

**Caracterización microbiológica y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* colonizantes de pacientes con patología nasal atendidos en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario del Caribe de la ciudad de Cartagena de Indias.**

**Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Microbiología**

**Oscar Alonso Montes Guevara**

---

**Niradiz Reyes Ramos, PhD**  
**Directora**

---

**Álvaro Álvarez Coneo, MS**  
**Codirector**

---

**Rosa Milanés Pérez, MD**  
**Codirectora**



**Facultad de Medicina**  
**Universidad de Cartagena**

**2014**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

**Nombre y firma del Jurado**

---

**Nombre y firma del Jurado**

---

**Nombre y firma del Jurado**

## DEDICATORIA

*-“En su lecho de enfermedad, en una clínica de la ciudad de Sincelejo, el cual estuvo 8 días en UCI y dos en una habitación; tuve el privilegio de charlar con mi madre-abuela, en sus últimos cuatro días.*

*El último día en la tarde de su vida, me sorprendió con su expresión: -“cuidate mucho, pórtate bien miijo y que ganes mucha plática”- con voz temblorosa carente de oxígeno, el cual fue su postrer anhelo y despedida. Un día antes me pronosticó su última bendición profética sobre mis futuros estudios y ocupaciones, de los cuales durante muchos años solíamos charlar con respeto al tema, y anhelaba ver el fruto de ellos”-.*

*Para tí, con bendición;*

*Alicia De Las Mercedes Ríos Vergara*

*Q.E.P.D.*

## AGRADECIMIENTOS

*Excelentísimo y Poderoso Dios, por haberme creado con inteligencia y capacidad para estudiar. Que maravilloso, que cada día pones en mi camino personas de las cuales me permitas ver reflejado tu inmenso amor y propósito, para manifestar tu gloria, honra y poder.*

*A mis padres Cesar Julio y Ana Isabel, por darme su amor; por hacer que las fechas especiales sean maravillosas, por esos abrazos de consuelo cuando estoy triste y por celebrar conmigo mis triunfos. “Me siento orgulloso de ser su hijo”*

*A Cesar Emiro, Víctor Julio, Noris Josefina, Cesar Julio, Gina María y Jazmín Martínez, porque más que hermanos siempre han sido mis amigos. Siempre ha sido una bendición estar junto a ustedes.*

*A mi directora de tesis, Dra. Niradiz Reyes Ramos; quien es un ejemplo de combinación de saberes y disposiciones, que hacen de este equipo una unidad triunfante. A mis codirectores, Dr. Álvaro Álvarez y Dra. Rosa Milanes por abrirme caminos para este proyecto.*

*A mis compañeros de maestría, Eduardo Covo, Jenifer Bonivento, Sandra Gonzales, Carlos Leal, Rina Ojeda e Indira Llanos. En nuestras memorias siempre estarán los prodigiosos recuerdos llenos de emociones, curiosidades, nerviosismos, y sobre todo muchas alegrías... En especial quiero dar gracias a Covo por no dejarme dormir en el suelo, -era muy incómodo-, “gracias”.*

*A mis profesores de maestría, mi estimada Paola Suarez, quien siempre tiene una palabra y una sonrisa que me alienta a seguir en este arduo y productivo camino, de igual forma a Mariano Espinosa y Sandra Coronado, quienes han sido un modelo de sencillez sublime. A mi hermosa madrina Mayra Martínez Blanco, quien anhelo bendecir a futuro y está presente siempre en mis oraciones...*

*A todo el equipo del laboratorio de investigaciones, Juan, Alfonso, mayito, Ketty, Martha, Gregorio... Gracias mi alma mater... Gracias por el futuro PhD... Amen.*

# CONTENIDO

NOTA DE ACEPTACIÓN.....	2
DEDICATORIA .....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
LISTA DE TABLAS .....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	12
A. Pruebas de susceptibilidad a meticilina en <i>S. aureus</i> .....	12
B. Bases moleculares de la resistencia del <i>S. aureus</i> a la meticilina.....	14
C. Estructura del casete cromosómico <i>SCCmec</i> .....	15
D. Tipos de casete cromosómico <i>mec (SCCmec)</i> .....	16
E. SASM, SARM, nosocomial y de comunidad .....	16
F. Tipificación de SARM .....	19
G. Evolución de los clones de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.....	20
H. Propagación internacional de los clones de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina .....	21
I. Clones de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina en América Latina .....	22
III. OBJETIVOS.....	26
Objetivo General.....	26
Objetivos Específicos .....	26
IV. METODOLOGIA .....	27
A. Tipo de estudio, Población y Muestra .....	27
B. VARIABLES DE ESTUDIO .....	27
C. Toma y Procesamiento de Muestras .....	29
D. Pruebas de Susceptibilidad a Antibióticos .....	30
E. Extracción de ADN bacteriano .....	30
F. Amplificación por PCR múltiple de los genes <i>nuc</i> , <i>mecA</i> y <i>lukF/S-PV</i> .....	31
G. Tipificación y sub-tipificación del elemento <i>SCCmec</i> de las cepas SARM .....	31
H. Prevalencia de los complejos clónales (CC5) y (CC8) .....	32
I. Tipificación molecular por Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (PFGE).....	33
J. Análisis estadístico.....	34

V. RESULTADOS .....	35
VI. ANALISIS DE RESULTADOS .....	43
VII. CONCLUSIONES .....	51
VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	53
IX. BIBLIOGRAFIA .....	55

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. CIM por el CLSI y puntos de corte del diámetro <i>S. aureus</i> .....	13
Tabla 2. AH-SARM vs. AC-SARM.....	17
Tabla 3. Definición de variables.....	28-29
Tabla 4. Perfiles de sensibilidad antibiótica de <i>S. aureus</i> .....	37
Tabla 5. Características moleculares de <i>S. aureus</i> .....	40

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Evolución de resistencia: <i>S. aureus</i> .....	21
Figura 2. Clones de SARM en América Latina desde el año 2000.....	23
Figura 3. Complejos clonales SARM de América Latina con clones SARM internacionales.....	24
Figura 4. Frecuencia de aislamientos de <i>S. aureus</i> .....	35
Figura 5. PCR para detección de <i>nuc</i> , <i>mecA</i> y <i>pvl</i> .....	36
Figura 6. Tipificación de los tipos <i>SCCmec</i> de SARM.....	38
Figura 7. Sub-tipificación de <i>SCCmec</i> IV de SARM.....	38
Figura 8. PCR múltiple de Complejos Clonales (CC5) y (CC8).....	39
Figura 9. Tipos de clones aislados por PFGE.....	41
Figura 10. Dendograma del análisis de PFGE de SARM.....	42

## RESUMEN

**Introducción:** Investigaciones recientes reportan la diseminación de cepas SARM de origen comunitario hacia los centros asistenciales. No obstante, la comprensión de este fenómeno sigue siendo limitada en Latinoamérica. USA300 con *SCCmec IVc*, el cual se ha asociado a la comunidad, está aumentando su presencia en el ambiente nosocomial, causando un desplazamiento del SARM hospitalario. **Objetivo:** Determinar las características moleculares y perfiles de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *Staphylococcus aureus* colonizantes de pacientes con patología nasal atendidos en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario del Caribe de la ciudad de Cartagena de Indias. **Métodos:** Estudio analítico observacional, en el cual se determinaron los perfiles de sensibilidad antibiótica mediante el método de difusión en disco y dilución en agar. La identificación de los genes *nuc*, *mecA* y los de *pvl* se confirmaron mediante PCR múltiple. La caracterización molecular incluyó la tipificación y sub-tipificación de *SCCmec*, asignación a los complejos clónales 5 y 8, y tipificación por electroforesis en gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE). **Resultados:** De los 171 participantes del estudio, la prevalencia de colonización por *S. aureus* en la población muestreada fue 4.1 % de cepas resistentes a metilina y 17.6 % para cepas sensibles a la metilina. Por otro lado la proporción de cepas SARM en el total de aislamientos fue de 18.9% y 81.1 % para cepas sensibles a metilina. En 25 aislamientos analizados mediante PFGE, el clon de AC-SARM USA300 (CC8-*SCCmecIVa*) y su variante *SCC mec IVc*, predominó en las cepas SARM (75%). Con respecto a la leucocidina PVL se evidenció 6 (85.7%) de 7 aislados SARM y 12 (40%) de 30 aislados SARM de pacientes. Además, el complejo clonal más frecuente fue el CC8 con 18 cepas (72%), seguido del CC5 con 7 cepas (28%). **Conclusiones:** Cepas SARM CC8 portan el tipo *SCCmec IVc*, desplazando a los clones CC5 AH-SARM. Con base en las características comunes, tales como *SCCmec IVc*, y una alta resistencia a la tetraciclina, los aislamientos relacionados con USA300 en este estudio, tienen alta probabilidad de pertenecer a la variante USA300-LV, recientemente descrita para el clon USA300.

**Palabras claves:** clon, portación nasal, SARM, *SCCmec*, tipificación.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde su aparición en 1961, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) ha sido tradicionalmente considerado un patógeno nosocomial. En los últimos años, sin embargo, el SARM originado en la comunidad (AC-SARM) se ha convertido en un importante problema de salud pública a nivel mundial(1). Las infecciones de SARM asociados a los hospitales (AH-SARM), generalmente ocurren en personas con factores de riesgo predisponentes, como las cirugías o la presencia de dispositivos médicos permanentes, mientras que las infecciones por AC-SARM ocurren típicamente en individuos aparentemente sanos que no presentan factores de riesgo (2).

Los estudios epidemiológicos moleculares han destacado la evolución global continua y el desplazamiento de los clones de SARM con un aumento de la resistencia a fármacos antimicrobianos y de la virulencia. Los factores que contribuyen al desplazamiento de dichos clones se conocen sólo parcialmente, pero se cree que algunas son migración de poblaciones humanas, métodos ineficaces para controlar la transmisión de SARM en pacientes infectados y estrategias de tratamiento como uso y elección inapropiados de antimicrobianos (3, 4).

En América Latina, los clones pandémicos son comunes en los hospitales y las infecciones asociadas a la comunidad están creciendo considerablemente(5). Los clones que circulan en Latinoamérica muestran diversidad genética, aunque expresan en común resistencia a múltiples antimicrobianos. Otras propiedades patogénicas identificadas incluyen la producción de biopelículas y enterotoxinas en ciertos clones así como la capacidad de intercambio genético entre clones nosocomiales y comunitarios. Sin embargo, los datos de vigilancia de los clones de SARM específicos de algunos países de América Latina son limitados (5); datos parciales sólo existen en los países más desarrollados y en los centros de investigación sofisticados.

A nivel de Colombia, se ha reportado el cambio en el patrón clonal de SARM. Durante la década de los noventa predominó el denominado clon Pediátrico (6), el cual fue reemplazado a finales de siglo por el clon chileno (7) y, a mediados de esta década, inició el cambio por un clon emparentado con los clones USA 300 circulantes en los Estados Unidos (8). A diferencia de los clones previamente circulantes, el nuevo clon se caracteriza por tener susceptibilidad alta a los antibióticos diferentes a los  $\beta$ -lactámicos, lo que permite su seguimiento fenotípico en los estudios de vigilancia. En Cartagena no se han hecho estudios específicos con respecto a la tipificación, su tipificación y complejos clónales de los diferentes clones circulantes en esta región.

Paradójicamente, los países que muestran el predominio más elevado de infecciones por SARM nosocomial, como Perú, a menudo brindan muy poca información con respecto a la epidemiología molecular y a los resultados clínicos. Se necesitan programas de vigilancia regional que utilicen laboratorios centrales de referencia e información integral para los centros de salud con diferentes complejidades, si se quiere comprender de manera más completa el patrón de desarrollo de las infecciones por SARM en toda América Latina y diseñar un mejor tratamiento y estrategias de prevención.

En los últimos años se han producido algunos cambios estructurales a nivel molecular de *S. aureus*, los cuales se ven reflejados en su epidemiología clínica, observándose cada vez más infecciones en individuos sanos y sin factores de riesgo convencionales para su adquisición (9). Se ha reportado también que hay diferencias marcadas en la susceptibilidad de las cepas de este microorganismo y que los cambios en los perfiles de resistencia se pueden producir gradualmente (10). Aunque muy pocos estudios han evaluado la epidemiología molecular de los clones de SARM en América Latina, se sabe con certeza que varios clones circulan en esta región y que éstos difieren en virulencia, perfil de resistencia antimicrobiana y distribución geográfica (5, 11, 12).

La caracterización de estos clones es importante para desarrollar estrategias locales adecuadas de tratamiento, conocer las diferencias genéticas entre ellos e identificar

cuál de todos; está circulando en un área determinada. Por ejemplo, un conocimiento completo de estos clones que circulan en una región puede ser de utilidad para evaluar la relación entre los tipos de clones, los síntomas de la enfermedad, la selección de antimicrobianos y los resultados clínicos. Además, si se conociera la razón por la que clones específicos predominan en diferentes regiones de América Latina, se lograría un paso importante y necesario en el desarrollo de estrategias más eficaces para controlar la transmisión de SARM en la región. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue determinar las características microbiológicas, moleculares, y el perfil de susceptibilidad distintivos de las cepas de *S. aureus* que colonizan pacientes con patologías nasales en el primer centro asistencial de Cartagena de Indias.

## II. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### A. Pruebas de susceptibilidad a meticilina en *S. aureus*

Existen muchas opciones para detectar la susceptibilidad de *S. aureus* a meticilina, tales como difusión de disco, mediciones de la concentración mínima inhibitoria (CIM) (en caldo o mediante E-test®), agar cromogénico, aglutinación de látex, métodos automatizados, métodos de detección rápida y enfoques moleculares (13).

Para los métodos que se basan en la difusión por disco, las condiciones del agar o medio de cultivo, tiempo de incubación y temperatura, tienen un papel importante en la determinación del resultado de las pruebas de susceptibilidad a meticilina; estos factores deben tenerse muy en cuenta cuando se realicen las pruebas de susceptibilidad para estafilococos. La Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC) recomienda agar Columbia o Mueller-Hinton suplementado con NaCl (2%) para los métodos de dilución y difusión de disco(14, 15); se ha demostrado que el agregado de hasta 5% de NaCl al medio mejora la detección de resistencia en la mayoría de las cepas(16, 17).

