

T

1149

123983

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DE  
FACTORES DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Staphylococcus  
aureus* AISLADAS EN LA COMUNIDAD MEXICANA.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**P R E S E N T A:**

M. en B. Aída Hamdan Partida

**COMITÉ TUTORIAL**

**CODIRECTORES:**

**DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES.**

**DR. JAIME AMADEO BUSTOS MARTÍNEZ**

**ASESOR:**

**DR. HUGO CÉSAR RAMÍREZ SAAD.**

México, D.F.

Enero, 2011.

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

La realización de esta tesis se logró con el apoyo económico del acuerdo 12/2008 del rector General de la Universidad Autónoma Metropolitana con el proyecto Estudio de factores de virulencia de dos agentes patógenos de importancia para la Salud Pública: *S. aureus* y *Proteus mirabilis* y con la beca No. 103369 otorgada por CONACyt a la M. en B. Aída Hamdan Partida con matrícula 206383806.

El Jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presentó:

**M. EN B. AIDA HAMDAN PARTIDA**

Matrícula: 206383806

El día 28 de enero del año 2011.

**Sinodales:**

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes (Presidente)



Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez (Secretario)



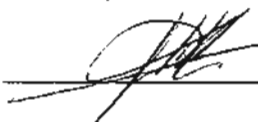
Dr. Hugo César Ramírez Saad (Vocal)



Dra. María Elena Velázquez Meza (Vocal)



Dr. Jorge Mateo Villaseca Flores (Vocal)



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Departamento de Atención a la Salud y en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos, de la Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de la Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes y del Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez y la asesoría del Dr. Hugo César Ramírez Saad.

Al posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud por las facilidades otorgadas durante la realización del Doctorado y por la oportunidad de presentar este proyecto.

## COMITÉ TUTORIAL

### CODIRECTORES DE TESIS

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes.

Profesor Titular "C", de Tiempo Completo del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

Profesor Titular "C", de Tiempo Completo del Departamento de Atención a la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana

### ASESOR

Dr. Hugo César Ramírez Saad.

Profesor Titular "C", de Tiempo Completo. Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana

### SINODALES

Dra. María Elena Velázquez Meza

Investigador en Ciencias Médicas D. Departamento de Evaluación de Vacunas. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública. México

Dr. Jorge Mateo Villaseca Flores.

Profesor Asociado "C" de Tiempo Completo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

## **Dedicatorias.**

***A mis hijas Anaid y Karime: Gracias por compartir conmigo y alentarme en este trabajo, son parte el motivo de mi vida.***

***A mi esposo: Por estar a mi lado en todo momento, por ayudarme continuamente para la realización de esta meta y todos mis proyectos de vida.***

***A mi madre, a mi tía Luz María, a mis hermanos Miriam, Cecilia y Adolfo, por su aliento para continuar y por sus bendiciones.***

***A mis sobrinos Omar y Alan, por permitirme ver la vida con otros puntos de vista.***

***A mis primas Hamdan y Partida; por su aliento y sus bendiciones.***

***A todas mis amigas: Cristy, Elena, Lucero, Irene, Ariadne y sobre todo a Horte y Kary, por su ayuda incondicional a lo largo de estos años.***

***A la memoria de mis amados abuelos (Filomena y Said) y de mi querida tía Chela, que en gran medida contribuyeron a formaron al ser que ahora soy.***

***A todos mis amigos que caminaron conmigo alguna senda en el camino de la vida.***

***A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta tesis.***

***A la vida misma.***



## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes, por la acertada dirección y apoyo brindado por la realización de esta tesis y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez, por su invaluable guía y consejos impartidos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Hugo César Ramírez Saad por su apoyo, consejos y comentarios a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Reyna Fierro, Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud, por su profesionalismo, comprensión y sensibilidad, importantes cualidades para desempeñar una excelente labor.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Ma. Elena Velázquez Meza, por valiosas recomendaciones y contribución al presente trabajo.

Dr. Jorge M: Villaseca Flores, les agradezco sus valiosos comentarios y aportaciones al presente trabajo.

Quiero agradecer a todos y cada uno de mis alumnos que participaron para la realización de esta tesis. A Rocío Martínez, Carmen Galicia, Francisco Miranda, Oscar Torres, Gabriela Ramírez, Osmin Pérez, Isacc Arteaga, Lucero Bautista; sin su ayuda no hubiera sido posible.

Agradezco a amigos y compañeros que me animaron a Rina, Paty Martínez, Alejandro Azaola, Esteban, Lino, Paty Bustamantes, Laura Castrillón, Lolita Gavaldón y a todas aquellas personas que por el momento se escapan de mi memoria.

A todas las personas que contribuyeron con su trabajo de manera directa o indirecta: Norma Paredes, Mary Corrales y Lupita.

## **Me encanta Dios.**

Me encanta Dios. Es un viejo magnífico que no se toma en serio. A él le gusta jugar y juega, y a veces se le pasa la mano y nos rompe una pierna o nos aplasta definitivamente. Pero esto sucede porque es un poco cegatón y bastante torpe con las manos.

Nos ha enviado a algunos tipos excepcionales como Buda, o Cristo, o Mahoma, o mi tía Chofi, para que nos digan que nos portemos bien. Pero esto a él no le preocupa mucho: nos conoce. Sabe que el pez grande se traga al chico, que la lagartija grande se traga a la pequeña, que el hombre se traga al hombre. Y por eso inventó la muerte: para que la vida —no tú ni yo— la vida, sea para siempre.

Ahora los científicos salen con su teoría del Big Bang. Pero ¿que importa si el universo se expande interminablemente o se contrae? Esto es asunto sólo para agencias de viajes.

A mí me encanta Dios. Ha puesto orden en las galaxias y distribuye bien el tránsito en el camino de las hormigas. Y es tan juguetón y travieso que el otro día descubrí que ha hecho —frente al ataque de los antibióticos— ¡bacterias mutantes!

Viejo sabio o niño explorador, cuando deja de jugar con sus soldaditos de plomo de carne y hueso, hace campos de flores o pinta el cielo de manera increíble.

Mueve una mano y hace el mar, y mueve la otra y hace el bosque. Y cuando pasa por encima de nosotros, quedan las nubes, pedazos de su aliento.

Dicen que a veces se enfurece y hace terremotos, y manda tormentas, caudales de fuego, vientos desatados, aguas alevosas, castigos y desastres. Pero esto es mentira. Es la tierra que cambia —y se agita y crece— cuando Dios se aleja.

Dios siempre está de buen humor. Por eso es el preferido de mis padres, el escogido de mis hijos, el más cercano de mis hermanos, la mujer más amada, el perrito y la pulga, la piedra más antigua, el pétalo más tierno, el aroma más dulce, la noche insondable, el borboteo de luz, el manantial que soy.

A mí me gusta, a mí me encanta Dios. Que Dios bendiga a Dios.

**JAIME SABINES**

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 3  |
| INTRODUCCION.....  | 5  |
| ANTECEDENTES.....  | 6  |
| Características microbiológicas.....   | 6  |
| <i>S. aureus</i> organismo comensal o patógeno en el humano.....                   | 8  |
| Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .....                                   | 9  |
| Enzimas extracelulares.....  | 16 |
| Sistema Regulatorio "quorum sensing".....  | 18 |
| Resistencia Antimicrobiana.....  | 19 |
| Resistencia a meticilina.....  | 21 |
| Estructura del casete cromosomal estafilocócico <i>mec</i> ( <i>SCCmec</i> ).....  | 21 |
| Evolución de <i>S. aureus</i> .....  | 30 |
| Resistencia a vancomicina.....   | 33 |
| Portadores sanos de <i>S. aureus</i> .....   | 34 |
| Tipificación molecular de <i>S. aureus</i> .....                                   | 35 |
| Electroforesis en campos pulsados (PFGE).....                                      | 38 |
| Criterios para la interpretación de los patrones de PFGE de acuerdo a Tenover..... | 39 |
| HIPOTESIS.....   | 42 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....  | 42 |
| OBJETIVO GENERAL.....  | 44 |
| Objetivos Específicos.....   | 44 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 45 |
| Población de estudio.....  | 45 |
| Cepas de Colección.....  | 45 |
| Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .....                               | 46 |
| Pruebas Bioquímicas.....   | 46 |
| Prueba de coagulasa.....   | 46 |
| Prueba de catalasa.....  | 47 |
| Identificación de estafilococos mediante galerías API Staph System.....            | 47 |
| Determinación de patrones de resistencia a los antibióticos.....                   | 48 |
| Identificación de cepas MRSA.....  | 48 |
| Susceptibilidad antimicrobiana.....  | 48 |
| Método de Kirby-Bauer.....   | 48 |
| Método de Cribado (screening en placa en agar sal-oxacilina).....                  | 49 |
| Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....                    | 49 |
| Extracción de DNA Genómico.....  | 50 |
| Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa.....                   | 50 |
| Detección de genes por PCR.....  | 51 |
| Detección del gen <i>nucA</i> por PCR.....   | 51 |
| Detección del gen <i>mecA</i> por PCR.....   | 52 |
| Detección del gen de la exotoxina Leucocidina Pantón-Valentine por PCR.....        | 54 |
| Identificación y Genotipificación del elemento <i>SSCmec</i> .....                 | 55 |
| Análisis de los patrones de PFGE.....  | 59 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 60 |

|  |    |
|--|----|
| Portadores de <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 60 |
| Susceptibilidad antimicrobiana.....  | 62 |
| Identificación de Cepas MRSA.....  | 63 |
| Concentración inhibitoria mínima (CIM) para oxacilina.....   | 63 |
| Portadores de cepas MRSA.....  | 65 |
| Identificación del gen <i>mecA</i> .....   | 67 |
| Tipificación del casete cromosomal SCC <i>mec</i> , de las cepas de MRSA aisladas de la comunidad.....   | 69 |
| Tipificación molecular de cepas MRSA aisladas de la comunidad.....   | 73 |
| Tipificación molecular de cepas MRSA aisladas de nariz y faringe del mismo portador.....   | 76 |
| Tipificación molecular de las cepas <i>S. aureus</i> MRSA aisladas de portadores exclusivos de nariz o de faringe.....                           | 78 |
| Tipificación molecular de cepas de <i>S. aureus</i> sensibles a la meticilina (MSSA), aisladas de la comunidad.....                              | 80 |
| Tipificación molecular de cepas de <i>S. aureus</i> sensible a la meticilina (MSSA) aisladas de la nariz y de la faringe del mismo portador..... | 83 |
| Estudio de la persistencia cepas <i>S. aureus</i> en la faringe.....   | 86 |
| Detección del gen de la exotoxina Leucocidina Pantón-Valentine en las cepas MRSA.....  | 87 |
| CONCLUSIONES.....  | 90 |
| LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....  | 91 |
| PERSPECTIVAS.....  | 91 |
| BIBLIOGRAFIA.....  | 93 |

