, Phillips I. Epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. (1988).21(suppl C):57-65.
- Dasen A, Berthier F, Grappin R, Williams AG, y Banks J. Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct- containing cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurized milk. J Appl. Microbiol. (2003).94. 595-607.
- Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, Grundmann H, Jonas D, and the European study group on epidemiological markers of the ESCMID. Multicenter Evaluation of epidemiological typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. J Clin Microbiol. (2000).38.3527-353.
- Di Maria, S., Basso, AL., Santoro, E., Gracia, L., Coppola, R. Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. J Appl Microbiol. (2002).92 158-164.
- Dominguez MA, De Lencastre H, Linares J, Tomazs A. Spread and maintenance of a dominant Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. J Clin Microbiol. (1994). 32: 2081-2087.
- Dominguez MA, Coll P, Coque T, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología .En: Cartón R, Cercenado E(Eds). Procedimientos de Microbiología Clínica SEIMC. (2005).
- Emmerling P, Schulze H, Lohneiss MT. Evaluation of a new latex agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. Zentralbl Bakteriologie Mikr. (1983).253(4):462-65.

- Enright MC, Day NP, Davies CP, *et al.* Multilocus sequence Typing for characterization Methicillin – resistant and Methicillin- susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin. Microbiol. (2000).38: 1008-1015.
- Farber JM y Addison CJ. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol. (1996).19. 357-358.
- Farrar WE Jr. Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigation. J Infect Dis. (1983). 148: 1-6.
- Feil E, Zhou J, Maynard smith J, y Spratt BG. A comparison of the nucleotide sequences of the *adk* and *rec A* genes of pathogenic and commensal *Neisseria* species: evidences for extensive interspecies recombination within *adk*. J mol. Evol. (1999).43.631-640.
- Fernández – Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enferm Infecc microbiol clin (2004).355-360.
- Fey PD, Said- Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, and Schievert pm. Comparative molecular analysis of community- or hospital- acquired methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. (2003).47: 196-203.
- Fournler JM, Bouvet A, boutonnier A *et al.* Predominance of capsular polysaccharide type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. (1987). 25: 1922-1933.
- Gaillot O, Wetsh M, Fortineau N, Berche P. Evaluation of Chromagar *Staphylococcus aureus*, a new medium, for isolation and presuntive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol. (2000).38(4):1587-591.
- Gaston MA, Duff PS, Naidoo J, Ellis K, Roberts JI, Richardson JF, Marples RR, Cooke EM. Evaluation of electrophoretic methods for

typing Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. (1988).26(3):189-197.

- Gillespie MT, Lyon BR, Skurray RA. Typing of by antibiotic resistance phenotype. J Med Microbiol. (1990). 31(1):57-64.
- Goering, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. Infect Control Hosp. Epidemiol. (1993). 14: 595-600.
- Goetz MB, Mulligan ME, Kwok R, O'Brien H, Caballes C, Garcia JP. Management and epidemiological analyses of an outbreak due to Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Med. (1992).92: 607 - 614.
- International committee on systematic bacteriology. Subcommittee on phage typing of Staphylococci. Int J Syst. Bacteriol. (1987).37: 171-175.
- Janda WM, Ristow K, Novak D. Evaluation of Rapidec staph for identification of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. J Clin Microbiol. (1994).32(9):2056-59.
- Jones D y Bej A. Detection of footborne microbial pathogens using polymerase chain reaction methods. En PCR Technology: current innovations. pp 341-346. H. G. Griffin y A.M. Griffin (eds). Londres, Reino Unido: CRC Press Inc (1994).
- Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S, Gannertm, Wale MC, Warner M. *et al.* Dominance of EMRSA-15 and EMRSA-16 MRSA causing nosocomial bacteremia in the UK: analisis of isolates from the European antimicrobial Resistance surveillance System (EARSS). J antimicrobial Chemother. (2001).48: 143.

- Jordens JS, Hall LMS. Characterization of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates by restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA. J Med Microbiol 1988; 27:117-123.
- Karakawa WW, Vann WF, Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. En: Neinstein LJ, Fields BN, ed. Seminars in infectious diseases. New York, Thieme-stractoon. (1992). 285-293.
- Kerr S, Kerr GE, Mackintosh CA, Marples RR, A Survey of Methicillin resistant *staphylococcus áureus* affecting patients in England and Wales. J Hosp Infect. (1990). 16:35-48.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT y De Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenec *Xanthomonas* y *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. Environ. Microbiol. (1994).60.2286-2295.
- Lupski JR and Weinstoc GR, Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J. Bacteriol. (1992).174. 4525-4529.
- Mahon, C. and Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. Second Edition. W.B. Saunders Company. USA. (2000).
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JG, Urwin R. *et al*. Multilocus sequence typing; a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microornisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1998).95.3140-3145.
- Marples RR, Richardson JR, De Saxe MJ. Bacteriological characters of strains of *S. aureus* submitted to a reference laboratory related to Methicillin resistant. J Hyg Camb. (1986).96; 217-223.
- Maslow, J. N., Ellis, M. M., Arbeit, R. Molecular epidemiology: application of temporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis. (1993).17: 153-164.