Para mejorar la detección de SARM heteroresistente en las pruebas con oxacilina, se requiere agregar NaCl (2% p/v; 0,34 mol/L), ya sean de dilución en caldo o en agar. Para las pruebas de difusión por disco, no debe enriquecerse el agar Mueller-Hinton. Por lo general, la resistencia a meticilina se detecta de manera más confiable a bajas temperaturas (30 a 35 °C)(18), aunque algunas cepas raras pueden crecer lentamente a 30 °C cuando hay 5% de NaCl. El CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) y la BSAC recomiendan realizar las incubaciones durante 24 horas (14, 15) pero, para algunas cepas heterogéneas, es posible que subpoblaciones resistentes crezcan más lentamente y quizás se necesiten incubaciones de 48 horas para mejorar la detección. En la actualidad, la cefoxitina es el disco de susceptibilidad elegido para las pruebas de susceptibilidad a meticilina, debido a que detecta en mejor forma la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*. La oxacilina sigue siendo una segunda opción pero diversas publicaciones demostraron que cefoxitina es más confiable que la

oxacilina (19-22). Para todos los estafilococos debe leerse el halo de inhibición alrededor del disco de cefoxitina con luz reflejada. Si se obtiene un resultado intermedio en la prueba de susceptibilidad de *S. aureus* a oxacilina habrá que realizar la prueba para detectar el gen que causa resistencia a la meticilina en *S. aureus*, conocido como *mecA* o PBP 2a (proteína de unión a penicilina 2a), la prueba de CIM o de difusión por disco con cefoxitina, la prueba de CIM con oxacilina, o la prueba de detección con placas de agar con sal y oxacilina (13).

Es realmente importante presentar protocolos consistentes para todas las pruebas anteriores cuando sea posible pero, sobre todo, realizar los controles de calidad con las cepas de referencia ATCC adecuadas, tales como aquellas que se detallan en las pautas de la BSAC y el CLSI (14, 15). Para los estudios de CIM y difusión de disco, en las pautas del CLSI se proporcionan valores de referencia de la CIM y la zona de inhibición para definir si la cepa estudiada es sensible, intermedia o resistente a los agentes antimicrobianos específicos. Tabla 1.

**Tabla 1. CIM por el CLSI y puntos de corte del diámetro *S. aureus***

Agente antimicrobiano	Contenido del disco (µg)*	Puntos de corte del diámetro de la zona (mm más cercanos)*			Norma de CIM (µg/mL)*		
		S	I	R	S	I	R
Meticilina	5	≥ 14	10-13	≤ 9	≤ 8	-	≥ 16
Oxacilina	1	≥ 13	11-12	≤ 10	≤ 2	-	≥ 4
Cefoxitina	30	≥ 22	-	≤ 21	≤ 4	-	≥ 8
Vancomicina	-	-	-	-	≤ 2	4-8	≥ 16
Teicoplanina	30	≥ 14	11-13	≤ 10	≤ 8	16	≥ 32
Clindamicina	2	≥ 21	15-20	≤ 14	≤ 0,5	1-2	≥ 4
Daptomicina	-	-	-	-	≤ 1	-	-
Linezolid	30	≥ 21	-	-	≤ 4	-	-
Rifampicina	5	≥ 20	17-19	≤ 16	≤ 1	2	≥ 4
Quinupristina-dalfopristina	15	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Cotrimoxazol	1,25/23,75	≥ 16	11-15	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76

S: susceptible; I: resistencia intermedia; R: resistencia; CIM: concentración inhibitoria mínima. \*Reproducido con autorización de la publicación del CLSI M100-S19, Normas de desempeño de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, Tabla 2C. Se pueden obtener copias de la edición actual del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico en 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvania 19087-1898, USA. [www.clsi.org](http://www.clsi.org)

Tomado de: Zurita, Jeannete, Carlos Mejia, and Manuel Guzman-Blanco. "[Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America]." *Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología* 27 (2010): S70-80.

El SARM debe informarse como resistente a todos los agentes  $\beta$ -lactámicos disponibles; actualmente estos incluyen penicilinas, combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefemes y carbapenemes, ya que la actividad de los agentes  $\beta$ -lactámicos en contra de SARM en pruebas in vitro no se traduce necesariamente en eficacia clínica (13).

## **B. Bases moleculares de la resistencia del *S. aureus* a la meticilina**

La resistencia del *S. aureus* a meticilina se debe a la presencia de una proteína alterada de unión a la penicilina (PBP2a, por la sigla en inglés de Penicillin binding protein 2a), codificada por el gen *mecA* (23). Esta proteína, de 76 kDa, se caracteriza por su afinidad disminuida para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y por tener solo un dominio transpeptidasa, por lo que necesita apoyarse en la actividad de transglicosilación de la proteína normal (PBP2) para la formación del peptidoglicano de la pared celular (24).

El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil conocido como el casete cromosómico (*Staphylococcal chromosome cassette mec*, *SCCmec*) (24, 25), que se inserta en un sitio específico del cromosoma bacteriano (*attBSCC*), cerca del origen de replicación de *S. aureus*. Esta característica es de gran relevancia porque le permite replicarse en forma temprana y transcribir los genes de resistencia importados (26).

Dada la complejidad de este mecanismo de resistencia, se ha considerado poco probable que haya surgido por la presión selectiva ejercida por la introducción de los medicamentos  $\beta$ -lactámicos (27). Aún no está claro el origen del gen *mecA* pero se ha propuesto que pudo haber evolucionado mucho tiempo atrás, en especies de estafilococo libres de penicilinasas que se encontraban bajo presión selectiva por la penicilina, cuando se inició su utilización intensiva como medida profiláctica en veterinaria, luego de su introducción para uso en humanos (26).

Durante la evolución de los clones de SARM, la escisión independiente de *SCCmec* es un fenómeno frecuente que da como resultado la pérdida de resistencia a meticilina y la transformación de un clon SARM en un clon meticilino sensible de *S. aureus* (SASM). Por consiguiente, los clones pueden evolucionar de SASM a SARM o de SARM a SASM, a través de la adquisición y escisión de *SCCmec*, respectivamente (28).

### **C. Estructura del casete cromosómico *SCCmec***

El *SCCmec* tiene tres componentes genéticos esenciales; son ellos: el complejo de genes *mec*, el complejo de genes *ccr*, que codifica para recombinasas, y una región conocida como J (junkyard), conformada por elementos cuya constitución puede variar(27, 29). El complejo *mec* está compuesto por el gen *mecA* y sus genes reguladores, *mecR1* y *mecl*, que pueden aparecer intactos o truncados en diferentes aislamientos; cuando estos genes reguladores están intactos y son completamente funcionales parece que confieren una mayor represión en la expresión de la PBP2a.

Con base en su estructura se han identificado cuatro clases de complejo *mec*: A, B, C, D. Las clases A y B son más comunes en *S. aureus* y la C en *Staphylococcus haemolyticus*; sin embargo, se detectó un nuevo tipo de casete *SCCmec* en *S. aureus* que presentó la clase C (30). La clase D se ha detectado solo en *Staphylococcus hominis* (31). El complejo *ccr* está compuesto por genes que codifican para recombinasas responsables de la movilización del *SCCmec*; ellas median su integración y escisión del cromosoma (29). El resto del casete cromosómico contiene secuencias de la región J, o Junkyard, que comprende tres fragmentos denominados J1, J2 y J3; puede contener plásmidos o transposones portadores de genes de resistencia a antibióticos no -lactámicos y a metales pesados(29).

#### **D. Tipos de casete cromosómico *mec* (*SCCmec*)**

Diferentes combinaciones de las clases del complejo *mec* y de los alotipos del complejo *ccr* generan varios tipos de casete *SCCmec*. Además, variaciones en la región J, aun teniendo la misma combinación de los complejos *mec* y *ccr*, definen los subtipos o variantes (32).

Once tipos de *SCCmec* (*SCC mec* I-XI) se han descrito hasta la fecha (33, 34); de estos, *SCCmec* tipo I, II y III son características de las cepas tradicionales de AH-SARM, mientras que los tipos IV, V y VI están generalmente asociados con la AC-SARM(1). Todos los tipos de *SCCmec* confieren resistencia a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos y los tipos II y III de *SCCmec* brindan resistencia a múltiples clases de antimicrobianos(1).

El *SCCmec* tipo IV es el más variable: hasta el momento se han descrito 8 subtipos que comprenden del IVa al IVh (35); el *SCCmec* tipo II contiene 5 subtipos, del II a al II e (26). Los tipos II y III se caracterizan por contener muchos determinantes de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos y por su mayor tamaño, el II de 52 kb y el III de 66 kb. Los tipos I, IV y V solo contienen genes para recombinasas, genes estructurales y reguladores de la resistencia a meticilina, carecen de elementos transponibles y de genes que codifiquen para resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos(36).

#### **E. SASM, SARM, nosocomial y de comunidad**

La presión de los antibióticos ha favorecido la evolución genética del *S. aureus*, con la consecuente aparición de cepas con diferentes determinantes de virulencia y patrones variables de susceptibilidad, que difieren no solo epidemiológicamente sino también en los tipos de infecciones que producen; así, se reportan cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM), de *S. aureus* resistentes a meticilina asociadas

al ambiente hospitalario o nosocomiales (AH-SARM) y de *S. aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (AC-SARM) (37, 38).

Estos cepas de *S. aureus* pueden distinguirse con base a las características microbiológicas y genéticas específicas y, a menudo, tienen diferentes características epidemiológicas, clínicas y terapéuticas (39). Tabla 2.

**Tabla 2. AH-SARM vs. AC-SARM**

Características	SARM-AH	SARM-AC
Año de descubrimiento	1961	1980s
Población en riesgo	Pacientes con hospitalización previa, intervenciones quirúrgicas, residencia prolongada en centros de salud, diálisis, catéteres permanentes, unidad de cuidados intensivos	Niños, personas sin hogar, homosexuales, atletas, reclutas, presos, indios nativos estadounidenses, isleños de las islas del Pacífico, pacientes del departamento de urgencias para adultos
Principales síndromes clínicos	Bacteriemia, NAH, NAVM, infecciones por catéter o protésicas	IPTB, NAC necrosante, bacteriemia, osteomielitis
Perfil resistente a antimicrobianos	Multiresistente, incluidos $\beta$ -lactámicos, macrólidos, TMP-SMX, lincosamidas, tetraciclinas, rifampina, quinolonas. Resistencia en aumento a glucopéptidos	Resistente a $\beta$ -lactámicos. Susceptibilidad variable a macrólidos, TMP-SMX, tetraciclinas, lincosamidas
Tipo SCCmec asociado con las cepas que provocan la infección	También I, II y III	IV y V
Expresión de LPV	Poco común	Común
NAH: neumonía adquirida en el hospital; NAVM: neumonía asociada a ventilación mecánica; IPTB: infección de piel y del tejido blando; NAC: neumonía adquirida en la comunidad; TMP-SMX: cotrimoxazol; SCCmec: cromosoma en cassette estafilocócico mec; LPV: leucocidina de Pantón-Valentine.		

Tomado de: Rodríguez-Noriega, Eduardo, and Carlos Seas. "The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 14 (2010): 87-96.

SASM se aísla más comúnmente en pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad y causa principalmente infecciones de la piel, osteomielitis hematógena, artritis séptica y neumonía con derrame. Produce además varios síndromes asociados a toxinas, como el de choque tóxico, el de piel escaldada e intoxicaciones alimentarias (37).

En años recientes se ha observado un incremento progresivo de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), que se han vuelto endémicas en muchos hospitales, sobre todo en los que brindan atención compleja y manejan un alto número de camas, donde puede ser el agente causal de cerca del 50% de las infecciones nosocomiales. Se ha asociado el AH-SARM a varios factores de riesgo, entre los que se destacan, hospitalización reciente y permanencia en unidades de cuidados intensivos (UCI) (40); con el agravante de que los trabajadores de la salud y los pacientes colonizados por SARM pueden convertirse en nuevos focos de infección (41).

En la década de los años 90 adquirió gran importancia la emergencia de cepas de SARM en la comunidad (AC-SARM). Los primeros casos se reportaron en Australia (42) y Estados Unidos (43), en 1993 y 1998, respectivamente; desde entonces, se ha incrementado su aparición mundial. Las cepas de AC-SARM poseen numerosos factores de virulencia, entre ellos la toxina Pantón-Valentine (*PVL*), una leucocidina bicompuesta responsable de destruir leucocitos y producir necrosis tisular; la codifican dos genes cotranscritos (*lukS-PV* y *lukF-PV*), que residen en un profago (44).

La presencia de la *PVL* se ha asociado con agravamiento de la enfermedad de infecciones de la piel y tejidos blandos, causadas por cepas AC-SARM en adultos jóvenes y niños; estas infecciones evolucionan para dar lugar a la aparición de osteomielitis crónica y neumonía necrosante (36, 44).

## F. Tipificación de SARM

La tipificación de SARM se puede hacer por métodos fenotípicos y moleculares. Los primeros han sido útiles pero algunos pueden presentar desventajas por ser dispendiosos y por las limitaciones de su poder discriminatorio; además, algunos de ellos no son aplicables a todas las cepas de *S. aureus* (45). Los métodos moleculares de tipificación se han empleado recientemente, con mayor frecuencia, en estudios de epidemiología molecular de SARM, lo que ha permitido entender mejor las relaciones evolutivas de estos clones (46).

Entre los métodos empleados para tipificar SARM se encuentran los siguientes: la ribotipificación (47), los patrones de macrorrestricción de ADN cromosómico por electroforesis de campo pulsado (PFGE, por la sigla en inglés de Pulsed field gene electrophoresis) empleando la enzima *SmaI* (48, 49), las técnicas basadas en PCR(29, 32, 50) y, más recientemente, las basadas en el secuenciamiento de ADN(51, 52).

La PFGE empleando la enzima *SmaI* es el método más comúnmente utilizado para estudios de la epidemiología molecular de *S. aureus* y ha sido de gran valor en estudios de brotes nosocomiales (53). Inicialmente esta técnica estuvo restringida a estudios locales y de corto plazo, debido a la falta de reproducibilidad entre laboratorios; sin embargo, gracias a la estandarización de la metodología para hacer la electroforesis y al esquema de interpretación de los patrones producidos siguiendo los criterios de Tenover y colaboradores (54), se pudieron adelantar estudios multicéntricos que han sido de gran utilidad para determinar las relaciones genéticas de las cepas de SARM; en la actualidad se cuenta con un software que permite comparar los perfiles obtenidos en la PFGE e identificar a qué linaje de SARM, entre los reportados, pertenecen las cepas en estudio (55).