## RESUMEN.

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que ha adquirido relevancia médica al paso del tiempo a causa de sus características particulares de virulencia y resistencia a los antibióticos. En los humanos causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas como infecciones cutáneas, septicemia, neumonía e intoxicación alimentaria. El principal impacto de este microorganismo se debe a las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), que tradicionalmente se encontraban limitadas al ámbito hospitalario. Sin embargo, en años recientes las cepas MRSA, también se han encontrado en comunidades y se ha ido incrementando sustancialmente su incidencia. Los portadores sanos de cepas de *Staphylococcus aureus* tiene un papel importante en la diseminación de esta bacteria. Se investigó la presencia de *S. aureus* en las fosas nasales y la faringe de 1243 voluntarios en una comunidad mexicana sana. El porcentaje de portadores sanos fue del 59.8%. Se encontró que la colonización de la faringe es más frecuente que la de nariz (46.5% frente a 37.1%,  $P < 0,0001$ ). De los portadores de *S. aureus*, 22.2% fueron portadores exclusivos nasales y el 38% portadores exclusivos de la faringe. Se aislaron 1039 cepas, de las cuales el 12.6% fueron resistentes a la meticilina (MRSA). De las cepas MRSA, el 32.1% se aislaron de portadores exclusivos de faringe. La mayoría de las cepas aisladas de las narinas anteriores y la faringe del mismo portadores fueron idénticas o similares. Sin embargo, algunas cepas fueron diferentes. Al analizar los patrones genómicos de las cepas MRSA aisladas de los portadores exclusivos nasales o faríngeos por electroforesis de campos pulsados (PFGE), se encontró que las cepas nasales y faríngeas se agrupan en diferentes grupos. También se realizó un estudio prospectivo durante 6 años para investigar la persistencia de *S. aureus* en la faringe. Los resultados mostraron que el 13% de los sujetos fueron portadores persistentes. La mayoría de ellos fueron colonizados con la misma clona de *S. aureus* en todo el tiempo del estudio, y sólo tres presentaron diferentes clonas. Este estudio demuestra que *S. aureus* coloniza con regularidad la faringe de

personas sanas, donde puede persistir durante años. Se aislaron 131 cepas de MRSA en una población mexicana sana. El SCCmec tipo IV fue el casete cromosomal más comúnmente encontrado (69.06 % de los aislados), seguido del SCCmec tipo II (20.1%), el SCCmec tipo V (2.1% de los aislados) y el SCCmec tipo III (0.76%) no se encontraron aislados del SCCmec tipo I. El 8.6% de los aislados no se pudo tipificar. Se detectó que 31 cepas de *S. aureus* (23.66%) presentan el gen de la leucocidina Pantón-Valentine.

Así mismo encontró que 29 cepas MRSA (22.13%), que previamente habían sido tipificadas como cepas con SCCmec tipo IV y SCCmec tipo V, presentaban el gen de la toxina leucocidina Pantón-Valentine (PVL). Se determinó que cepas CA-MRSA se encuentran circulando en la población mexicana sana.

## INTRODUCCION.

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo versátil con diversos factores de virulencia y mecanismos de resistencia a los antibióticos. Aunque tradicionalmente este microorganismo estaba limitado a un ámbito hospitalario, en la actualidad la colonización de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) está aumentando rápidamente en la comunidad y, por lo tanto, son un problema de salud importante en todo el mundo. Este microorganismo es una de las bacterias patógenas que más frecuentemente está involucrado en la etiología de diversas infecciones en los seres humanos incluyendo osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica y septicemia.

La introducción de técnicas de tipificación molecular dentro de las investigaciones epidemiológicas ha provisto de nuevas herramientas para conocer el origen y las vías de diseminación de este microorganismo. Una de las conclusiones importantes que ha surgido de este tipo de estudios es que un número pequeño de clonas son las responsables de las infecciones estafilocócicas en todo el mundo.

La electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés), es el método más confiable para la tipificación molecular y el estudio de la epidemiología local y global de los MRSA, lo que contribuye a definir las rutas de transmisión y controlar la diseminación de resistencia entre estafilococos, así como identificar infecciones nosocomiales y comunitarias.

De ahí la importancia de realizar este tipo de estudios moleculares en nuestro país ya que aquí casi no se conoce la epidemiología molecular de este microorganismo, se conoce poco de sobre todo en población mexicana abierta y sana.

## ANTECEDENTES

### Características microbiológicas.

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo de gran importancia médica, se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano desde hace muchos años. Forma parte de la familia *Micrococcaceae* (Howe, 1996). Constituida también por los géneros *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomacoccus*. El género *Staphylococcus* se compone de 33 especies, de las que sólo 6 son importantes en el campo de la salud pública: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* y *S. schleiferi*. Cabe mencionar que de éstas, sólo *S. aureus* es coagulasa positiva, en tanto que las restantes integran el grupo de los estafilococos coagulasa negativa (Martins y Cunha, 2007). Los estafilococos son cocos Gram positivos, de 0.8 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se presentan aislados, en pares, tétradas o cadenas cortas y en grupos irregulares o racimos, no móviles, no esporulados, anaerobio facultativo, fermentadores de glucosa y otros carbohidratos como el manitol, las colonias produce pigmentos carotenoides (Figura 1).

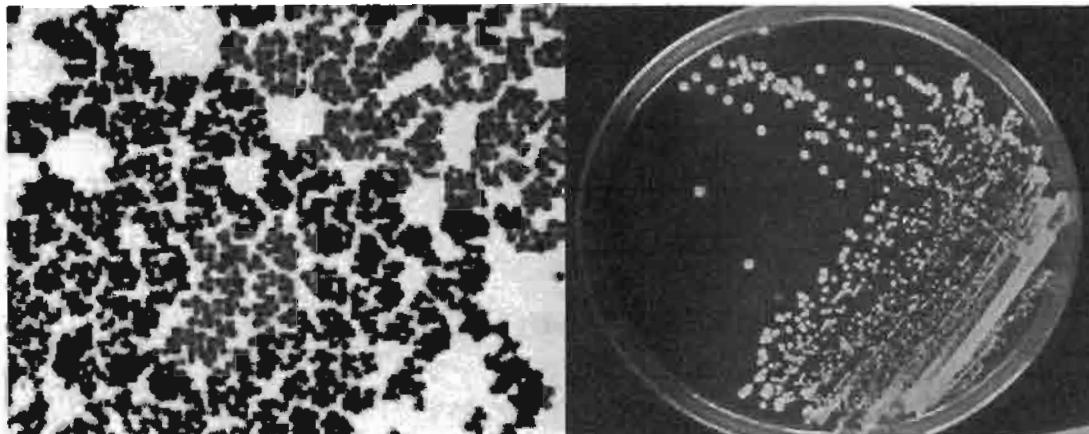


Figura 1. Morfología celular y colonial de *Staphylococcus aureus*  
[www.unpisi.it/images/staffilococco.jpg](http://www.unpisi.it/images/staffilococco.jpg).



*S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una gran cantidad de infecciones: 1) produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios; 2) causa infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis; 3) es causante de infecciones respiratorias como neumonía; 4) es la principal causa de infecciones nosocomiales; 5) causa intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos; 6) produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo; 7) también causa septicemia, impétigo y fiebres (Shopsin y Kreiswirth, 2001).

Estos microorganismos se identifican mediante las siguientes pruebas bioquímicas:

**1)** Prueba de la catalasa, es utilizada para diferenciar los estafilococos que presentan la enzima catalasa del género *Streptococcus* que son catalasa negativa. Esta prueba detecta la presencia de citocromo oxidasa en los estafilococos debido a que poseen la enzima catalasa.

**2)** La prueba de la coagulasa, es el principal criterio usado para identificar *S. aureus* ya que es la única especie que da positiva a esta prueba; sin embargo, algunas cepas de *S. aureus* no producen esta enzima en niveles detectables. Todas las cepas de este microorganismo poseen el gen de la coagulasa (*coa*), sin embargo, algunas cepas de *S. aureus* no producen esta enzima en niveles detectables (Fischetti y col. 2006).

**3)** Fermentación del manitol, *S. aureus* a diferencia de *S. epidermidis* y otras especies coagulasa negativas, es capaz de fermentar el manitol; el medio utilizado es agar sal y manitol, que es selectivo para estafilococos, *S. aureus* se detecta por la presencia de un halo amarillo alrededor de las colonias, lo que indica la producción de ácido a partir del manitol. Pero no es la única especie de estafilococos que pueden fermentar manitol.

Las cepas de *S. aureus* dan positivas, además, las siguientes reacciones:  $\beta$ -glucosidasa, arginina descarboxilasa, N-acetilglucosamina, acetoina, reducción de nitratos, ureasa y resistencia a la polimixina B (disco 300 U) (Kloos y Bannerman,

1995). Poseen igualmente una desoxirribonucleasa o DNasa, una nucleasa exocelular que despolimeriza el ADN. A esta enzima se la denomina termonucleasa por ser termoresistente en las cepas de *S. aureus*.

### ***S. aureus* organismo comensal o patógeno en el humano.**

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo cuyo potencial patogénico es bien conocido, como también lo es su importancia en las infecciones extrahospitalarias y en las hospitalarias, se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. Es parte de la microbiota normal del hombre, siendo el sitio de portación principal las fosas nasales, donde actúa como reservorio, seguido de la faringe y las regiones perianal, inguinal, axilar y rectal (Coello y col. 1994), por lo que debe ser considerado como un patógeno oportunista. Cuando una persona entra en contacto con *S. aureus* puede ser colonizada, desarrollar infección y/o convertirse en portador (Wenzel y col. 1998). Se habla de colonización cuando este microorganismo es aislado de una muestra clínica en ausencia de signos de infección. Las zonas más frecuentes de colonización son: las lesiones cutáneas, el tracto respiratorio y el tracto urinario; puede persistir durante meses o años (Sanford y col. 1994). El ser portador es un factor de riesgo importante en las infecciones por esta bacteria. Puede causar una amplia variedad de infecciones: lesiones superficiales, infecciones sistémicas con riesgo de vida (endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteriemia), y enfermedades producidas por toxinas (intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada o síndrome de shock tóxico).