- Mendoza M.C and E. Landeras. Molecular epidemiological methods for differentiation of *Salmonella enteritidis* strains en *Salmonella enterica* serovar enteritidis in humans and animals. Saeed Ed Iowa State University Press. AMESS, (1999).
- Mulvey M, Arbutnott JP, Coleman DC, Molecular typing of Methicillin and Gentamicina *Staphylococcus aureus* in Dublin. Eur. J Clin Microbiol. (1986). 5:719-723.
- Mulligan ME, Kwok RYY, Citron DM, John JF, Smith PB. Inmunoblots antimicrobial resistance and bacteriophage typing of oxacillin- resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin microbial. (1988). 26:2395-2401.
- Murchan S., M. E. Kaufmann, A. Deplano, R. de Ryck, M. Struelens, C.E. Zinn, V. Fusing, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, N. El Solh, C. Cuny, W. Witte, P.T. Tassios, N. Legakis, W. van Leeuwen, A. van Belkum. A., Vindel, I. Laconcha, J. Garaizar, S. Haeggman, B. Olsson-Liljequist, U. Ransjo, G. Coombes and B. Cookson. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strain methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* (2003).41, 1574-1585.
- Olive, DM. y Bean, p. Principles and applications of methods for DNA Based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol. (1999). 37, 1661-1669.
- Oliveira DC, Tomasz A, and De Lancastre H. The Evolution of Pandemic clones of Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*: Identification Of Two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. Micob. drug Resist. (2001).7. 349-346.
- Orskov F, Orskov I. Fron the National Institute of Health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy and,

evolution of the Enterobacteriaceae and other bacterial. J Infect Dist (1983). 148: 346 – 347.

- Perssone P, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Brun X, Etenne J. Comparative performance of six agglutination kit assessed by using typical and atypical strains of *S. aureus*. J Clin Microb. (1997). 35:1138-40.
- Prevost G, Jaulbac B, Piemont Y, DNA fingerprinting by pulsed - field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J clin Microbiol (1992).30:967-973.
- Pumarola A. Rodriguez Torres A, Garcia Rodriguez J. A, Piedrola Angulo G. Microbiología y Parasitología médica. 2 da edición. Salvad Editores, S. A.(1995).
- Quinn NE. Clinical veterinary microbiology. London. Wolfe (1994) 730:118 26.
- Richardson JF, Chittasobhon N, Marples RR. Supplementary phages for the investigation of strains of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol (1988).25:67-74.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S., y Suzzu, G. Identification by 16s - 23s rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of staphylococcus strains from dry sausages. J Appl Microbiol. (2001).90: 364 – 371.
- Samadpour M, Grimm LM, Desai B, Alfi D, Ongerthth JE y Tarr PI. Molecular epidemiology of *E. coli* 0157: H7 strains by bacteriophage lambda restriction fragment length polymorphism analysis: application to a multistate foodborne outbreak and a day- care center gluster. J clin. Microbiol. (1993).31, 3179-3183.

- Shales DM, Currie MC, Cumber CA. Plasmid analysis in molecular epidemiology: a summary and future direction. *Rev Infect Dis.* (1986).8:738-746.
- Smith JL, y Palumbo SA. Inhibition of aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* .*J Food Sad.* (1980).4.221-233.
- Sloos J, Dijkshoorn L, Vogel L and Van Boven C. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* (2000).38, 2488-2493.
- Soll D, Lockhart s, Pujol C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC (Eds). *Manual of clinical microbiology.* (8<sup>a</sup> edicion) Washington, DC. American Society for microbiology. 2003.139-161.
- Struelens M. J.,bauernfeind, A . Van Belkum, D. Blanc B.D. Cookson, L. Dijkshoorn, N. Elsolh, J. Etienne, J. Garaizar, P. Gerner-Smids,N. Legakis, H. De lencastre, M. H. Nicolas , T. L. Pitt.U. Romling,V. Rosdahl and W. Witte. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbial. Infect.* (1996). 2, 2-11.
- Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Maes N, Serruys E. Epidemiological typing and delineation of genetic relatedness of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by macro restriction analysis of genomic DNA by using pulsed – field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* (1992). 30:2599-2605.
- Struelens, MJ. Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (MESGEM). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiology and Infect,* (1996).2 (1): 2-11.