Oliveira y colaboradores (50) desarrollaron una PCR múltiple (multiplex PCR), basada solo en las variaciones de las secuencias del complejo *mecA*, sin tener en cuenta el

complejo *ccr*. El ensayo determina los tipos de *SSCmec* al identificar 8 locus situados corriente arriba y corriente abajo del gen *mecA*, principalmente en la región J. Este método permitió la discriminación rápida de los tipos estructurales del elemento *mec*; sin embargo, tiene la limitación de que no detecta todos los tipos y subtipos descritos de casete *SCCmec*, como son el tipo V y los subtipos IVa, b, c y d. Posteriormente, Zhang y colaboradores (29) describieron una PCR múltiple que detecta los tipos I a V y varios subtipos.

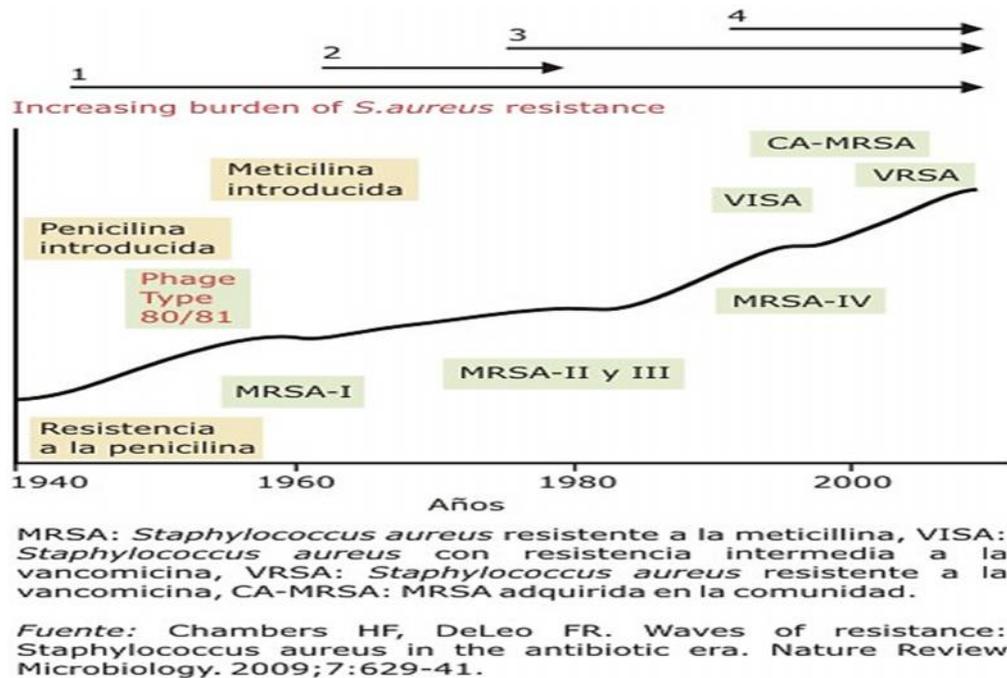
### **G. Evolución de los clones de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**

Los clones bacterianos son células genéticamente idénticas que descienden de un antepasado común. Con el paso del tiempo, los miembros de un clon individual pueden diferenciarse a través de mutaciones puntuales, de recombinación y de adquisición o eliminación de elementos genéticos móviles. Esta diferenciación ofrece los medios adicionales para la adquisición de características patogénicas como la resistencia antimicrobiana. De este modo, la variación genética da origen a una amplia diversidad genética y fenotípica (12).

Desafortunadamente, este patógeno ha ido desarrollando resistencia a los antimicrobianos de forma vertiginosa. El primer aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) fue descrito en Inglaterra en 1961, (56) y se consideró como un patógeno asociado a los cuidados de salud. Posteriormente, en 1963, se reportó el primer brote epidémico de SARM nosocomial (57).

En 1997 se describe en Japón la primera cepa de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA o GISA) (58), y en el año 2002 aparece en Estados Unidos la primera cepa resistente a la vancomicina (VRSA) (59). La figura 1 muestra las etapas del desarrollo de la resistencia de este microorganismo (60).

Figura 1. Evolución de resistencia: *S. aureus*



#### H. Propagación internacional de los clones de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Los clones de *S. aureus* se propagan rápidamente por el mundo (61) y se diseminan de manera eficaz entre países, dentro de éstos y en pequeñas áreas geográficas y, por lo general, con una evolución concomitante del fenotipo sensible a meticilina al fenotipo resistente a meticilina (62, 63). La mayoría de las infecciones intrahospitalarias por SARM en el mundo son derivadas de uno a cinco linajes principales conocidos como complejos clonales (CC): 5, 8, 22,30 y 45 (64-66). Entre 1994 y 2000, los datos de supervisión recolectados por iniciativa del Centro de Epidemiología Molecular de la Red de Seguimiento de las bacterias Gram-positivas patógenas (CEM/NET); identificaron cinco clones pandémicos predominantes (brasileños, ibéricos, húngaros, pediátricos y de Nueva York/Japón [NYJ]), los cuales representaban aproximadamente 70% de las cepas aisladas de SARM en todo el mundo (50).

En EE.UU., el Reino Unido, Dinamarca, Suiza, Egipto y Uganda se observó una propagación intercontinental de SARM derivada de un clon de SARM ancestral individual a principios de los años 90. A fines de los años 90, se observó una mayor propagación cuando se descubrió que los clones de SARM previamente aislados de Australia, los EE.UU. e Irlanda tenían similitudes con otros clones de SARM recolectados en el mundo (61, 67).

Dentro de los países, los clones de SARM se han diseminado de forma rápida y eficaz. La diversificación y el desplazamiento de estos clones también son rápidos. Durante un período de nueve años en España, el clon común NYJ SARM fue desplazado por el clon brasileño SARM, que luego fue desplazado por el clon ESARM-16 (SARME-16) (68). Del mismo modo, en Bélgica, los clones de SARM epidémicos que pertenecían a los complejos clonales 5, 8, 22,30 y 45 se diversificaron rápidamente y en 2001, estos complejos clonales demostraron una amplia distribución geográfica en los hospitales de Bélgica, a diferencia de los resultados de informes anteriores(65). En Portugal, el clon SARM brasileño predominante fue reemplazado en los hospitales por dos clones de SARM más tempranos por un período de 16 años (66).

### **I. Clones de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en América Latina**

Desde el primer informe, en 1994, sobre el clon de SARM autóctono que se originó en Brasil (69), conocido como el clon brasileño, se han descrito cuatro clones adicionales que circulan por América Latina: los clones Cordobeses, Pediátricos, Chilenos y de NYJ (70, 71). A los clones Cordobeses y Chilenos íntimamente relacionados se las considera actualmente como un clon individual (Cordobés/Chileno). Estos clones circulan por toda la región (Figura 1) y existen pruebas que avalan la aparición de variantes genéticas. También se han identificado varios clones menores, aunque a menudo están presentes en áreas geográficas restringidas (Figura 2) (72).

**Figura 2. Clones de SARM en América Latina desde el año 2000 hasta el 2010 (73, 74).**

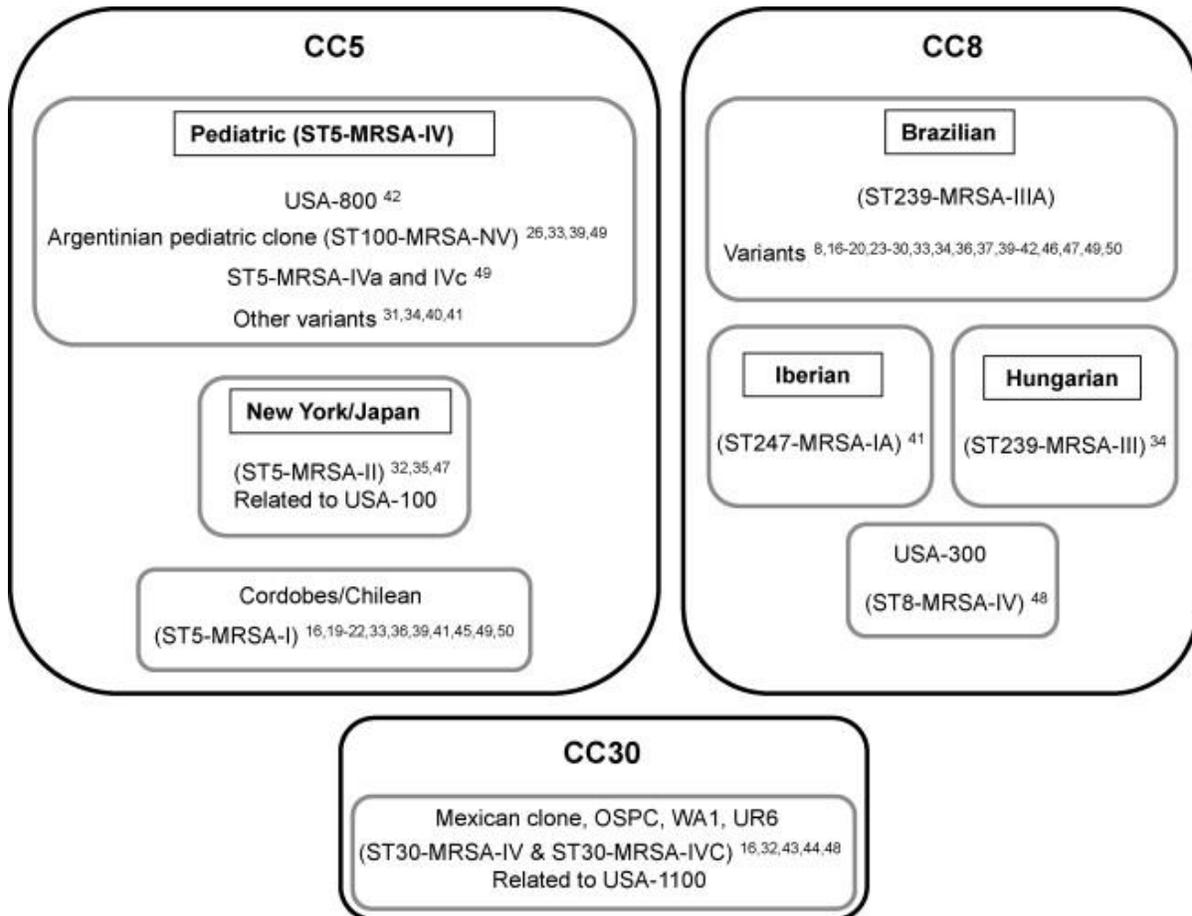


Rodríguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14:87-96.

Robinson y Enright (2003), propusieron el modelo donde se relaciona las cepas SARM de los complejos clonales (CC5, CC8 y CC30) de América Latina con clones SARM internacionales (Figura 3) (75).

Los clones CC5 y CC8 representan los linajes más diversificados de SARM y contienen los clones más pandémicos (75). Los antepasados putativos de estos linajes fueron los tipos de secuencias (STs) que tenían el mayor número de variantes de un solo paso (es decir, variantes de un solo locus y variantes de un solo nucleótido) y fueron representados históricamente por las primeras cepas SARM (62).

**Figura 3. Relación SARM de complejos clonales de América Latina con clones SARM internacionales.**



Tomado de: Rodríguez-Noriega, Eduardo, et al. "Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America." *International Journal of Infectious Diseases* 14.7 (2010): e560-e566.

En Colombia, el SARM constituye un problema clínico cada vez más preocupante (74, 76); sin embargo, la comprensión de su epidemiología molecular sigue siendo limitada. Varios clones de AH-SARM se han descrito, incluyendo el clon Pediátrico (ST5-SARM-IV), clasificados como SCC *mec* tipo VI (12, 77), y el clon chileno (ST5-SARM-I), principalmente en los grandes hospitales de tercer nivel en Bogotá, la capital (78, 79). Estos clones no poseen los genes *LukF-PV/LukS-PV*; ambos tienen un ST5 (combinación alelo 1, 4, 1, 4, 12, 1, 10) y pertenecen al complejo clonal 5. En contraste, los aislamientos de AC-SARM colombianos están relacionados con el clon USA300 y tienen un ST8 (combinación de alelos 3, 3, 1, 1, 4, 4, 3) (37).

Además, el clon CA-SARM USA300 (ST8-SARM-IV), recientemente se ha asociado con las infecciones nosocomiales en América Latina (74, 76, 80). La mayor parte de estos últimos aislamientos pertenecen a una variante latinoamericana distinta de USA300 recientemente apodado "USA300-LV", que se caracteriza por el transporte de *SCCmec IVc*, la ausencia del elemento móvil catabólico arginina (ACME) y alta prevalencia de resistencia a la tetraciclina (74, 79). A este clon SARM USA300, se ha asociado con infecciones severas de la piel y tejidos blandos asociada con la comunidad, así como la sepsis grave y otras infecciones invasivas. Diferenciar entre USA300 y colonización no USA300 puede ser útil para predecir el riesgo de infección durante la hospitalización (81-83).

Los clones cordobeses y chilenos (ST5-*SCCmec* tipo I) se identificaron por separado en las cepas aisladas de Argentina (73) y Chile (70) y luego se consideraron como variantes del mismo clon. En Argentina, el clon cordobés/chileno reemplazó rápidamente al clon brasileño íntimamente relacionado y ahora predomina en distintos países de América Latina, como Argentina, Chile, Paraguay y Colombia (78, 84, 85), donde se asocia con brotes nosocomiales. El clon Cordobés/Chileno muestra un fenotipo resistente a multifármacos, incluso con resistencia a eritromicina, aunque las variantes todavía son susceptibles a glucopéptidos, linezolid, cotrimoxazol, rifampicina y tetraciclinas.

Los clones SARM pediátricos (USA800; ST5- *SCCmec* tipo IV o *SCCmec* tipo VI) y NYJ (USA100; ST5-*SCCmec* tipo II) también se han propagado con éxito por toda América Latina. Las variantes del clon pediátrico, con resistencia heterogénea y de bajo nivel a meticilina y resistencia a antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, han provocado infecciones en Brasil, Argentina y Colombia (73, 79, 86) y han desarrollado resistencia a multifármacos en algunos hospitales de América Latina(79).

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo General

Analizar las características moleculares y la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *Staphylococcus aureus* colonizantes de pacientes con patología nasal atendidos en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario del Caribe de la ciudad de Cartagena de Indias.