Esta bacteria ha demostrado un gran poder de adaptación a los agentes antimicrobianos, adquiriendo paso a paso resistencia a todos los antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones que ocasiona (Jensen 2009).

Actualmente existen cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiridos en la comunidad (CA-MRSA), que causan infecciones no asociadas a

hospitales. Se caracterizan por ser susceptibles a diversos antibióticos, este tipo de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina portan el elemento genético SCCmec (casete cromosomal estafilocócico mec) de tipo IV, V o VI, que se caracterizan por ser los SCCmec de menor tamaño conteniendo sólo un elemento genético de resistencia a antibióticos: el gen *mecA* (Bonnstetter y col. 2007).

### **Factores de virulencia de *S. aureus*.**

*S. aureus* produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su habilidad para colonizar y causar enfermedades en el humano. Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas las cuales incluyen cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La principal función de estas proteínas puede ser el convertir los tejidos locales del huésped en nutrientes que requieren las bacterias para su crecimiento. Algunas cepas producen una o más proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina (Dinges y col. 2000).

Los factores de virulencia se clasifican teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria o si son enzimas o toxinas (tabla 1).

En base a esto los factores se han clasificado en tres categorías: 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la toxina leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares y 3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina  $\alpha$ , hemolisinas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ .(42). (Velázquez-Meza, 2005; Bustos y col. 2006)

**Tabla 1. Principales factores de virulencia de *S. aureus***

| Estructurales            | Enzimas        | Toxinas   |
|--------------------------|----------------|---|
| Peptidoglucano           | Catalasa       | Toxina $\alpha$                                 |
| Proteína A               | Hialuronidasa  | Hemolisina $\alpha$                             |
| Factores de adhesión     | Lipasas        | Hemolisina $\beta$                              |
| Ácidos teicoicos         | Coagulasa      | Hemolisina $\gamma$                             |
| Polisacáridos capsulares | Nucleasas      | Hemolisina $\delta$                             |
|                          | Proteasas      | Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)           |
|                          | Estafilocinasa | Enterotoxinas estafilocócicas (SE)              |
|                          | Colagenasa     | Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1) |
|                          |                | Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)                |

En la Figura 2, se muestran los diferentes factores de virulencia que presenta *Staphylococcus aureus*.

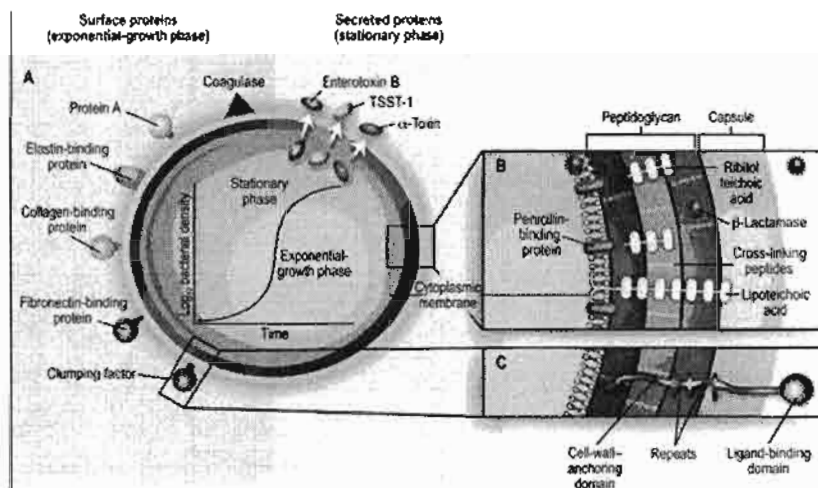


Figura 2. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*, con productos estructurales y de secreción (Gordon, 2008).

**Componentes importantes de la Pared Celular.** El peptidoglucano es el componente básico que confiere forma y estabilidad al microorganismo y representa el 50% de la pared celular. Este polisacárido está compuesto por subunidades de N-acetilmurámico (con una cadena de 4 aminoácidos L-alanina-D-glutámico-L-lisina-D-alanina) y N-acetilglucosamina unida mediante enlaces ( $\beta$ -

1.4). Las cadenas peptídicas laterales están unidas al residuo de ácido murámico por un puente de pentaglicina, adherido a la L-lisina de una cadena y a la D-alanina de la otra cadena. Otros componentes de la pared son los ácidos teicoicos, están unidos de forma covalente al peptidoglicano y otros a la membrana citoplasmática. La adherencia a la mucosa nasal esta mediada por los ácidos teicoicos (Fueyo, 2005).

**Proteína A y otras proteínas de adhesión.** La proteína A esta embebida en la capa externa del peptidoglicano, tiene un peso molecular de 42 KDa presente en cantidades variables en distintas cepas, su reacción con los mecanismos del hospedador consiste en enlazar con la parte terminal Fc de las inmunoglobulinas, excepto con la IG3. Entre las adhesinas asociadas a la pared celular que promueven la adherencia de las bacterias a las células del hospedador están las proteínas de unión a la fibronectina y al colágeno. Finalmente, muchas cepas están recubiertas por una capa externa de polisacáridos, que suele considerarse como "cápsula", que puede liberarse durante la infección focal y ser detectada en el suero del hospedador infectado (Mandell y col., 2000).

## **EXOTOXINAS.**

Las exotoxinas de *Staphylococcus aureus* se pueden agrupar en tres grupos generales: i) Agentes activos de membrana ii) Toxinas Superantígenos Pirogénicos (PTSAgs) y iii) toxinas exfoliativas.

Los agentes activos de membrana son hemolisinas, citolisinas y leucocidinas que contribuyen en general a la patogénesis de las diferentes enfermedades estafilocócicas. Los superantígenos de toxinas pirogénicas de *S. aureus* incluyen una gran familia de antígenos. Estas toxinas comparten actividades inmunomoduladoras como resultado de su función de superantígeno que promueve la habilidad de muchas toxinas pirogénicas como la toxina del síndrome de shock tóxico (TSS, siglas en inglés de Toxic shock syndrome). Algunos superantígenos, como el de las enterotoxinas estafilocócicas, tienen

actividades adicionales como dotarlos de la capacidad de inducir otras enfermedades como la intoxicación alimentaria estafilocócica (SFP). Las toxinas exfoliativas tienen actividad proteasa que les permite provocar patologías específicas en la piel.

**Alfa Toxina o Alfa Hemolisina.** Es una toxina citolítica formadora de poros, es una de las toxinas más potentes conocidas. La alfa toxina es especialmente tóxica para los conejos, los eritrocitos de conejo son muy sensibles a la lisis por esta toxina. En eritrocitos humanos es aproximadamente 1000 veces menos sensible. El gen que codifica la alfa-hemolisina (*hla*), fue clonado a partir del cromosoma de *S. aureus* y secuenciado en 1984 por Gray y Kehoe.

La proteína tiene un peso molecular de 33 KDa. Esta toxina está bajo control del gen regulador por el sistema *agr*. Los monómeros de alfa-hemolisinas son secretadas por *S. aureus* y se integran en la membrana de una célula diana, donde forman heptámeros cilíndricos. Esta forma oligomérica es capaz de lisar las células eucariontes. (Dinges y col. 2000)

**Beta Hemolisina (Esfingomielinasa C).** La beta-hemolisina de *S. aureus*, fue identificada por primera vez en 1935 por Glenny y Stevens, se demostró que era muy hemolítica para eritrocitos de ovejas, pero no para eritrocitos de conejo. No es dermonecrótica en conejillos de Indias y no es letal en ratones. Glenny y Stevens señalaron también que la actividad hemolítica de esta toxina se mejora por la incubación por debajo de 10°C después del tratamiento a 37°C, dando lugar a la denominación hemolisina "caliente-frío". La beta-hemolisina es secretada en el medio de cultivo como una exotoxina con un peso molecular de 35 KDa. El gen *hlb*, se encuentra en un fragmento de DNA cromosomal de 4 Kb llamado *ClaI* y codifica un polipéptido de 330 aminoácidos. La beta-hemolisina es producida por un gran número de cepas de *S. aureus*, particularmente de aislados de animales (Dinges y col. 2000).

**Delta Hemolisina.** Es un péptido de 26 aminoácidos que está codificada por el gen *hld*, dicho gen está también regulado por el sistema regulatorio *agr*, el cual

controla la producción de diversos factores de virulencia, como el gen de delta-hemolisina.

La delta-hemolisina puede causar un gran daño en la membrana de una amplia variedad de células de mamíferos. La delta-hemolisina es producida por el 97% de las cepas de *S. aureus*. Se cree que entre el 50 y 70% de las cepas de estafilococos coagulasa negativa producen esta toxina. Aunque la delta-hemolisina causa una amplia gama de efectos citotóxicos, su importancia en la etiología de la enfermedad no está clara. La delta hemolisina es capaz de lisar los eritrocitos y otras células de mamíferos, formando estructuras subcelulares como esferoplastos y protoplastos (Dinges y col. 2000).

**Gamma Hemolisina.** Hay dos tipos de toxinas bicomponente producidas por *S. aureus*, gamma-hemolisina y la toxina leucocidina Pantón-Valentine (PVL). Cada una de estas toxinas se forma como dos proteínas secretadas no asociadas, conocidas como componentes S y F (S para el lento y F para el rápido cuando se eluyen dichas proteínas en una columna de intercambio iónico) (Fischetti y col. 2006). La gamma-hemolisina la producen prácticamente todas las cepas de *S. aureus*. Las toxinas afectan los neutrófilos y los macrófagos, y la gamma-hemolisina además, es capaz de lisar muchas variedades de eritrocitos de mamíferos. La gamma-hemolisina no es identificable en la placas de agar sangre, debido al efecto inhibitor del agar sobre actividad de la toxina (Dinges y col. 2000).