- Swaminathan B, y Matar GM. molecular typing methods. In diagnostic molecular microbiology, Principles and applications. Persing DH, Smith TF, Tenover FC y white TJ. (Eds). (1993).Pp.26-50.
- Tansel, O., Kuloglu, F., Mutlu, B., Anthoni, RM., Uyar, A., Vahaboglu, H., y French, GL. A Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a new university hospital due to a strain transferred with an infected patient from another city six months previously. New microbiol. (2003).26, 175-180.
- Tenover FC. Plasmid fingerprinting: a tool for bacterial strains identification and surveillance of nosocomial and community acquired infection Clin Lab Med. (1985).5:413-436.
- Tenover, F., Arbeit, R., Archer, G, *et al.* Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. (1994).32: 407-415.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Michelson PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing. J clin Microbiol. (1995). 33: 2233-2239.
- Tenover, F. C., Robert D. A., Goering, R. V., y the Molecular Typing Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infection Control and Hospital Epidemiology. (1997).Vol. 18 (6): 426-439.
- Tenover F.C., R.D. Arbeit R. Goering P.A. Mickensel, B.E Murray, D.H. Persing and B. Swminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. (1995).33, 2233-2239.

- Trilla A. Epidemiología clínica de un brote de infección nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y aminoglucósidos: eficacia de las medidas de control. .Med Clin. (1993). 100: 205-209.
- Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting the reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. J Clin Microbiol. (1999).35.339-346.
- Van Benkul, A. DNA of fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR Clin. Microbiol. Rev. (1994).7,174 – 178.
- Van Belkum .A, Kluytmans J, Van Leeuwen W, Peters E. *Et al.* Multicenter evaluation of arbitrarily primer PCR for typing *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. (1995).33, 1537-1547.
- Van Belkum, A, Struelens M, de Visser, A, Verbrugh, H, Tibayrenc, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev. (2001). 14: 547-560.
- Van Leeuwen W, Jay C, Snijders S, Durin N, Lacroix B, Verbrugh HA, Enright MC, Troesch A, van Belkum A. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology. J Clin Microbiol 2003. 41: 3323-3326.
- Vásquez AJ y Berron S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. Enferm Infecc. Microbiol clin. (2004).22.113-120.
- Versalovic. Genomic fingerprinting of bacterial using repetitive sequence based polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell Boil. (1994).5. 25-40.
- Versalovit, J, De Bruijn FJ, y Lupsky JR. rep-PCR based DNA fingerprinting of bacterial genomes. *En bacterial genomes: physical*

*and structure and analysis*. De Bruijn FJ, Lupsky JR y Weinstock GM. (eds.), pp.437-454. Chapman and Hall. New York. N.Y, EE.UU.(1997).

- Vila J, Marcos MA, y Jimenez de anta MT. A comparative study of different PCR based DNA fingerprinting techniques for typing of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. J Med Microbiol. (1996).44.482-489.
- Venezia RA, Harris V, Miller C et al. investigation of an outbreak of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients with skin disease using DNA restriction patterns. Infect Control Hosp Epidemiol. (1992).13:472-476.
- Vindel A, Sáez- Nieto JA. Caracterizacion de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina causantes de brotes mediante fagotipificacion. Enferm Infecc Microbiol Clin.(1992). 10 (supl 3):36-38.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M. *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleids Acids Res. (1995). 23. 4407-4413.
- Warner, J. E. y Onderdonk, A. B. Method for Optimizing Pulsed-Field Gel Electrophoresis Banding Pattern Data. Journal of Molecular Diagnostics. (2003). Vol. 5, (1): 21-27.
- Wei, H. and L. Yang. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. (2000).38, 2186-2190.
- Welsh J and Mccelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res.(1990). 18, 7213-7218.
- Wilkerson M, McAllister S, Miller JM, Heiter BJ, y Bourbeau PP. Comparison of five agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin Microbiol. (1997). 35:148-51.

- Zuccarelli AJ, Roy I, Harding GP, Couperus JJ, Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J clin Microbiol. (1990). 28:97-102.