#### Objetivos Específicos

1. Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos *S. aureus* colonizantes.
2. Determinar la prevalencia de los genes *mecA* y la leucocidina *pvl* de los aislamientos de *S. aureus*.
3. Determinar la prevalencia de los complejos clónales CC5 y CC8 en el grupo de aislamientos.
4. Tipificar y sub-tipificar el elemento genético móvil *SCCmec* de los aislamientos.
5. Tipificar molecularmente los aislamientos mediante PFGE

## IV. METODOLOGIA

### A. Tipo de estudio, Población y Muestra

El presente fue un estudio analítico observacional en el que se evaluaron las características moleculares y los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de 171 pacientes adultos con patología nasal atendidos en la consulta externa del departamento de Otorrinolaringología (ORL) del Hospital Universitario del Caribe de la ciudad de Cartagena de Indias. El período de estudio estuvo comprendido entre agosto de 2012 a agosto de 2013 y se contó con el consentimiento informado de los participantes y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Cartagena y de la Institución Hospitalaria participante.

La técnica de muestreo fue secuencial por conveniencia, accediéndose al total de las muestras recuperadas durante el periodo de estudio. Se excluyeron del muestreo aquellos pacientes que presentaron las siguientes enfermedades: Fibrosis quística, diagnosticada por la obtención de resultados positivos en una prueba del sudor o por los alelos del ADN; inmunodeficiencia grave (congénita o adquirida); problemas mucociliares congénitos (discinesia ciliar primaria); micetomas no invasivos y micosis invasivas; enfermedades vasculíticas y granulomatosas sistémicas; adicción a la cocaína y neoplasias.

### B. VARIABLES DE ESTUDIO

Se estudiaron las siguientes variables: *S. aureus*, medio manitol salado, prueba catalasa, API STAPH, PCR múltiple, genes *nuc*, *mecA*, *lukF/S-PV*, tipo y subtipo *SCCmec*, complejo clonal CC5 y CC8, antibiogramas, MIC, pulsotipos, SARM, SASM, PCR multiple. (Tabla 3).

**Tabla 3. Definición de variables**

N°	NOMBRE	DEFINICION	TIPO	CATEGORIA	RANGO
C1	Medio manitol	Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos.	Cualitativa Nominal	Cambio color  Sin cambio de color	No aplica
C2	Prueba catalasa	Enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Cualitativa Nominal	Burbujas  No burbujas	No aplica
C3	API STAPH	Batería bioquímica y fermentación estandarizadas, referencia para la identificación de estafilococos.	Cualitativa Nominal	Positivo  Negativo	No aplica
C4	PCR multiplex	Detección simultánea de más de una secuencia de genomas diferentes en una sola reacción mediante el empleo de dos o más parejas de cebadores	Cualitativa nominal	Si  No	No aplica
C5	Gen nuc	Presencia de secuencia genética que codifica para el gen de la term nucleasa estafilocócica ( <i>nuc</i> )	Cualitativa Nominal	Si  No	No aplica
C6	Gen <i>mecA</i>	Presencia de secuencia genética que codifica para el gen <i>mecA</i>	Cualitativa nominal	Si  No	No aplica
C7	Leucocidina PVL	Presencia de secuencia genética que codifica para el gen: PVL ( <i>lukS-PV</i> y <i>lukF-PV</i> )	Cualitativa nominal	Si  No	No aplica
C8	Tipo y subtipo <i>SCCmec</i>	Presencia del cassette cromosómico estafilocócico <i>SCmec</i> y subtipificación <i>SCCmec</i> IVc	Cualitativa nominal	<i>SCCmec</i> tipo I,II,III y IV (a,b,c,d)	No aplica
C9	Clon	Seres genéticamente idénticos que descienden de un mismo individuo.	Cuantitativa nominal	USA 300 Chileno Pediátrico	No aplica
C10	Complejo clonal	Grupos de clones distintos pero suficientemente próximos genéticamente como para permitir el reconocimiento de un origen común.	Cualitativa nominal	CC5  CC8	No aplica
C11	Perfil de resistencia Antibiograma	Sensibilidad o resistencia a antibióticos Oxacilina, Cefoxitina, Clindamicina, Eritromicina, Rifampicina, Gentamicina, eritromicina, penicilina, cloranfenicol, tetraciclina, linezolid, ciprofloxacina, ampicilina, levofloxacina, cefalotina, por el método de Kirby-Bauer	Cualitativa nominal	Resistente.  Resistencia intermedia.  Sensible	Depende del halo inhibición (CLSI)

C12	MIC	Concentración mínima inhibitoria para los antibióticos Vancomicina y Oxacilina	Cuantitativa continua	Vancomicina	Concentración anti-biótica (CLSI)
C13	Tipificación genética (pulsotipos)	Relación clonal mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	Cualitativa nominal	Análisis de agrupamiento de las cepas	No aplica
C14	<i>S. aureus</i>	Bacteria Gram-positiva identificada de acuerdo a lineamientos de la Asociación Americana de Microbiología	Cualitativa nominal	Fermenta el agar manitol, pruebas catalasa y coagulasa, API STAPH	No aplica
C15	SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina	Cualitativa nominal	Presencia gen <i>mecA</i>	No aplica
C16	SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a metilina	Cualitativa nominal	Ausencia gen <i>mecA</i>	No aplica

### C. Toma y Procesamiento de Muestras

Ante la sospecha clínica de una enfermedad nasal o paranasal de tipo infecciosa, causada por *S. aureus*, se tomaron muestras de meato medio, senos paranasales o rinofaringe de secreciones nasales, mediante aspiración y ayuda endoscópica. Estas muestras se recolectaron con hisopos estériles y fueron trasladadas posteriormente en medio de transporte Stuart (OXOID) al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena para su procesamiento. Las muestras fueron inoculadas en placas de agar manitol salado (Becton D), incubadas a 37°C por 48 horas, al término de las cuales se examinaron las características de las colonias.

Los aislamientos de las colonias que se desarrollaron en el medio agar manitol salado, con morfología microscópica de cocos Gram-positivos a la tinción Gram, se les realizó pruebas de catalasa y coagulasa en tubo (BBL, Coagulase plasma Rabbit, Becton, EEUU), y fueron confirmadas mediante identificación bioquímica con el estuche API Staph (Biomérieux). Los cultivos positivos fueron catalogados como *Staphylococcus aureus*. De cada cultivo positivo se realizó una resiembra y se mantuvo en crecimiento durante 18 horas, al cabo de las cuales las colonias se transfirieron a tubos eppendorff

de 1.5 mL con 700 µl de caldo tioglicolato y 300 µl de glicerina y se conservaron en congelación a -35° C en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena.

#### **D. Pruebas de Susceptibilidad a Antibióticos**

La determinación de la sensibilidad antibiótica se realizó por el método de difusión en disco de Kirby Bauer, según los estándares del CLSI(87, 88). Los antibióticos evaluados fueron: rifampicina (5µg), clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), oxacilina (1µg), penicilina (10 µg), cloranfenicol (30ug), tetraciclina (30 µg), linezolid (30 µg), ciprofloxacina (5 µg ), cefoxitin ( 30 µg ), ampicilina (10 µg ), gentamicina (10 µg ), levofloxacina (5 µg ) y cefalotina(30 µg ). Adicionalmente, para determinar la resistencia a clindamicina inducida por macrólidos, se utilizó la prueba de difusión de doble disco (prueba D), colocando en la misma placa, discos de clindamicina y eritromicina con una separación de 15 mm. Después de 24 horas de incubación en aerobiosis a 35°C, se determinó el diámetro de los halos de inhibición, según las medidas expresadas por el CLSI. Para todos los procedimientos microbiológicos se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 25923 (sensible a meticilina) y ATCC 33591(resistente a meticilina). Para las cepas meticilino-resistentes (SARM) la susceptibilidad a vancomicina y oxacilina se evaluó mediante el método de microdilución en agar, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se usaron concentraciones seriadas de 0,5 a 32 µg/ml para vancomicina y de 0,5 a 64 µg/ml para oxacilina, siguiéndose las recomendaciones de la CLSI. Como controles se utilizaron las cepas ATCC-29213 (vancomycin-sensitive), ATCC-25923 (SASM) y ATCC-33591 (SARM).

#### **E. Extracción de ADN bacteriano**

Para la obtención del ADN genómico de cada aislamiento, se tomaron alrededor de 3-5 colonias a partir de un cultivo puro en agar nutritivo, se suspendieron y lavaron con Tris 0,5 M y luego se homogenizó en tampón TE (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA), se calentó a 100 ° C durante una hora y se congeló inmediatamente a -35 ° C durante 20

minutos, se descongeló a 65 °C y finalmente se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano se depositó en un tubo fresco y se almacenó a -20 ° C para su posterior análisis.

#### **F. Amplificación por PCR múltiple de los genes *nuc*, *mecA* y *lukF/S-PV***

Se realizó PCR múltiple a todos los aislamientos de *S. aureus* utilizando tres pares de oligonucleótidos: *MecA1F– MecA2R* (39) que amplifica un fragmento de 147 pb del gen *MecA*; *Nuc1F – Nuc2R* que amplifica un fragmento de ~300 pb del gen *nuc* que codifica la termonucleasa extracelular específica de *S. aureus*; *LukPV1F – LukPV2R* que amplifica un fragmento de 437 pb del gen que codifica la leucocidina de Pantón Valentine (PVL). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25uL, que contenía 12.5uL de la mezcla de PCR (Go-Taq Green Master Mix; Promega®), 0.2 uM de cada primer y 5 uL de ADN molde. La reacción se efectuó en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Como controles se utilizaron las cepas de *S. aureus* USA300 (*mecA* +; *nuc* +; *pvl* +) y ATCC 29213 (*mecA* -; *nuc* +; *pvl* -) y como control negativo de la reacción se utilizó agua ultra pura. Al final de la reacción de PCR, los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 ug/ml, y se visualizaron usando un transiluminador de luz UV.

#### **G. Tipificación y sub-tipificación del elemento *SCCmec* de las cepas SARM**

Las cepas confirmadas como SARM fueron sometidas a tipificación del casete cromosomal estafilocócico (*SCCmec*), mediante PCR múltiple diseñada para la amplificación de fragmentos específicos en la región que codifica para las recombinasas y el complejo *mecA* usando cebadores específicos para cada uno de los tipos *SCCmec* (I, II, III, y IV)(50) y las cepas controles de referencia: NCTC10442 (*SCCmec* type I), N315 (*SCCmec* type II), y JCSC4744 (*SCCmec* type IV). A los aislamientos con *SCCmec* tipo IV se les determinó el subtipo mediante amplificación

múltiple de fragmentos específicos de la región J1 variable usando cebadores específicos para los subtipos *SCCmec* IV : (IVa, 278 pb), (IVb, 336 pb), y (IVc, 483 pb), y las cepas controles de referencia: MW2 (IVa), JCSC2172 (IVb), y JCSC4178 (IVc) (35).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (Go-Taq Green Master Mix; Promega®), 0.25 uM de cada primer y 5 uL de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 seg , 53°C por 30 seg, y 72°C por 1 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 4 min. Al final de la reacción de PCR, los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 ug/ml, y se visualizaron usando un transiluminador de luz UV.

#### **H. Prevalencia de los complejos clónales (CC5) y (CC8)**

Los aislamientos con tipos de secuencia (ST) relacionados conforman un complejo clonal (CC). Para asignar los aislamientos a los complejos clónales CC5 y CC8 se utilizó la técnica desarrollada por Escobar y colaboradores(81), basada en la amplificación con cebadores específicos para el gen guanilato quinasa (*gmk*) seguido de digestión con la enzima de restricción *Hha-I*, que permite diferenciar los tipos de secuencia 5 (ST5) y 8 (ST8) correspondientes a aislamientos SARM-AH y SARM-AC, respectivamente. Los cebadores amplifican un fragmento de 557 pb del gen *gmk* y después de la digestión con la enzima *HhaI*, se generan fragmentos de 429 y 124 pb para el ST5 mientras que para el ST8 se generan fragmentos de 323, 124, y 105 pb.

Para el ensayo se usaron como controles las cepas de referencia: HDE3 correspondiente al clon Pediátrico (ST5-SARM-IV) y USA300-0114 (ST8-SARM-IVa). Después de la amplificación con los cebadores específicos para el gen *gmk*, los productos se sometieron a digestión con la enzima de restricción *Hha-I* a 37°C por 2

horas. Finalmente, los patrones de restricción fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio.

### **I. Tipificación molecular por Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (PFGE)**

La relación clonal de los aislamientos se determinó mediante electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE). Para la tipificación por PFGE se cultivó una colonia de cada aislamiento puro de *S. aureus* en caldo tripticasa de soya (TSB), e incubándose en agitación a 200 rpm a 37°C por 18hr. Posteriormente, se centrifugó a 4.000 rpm por 10 min a 4°C, descartándose el sobrenadante y se re-suspendió el sedimento en buffer de suspensión celular.

Seguidamente se centrifugó a 11.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento nuevamente en este mismo buffer y sometiendo a digestión con lisostafina en moldes de agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 2%, y tratamiento con Proteinasa K. Luego de ser lavados, los bloques fueron sometidos a restricción con la enzima *SmaI* (Promega).

Para la electroforesis en campos pulsados se utilizó el equipo CHEF (BioRad) utilizando los siguientes parámetros: Angulo 120°, gradiente de voltaje 6.0 v/cm, temperatura de 14°C. Se programaron 2 bloques de electroforesis en pulsos de la siguiente manera: Bloque 1: Pulso inicial de 5 seg; Pulso final de 15 seg; tiempo de corrido: 10 horas. Bloque 2: Pulso inicial de 15 seg; Pulso final de 60 seg; tiempo de corrido: 13 horas. Finalmente el ADN fragmentado se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio durante una hora, en un transiluminador de luz UV (46).

Los patrones electroforéticos obtenidos fueron analizados con el programa Bionumerics (Applied Maths) usando el coeficiente de similitud Dice. Para la generación de dendogramas, los aislamientos con >75% de similitud se agruparon en patrones, y se clasificaron de acuerdo a los criterios descritos por Tenover y

colaboradores (47), según los cuales, se considera como indistinguibles aquellas cepas que no presenten diferencias en ninguna de las bandas; cercanamente relacionadas las que presenten 2 o 3 bandas diferentes; posiblemente relacionadas las cepas con diferencias en 4 a 6 bandas; mientras que aquellas con 7 o más bandas diferentes son consideradas como no relacionadas.