Estas toxinas dañan la membrana de la célula huésped y los eritrocitos por acción sinérgica; PVL junto con  $\gamma$ -hemolisinas y otras leucocidinas (leucocidina R bovina), pertenece a una familia recientemente descrita de toxinas sinergomenotrópicas. La secuenciación de la leucocidina R de *Staphylococcus aureus* P83 sugiere que las leucocidinas estafilococicas y la hemolisina gamma son miembros de una misma familia. Esta actividad resulta de tres proteínas (HlgA y HlgC, pertenecen a la clase S y HlgB, pertenece a la clase F), formando dos pares (S +F): HlgA + Hlg B y HlgC + HlgB (Fischetti y col. 2006).

**Toxina Leucocidina Pantón-Valentine (PVL)** es una citoxina que causa la destrucción de los leucocitos y necrosis del tejido. Es producida por cerca del 5% de las cepas de *S. aureus*. Esta toxina está asociada a infecciones como furúnculos, abscesos cutáneos e infecciones necróticas de la piel. PVL actúa junto con  $\gamma$ -hemolisinas y otras leucocidinas (leucocidina R bovina). Los dos componentes del PVL, LukS-PV y LukF-PV, son proteínas secretadas antes de que se ensamblan en un heptámero que es formadora de poros en las membranas de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), lo que lleva a la lisis de los PMN. A diferencia de otras leucocidinas de *S. aureus* formadores de poros, la citoxina PVL no es hemolítica.

Cuando LukS-PV se une a los PMN, una proteína cinasa (A ó C) de los PMN, fosforila a LukS-PV seguido a esto por la inducción de los canales de calcio. Esto sugiere la inducción de eventos de transducción de señales que pueden desencadenar la producción de interleucinas y mediadores inflamatorios. Dependiendo de la concentración de PVL, puede causar la lisis PMN o apoptosis, esta última a través de una nueva vía que presumiblemente involucra la formación de poros en el membrana mitocondrial mediada por PVL (Boyle y Daum, 2007).

En concordancia con la actividad citolítica de PVL en los PMN, la neutropenia es un hallazgo clínico frecuentemente asociados con cepas *Staphylococcus* PVL-positivo, en neumonía necrotizante. La lisis mediada por PVL en los PMN define el primer paso en la patogénesis ya que media la evasión de esta primera línea de defensa del huésped. Esto conduce a la necrosis tisular y sepsis grave (Boyle y Daum, 2007).

Lina y col. en 1999 reportaron que entre el 50 y 93% de las cepas de *S. aureus* que causan infección primaria en la piel producen PVL. Además, estudios de Gillet y col. en 2002 demostraron una fuerte asociación entre la presencia de PVL y la neumonía necrotizante en niños saludables y adultos jóvenes. En estos estudios los autores sugieren la propensión de cepas de CA-MRSA que causan infecciones



en la piel y tejidos blandos y ocasionalmente neumonía necrotizante por la habilidad de estas cepas de producir PVL.

**Enterotoxinas y otros Superantígenos.** Las toxinas pirogénicas superantígenos (PSTAg) son proteínas extracelulares de tamaño entre 22.5 y 28.5 KDa, ricas en aminoácidos hidrofílicos. *S. aureus* produce tres grupos de PSTAg: enterotoxinas (SEs), toxinas de shock tóxico (TSST) y toxinas exfoliativas (ETs) (Dinges, 2000; Torres y col, 2001; Alouf y Müller-Alouf, 2003). Cada molécula está constituida fundamentalmente por una estructura beta, aunque también tiene algunas partes de alfa-hélice. El término pirogénico hace referencia a su potencial para provocar fiebre, mientras el término superantígeno (SAg), es por su habilidad para estimular inespecíficamente a un número alto de linfocitos T en el hospedador, provocando la producción de citocinas (Fueyo, 2005).

El grupo más numeroso y frecuente de PSTAg, es el de las SEs. Hasta el momento, han sido reconocidos 18 SEs serológicamente distintas, denominadas A, B, C (con cinco variantes), D, E, G, H, I (las tres últimas con variantes antigénicas) J, K, L, M, N, O, P, Q, R, U; cada una de ellas es codificada por un gen que se denomina por el prefijo *sea* seguido de la letra a la que corresponde la enterotoxina (*sea-seu*).

Tanto las SEs como sus genes presentan diferentes grados de homología y se ha propuesto la organización de parte de los genes en cuatro "clusters" (Fueyo, 2005). Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por cepas de *S. aureus* muy específicas; sin embargo, pocas de ellas son capaces de sintetizar más de un serotipo de enterotoxinas (Fueyo, 2005).

**Toxina del Síndrome de Shock Tóxico.** (TSST-1) es un superantígeno con un tamaño de 22 KDa producido por entre el 5% y el 25% de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Es la causa del síndrome de shock tóxico al estimular la liberación de grandes cantidades de interleucina-1, interleucina-2 y factor de necrosis tumoral (TNF). En general, la toxina no es producida por bacterias que

crecen en la sangre, sino que se produce en el sitio local de una infección y luego entra en el torrente sanguíneo. TSST-1 es codificada por *tstH*, está presente en el cromosoma bacteriano en un elemento genético móvil de 15.2 Kb que se encuentra en una isla de patogenicidad del estafilococo (Dinges y col. 2000).

**Toxinas Exfoliativa.** En este grupo se encuentra la toxina que está implicada en el síndrome estafilocócico de piel escaldada (SSSS) del inglés Staphylococcal scalded skin syndrome. Esta toxina se encuentra relacionada en infecciones de piel, impétigo, enfermedad de Ritter's, necrosis epidermal toxica; predominante en bebés y niños. Se encuentran dos formas antigénicas, designadas como ETA y ETB, en *S. aureus*; aunque también se han reportado dos variantes ETC y ETD en otros estafilococos coagulasa negativos.

El gen estructural *eta*, está localizado en el cromosoma de las cepas, se ha demostrado que algunas cepas que albergan a un fago pueden movilizar este gen y convertir a las cepas en *eta*<sup>-</sup> cuando antes eran productores de la toxina. Los genes *etb* y *etd* son localizados en plásmidos y en islas de patogenicidad (Fischetti y col. 2006).

#### **Enzimas extracelulares.**

*S. aureus* producen un gran número de enzimas extracelulares y su acción se presenta en zonas próximas a los focos infecciosos. Estas enzimas hidrolizan macromoléculas orgánicas en el medio ambiente para proveer nutrientes de bajo peso molecular para la bacteria. La degradación de constituyentes del tejido es una parte esencial para la patogenicidad estafilocócica y puede promover la propagación de la bacteria en el tejido del huésped. Algunas enzimas extracelulares contribuyen para la virulencia del estafilococo ya que actúan sobre moléculas involucradas en la defensa contra la infección. Se encuentran diferentes enzimas con diversas actividades entre las que se tienen: coagulasa, estafilocinasa (Sak), diversas serinas proteasas, cisteína proteasas, metaloproteasas, lipasas, lipasa esterasa, fosfolipasa C, enzima modificadora de

ácidos grasos, hialuronidasa, termonucleasas,  $\beta$ -lactamasas, endo- $\beta$ -N-acetilglucosamida y N-acetilmuramil-L-alanina amidasa (Fischetti y col. 2006).

**Coagulasa.** Esta enzima se encuentra en dos formas: a) el factor de agregación (clumping factor) o coagulasa ligada, la cual se une al fibrinógeno facilitando así la agregación bacteriana y b) la coagulasa libre o extracelular. Ambas intervienen en la formación de coágulos, convirtiendo el fibrinógeno a fibrina, facilitando procesos sépticos y permitiendo la formación de abscesos. Existe una fuerte correlación entre la producción de la coagulasa y la virulencia de las cepas. La detección de la coagulasa libre es la prueba que diferencia a *S. aureus* de los estafilococos coagulasa negativa. Esta proteína está codificada por el gen *coa*. La producción de la coagulasa es el principal criterio para la identificación de *S. aureus*. La producción de coagulasa es regulada negativamente por *agr*.

**Catalasa.** Esta enzima degrada el peróxido de hidrogeno protegiendo al microorganismo durante la fagocitosis.

**Hialuronidasa.** El ácido hialurónico es un componente de la matriz extracelular de vertebrados. Enzimas extracelulares pueden hidrolizar el ácido hialurónico del tejido conjuntivo y facilita la propagación de la infección. El ácido hialurónico está compuesto de un polisacárido lineal compuesto de unidades repetidas de ácido D-glucorónico (1- $\beta$ -3)-N-acetil-D-glucosamina (1- $\beta$ -4). La hialuronidasa de *S. aureus* degrada el ácido hialurónico por un mecanismo de eliminación  $\beta$  teniendo disacáridos de ácido N-acetil glucosamina y ácido glucorónico por molécula, llamados lisados hialurónicos (Fischetti y col. 2006).

**Penicilinasa.** Esta enzima es producida en la actualidad por casi todas las cepas de *S. aureus*. Es una betalactamasa que inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo beta-lactámico.

**Estafilocinasa (Sak).** Es una proteína que forma un complejo con el plasminógeno, y se convierte en una serina proteasa plasmina activada, cuyo sustrato es C<sub>3</sub> y IgG<sub>3</sub> humanas. La plasmina se une a la superficie de *S. aureus* y remueve IgG, C<sub>3</sub>b e iC<sub>3</sub>b, de esta superficie, revertiendo así el efecto de la opsonización. Además de activar la plasmina, la estafiloquinasa suprime directamente las propiedades bactericidas de la defensina  $\alpha$ , lo cual lo hace un importante factor de colonización (Lambris y col. 2008).

**Proteasas.** Muchas cepas de *S. aureus* producen actividad proteolítica. Estas enzimas pertenecen a la familia de serina, metalo y cisteína proteasas.

**Termonucleasa.** Es producida por casi todas las cepas de *S. aureus* y la presencia de esta puede ser usada como criterio para identificar a esta especie. Sin embargo, cepas de *S. hycus* y *S. intermedius* también pueden producir pequeñas cantidades de esta enzima. La termonucleasa hidroliza cadenas sencillas y dobles de DNA y RNA en el extremo 5' del enlace fosfodiéster, este mecanismo es dependiente de calcio.

### **Sistema Regulatorio “quorum sensing”**

Las bacterias permiten la regulación de la expresión génica en respuesta a fluctuaciones de la densidad celular. En las bacterias se producen y excretan moléculas químicas a modo de señales (autoinductores) cuya concentración se incrementa en función de la densidad celular. Las bacterias utilizan rutas de comunicación *quorum sensing* para regular diversas actividades fisiológicas incluyendo simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, movilidad, esporulación y formación de biopelículas (Miller y Baseler, 2001). En *S. aureus*, el locus *agr* (accessory gene regulator) es el responsable del control de la expresión de numerosos determinantes de virulencia vía *quorum sensing* (Jarraud y col. 2002, Fueyo, 2006).