# **ANEXOS**

## Anexo 1. Consentimiento informado

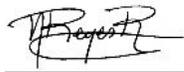
Universidad de Cartagena  
Facultad de Medicina  
Cartagena de indias

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACION

Yo, \_\_\_\_\_ por el presente, estoy de acuerdo en participar en un estudio que tiene como objetivo determinar la frecuencia de colonización del patógeno oportunista *Staphylococcus aureus* en los estudiantes de medicina de la Universidad de Cartagena durante el año 2008. Los investigadores me han explicado que los estudiantes de medicina representamos una población en riesgo de adquirir cepas de *Staphylococcus aureus* debido a que durante el desarrollo de nuestro programa de estudios, interactuamos directamente con pacientes y con personal médico de diversas instituciones de prestación de la salud en diferentes áreas de la ciudad. Por lo tanto, existe un riesgo real de que en algún momento los estudiantes adquiramos inadvertidamente una cepa resistente en una institución y la transfiramos a pacientes susceptibles de la misma institución o de una institución diferente. Me han informado que la duración estimada del estudio es de **12 meses**; entiendo que los investigadores pueden detener el estudio ó mi participación en cualquier momento sin mi consentimiento. Así mismo tengo derecho a retirarme del estudio en cualquier momento. Me han explicado que de acuerdo a la reglamentación del Ministerio de Salud de Colombia, Resolución número 8430 de 1993, este estudio está clasificado como de **riesgo mínimo** para los sujetos participantes y en él se requiere la toma de muestras nasales mediante el uso de hisopos, lo cual no representa riesgos significativos para mi salud. La toma de muestras se hará por una única vez en el estudio. En los casos que resulten positivos para la portación de la bacteria *S. aureus*, se harán estudios de seguimiento que implican la toma periódica de muestras nasales con periodicidad mensual por un lapso de un año. Mi participación en el estudio también requiere que complete una encuesta en la que contestaré preguntas relacionadas con mi historial clínico. Los investigadores me han explicado que no recibiré ningún beneficio económico por mi participación en este estudio. Que mi participación puede ser de utilidad para la comunidad médica en general, ya que los resultados contribuirán al diseño de programas dirigidos a lograr el control efectivo de la diseminación de cepas resistentes, tanto al interior del ambiente hospitalario como a la comunidad en general. Por el presente autorizo a los investigadores a utilizar las muestras nasales y sus derivados para este estudio y los que se deriven del mismo, y los autorizo a enviarlas a otros laboratorios, tanto nacionales como internacionales para la realización de análisis relacionados. Además, autorizo a los investigadores responsables a publicar la información obtenida como resultado de mi participación en este estudio, en revistas u otros medios legales, y de permitirles revisar mi historia clínica, guardando la debida CONFIDENCIALIDAD de mi nombre y apellidos. Entiendo que todos los documentos que revelen mi identidad serán confidenciales, salvo que sean proporcionados tal como se menciona líneas arriba ó requeridos por Ley.

Firma del Participante: \_\_\_\_\_ Iniciales del participante: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_

Niradiz Reyes Ramos Firma:



Tel: 313 5512833

Yorlais Arroyo barrios Firma:

yorlais arroyo b

Tel: 3107415599

Alfonso Bettin Martínez Firma:

Alfonso Bettin M

Tel: 312-6799095

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Cartagena

## Anexo 2. Formato recolección de datos.

DETERMINACION DE LA TASA DE PORTADORES NASALES DE *Staphylococcus aureus* EN ESTUDIANTES DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

**DATOS PERSONALES**

APELLIDOS		NOMBRES			EDAD	SEXO		FECHA DE NACIMIENTO		
						M	F	DIA	MES	AÑO
TIEMPO DE RESIDENCIA EN CARTAGENA		AÑOS		MESES		DIRECCION RESIDENCIA				
R A Z A	Blanca	Negra		Mestiza						
SEMESTRE		E-mail:			TEL. (Fijo Y/O Celular)					

**ANTECEDENTES CLINICOS**

SINUSITIS		ENFERMEDAD ALERGICA		Asma		Rinitis		Dermatitis	
INECCIONES EN PIEL		Acne		OTRAS					
CAMBIOS ANATOMICOS EN NARIZ				CUALES					
USO DE ANTIBIOTICOS		ULTIMO MES		ULTIMOS TRES MESES		ULTIMOS SEIS MESES			
CUALES:									
HOSPITALIZACIONES (últimos 3 ó 6 meses)				TIEMPO					

**OTROS**

PIERCING NASAL		FUMA			SPRAY NASAL		RONCA	
CONTACTO CON PACIENTES		NUNCA	DIARIO	SEMANAL		UNIDAD MEDICA DE ROTACION		
				1	2	3		

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Anexo 3. Prueba de aglutinación en látex.

**Prueba negativa**

**Prueba positiva**