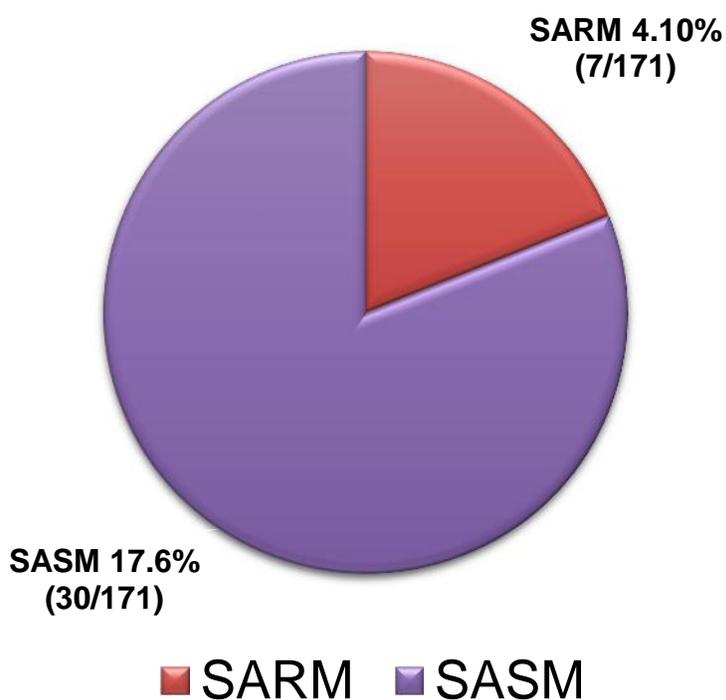
## **J. Análisis estadístico**

Microsoft Office Excel se utilizó con el objeto de registrar resultados microbiológicos y moleculares de los aislamientos de las cepas en estudio y se exportó al software estadístico SPSS (versión 20.0) para el análisis final de los datos. El análisis descriptivo se basó en tablas de frecuencia y medidas de resumen para las variables cualitativas y cuantitativas respectivamente. Además se realizaron pruebas de hipótesis para comparar la presencia de características moleculares y genéticas por patrón de sensibilidad o resistencia antibiótica, para tal efecto se utilizó la prueba  $\chi^2$  o Test exacto de Fisher para variables cualitativas y Anova o U de Mann Whitney para las cuantitativas según correspondiera, un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo.

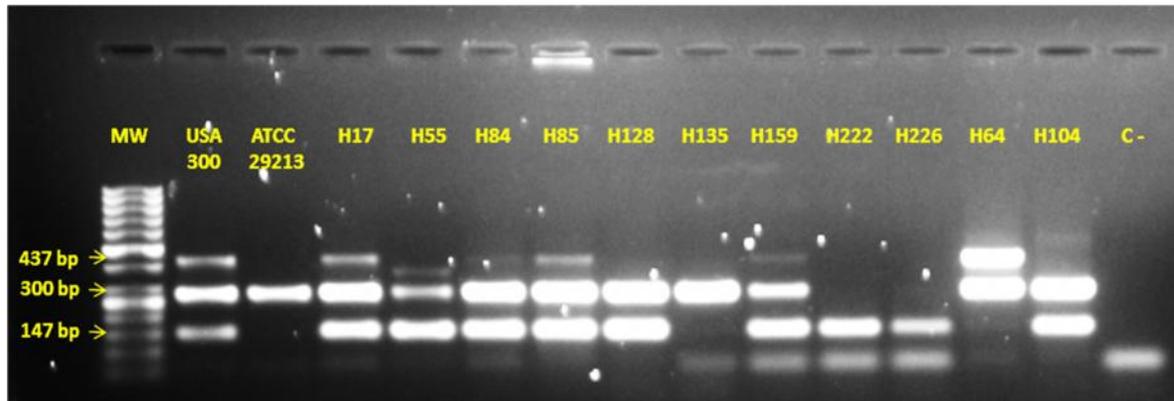
## V. RESULTADOS

En el estudio se obtuvieron 37 aislamientos de *S. aureus* (21.64%) a partir de 171 pacientes participantes. Del total de 37 aislamientos, 7 (18.9%) presentaron el gen *mecA* característico de las cepas SARM para una prevalencia de 4.1% (7 aislamientos de 171 pacientes). Los 30 aislamientos restantes tuvieron ausente este gen, por lo que fueron considerados como cepas SASM (81%), para una prevalencia de SASM de 17,6% (30 aislamientos de 171 pacientes) (Figura 4 y 5).

**Figura 4. Prevalencia de colonización por *S. aureus***



**Figura 5. PCR para detección de *nuc*, *mecA* y *PVL***



PCR Multiplex para detectar genes *nuc*, *mecA* y *PVL* en aislamientos de portadores nasales para confirmar la especie *Staphylococcus aureus* (gen *nuc*), resistencia a la meticilina (gen *mecA*) y la presencia de los genes para *pvl*. Carril 1: MW (marcador de peso molecular de ADN). Carriles 2 y 3: cepa de referencia USA300 (*nuc* +, *mecA* +, *PVL*+) y la cepa de referencia ATCC 29213 (*nuc* +, *mecA* -, *PVL*-) respectivamente. Los carriles 3 a 13: aislamientos representativos del estudio. Carril 14: control negativo de la reacción de PCR.

Los 7 (4.10%) aislamientos de *S. aureus* considerados SARM por su resistencia a cefoxitina, fueron confirmados mediante la PCR múltiple, revelando la presencia del gen *mecA*. Figura 5.

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos indicaron que de los 37 aislamientos fueron resistentes a: penicilina (89.2%), a ampicilina (72%), a cefalotina (73%). La prueba D no indicó resistencia inducible a la clindamicina. En el caso del antibiótico vancomicina, el MIC de todos los aislados positivos de *S. aureus* estuvo dentro del rango 2. Esto quiere decir, que todos los aislamientos positivos para *S. aureus* fueron sensibles a este antibiótico. (Tabla 4).

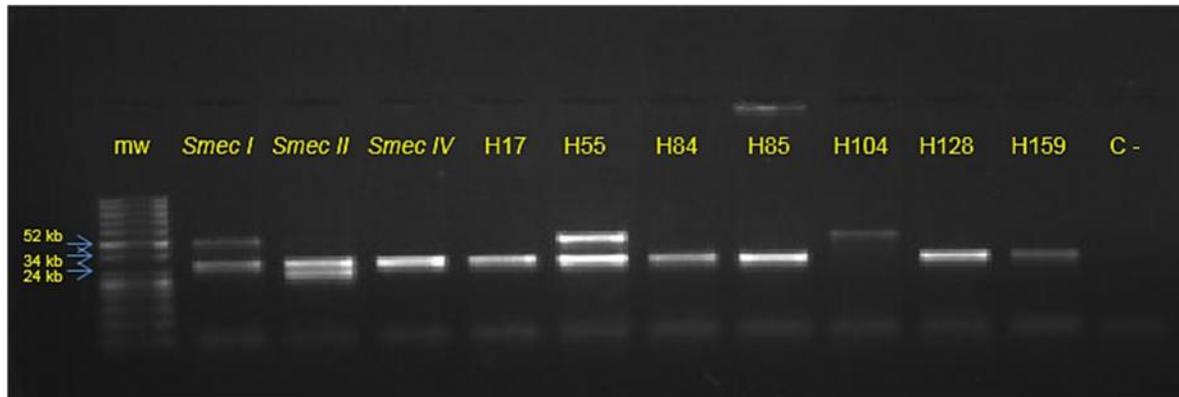
**Tabla 4. Perfiles de sensibilidad antibiótica de *S. aureus* de aislados nasales (n= 37)**

ANTIBIOTICO	S	I	R
	n (%)	n (%)	n (%)
Ciprofloxacina	35 (94.6)	1 (2.7)	1 (2.7)
Linezolid	35 (94.2)	0	2 (5.4)
Penicilina	4 (10.8)	0	33 (89.2)
Clindamicina	22 (59.5)	7 (18.9)	8 (21.6)
Eritromicina	11 (29.7)	19 (51.3)	7 (18.9)
Cefoxitin	30 (81.0)	0	7 (18.92)
Ampicilina	5 (13.5)	0	32 (86.4)
Oxacilina	29 (78.3)	0	8 (21.6)
Gentamicina	36 (97.3)	0	1 (2.7)
Rifampicina	31 (83.7)	0	6 (16.2)
Levofloxacina	36 (97.3)	0	1 (2.7)
cefalotina	4 (10.8)	6 (16.2)	27 (73)
Tetraciclina	15 (39.5)	1 (2.7)	22 (60.5)
Cloranfenicol	33 (89.2)	2 (5.4)	2 (5.4)

S = susceptibles I = intermedia R = resistente

La tipificación *SCCmec* de las cepas SARM aisladas por PCR múltiple, mostró que 5 aislamientos presentaron *SCCmec* tipo IV y dos presentaron *SCCmec* tipo I. (Figura 6).

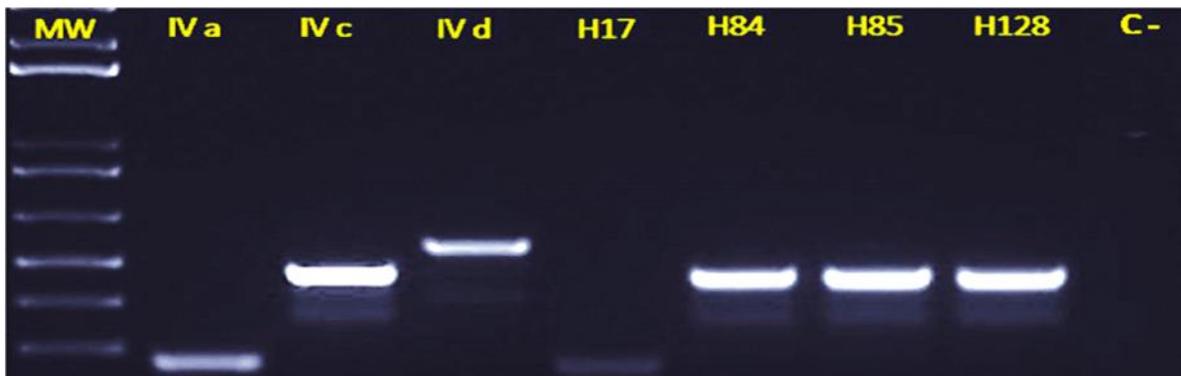
**Figura 6. PCR múltiple para tipificación del elemento *SCCmec***



PCR múltiple se llevó a cabo para determinar los tipos de *SCCmec* de aislados de SARM. Carril 1: MW (marcador ADN de peso molecular). Carril 2: cepa de referencia *S. aureus* ATCC 33591 (*SCCmec* tipo I). Carril 3: cepa de referencia *S. aureus* N315 (*SCCmec* tipo II). Carril 4: cepa de referencia *S. aureus* JCSC4744 (*SCCmec* tipo IV). Los carriles 5 a 11: aislamientos representativos del estudio. Carril 12 muestra los resultados para un control negativo de la reacción de PCR.

Subsecuentemente en la sub-tipificación de SARM del casete cromosómico *SCCmec* tipo IV por PCR múltiple de las cepas SARM se evidenció que 4 aislamientos pertenecían al subtipo *SCCmec* IVc y 1 aislamiento al subtipo *SCCmec* IVa (Figura 7).

**Figura 7. PCR múltiple para sub-tipificación del elemento *SCCmec* IV**



Aplicación de la PCR múltiple a una colección de 5 cepas SARM de tipo *SCCmec* IV. Carriles 1 -3: cepas prototipo MW2, Q2314 y JCSC4469, con subtipos IVa , IVc y IVd respectivamente. Carril 5: aislamiento con subtipo *SCCmec* IVa. Carriles 6 – 8: aislamientos con subtipo IV c. MW: marcador de ADN de peso molecular.

Con relación al complejo clonal, en el estudio fueron identificados tres aislamientos por PCR multiplex SARM pertenecientes al complejo clonal 8 (CC8) y un aislamiento

SARM perteneciente al complejo clonal 5 (CC5). En la figura 8, se muestran algunos aislamientos representativos.

**Figura 8. PCR múltiple de Complejos Clónales (CC5) y (CC8)**



PCR Múltiple para identificación de los complejos CC5 y CC8 de SARM. Carril 1: MW (marcador ADN de peso molecular). Carril 2: Clon chileno (CC5); Carril 3: Clon USA 300 (CC8); Carril 4, 5, 6 aislamientos SARM pertenecientes al CC8; Carril 7: aislamiento SARM no tipificable; Carril 8: aislamiento SARM perteneciente al CC5; Carril 9: control negativo.

En nuestro estudio se observó que la leucocidina PVL (Panton-valentine leucocidin) en 6 (85.7%) de 7 aislados SARM y 12 (40%) de 30 aislados SASM.

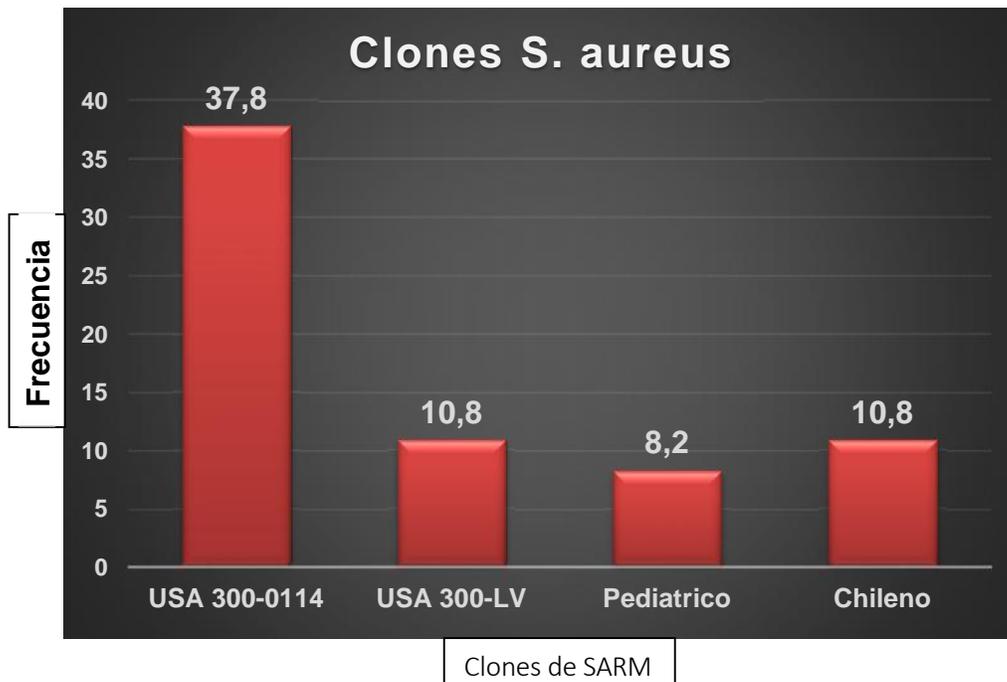
En los análisis de la PFGE de los aislamientos, tanto *SARM* como *SASM*, se encontró que esos presentaron un coeficiente de similitud de 81,7% con el clon USA300 (CC8-SCC*meclV*). En cuanto a las cepas SASM, se identificaron 7 aislamientos pertenecientes al complejo CC5 y 18 aislamientos pertenecientes al complejo CC8, para una prevalencia de 19% para CC5 y de 72% para CC8 de *S. aureus*. Tabla 5

**Tabla 5. Características moleculares de los aislamientos de *S. aureus* por PFGE (n=25)**

<b>COMPLEJO CLONAL <i>S. AUREUS</i></b>		
<i>SARM CC8</i>		6 (24%)
<i>SASM CC8</i>		12 (48%)
<i>SARM CC5</i>		3(8.2%)
<i>SASM CC5</i>		4 (10.8%)
<b>TIPO DE CLONES <i>S. AUREUS</i></b>		
CLON USA 300	USA 300 - CC8	4 (16%)
	USA 300 PV-CC8	14 (56%)
CLON PEDIATRICO	Pediátrico - CC5	3 (12%)
CLON CHILENO/CORDOBES	Chileno/Cordobés – CC5	4 (16%)

Asimismo, se pudo evidenciar que el clon USA300-0114 tuvo una prevalencia de 16% (4) y su variante "USA300-LV", predominó en su mayoría con 56% (14) de las cepas *S. aureus* aisladas, seguidos de un 16% (4) y 12% (3) respectivamente de los clones Chileno/cordobés y Pediátrico. Figura 9 y 10.