Actualmente el bloqueo del *quorum sensing* se presenta como una nueva estrategia para atenuar la infección y una alternativa al tratamiento con antimicrobianos.

La mayoría de las enfermedades de *S. aureus* resultan de la acción combinada de varios determinantes de patogenicidad con diversas funciones: adherencia, invasión de los tejidos, evitar la fagocitosis y toxicidad. En el desarrollo y pronóstico de la enfermedad, también son factores determinantes los dependientes del hospedador (García-Rodríguez y Picazo, 1999; Mandell y col. 2000; Torres y col. 2001; Fueyo, 2005).

### **Resistencia Antimicrobiana.**

*Staphylococcus aureus* es un claro ejemplo de patógeno en evolución. A lo largo de los años, ha demostrado una progresiva adaptación al medio circundante y un gran éxito para sobrevivir en condiciones diversas y cambiantes, así como para ser la causa de infecciones graves en todas las etapas de la vida.

Poco tiempo después de la introducción de la penicilina en 1941, se detectaron las primeras cepas de *S. aureus* productoras de penicilinasas en pacientes hospitalizados. En menos de una década más del 25% de los aislamientos eran resistentes a la penicilina, y en dos décadas más el 75% eran resistentes.

En 1949 apareció la meticilina, una penicilina semisintética, como antibiótico de elección para estas cepas. Los primeros casos de *S. aureus* con resistencia a la meticilina (MRSA) se describieron en Londres en 1961 por Jevons (Gil, 2000). Este hecho no fue aislado, ya que de forma casi inmediata se aislaron cepas MRSA en otros países de Europa, Australia y Estados Unidos. A partir de 1965 en Europa y de 1974 en Estados Unidos, la infección por MRSA constituye una causa importante de infección nosocomial.

Desde la aparición de los primeros casos de infección por MRSA ya se observó que estas cepas presentaban también resistencia a otros antimicrobianos, hecho

que no ocurría entre los aislamientos sensibles a la meticilina. Esta “coevolución” de la resistencia, que se ha mantenido hasta el presente, limita las opciones terapéuticas de las infecciones producidas por MRSA. Aunque la resistencia de *S. aureus* a los aminoglucósidos parece relacionada en su inicio con el uso tópico de neomicina y gentamicina, un paso más en la adquisición de factores de resistencia lo constituyó en 1976 el aislamiento de cepas con resistencia a la meticilina y la gentamicina. Desde entonces, la resistencia a los aminoglucósidos ha sido un marcador habitual en MRSA. A finales de la década de 1980, la infección por *S. aureus* multiresistente adquiere todas las connotaciones propias de la infección nosocomial, con mayor incidencia, aunque no exclusiva, en las unidades de cuidados intensivos, de neonatos y de quemados, y el espectro de la multiresistencia se amplía a otros antimicrobianos como cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Este hecho, obligó a incrementar el consumo de glucopéptidos en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* y trajo como consecuencia la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a la vancomicina (Hiramatsu y col. 1997).

En 1996 se describe en Japón el primer aislamiento de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina (VISA: *Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*) y la existencia de cepas con resistencia heterogénea a este antimicrobiano, y poco más tarde aparecen cepas con estas mismas características de sensibilidad en Estados Unidos, Europa y España. La reciente descripción en 2002 de cepas de MRSA con resistencia de alto grado a la vancomicina, y la demostración de su transferencia plasmídica *in vivo*, constituyen actualmente un motivo de preocupación.

En definitiva, *S. aureus* es capaz de desarrollar resistencia a los antimicrobianos más rápidamente de lo que la industria farmacéutica tarda en crearlos. Si bien esta resistencia se ha manifestado principalmente en cepas de origen hospitalario, en los últimos años han aparecido brotes comunitarios de infección por MRSA en niños y adultos por lo demás sanos y sin ninguna relación con centros sanitarios. Si se mantienen los mismos patrones observados con la evolución de la resistencia en los aislamientos hospitalarios de *S. aureus*, es de esperar que la

prevalencia de *S. aureus* multirresistente en la comunidad aumente en la próxima década (Mansilla, 2006).

### **Resistencia a meticilina.**

El elemento central de la resistencia a la meticilina en *S. aureus* es la adquisición horizontal del gen *mecA*, el cual se encuentra en un elemento genético móvil grande, conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* ("Staphylococcal cassette chromosome *mec*", SCC*mec*). Este casete no es endógeno de esta bacteria y se encuentra integrado en el cromosoma de las cepas MRSA. El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP) de 78 KDa, llamada PBP2a, la cual presenta baja afinidad para la meticilina y todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que se han desarrollado, incluyendo las isoxazoil penicilinas (por ejemplo, la oxacilina). La proteína PBP2a continúa sintetizando peptidoglicano para la pared celular aun cuando las PBP normales estén inhibidas por los antibióticos (Bustos y col. 2006; Gil, 2000; Gordon y Lowy 2008; Velázquez-Meza, 2005).

La meticilina es un derivado semisintético de la penicilina. Esta droga fue introducida en Europa en 1959, y un año después se detectó la primera cepa *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), más tarde, en 1963, se reportó el primer brote nosocomial causado por MRSA desde entonces se han notificado cepas de *S. aureus* multirresistentes en todo el mundo (Velázquez-Meza, 2005).

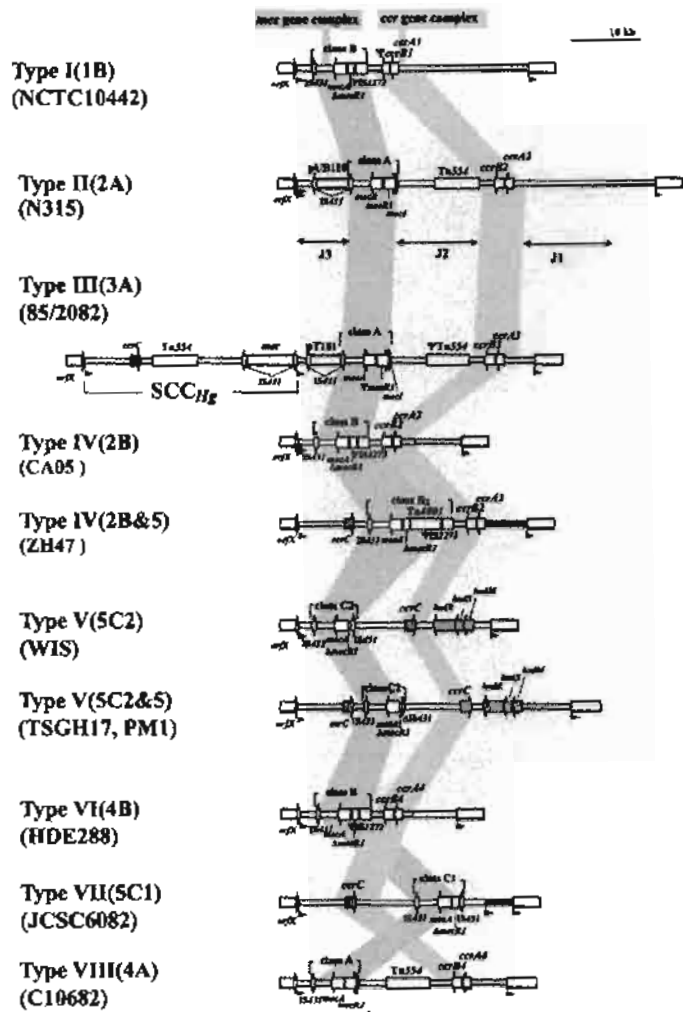
### **Estructura del casete cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*).**

Ito y col. en el año 2001, elucidaron la estructura completa del casete cromosomal del elemento *mec* (SCC*mec*), en *S. aureus* y el de sus tipos principales, como se muestra en la Figura 3, en la cual se esquematiza la estructura de los principales tipos de SCC*mec*. Se ha elucidado la estructura completa de los diferentes tipos del casete cromosomal SCC*mec* (Gordon y Lowy 2008; Ito y col. 2001; Ito y col

2002; Ito y col. 2004), y diversos subtipos, debido a la alta diversidad genética en cuanto a la organización estructural que puede mostrar dicho casete cromosomal, hasta el momento se han reportado alrededor de ocho tipos diferentes del SCC*mec* y un determinado número de variantes o subtipos (IA, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIIA, IIIB, IVA, IVB, IVC, IVE, IVF, V, VI, VII y VIII) (Ito y col. 2001; Oliveira y col. 2001; Ma y col. 2002; Okuma y col. 2002; Shore y col. 2005), clasificados principalmente en base a las secuencias de la región J (junkyard). Algunos tipos del SCC*mec* tiene involucrado resistencia a otros antibióticos.

Existen diferencias sustanciales en cuanto al tamaño y secuencias nucleótidas en los diferentes tipos de SCC*mec*. El análisis de la estructura de dicho elemento revela secuencias terminales repetidas e invertidas y conservadas en los puntos de integración y conservan la organización genéticas alrededor del gen *mecA*. Dicho elemento está localizado específicamente en el extremo 3' de un fragmento de lectura abierta (ORF) *orfX* cuya función hasta el momento es desconocida (Ito, 1999). Esta región se encuentra cerca del origen de replicación de *S. aureus*. SCC*mec* es considerada una isla genómica (G island), o mejor dicho una isla de resistencia de antibióticos (Ito y col. 2001, Oliveira y col. 2006 y Ito y col. 2007).





ALMA MATER  
 ARCHIVO HISTORICO  
 INSTITUCION

Figura 3. Representación de la estructura básica de los diferentes tipos de SCCmec. (Ito y col. 2001; Ito y col. 2004; Ma y col. 2002; Shore y col. 2005; Oliveira y col. 2006, Zhang y col. 2009). International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2009.

Se localizan también recombinasas del casete cromosomal (*ccr*) genes responsables del movimiento de SCCmec. La presencia de recombinasas como CcrA y CcrB, influyen en la escisión e integración del casete cromosomal estafilocócico *mec* (Wang, 2010). Se encuentran cuatro alotipos de los genes de las proteínas CcrA y CcrB, que son los genes *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* y *ccrA4* y *ccrB*: *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* y *ccrB4*, respectivamente.

| <b>Tipo SCCmec</b> | <b>Complejo <i>ccr</i> gene<sup>a</sup></b> | <b>Complejo <i>mec</i> gene</b> |
|--------------------|---|---------------------------------|
| I                  | 1 (A1B1)                                    | B                               |
| II                 | 2 (A2B2)                                    | A                               |
| III                | 3 (A3B3)                                    | A                               |
| IV                 | 2 (A2B2)                                    | B                               |
| V                  | 5 (C)                                       | C2                              |
| VI                 | 4 (A4B4)                                    | B                               |
| VII                | 5 (C)                                       | C1                              |
| VIII               | 4 (A4B4) <sup>b</sup>                       | A                               |

<sup>a</sup> los genes *ccr* en el complejo genético, están indicados en los paréntesis.

<sup>b</sup> los genes *ccrA4B4* encontrados en el SCCmec tipo IV también se encuentran en el SCCmec tipo VIII.

Hasta el momento se han reportado cuatro clases del complejo *mec* y cinco tipos del complejo *ccr*.

Las partes restantes del casete cromosomal SCCmec se llaman regiones J (junkyard) (regiones J1, J2 y J3), que constituyen los componentes esenciales del casete, aunque en algunos casos, estas regiones suelen llevar la resistencia a algunos antibióticos. J1 es la región que se encuentra del lado derecho del complejo *ccr*, J2 es la región entre el complejo *ccr* y el complejo *mec*, esta región contiene al transposon Tn554 y J3 es la región que se encuentra entre los complejos *mec* y la parte 5' del casete. Por lo tanto, la organización estructural de SCCmec puede resumirse como 5' J3-*mec*-J2-*ccr*-J1 3', como se muestra en la Figura 4. Por otra parte, existen numerosas diferencias en las regiones J.

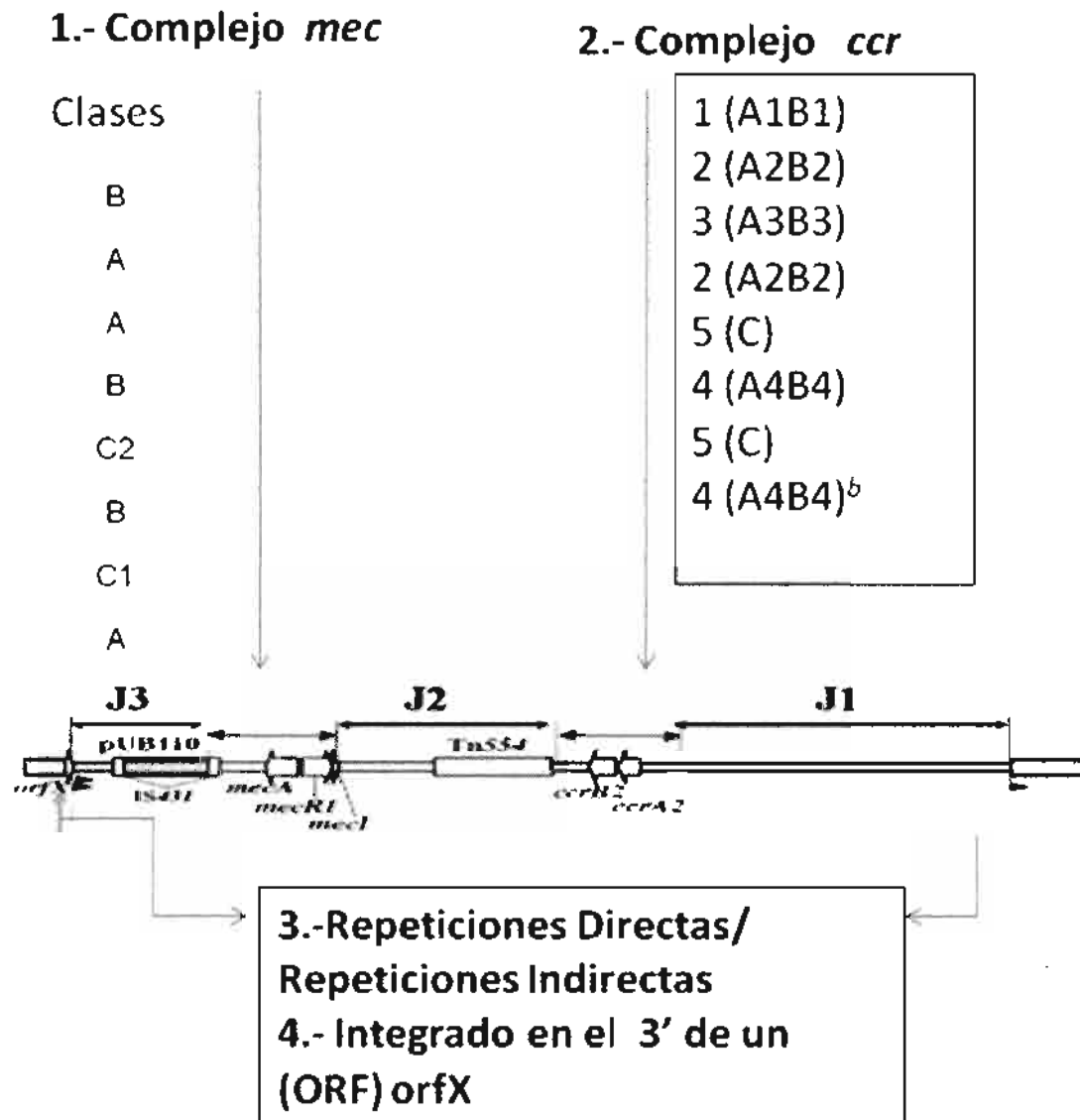


Figura 4. Estructura esencial de los diferentes tipos del casete cromosomal SCC*mec* de *Staphylococcus aureus*.

Los elementos SCC*mec* se han clasificado en función de las características de los genes *ccr*, y sobre las diferencias en el gen *mec*, así como también las regiones J y en los genes reguladores. También se diferencian según las determinantes genéticas adquiridas como el resultado de la integración de plásmidos y transposones (Ito y col. 2004).

Las regiones J no siempre son específicas para cada tipo de SCC*mec*, pero algunas regiones J se comparten entre los diferentes tipos de elementos SCC*mec*. De las tres regiones, se considera que J1 es la más esencial, porque se supone que refleja la forma original del SCC en el que se han ido integrado los genes *mec*. Por otra parte, se han identificado varias regiones J1 diferentes en los SCC*mec* tipo II y IV. La presencia o ausencia de plásmidos integrados en la región J3, que codifican genes de resistencia a los antibióticos también se pueden utilizar como marcadores para clasificar los diferentes tipos de SCC*mec* en los estudios epidemiológicos (<http://www.staphylococcus.net/>).

Hasta el momento se han encontrado 8 diferentes casetes SCC*mec*, tipos I-VIII. Ito y col., en el año 2001, identificaron las estructuras completas de tres tipos de elementos SCC*mec* (I, II y III) posterior a ello, se encontraron tres nuevos tipos de SCC*mec* de menor tamaño. En el año 2009, el International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), se organizó para formar una red intelectual para contribuir al estudio de los elementos SCC, i) establecer un consenso sobre un sistema de nomenclatura uniforme para los elementos de SCC, (ii) definir los requisitos mínimos para la designación de nuevos elementos de SCC, y (iii) establecer directrices para la identificación de los elementos de SCC para el estudio epidemiológico. En la tabla 3, se agrupan las principales características de los SCC*mec*.

**SCC*mec* Tipo I.** Fue identificado en una cepa MRSA en el Reino Unido en 1961, se identificó en una clona pediátrica; tiene un tamaño aproximado de 34 Kb. Este casete no tiene plásmidos ni transposones que confieren resistencia a otras drogas parecidas a la meticilina o resistencia a metales pesados. Sin embargo se ha encontrado un subtipo IA, que difiere por la presencia de un plásmido integrativo (pUB110) reportado por Shore y col. en el 2005.

**SCC*mec* Tipo II.** Se identificó en una MRSA aislada en Japón en 1982, tiene un tamaño cercano a 53 Kb y lleva el Tn554 quien es responsable de la resistencia a

la eritromicina y estreptomina. Se han encontrado diversos subtipos de este casete, que pueden variar en el tamaño y secuencias nucleotídicas.

**SCCmec Tipo III.** Aislado de una cepa de Nueva Zelanda en 1985, tiene un tamaño de aproximadamente 66 Kb, contiene los genes de *mecA* y *mecR1*, tiene un complejo de recombinasas tipo 3 (*ccrA3*, *ccrB3*), transposones Tn554 y  $\Psi$ Tn554 (confiere resistencia a el cadmio), y el plásmido pT181 (responsable de la resistencia al mercurio y a la tetraciclina). Además, se encuentran las secuencias de inserción IS431 y IS256. Por otro lado, tiene cortada una copia de genes *ccr*, situada entre dos elementos IS431, esto sugiere que posiblemente el SCCmec tipo III en el pasado se derivó de la fusión de dos elementos SCC (Ito y col. 2001).

**SCCmec Tipo IV.** Tiene un tamaño entre 20–24 Kb, fue identificado en una clona pediátrica y en dos cepas MRSA comunitarias. Contiene el complejo de genes *ccr* tipo 2 (*ccrA2* y *ccrB2*), el complejo *mec* clase B y la IS272. Es el más pequeño de los casetes cromosomales *mec*, lo que le confiere movilidad genética, no lleva otros factores de virulencia, ni genes adicionales de resistencia a otros antibióticos (Ma y col. 2002). Este casete se encuentra asociado a cepas adquiridas en la comunidad. La detección del gen que codifica a la exotoxina leucocidina de Pantón-Valentine, se asocia frecuentemente con infecciones supurativa en piel y tejidos blandos y se relaciona con las cepas MRSA adquiridas en la comunidad (CA-MRSA), dicho gen se puede utilizar como un marcador para determinar a las cepas de origen comunitario. La importancia de la identificación de la exotoxina leucocidina Pantón-Valentine es la detección de cepas CA-MRSA (Vandenesch y col. 2003).