**Figura 9. Tipos de clones aislados por PFGE.**

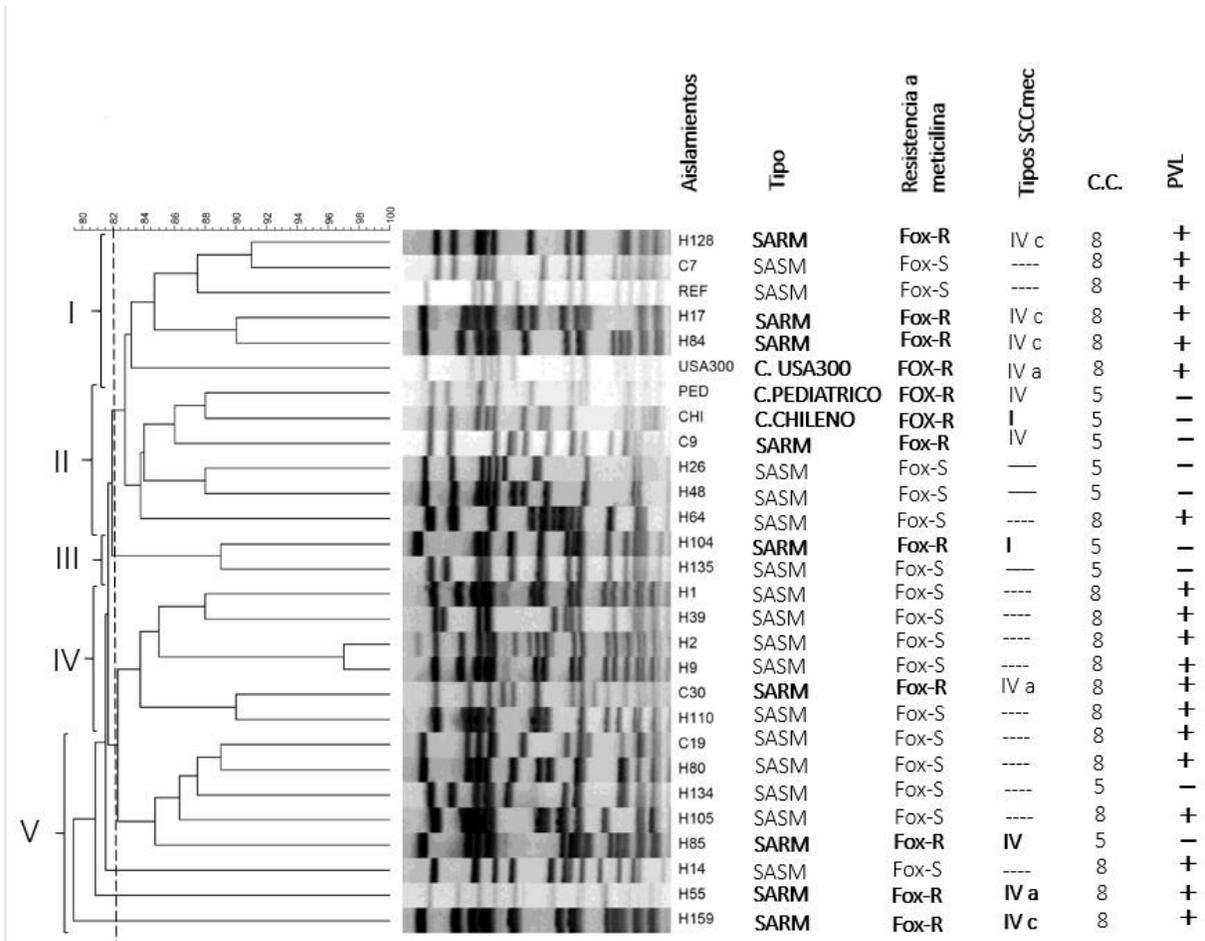


Tipos de clones aislados del estudio en una población de 37 cepas analizadas con PFGE. Clon USA 300-0114 (CC 8 *SCCmec* IVa); Clon USA 300-LV (CC8 *SCCmec* IV c); Clon Chileno/Cordobés (CC5 *SCCmec* I) y Clon Pediátrico (CC5 *SCCmec* IV)

Las cepas que presentaron mayor similitud, es decir, menor distancia entre ellas desde el punto de vista filogenético, fueron H2 y H9. Por el contrario, las cepas que se alejaron más fueron las del grupo H159, ya que fue la última que se incorporó al dendograma. Figura 10.

La resistencia a los antibióticos clindamicina, eritromicina, gentamicina y tetraciclina difirió significativamente entre los aislamientos SARM que portaban *SCCmec* tipo I y *SCCmec* tipo IV comparado con las que portaron el *SCCmec* tipo IVc ( $p < 0,0001$ ). Los aislamientos pertenecientes a ST5-SARM-I y SARM IV fueron susceptibles a clindamicina, eritromicina, gentamicina y rifampicina; mientras que 56% (14) de los pertenecientes a la variante del clon USA-300, conocida como USA-300 PV CC8 tuvieron resistencia a tetraciclina.

**Figura 10. Dendograma del análisis de PFGE de SARM**



Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) que muestra la relación genética entre los aislamientos representativos de SARM encontrados en el año de estudio. La línea discontinua corresponde a un coeficiente de similitud de 80 % que se utiliza para definir clones relacionados por PFGE. Cepas: CC8-SCCmecIVc (H128, H17, H84, H159); CC8-SCCmecIVa (C30, H55); CC5-SCCmecI (H104); CC5-SCCmecIV (H85). Cepas control: USA 300- 0114 (CC8-SCCmecIVa); clon Chileno/Cordobés (CC5-SCCmecI); clon pediátrico (CC5-SCCmecIV).

## VI. ANALISIS DE RESULTADOS

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) representa una seria amenaza para la salud pública mundial, debido a la rápida transmisión y variación de los clones de SARM pandémicos con mayor virulencia y resistencia antimicrobiana. En América Latina, SARM es la causa principal de infecciones nosocomiales y está aumentando el predominio de SARM en las infecciones adquiridas en la comunidad(5, 12), por lo cual no debe ser considerado como patógeno nosocomial estricto(89, 90).

Con respecto al perfil de resistencia, en este estudio se observó una alta tasa de resistencia a los antibióticos penicilina (89.2%), ampicilina (86.4%) y cefalotina (72.1%). Además, 7 aislamientos (18.9%) fueron resistentes a más de 2 antibióticos. Como era de esperar, los aislamientos SARM tuvieron una alta resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, resultado similar al reportado por Dong et al, 2006 (91). Uno de los principales factores que intervienen en la resistencia a la meticilina en *S. aureus* es la proteína de unión a penicilina, PBP2a. Esta proteína no es sensible a la inactivación por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la meticilina. Se ha sugerido que PBP2a se hace cargo de la biosíntesis de peptidoglicano en presencia de dosis de otro modo letales de antibióticos  $\beta$ -lactámicos(92).

En el 2007 se descubrió una nueva proteína, llamada *FMTA*, sin embargo aún no está claro su mecanismo de acción. Se considera que esta proteína *FMTA* tiene una baja afinidad de unión para los  $\beta$ -lactámicos, y experimenta una tasa de acilación lenta, lo que sugiere que esta proteína es intrínsecamente resistente a la inactivación de  $\beta$ -lactámicos(93).

Para otros antibióticos se evidenció un alto grado de sensibilidad, como en gentamicina (97.3%), levofloxacina (97.3%) ciprofloxacina (94.6%), cloranfenicol (89.2%), linezolid (83.8%) y rifampicina (83.7%). En contraste, otros estudios (94-96), han reportado alta resistencia a estos antibióticos.

En un estudio realizado por Fis Freitas y colaboradores en la ciudad de Brasil, los aislamientos de *S. aureus* obtenidos se caracterizaron en relación a la resistencia a la gentamicina y aminoglucósidos relacionados(97). El mecanismo más generalizado de resistencia a aminoglucósidos es la modificación de los antibióticos por enzimas celulares, tales como aminoglicósidos acetiltransferasas (AAC), aminoglicósidos adeniltransferasas (AAD) y aminoglicósido de fosfotransferasas (APH) (97-99).En el caso de las fluoroquinolonas levofloxacin y ciprofloxacina, los resultados en este estudio; fueron similares a los reportados en Nigeria por Emmanuel Onwubikoy colaboradores en el 2011, donde hubo una alta sensibilidad de estos antibacterianos (100).

Con relación al antibiótico vancomicina, donde el MIC de todos los aislados positivos de *S. aureus* estuvo dentro del rango 2, coincide con un estudio hecho por Gregory Steinkraus entre los años 2001 y 2005 de estudio de aislamientos de *S. aureus* en sangre donde no se evidencio resistencia a la vancomicina (101).Sin embargo, dos informes recientes de infecciones causadas por vancomicina resistente a *S. aureus* (VRSA) son de gran preocupación, ya que reflejan tanto una resistencia total y un mecanismo diferente para su difusión (102, 103).

Las cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) son raras, mientras que las cepas vancomicina heterogenea (hVISA) y vancomicina intermedia (VISA) son comunes en el ámbito clínico, especialmente en bacteriemia persistente y endocarditis por SARM. Por otra parte en un estudio realizado en Korea, se encontró una alta resistencia de *S. aureus* vancomicina heterogenea (hVISA) en comparación con vancomicina intermedia(VISA) (104).

La emergencia de *S. aureus* con resistencia intermedia a glicopéptidos y SARM heterorresistente sugiere que la resistencia completa a glicopéptidos puede desarrollarse rápidamente y limitar la utilidad de vancomicina, lo cual subraya la necesidad de nuevos antibióticos (105).

No hubo evidencia de resistencia inducida a clindamicina. Los clones de *S. aureus* han surgido con una resistencia inducida a clindamicina seguida de una modificación del blanco ribosómico. La resistencia a clindamicina es inducida por macrólidos (106). Los estudios basados en los EE. UU. observan un predominio total de resistencia inducida a clindamicina en las cepas aisladas de *S. aureus* con 52% (50% de cepas de SARM y 60% de cepas de SASM) (107), aunque esto puede cambiar ya que el cambio clonal ha demostrado afectar a la resistencia inducida a clindamicina (108).

Por otra parte las fluoroquinolonas, levofloxacin y ciprofloxacina con frecuencia son utilizados en el área de otorrinolaringología (ORL) del Hospital Universitario del Caribe; en el estudio se observó una resistencia muy baja, de alrededor del 2.7% en los aislamientos analizados. No obstante, en algunos estudios se ha observado resistencia de fluoroquinolonas en los aislamientos de *S. aureus* (109, 110).

Por otra parte, en un estudio similar en el año 2004 se observó que todas las cepas fueron sensibles a gentamicina (111). Este antibiótico en su forma tópica es uno de los antibióticos más prescritos en las instituciones hospitalarias, sin embargo los resultados de sensibilidad y resistencia lo clasifican dentro del grupo C, los cuales comprenden agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que pueden requerir pruebas en aquellas instituciones que mostraron endemias o epidemias de cultivos resistentes a muchas drogas primarias (especialmente en la misma clase por ej.:  $\beta$ -lactámicos o aminoglicósidos). La administración de este fármaco no se recomienda en mujeres embarazadas (112).

El uso del antibiótico gentamicina es frecuente para el tratamiento de infecciones cutáneas o profilaxis de postoperatorios dermatológicos puede representar una posible fuente de selección de cepas resistentes. En la literatura mundial esta tasa de resistencia es mínima en algunos países, gracias a su utilización limitada y a las políticas de control diseñadas en las décadas de los setentas y ochentas (113). Estas estrategias deben ser introducidas en nuestro medio con el propósito de contar con la gentamicina como alternativa costo efectiva frente al *S. aureus*.

Los 7 aislamientos con fenotipo SARM (resistentes al sensidisco cefoxitina) se confirmaron mediante la PCR múltiple, mostrando poseer el gen *mecA*, el cual está presente en las cepas meticilino resistentes de *S. aureus* (SARM). La cefoxitina es una cefamicina que actúa como un inductor más fuerte que la oxacilina sobre la producción de PBP2 en aislados de *S. aureus* que poseen el gen *mecA*. Por lo tanto, la cefoxitina parece más eficaz que la oxacilina en la detección de la resistencia a meticilina mediante el test DD (difusión en disco); al menos en aquellas poblaciones de *S. aureus* que son heterorresistentes (19).

Las directrices internacionales recomiendan el uso de mupirocina nasal para la descolonización en ciertos grupos de pacientes y trabajadores de la salud portadores de SARM (114, 115). Cabe destacar que en algunos estudios se han detectado cepas SARM resistentes a la mupirocina (116, 117). Otras investigaciones revelan que este antibiótico sólo es eficaz en la eliminación de la bacteria de la nariz durante un par de semanas, y las recaídas nasales son comunes dentro de varios meses. Otra falencia de este antibiótico es la tendencia creciente de la resistencia y la posterior reducción en la eficacia (117, 118).

Las cepas multirresistentes de *S. aureus*, que ahora se han dispersado en la comunidad representan un reto para la práctica clínica de rutina para el manejo de las enfermedades infecciosas. Por lo tanto, las investigaciones dirigidas al seguimiento de las cepas de *S. aureus* necesitan estudios de base epidemiológica, que sirvan de guía para el diseño de estrategias dirigidas a controlar su propagación y difusión en un hospital y/o comunidad.

Las tasas de colonización encontradas para SARM (4.10%) y SASM (17.6%), pueden representar un riesgo para la comunidad, teniendo en cuenta que este tipo de bacterias están implicados en las infecciones por *S. aureus* (119, 120). El contacto cercano de estos pacientes con la comunidad, puede desempeñar un papel en la transmisión y propagación de estas cepas. Además pueden convertirse en un importante reservorio

y fuente para la transmisión de estos microorganismos que causan frecuentemente infecciones en la piel y tejidos blandos.

Consecuentemente en nuestro estudio el hallazgo de la leucocidina PVL (Panton-valentine leucocidin) en 6 (85.7%) de 7 aislados SARM y 12 (40%) de 30 aislados SASM de pacientes es un agravante y factor de riesgo relevante para las infecciones por *S. aureus*(121). Investigaciones recientes sugieren que la portación de los genes de la leucocidina PVL en las cepas de *S. aureus* aumenta su virulencia y es responsable de infecciones graves tales como las óseas, articulares y neumonía necrotizante(122-124). Debido al *S. aureus* "PVL positiva", adquirido en la comunidad, la neumonía necrotizante es una infección emergente (36).

En Europa, la mayoría de los casos de neumonía necrotizante se deben a cepas de SASM(124). En nuestro estudio se identificaron una cepa SASM y tres cepas SARM PVL positivas. En Colombia, varios estudios han demostrado cepas PVL-positivas de *S. aureus*, tanto SASM como SARM, como fuente importante de infecciones de diversa gravedad (125, 126), evidenciando una vez más un serio problema de salud pública en Colombia y por lo tanto una alerta sobre el riesgo potencial para la introducción de estas cepas en el entorno sanitario.

Las cepas SARM que se observaron en este estudio tuvieron diferentes tipos de *SCCmec* encontrados tanto a nivel nosocomial, como a nivel comunitario; lo cual deja ver la variedad de cepas SARM diseminadas en la comunidad. El SARM *SCCmec* tipo IV se pudo identificar mediante la PCR múltiple en 5 cepas SARM; este tipo de cepas se encuentran asociados a la comunidad. Además se encontraron dos aislamientos que portaron el *SCCmec* tipo II, el cual ha sido primordialmente asociado con al ámbito nosocomial (127), lo que demuestra evidencia de la versátil epidemiología y distribución de las cepas de *S. aureus* en la comunidad.

En cuanto a lo encontrado en los estudios de tipificación PFGE de los aislamientos SARM, se pudo evidenciar que el clon AC-SARM USA300 y su variante "USA300-LV", predominó en su mayoría con 56% (14) de las cepas *S. aureus* aisladas, seguidos de un 16% (4) y 12% (3) de los clones chileno y pediátrico respectivamente.

En 2005, Cruz, et al. (78), evaluaron 200 muestras de SARM recolectadas entre 1996 y 2003 que procedían en gran parte de centros sanitarios asistenciales de las ciudades de Bogotá y Cali (48% y 45%, respectivamente); los investigadores no identificaron cepas pertenecientes al clon pediátrico, el cual prevaleció a principios de los años 90; solo hallaron cepas correspondientes al clon chileno. Este fue el primer reporte de este clon en nuestro país, lo cual, según los autores, muestra un cambio en la población genética de SARM en el país. Álvarez, et al. (128), presentaron en el 2006 el primer reporte de AC-SARM en Colombia; posteriormente, Reyes, et al., en 2009 (74) y Álvarez, et al., en 2010 (76) reportaron el clon USA300 (CC8-ST8-SCCmecIV) como causante de infecciones nosocomiales.

Cabe resaltar, que los resultados de esta investigación relacionados con la variante del USA300 SCCmec IVc, el cual se encuentra asociado a la comunidad, pudieran indicar un desplazamiento de este tipo de SARM hacia el ambiente hospitalario, habiéndose convertido según reportes recientes; en el principal causante de infecciones de *S. aureus* asociadas al cuidado de la salud (74, 126, 129-131). Es relevante citar que estas cepas difieren del prototipo de cepas USA 300-0114 en que alojan el SCCmec IVc en lugar del IVa, compartiendo similares características con el USA300. Esta variante latinoamericana (USA300-LV), que presenta ausencia del elemento móvil catabólico de arginina (ACME) y alta prevalencia de resistencia a la tetraciclina fue recientemente descrita (82).

El alto índice de cepas con el casete cromosómico tipo IV pudiera deberse a las ventajas que este tipo de casete le proporciona a la bacteria, tales como : 1) Su tamaño pequeño, que le permite transferirse de forma más simple y tener una mayor rapidez de replicación; 2) Un número mínimo de genes de resistencia a fármacos, en

contraste con los presentados por las cepas que portan los *SCCmec* tipo I, II o III, y  
3) Una tasa de crecimiento mayor, que representa una ventaja en comparación con otras bacterias en cuanto a la colonización exitosa (132, 133).

Los clones SARM nosocomiales, como el Pediátrico (CC5-ST5-*SCCmecIV*) y Chileno/cordobés (CC5-ST5-*SCCmecI*), en relación a los clones de AC-SARM han comenzado a reemplazar las clones tradicionales de AH-SARM, como sucedió en el presente estudio de cepas SARM aisladas en la población comunitaria de pacientes, que acuden a la consulta externa del hospital local.

Este caso se puede corroborar, con estudios hechos en Estados Unidos y Taiwán, donde la prevalencia de AC-SARM es alta y recientemente, se ha descrito su presencia en aumento en el ámbito hospitalario; cepas asociadas a AC-SARM han comenzado a reemplazar las cepas tradicionales de AH-SARM(129, 134). En Colombia se han identificado estos clones hospitalarios mencionados anteriormente, principalmente en hospitales de tercer nivel en Bogotá (79).

Con respecto al complejo clonal CC8, el cual en este estudio resultó con mayor prevalencia, actualmente es el cuarto complejo clonal más común en la mayoría de países de Europa, Argentina, Canadá y especialmente los EE.UU., donde representa a la mayoría de aislamientos USA300 AC-SARM(1). También es el principal tipo según la tipificación *spa*, que se basa en la secuencia del gen que codifica la proteína de superficie conocida como Proteína A del estafilococo (135), asociado con USA300-LV, que se ha reportado en varios países fuera de América Latina, entre ellos España, Italia, Bélgica, los Países Bajos, el Reino Unido y Australia(82).

Por el contrario, el complejo clonal (CC5), asociado principalmente con el *SCC mec* tipo I, es uno de los tipos *spa* más comunes en América del Sur, incluyendo Argentina, Brasil, Chile y Paraguay, y se relaciona con el clon Chileno/Cordobés (136, 137), el cual fue encontrado con una menor prevalencia en este estudio, con relación al complejo clonal CC8 mencionado anteriormente.

Considerando la naturaleza cambiante de los clones de SARM y su importancia en la vigilancia local, es necesario hacer estudios longitudinales que describan el comportamiento en el tiempo de los clones SARM en los hospitales locales y clínicas de la ciudad, en los cuales SARM es prevalente.

Existen varios estudios a nivel de Colombia y Latinoamérica con relación a la infección y colonización nasal con *S. aureus* (80, 138-141). Sin embargo, no existen estudios específicos de colonización en pacientes con patologías nasales y su impacto en el tratamiento antibiótico a usar en la ciudad de Cartagena. Por lo tanto, resulta relevante un estudio de este tipo dirigido a optimizar el tratamiento antibiótico, frente a las múltiples patologías nasales y se tendría un control racional de estos mismos. Los cambios constantes y variables en cuanto a la epidemiología de los contagios ocasionados por *S. aureus* confirman que esta bacteria sigue siendo una importante amenaza para la salud pública humana, de allí la importancia de la vigilancia local y la difusión de los resultados, sobre todo en países en desarrollo como Colombia, donde el conocimiento de la epidemiología y la dinámica de la transferencia de *S. aureus* aún es delimitada.

## VII. CONCLUSIONES

- ✓ Las cepas SARM, las cuales se han dispersado ampliamente en la comunidad, representan un reto para la práctica clínica de rutina en el manejo de las infecciones por esta bacteria.
- ✓ En perfil de resistencia, en este estudio se observó una alta tasa de resistencia a los antibióticos penicilina (89.2%), ampicilina (86.4%) y cefalotina (72.1%). Además, 7 aislamientos (18.9%) fueron resistentes a más de 2 antibióticos.
- ✓ No se evidenciaron cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina en este estudio. Por consiguiente, el personal de salud de ORL del Hospital Universitario del Caribe debe tener siempre la precaución con el uso razonable del antibiótico vancomicina en el tratamiento de patologías nasales, con el fin de evitar a nivel local la emergencia de cepas vancomicina resistentes de *S. aureus*.
- ✓ Los aislamientos de *S. aureus* con fenotipo meticilino resistente (resistencia a cefoxitina y oxacilina) demostraron la presencia del gen *mecA* mediante el ensayo de PCR múltiple usado, con una correlación cercana al 100%.
- ✓ Consecuentemente en nuestro estudio el hallazgo de la leucocidina PVL (Panton-valentine leucocidin) en 6 (85.7%) de 7 aislados SARM y 12 (40%) de 30 aislados SASM de pacientes es un agravante y factor de riesgo relevante para las infecciones por *S. aureus*
- ✓ Las tasas de colonización en el estudio de SARM (4.10%) y SASM (17.6%) respectivamente, pueden representar un riesgo para la comunidad, teniendo en cuenta que este tipo de bacterias están implicados en las infecciones por *S. aureus*.

- ✓ Cepas de SARM pertenecientes al CC8 y que portan *SCCmec* tipo IVc, una variante del clon USA300, son cada vez más predominantes en los hospitales de nuestro medio, desplazando a los clones previamente reportados del tipo CC5 HA-SARM.
- ✓ Las cepas SARM que se observaron en este estudio tuvieron diferentes tipos de *SCCmec* encontrados tanto a nivel nosocomial, como a nivel comunitario; lo cual deja ver la variedad de cepas SARM diseminadas en ambos ámbitos.
- ✓ Los clones SARM nosocomiales como el Pediátrico (CC5-ST5-*SCCmec*IV) y Chileno/cordobés (CC5-ST5-*SCCmec*I), en relación a los clones de AC-SARM han comenzado a reemplazar los clones tradicionales de AH-SARM

## **Recomendaciones**

La combinación de diferentes metodologías de tipificación molecular como la MLST, la tipificación PFGE, *spa*, y del *SCCmec*, otorgan un alto poder de discriminación, por lo cual pueden ayudar a alcanzar una mejor comprensión del comportamiento de las cepas SARM y la dinámica de las infecciones causadas por esta bacteria en un área geográfica determinada.

## VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se enmarcó dentro del proyecto financiado por la Universidad de Cartagena, titulado “*Prevalencia del Staphylococcus aureus* meticilino resistente en pacientes con enfermedad nasal de consulta al servicio de ORL del Hospital Universitario del Caribe”, aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Cartagena. En todos los casos incluidos en el estudio se mantuvo la confidencialidad de la identidad de los pacientes, que solo fueron utilizados para la elaboración de la tabla maestra y no serán divulgados en los resultados de los estudios.

Este estudio fue previamente evaluado por los Comités de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena y del Hospital Universitario del Caribe y los pacientes firmaron un consentimiento informado. En este procedimiento se tomaron muestras en fosas nasales, lo cual no implicó un gasto extra ni para la institución ni para el paciente, ya que se utilizaron los recursos adjudicados por la Universidad de Cartagena para su ejecución. Los riesgos para el paciente se consideran mínimos, de acuerdo a la resolución 8430 de 1993.



Universidad  
de Cartagena  
Fundada en 1827

## EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

### HACE CONSTAR:

Que, el proyecto titulado "PREVALENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE EN PACIENTES CON ENFERMEDAD NASAL DE CONSULTA AL SERVICIO DE ORL DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL CARIBE", presentado por ROSA ISABEL MILANÉS PÉREZ, docente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, no presenta impedimentos éticos, de acuerdo a lo contemplado en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y en el Reglamento de Ética de la Universidad de Cartagena, tal como consta en el Acta N° 52 del Comité de Ética en Investigaciones del día 28 de junio de 2012.

Para constancia se firma en la Ciudad de Cartagena, a los veintinueve (29) días del mes de noviembre del año dos mil trece (2013).

ALVARO OLIVERA DÍAZ, MD  
Presidente

*Mapa Marketing*



Vicerrectoría de Investigaciones  
Centro – Cra. 4 No. 38-40, Claustro de la Merced Telefax: 6642663  
E-mail: [investigaciones@unicartagena.edu.co](mailto:investigaciones@unicartagena.edu.co) web: [www.unicartagena.edu.co](http://www.unicartagena.edu.co)  
Cartagena de Indias, D.T. y C. – Colombia

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution*. 2008;8(6):747-63.
2. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. 2010;375(9725):1557-68.
3. De Sousa MA, Sanches IS, Ferro M, Vaz M, Saraiva Z, Tendeiro T, et al. Intercontinental Spread of a Multidrug-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(9):2590-6.
4. Shopsin B, Mathema B, Zhao X, Martinez J, Kornblum J, Kreiswirth B. Resistance rather than virulence selects for the clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for MRSA transmission. *Microbial Drug Resistance*. 2000;6(3):239-44.
5. Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *International journal of antimicrobial agents*. 2009;34(4):304-8.
6. Pérez A, Dennis RJ, Rodríguez B, Castro AY, Delgado V, Lozano JM, et al. An interrupted time series analysis of parenteral antibiotic use in Colombia. *Journal of clinical epidemiology*. 2003;56(10):1013-20.
7. GALVIS CE, MARIÑO AC, MONROY J, POSSO H. The impact of an antibiotic restriction policy in the intensive care unit at the hospital militar central. *Revista Med*. 2008;16(1):19-24.
8. Saavedra C, Eslava J, Cuervo S, Quemba J, Cardona G. Correlación entre la disminución en el uso de cefalosporinas de tercera generación y la disminución de la resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. *Infectio*. 2002;6(2):96.
9. GIL D de M M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilina. *Revista chilena de infectología*. 2000;17:145-52.
10. Walsh TR, Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Reviews in Microbiology*. 2002;56(1):657-75.
11. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 1961;14(4):385.
12. Rodríguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010;14:87-96.
13. Zurita J, Mejia C, Guzman-Blanco M. [Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America]. *Revista chilena de infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*. 2010;27:S70-80.
14. Edition AS-E. CLSI document M07-A8. CLSI; 2009.
15. Andrews J. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(2):256-78.
16. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(6):1000-18.
17. Milne LM, Curtis G, Crow M, Kraak W, Selkon J. Comparison of culture media for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 1987;40(10):1178-81.
18. Mouton R, Mulders ST, De Knijff J, Hermans J. Comparison of test systems for recognition of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1989;8(11):968-73.

19. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;23(5):389-92.
20. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen A, Frimodt-Møller N, Olsson-Liljequist B, et al. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(2):204-7.
21. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(8):2766-71.
22. Mougeot C, Guillaumat-Tailliet J, Libert J. *Staphylococcus aureus*: nouvelle détection de la résistance intrinsèque par la méthode de diffusion. *Pathologie Biologie*. 2001;49(3):199-204.
23. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*. 1998;29(2):527-43.
24. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(4):781-91.
25. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(5):1323-36.
26. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet*. 2006;368(9538):874-85.
27. De Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Current opinion in microbiology*. 2007;10(5):428-35.
28. Donnio P-Y, Février F, Bifani P, Dehem M, Kervégant C, Wilhelm N, et al. Molecular and epidemiological evidence for spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(12):4342-50.
29. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(10):5026-33.
30. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(7):2637-51.
31. Nour M, Mastouri M, Ben NM. [Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: emergence and molecular basis]. *Pathologie-biologie*. 2005;53(6):334-40.
32. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(1):264-74.
33. Elements IWGotCoSCC. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(12):4961-7.
34. Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørup M, et al. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(6):3046-50.
35. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(1):42-8.

36. Zetola N, Francis JS, Nuernberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(5):275-86.
37. Jiménez Quiceno JN, Correa Ochoa MM. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *Iatreia*. 2009;22(2):Pág. 147-58.
38. Aires de Sousa M, Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2004;40(2):101-11.
39. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama*. 2003;290(22):2976-84.
40. Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS, Terrell BJ, McDougal LK, Tenover FC, et al. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(2):159-66.
41. Lu P-L, Chin L-C, Peng C-F, Chiang Y-H, Chen T-P, Ma L, et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(1):132-9.
42. Udo E, Pearman J, Grubb W. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *Journal of Hospital Infection*. 1993;25(2):97-108.
43. Control CfD, Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 1999;48(32):707.
44. McClure J-A, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(3):1141-4.
45. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infectious Diseases*. 1993;17(2):153-62.
46. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(2):323.
47. Preheim L, Pitcher D, Owen R, Cookson B. Typing of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* strains by ribosomal RNA gene restriction patterns using a biotinylated probe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1991;10(5):428-36.
48. Strandén A, Frei R, Widmer A. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis? *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(7):3181-6.
49. Quelle LS, Corso A, Galas M, Sordelli DO. STAR gene restriction profile analysis in epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: description of the new method and comparison with other polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2003;47(3):455-64.
50. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(7):2155-61.
51. Shopsin B, Gomez M, Montgomery S, Smith D, Waddington M, Dodge D, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(11):3556-63.

52. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6):3140-5.
53. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, De Ryck R, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(6):1830-7.
54. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(9):2233.
55. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(11):5113-20.
56. Jevons M. Celbernin-resistant staphylococci. *BMJ*, i. 1961:308-11.
57. Jevons MP, Coe A, Parker M. Methicillin resistance in staphylococci. *The Lancet*. 1963;281(7287):904-7.
58. Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug resistance updates*. 1998;1(2):135-50.
59. Control CfD, Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2002;51(26):565.
60. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(9):629-41.
61. Ayliffe G. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;24(Supplement 1):S74-S9.
62. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and-resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(17):9865-70.
63. Robinson D, Enright M. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection*. 2004;10(2):92-7.
64. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital-and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current molecular medicine*. 2009;9(2):100-15.
65. Denis O, Deplano A, Nonhoff C, De Ryck R, De Mendonça R, Rottiers S, et al. National surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(9):3625-9.
66. Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(9):2912-7.
67. Musser JM, Kapur V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(8):2058-63.
68. Potel C, Alvarez M, Alvarez P, Otero I, Fluiters E. Evolution, antimicrobial susceptibility and assignment to international clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 9-year period in two Spanish hospitals. *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(7):728-30.
69. Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Jones RN. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of

chromosomal DNA. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 1994;15(5):320-3.

70. De Sousa MA, Miragaia M, Sanches IS, Ávila S, Adamson I, Casagrande ST, et al. Three-Year Assessment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Latin America from 1996 to 1998. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(6):2197-205.

71. Velazquez-Meza M, De Sousa MA, Echaniz-Aviles G, Solorzano-Santos F, Miranda-Novales G, Silva-Sanchez J, et al. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3877-80.

72. Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, et al. Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(6).

73. Sola C, Gribaudo G, Vindel A, Patrino L, Bocco JL. Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(4):1427-35.

74. Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, et al. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(12):1861-77.

75. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(12):3926-34.

76. Alvarez CA, Yomayusa N, Leal AL, Moreno J, Mendez-Alvarez S, Ibañez M, et al. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *American Journal of Infection Control*. 2010;38(4):315-8.

77. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(10):3457-9.

78. Cruz C, Moreno J, Renzoni A, Hidalgo M, Reyes J, Schrenzel J, et al. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Colombian hospitals over 7 years (1996–2003): emergence of a new dominant clone. *International journal of antimicrobial agents*. 2005;26(6):457-62.

79. Gomes A, Santos Sanches I, Aires de Sousa M, Castaneda E, De Lencastre H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microbial Drug Resistance*. 2001;7(1):23-32.

80. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(7):e560-e6.

81. Escobar JA, Gómez IT, Murillo MJ, Castro BE, Chavarro B, Márquez RA, et al. Diseño de dos metodologías moleculares para la rápida identificación de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina asociados a la comunidad en Colombia. *Biomédica*. 2012;32(2):214-23.

82. Nimmo G. USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(8):725-34.

83. Weir SK, Fram J, Berg G, Kabbani D, Strymish J, Tang M, et al. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients Newly Identified as Nasal Carriers. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(10):3283-6.

84. Mayor L, Ortellado J, Menacho C, Lird G, Courtier C, Gardon C, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asuncion, Paraguay. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(7):2298-300.

85. Sola C, Saka HA, Vindel A, Bocco JL. Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Pantón-Valentine leucocidin-positive *Staphylococcus aureus* clone sharing the

- sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(5):1826-31.
86. Corso A, Sanches IS, De Sousa MA, Rossi A, De Lencastre H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Microbial drug resistance*. 1998;4(4):277-88.
  87. Master RN, Deane J, Opiela C, Sahm DF. Recent trends in resistance to cell envelope-active antibacterial agents among key bacterial pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1277(1):1-7.
  88. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *Am Soc Microbiol* <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>(Accessed 24 July 2012). 2009.
  89. Maltezou HC, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;27(2):87-96.
  90. Otter J, French G. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*. 2011;79(3):189-93.
  91. Dong L, Zhou X-C, Chen X-F, Yang J-H, Lin J, Zhang H-L, et al. [Detection of etiologic agents and antibiotic resistance in children with acute lower respiratory tract infection in Wenzhou City]. *Zhongguo dang dai er ke za zhi= Chinese journal of contemporary pediatrics*. 2006;8(5):369-72.
  92. Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(19):10886-91.
  93. Fan X, Liu Y, Smith D, Konermann L, Siu KM, Golemi-Kotra D. Diversity of Penicillin-binding Proteins RESISTANCE FACTOR FmtA OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS. *Journal of biological chemistry*. 2007;282(48):35143-52.
  94. Diekema D, Pfaller M, Schmitz F, Smayevsky J, Bell J, Jones R, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;32(Supplement 2):S114-S32.
  95. Holmes RL, Jorgensen JH. Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(2):757-60.
  96. Huang H, Flynn NM, King JH, Monchaud C, Morita M, Cohen SH. Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MSRA infections in Sacramento, California. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(7):2423-7.
  97. Freitas F, Guedes-Stehling E, Siqueira-Junior J. Resistance to gentamicin and related aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* isolated in Brazil. *Letters in applied microbiology*. 1999;29(3):197-201.
  98. Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*. 1993;57(1):138.
  99. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiological reviews*. 1987;51(1):88.
  100. Onwubiko NE, Sadiq NM. Antibiotic sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* from clinical isolates in a tertiary health institution in Kano, Northwestern Nigeria. *Pan African Medical Journal*. 2011;8(1).

101. Steinkraus G, White R, Friedrich L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001–05. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;60(4):788-94.
102. Gobernado M. Resistencia en *Staphylococcus aureus*. Ahora a la vancomicina. *Rev Esp Quimioter*. 2002;15(3).
103. Control CfD, Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2002;51(40):902.
104. Park K-H, Kim ES, Kim HS, Park S-J, Bang KM, Park HJ, et al. Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteraemia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(8):1843-9.
105. Mamani E, Luján D, Pajuelo G, editors. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*: Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. *Anales de la Facultad de Medicina*; 2006: UNMSM. Facultad de Medicina.
106. Fiebelkorn K, Crawford S, McElmeel M, Jorgensen J. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(10):4740-4.
107. Patel M, Waites KB, Moser SA, Cloud GA, Hoesley CJ. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(7):2481-4.
108. Chavez-Bueno S, Bozdogan B, Katz K, Bowlware KL, Cushion N, Cavuoti D, et al. Inducible clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(6):2283-8.
109. Cheng H, Yuan W, Zeng F, Hu Q, Shang W, Tang D, et al. Molecular and phenotypic evidence for the spread of three major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones associated with two characteristic antimicrobial resistance profiles in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(11):2453-7.
110. Karlowsky JA, Adam HJ, Desjardins M, Lagacé-Wiens PR, Hoban DJ, Zhanel GG, et al. Changes in fluoroquinolone resistance over 5 years (CANWARD 2007–11) in bacterial pathogens isolated in Canadian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(suppl 1):i39-i46.
111. GENERAL IA. *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE. 2004.
112. Pannone DR, Cabrera S, Sosa L. FÁRMACOS EN EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA.
113. Aubry-Damon H, Legrand P, Brun-Buisson C, Astier A, Soussy C-J, Leclercq R. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. *Clinical infectious diseases*. 1997;25(3):647-53.
114. Delaney H, Wang E, Melish M. Comprehensive strategy including prophylactic mupirocin to reduce *Staphylococcus aureus* colonization and infection in high-risk neonates. *Journal of Perinatology*. 2013;33(4):313-8.
115. Gadepalli R, Dhawan B, Mohanty S, Kapil A, Das BK, Chaudhry R, et al. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* in an Indian hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2007;58(1):125-7.
116. Park S-H, Kim S-Y, Lee J-H, Park C, Lee D-G. Community-genotype strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level mupirocin resistance in a neonatal intensive care unit. *Early human development*. 2013;89(9):661-5.
117. Fujimura S, Watanabe A. Survey of high-and low-level mupirocin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 15 Japanese hospitals. *Chemotherapy*. 2003;49(1-2):36-8.

118. Simor AE, Stuart TL, Louie L, Watt C, Ofner-Agostini M, Gravel D, et al. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Canadian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(11):3880-6.
119. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 2007;315(5815):1130-3.
120. Adler A, Temper V, Block CS, Abramson N, Moses AE. Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1789-90.
121. Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D, Miklaševics E. Patients with Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. *International journal of molecular epidemiology and genetics*. 2012;3(1):48.
122. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin—producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 1999;29(5):1128-32.
123. Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO, Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics*. 2006;117(2):433-40.
124. Gillet Y, Vanhems P, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Floret D, et al. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(3):315-21.
125. Jiménez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodríguez EA, Garcés CG, Patiño LA, et al. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(8):980-5.
126. Alvarez-Olmos MI, Enríquez SP, Pérez-Roth E, Méndez-Alvarez S, Escobar J, Vanegas N, et al. Pediatric cases from Colombia caused by a Panton-Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8-SCCmecIVc clone. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009;28(10):935.
127. Qi W, Ender M, O'Brien F, Imhof A, Ruef C, McCallum N, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zürich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(10):5164-70.
128. Alvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincón S, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(12):2000.
129. Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(6):787-94.
130. Donnio P-Y, Preney L, Gautier-Lerestif A-L, Avril J-L, Lafforgue N. Changes in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over an 11 year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(5):808-13.
131. Denis O, Deplano A, De Ryck R, Nonhoff C, Struelens MJ. Emergence and spread of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals. *Microbial drug resistance*. 2003;9(1):61-71.
132. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(11):4289-94.

133. MC D'Agata E, Webb GF, Horn MA, Moellering RC, Ruan S. Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into hospitals. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48(3):274-84.
134. Huang Y, Tseng S, Hu J, Tsai J, Hsueh P, Teng L. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(7):717-24.
135. Majeed Z, Arafat Y, Ajab Z, Akbar Malik S, Shehzad Abbasi W, Ajab H. Caracterización genotípica de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina prevalente en hospitales de Pakistán. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2012;46(2):257-70.
136. Becker A, Santos O, Castrucci F, Dias C, D'AZEVEDO PA. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil. *Epidemiology and infection*. 2012;140(08):1372-5.
137. Arias CA, Rincon S, Chowdhury S, Martínez E, Coronell W, Reyes J, et al. MRSA USA300 clone and VREF—a US–Colombian connection? *New England Journal of Medicine*. 2008;359(20):2177-9.
138. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(7):666-74.
139. Chua K, Laurent F, Coombs G, Grayson ML, Howden BP. Not community-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A clinician's guide to community MRSA-Its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(1):99-114.
140. Briles DE, Novak L, Hotomi M, van Ginkel FW, King J. Nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. *Infection and immunity*. 2005;73(10):6945-51.
141. Rebollo-Pérez J, Ordoñez-Tapia C, Herazo-Herazo C, Reyes-Ramos N. Nasal carriage of Pantón Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. *Revista de Salud Pública*. 2011;13(5):824-32.