**SCCmec Tipo V.** Tiene un tamaño cercano a 28 Kb, fue encontrado en Australia en el año 2004, por Ito. y col. 2004. El SCCmec V es más grande que el subtipo IVb, la principal diferencia se encuentra con la presencia de un sistema de restricción- modificación codificada por los genes V22 y V23 que se encuentra en este tipo. Al igual que el tipo IV solamente posee genes de resistencia a la

meticilina, sin embargo, difieren de otros elementos como un nuevo tipo de gen *ccr*, llamado tipo C, el cual solamente presenta una copia en contraste con otros elementos que contienen un par de estos genes (Martins y Cunha, 2007). Este tipo de cassette tipo V se asocia con cepas comunitarias CA-MRSA.

**SCC*mec* Tipo VI.** En el 2006, Oliveira y col. redefinen la estructura de una variante del SCC*mec* IVB (20-24 Kb), pero con un alotipo *ccrAB* nuevo, el alotipo 4. La cepa HDE288 es el prototipo para el SCC*mec* VI caracterizada por tener *ccrAB4* y su elemento SCC*mec* ha sido totalmente caracterizado por PCR y secuenciación de nucleótidos. Esta cepa se encontró en una clona MRSA pediátrica en un hospital pediátrico en Portugal en 1992. Este tipo de cepas MRSA se ha detectado en Polonia, Argentina, Colombia y Estados Unidos (Oliveira y col. 2006).

Los tipos SCC*mec* VII y VIII se han descrito recientemente y sus características están en estudio.

En la tabla 3 se hace un resumen de las principales características que presentan los primeros tipos del SCC*mec*.

Estudios recientes indican que los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas MRSA en México (Velázquez Meza, 2005).

**Tabla 3. Principales características de los diferentes tipos de SCCmec.**

|                  | <b>Peso Molecular Kb</b> | <b>Complejo del gene mec.</b> | <b>mecR 1</b> | <b>mecI</b> | <b>Tipo ccr</b> |  |
|------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------|-------------|-----------------|--|
| <b>Tipo I</b>    | 34                       | B                             | +             | -           | 1               | MRSA aislada en Reino Unido en 1961.<br>Ito. y col. 2001   |
| <b>Tipo II</b>   | 52                       | A                             | +             | +           | 2               | MRSA aislada en Japón en 1982.<br>Ito. y col. 2001   |
| <b>Tipo III</b>  | 66                       | A                             | +             | +           | 3               | MRSA aislada en Nueva Zelanda en 1985.<br>Ito. y col. 2001   |
| <b>Tipo IV</b>   | 20–24                    | B                             | +             | -           | 2               | Identificado en una clona pediátrica y en dos cepas MRSA comunitarias en USA 2002.<br>Ma y col. 2002 y Oliveira y col. 2002. |
| <b>Tipo V</b>    | 28                       | C2                            | +             | -           | 5               | Cepa MRSA comunitaria Australiana en el 2004.<br>Ito y col. 2004.  |
| <b>Tipo VI</b>   | 20–24                    | B                             | +             | -           | 4               | Cepa MRSA comunitaria aislada en Portugal en 1992.<br>Oliveira y col. 2006.  |
| <b>Tipo VII</b>  | ~42                      | C1                            |               |             | 5               | Cepa MRSA comunitaria aislada en Taiwan.<br>Higuchi y col. 2008.   |
| <b>Tipo VIII</b> | ~32                      | A                             |               |             | 4               | Cepa MRSA comunitaria aislada en Canadá.<br>Zhang y col. 2009.   |

### **Evolución de *S. aureus*.**

Antes de que aparecieran los antibióticos una bacteriemia causada por *S. aureus* tenía una mortalidad aproximada del 82%, aún ahora este porcentaje permanece elevado, entre el 25 y 63% (Howe y col. 1996).

En años recientes las infecciones por *S. aureus* han reemergido, debido a que la bacteria se ha vuelto resistente a los antibióticos con los que normalmente se le combatía (Chambers, 1997; Howe y col. 1996). En la actualidad se tiene un aumento en el número de epidemias causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (Chambers, 1997; Kluytmanz y col. 1997; Shopsisin y Kreiswirth 2001).

En el Reino Unido en 1992, menos del 3% de los aislados de *S. aureus* provenientes de septicemias fueron *S. aureus* meticilina resistentes, en estos tiempos se ha encontrado cerca del 40% de los aislados obtenidos. En Estados Unidos y Japón, se encuentran porcentajes muy similares (Biedenback y col. 2004).

Esto ha provocado que la mayoría de los países tomen medidas para tratar de controlar las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina.

Las cepas MRSA son el patógeno resistente a antibióticos más comúnmente identificado en los hospitales de EUA, las cuales causan infecciones nosocomiales. A estas cepas se les denomina MRSA adquiridas en hospitales (HA-MRSA). El aumento en infecciones de cepas MRSA se debe a varios factores, que incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro, un mayor número de pacientes inmunocomprometidos en los hospitales y una mayor utilización de medios invasivos, como catéteres y sondas, que facilitan la entrada y colonización de cepas MRSA a la sangre y tejidos.

Las infecciones nosocomiales son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica, social, de importancia clínica y epidemiológica debido a que presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad. Las infecciones nosocomiales se definen como aquellas infecciones que no estaban presentes ni en periodo de incubación al momento en que el paciente ingresó al hospital. En México, se reporta una incidencia del 10 al 15%. El área hospitalaria con mayor



frecuencia de infecciones nosocomiales es la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por las de herida quirúrgica, bacteriemias y neumonías. Un factor que se relaciona con el desarrollo de infecciones nosocomiales es la edad.

En México, se cuenta con la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), la cual reportó que en el periodo de 1998-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto lugar en mortalidad (Velázquez Meza, 2005).

Además, a finales de los 90's, emergieron cepas MRSA en adultos y niños sanos en las comunidades, a las que se les dio el nombre de *S. aureus* meticilina-resistentes asociadas a la comunidad (CA-MRSA), las cuales han perdido los tradicionales factores de riesgo de las cepas MRSA hospitalarias, son susceptibles a pocos antibióticos y presentan la inclusión de factores de virulencia específicos (Naimi y col. 2003; Weber, 2005). La infección causada por CA-MRSA, puede causar neumonía necrotizante fatal en niños, un caso de este tipo fue reportado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos en 1999, la cepa es transmitida por contacto piel con piel. Los rasgos comunes de estas cepas CA-MRSA es la presencia del gen de la Leucocidina Pantón-Valentine (PVL) y del casete cromosomal *mec IV* (SSC*mec IV*) (Vandenesch y col. 2003).

En la comunidad la mayoría de las infecciones de *S. aureus*, como infecciones de la piel y infecciones en tejidos blandos, son causadas por cepas de *S. aureus* susceptibles a la meticilina (MSSA).

Las cepas de CA-MRSA representan un problema de salud pública, ya que se ha incrementado considerablemente el número de casos en muchos países (Kanafani y Fowler 2006). Se han producido varios brotes epidémicos de CA-MRSA en los últimos 6 u 8 años. Algunos de estos brotes se han registrado en: cárceles, equipos de fútbol; militares, homosexuales y nativos americanos de Alaska y de las Islas del Pacífico. En todos estos casos la población afectada no tenía los factores de riesgo establecidos para adquirir infecciones por HA-MRSA. Los síntomas clínicos causados por CA-MRSA son principalmente infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía necrotizante y septicemia (Sanjay, 2005). Las

diferencias entre los tipos CA-MRSA y HA-MRSA se pueden resumir en la tabla 4 (Bustos y col. 2006).

Desde el punto de vista microbiológico las cepas CA-MRSA son genéticamente diferente del clásico *Staphylococcus aureus* meticilina multiresistente que conocemos del ámbito hospitalario (HA-MRSA). Posee atributos de virulencia específicos como una exotoxina: la leucocidina de Panton-Valentine, habitualmente presente en menos de 5% de *Staphylococcus aureus* y asociada con procesos inflamatorios severos en piel y partes blandas y neumonía necrotizante. Posee también mayor rapidez de duplicación celular y una alta capacidad de diseminación. A su vez, los genes de resistencia a meticilina, se encuentran en una región de reciente identificación (SCC*mec* IV) distinta a la que poseen los MRSA hospitalarios clásicos, por lo que el origen de estas cepas no lo constituyen las diseminadas desde el hospital hacia la comunidad, sino que este nuevo agente nace de la asociación de dos genotipos: el genotipo resistente de un *Staphylococcus epidermidis* y el genotipo de un *Staphylococcus aureus* meticilina sensible más virulento.

**Tabla 4. Principales diferencias entre los dos tipos de cepas de *S. aureus* meticilina resistentes: adquiridas en comunidad (CA-MRSA) y adquiridas en hospitales (HA-MRSA) (Bustos y col. 2006).**

| HA-MRSA   | CA-MRSA  |
|---|--|
| Resistentes a múltiples antibióticos  | Resistentes a antibióticos $\beta$ -lactámicos y en algunas ocasiones a eritromicina.                        |
| Portadoras de SCCmec tipo I, II y III   | Portadoras de SCCmec tipo IV y V   |
| Productoras de diversas toxinas   | Productoras de algunas toxinas, siendo la más destacada la leucocidina Pantón-Valentine (PVL)                |
| Causantes de amplia variedad de infecciones   | Producen principalmente infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía necrotizante y septicemia         |
| Aisladas principalmente en pacientes con factores de riesgo nosocomial  | Cepas aisladas en la comunidad en pacientes que no tienen los factores de riesgo de una infección nosocomial |
| Se ha determinado la existencia las clonas pandémicas: Brasileña, Húngara, Ibérica, Nueva York/Japón y pediátrica | Dos clonas principales, la USA300 y la USA400  |

#### **Resistencia a vancomicina.**

Debido a la resistencia a la meticilina, se introdujo la vancomicina de manera global a principios de los años 90 como único antibiótico efectivo contra *S. aureus*. Sin embargo, ya en 1997 se encontraron cepas con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA) y en el 2002 se detectaron las primeras cepas resistentes a este antibiótico ("vancomycin resistant *S. aureus*", VRSA). La resistencia a la vancomicina se debe a la adquisición del gen *van*, el cual se transfiere a través de un plásmido. Para que la vancomicina ejerza su acción debe llegar a la membrana citoplásmica y unirse a las moléculas precursoras nacientes de la pared celular. Esta unión inhibe la incorporación de los precursores a la pared celular en formación. Al parecer, la resistencia a la vancomicina es debida a cambios en la permeabilidad de la pared bacteriana al antibiótico, y cambios en la biosíntesis del peptidoglucano. Las cepas VISA producen cantidades elevadas de peptidoglucano, dando como resultado una pared celular gruesa y de forma irregular. Además, se presenta menos entrecruzamiento entre las hebras de peptidoglucano. Esta pared gruesa y desordenada puede atrapar a la vancomicina

en la periferia de la célula, con el consiguiente bloqueo de la acción del antibiótico (Bustos y col. 2006; Gordon y Lowy, 2008; Kanafani y col. 2006).

### **Portadores sanos de *S. aureus*.**

*S. aureus* puede formar parte de la flora normal de piel y mucosas, se localiza principalmente en el tracto nasofaríngeo. Se ha estudiado ampliamente a los individuos sanos como portadores nasales de *S. aureus* y se distinguen tres patrones de portadores: los persistentes, los intermitentes y los no-portadores (Kluytmans y col. 1997; VandenBergh y col. 1999).

En la población adulta sana, aproximadamente el 20% son portadores persistentes de *S. aureus*, el 60% son portadores intermitentes y el 20% restante son no-portadores persistentes. Sin embargo, se ha observado en estudios longitudinales que el estado de portador muestra cambios a través del tiempo en el mismo individuo (Peacock y col. 2001; VandenBergh y col. 1999).

Al parecer existen factores tanto del hospedero como de la bacteria que influyen en el proceso de colonización y persistencia del microorganismo en los portadores. Se sugiere una influencia genética del hospedero en base a la variación en el estado de portador en relación a diferentes grupos étnicos, así como una predisposición familiar a ser portadores (Peacock y col. 2001). También se ha observado una variación en el fenotipo del hospedero, en un estudio se encontró que los portadores pierden actividad antimicrobiana en el fluido nasal, mientras que en los no-portadores se presenta actividad bactericida (Cole y col. 1999).

También se ha demostrado una pobre adherencia del *S. aureus* al epitelio ciliado, adhiriéndose mejor a las narinas anteriores, donde el epitelio de esta región es estratificado, queratinizado y no es ciliado (Shuter y col. 1996).

Se ha observado que la adherencia de *S. aureus* en células epiteliales descamadas es significativamente mayor en los portadores que en los no-portadores (Aly y col. 1977). También se ha determinado que las cepas MRSA se adhieren a las células del epitelio nasal de igual manera que las cepas sensibles a la metilicina (Ward, 1992). Sin embargo, parece que actualmente las cepas MRSA

son menos transportadas en la comunidad, por lo que es posible que estas cepas presenten una desventaja biológica en relación con las cepas susceptibles a la meticilina (Peacock y col. 2001). Pero este panorama parece haber cambiado debido a la aparición de las cepas adquiridas en la comunidad MRSA.

Al aplicar las técnicas de tipificación molecular en estudios longitudinales, se encontró que los portadores persistentes acarrean por lo regular una sola cepa, mientras que los portadores intermitentes pueden ser colonizados por cepas diferentes todo el tiempo (Hu y col. 1995).

Los portadores sanos pueden transmitir al *S. aureus* en casos de inmunodeficiencia, cortadas, en implantaciones quirúrgicas, así como provocar infecciones nosocomiales (Kluytmans y col. 1997; Corbella y col. 1997). También las personas que manejan alimentos pueden transmitir el *S. aureus* a la comida y se pueden provocar intoxicaciones alimentarias (Tondo y col. 2000; Weber, 2005). Debido a esto, los portadores sanos de *S. aureus* son un factor de riesgo importante en la infección por este microorganismo, tanto en la comunidad como en los hospitales y en los lugares de preparación de alimentos.

Una de las medidas preventivas y necesarias es la interrupción del estado de portador del *S. aureus* para disminuir el riesgo de infecciones, la aparición de cepas CA-MRSA aumenta esta necesidad. Por lo que es importante contar con un mayor conocimiento de los fundamentos biológicos del estado de portador del *S. aureus*.

### **Tipificación molecular de *S. aureus*.**

Las técnicas de tipificación molecular también se han incrementado en los estudios epidemiológicos de las cepas MRSA, para conocer la evolución entre las diferentes clonas de MRSA.

Las epidemias de enfermedades infecciosas resultan de la exposición de un agente etiológico común. Generalmente, este agente se deriva de una sola célula cuya progenie es genéticamente idéntica o cercanamente relacionada. En

términos epidemiológicos, los organismos involucrados en las epidemias están relacionados clonalmente, es decir, tienen un origen común. Los organismos relacionados clonalmente son miembros de la misma especie que comparten factores de virulencia, rasgos bioquímicos y características genómicas. Sin embargo, existe suficiente diversidad a nivel de especie que organismos aislados de diferentes fuentes y/o en diferentes regiones geográficas pueden ser diferenciados y clasificados en subtipos o cepas.

El proceso de tipificación es de gran importancia epidemiológica para reconocer entre otras cosas: epidemias, detección de transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, determinación de la fuente de infección, reconocimiento de cepas particularmente virulentas y monitoreo de programas de vacunación (Olive y Bean, 1999).

Cualquier método de tipificación debe tener un elevado poder de diferenciación. Debe ser capaz de diferenciar claramente cepas no relacionadas, como aquellas que provienen de diferente lugar, pero al mismo tiempo debe demostrar la relación de todos los organismos aislados de individuos infectados de la misma fuente.

En un sistema de tipificación, la velocidad de mutación puede influenciar directamente la estabilidad de los patrones durante los ciclos de replicación de una clona bacteriana. La velocidad de mutación, incluyen mutaciones puntuales, rearrreglos genéticos y transferencia horizontal de elementos genéticos móviles, como fagos y transposones, y es diferente de una especie bacteriana a otra (Olive y Bean, 1999).

Debido a la importancia clínica y epidemiológica del *S. aureus*, se han realizado numerosos estudios de tipificación molecular del *S. aureus*. Dentro de los métodos utilizados se encuentran: el análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Dong y col. 1997, VandenBergh y col. 1999, Van Leeuwen y col. 1996, Van Leeuwen y col. 1999); el análisis del polimorfismo longitudinal de fragmentos de restricción (RFLP) (Grady y col. 1999; Yugueros y col. 2001); así como una tipificación basada en el tamaño de los fragmentos del DNA por citometría de flujo (Larson y col. 2000); y recientemente, la tipificación por fragmentos de restricción de multilocus (MLRFT) (Diep y col. 2003). También se ha utilizado la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR), en su variante Multiplex, en donde se permite la identificación simultánea de los diferentes tipos y variantes del elemento *mec* en las cepas de *S. aureus* meticilina resistente (Henegariu y col. 1997).

Multilocus sequence typing (MLST) por sus siglas en inglés, es un método que permite la tipificación de aislados de especies bacterianas utilizando las secuencias de fragmentos internos de siete genes house-keeping. Se utilizan fragmentos de 450 a 500 pb de cada gen, para conocer con precisión la secuencia de ambas cadenas utilizando un secuenciador automático de ADN. Para cada gen house-keeping, las diferentes secuencias presentes dentro de una especie bacteriana se asignan como alelos distintos y para cada aislamiento, los alelos en cada uno de los siete loci permiten definir el perfil de alelos o tipo de secuencia (ST). La comparación de la secuencia nucleotídica se puede comparar en un sitio web <http://saureus.mlst.net/index.asp>. (Urwin y Maiden, 2003). Sin embargo, ha sobresalido la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y se le considera como el “estándar de oro” en la tipificación (Olive y Bean, 1999). La PFGE se ha utilizado ampliamente en la tipificación de cepas de *S. aureus* tanto en infecciones nosocomiales (Aires de Sousa y col. 2001; Dong y col. 1997; Hu y col. 1995; Mulvey y col. 2001; Shopsisin y Kreiswirth, 2001; VandenBergh y col. 1999), como en intoxicaciones alimentarias (Kluytmans y col. 1995; Monserrat y col. 1994).

Para una bacteria dada, la interpretación epidemiológica de los patrones de PFGE dependerá de las escalas de espacio y tiempo que uno considere. Para evaluar la evolución de los patrones de tipificación, se deben utilizar experimentos de periodos largos (hasta por varios años) de cultivo de los microorganismos *in vitro*. Sin embargo, esto no refleja las condiciones *in vivo* de transmisión y multiplicación de los microorganismos, por lo que se deben utilizar condiciones naturales de crecimiento de los microorganismos (Biedenback y col. 2004).

Por lo que en la actualidad se cuenta con una metodología poderosa para caracterizar molecularmente cepas de *S. aureus* de interés clínico o contestar preguntas relacionadas con el conocimiento básico del *S. aureus*.

## **Electroforesis en campos pulsados (PFGE).**

La PFGE, permite evaluar la mayor parte de DNA cromosomal, es hoy en día, la técnica que tiene el mejor poder discriminatorio y la mejor reproducibilidad, además de que permite tipificar la mayor cantidad de especies bacterianas, teniendo grupos clonales. Este método permite evaluar la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común, esta técnica también permite diferenciar aislamientos no relacionados (Maslow y Mulligan, 1996). Los métodos basados en PCR tienen la ventaja de ser más rápidos, más económicos y requerir infraestructura que está más ampliamente disponible; sin embargo, dan información de un sector reducido de DNA cromosomal de las bacterias y son menos reproducibles (Labarca, 2002).

Este método se fundamenta en que las moléculas de DNA se pueden separar en una matriz de agarosa sometidas a un campo eléctrico que se alterna en dos direcciones. La PFGE se considera la técnica de “estándar de oro” de los métodos de tipificación molecular. Esta técnica permite separar moléculas de DNA que tienen un tamaño entre 5 Kbp y hasta 10 Mpb. Las moléculas de diferentes tamaños difieren en la velocidad de separación y en la resolución dependiendo del peso molecular dado y se desplazan avanzando en dirección al polo positivo bajo la acción de un campo eléctrico. Cuando el campo eléctrico cesa, las moléculas de DNA se relajan recuperando su estado inicial. La aplicación de un segundo campo eléctrico, con una orientación distinta del primero, obliga al DNA a cambiar su conformación y reorientarse de nuevo para poder avanzar en la dirección del segundo campo eléctrico. Este principio fue el que llevó a la descripción de las técnicas de PFGE y su utilidad en la separación de moléculas grandes de DNA, del orden de varios cientos de kb (Schwartz y Cantor 1984).



## **Criterios para la interpretación de los patrones de PFGE de acuerdo a Tenover.**

Los patrones de PFGE obtenidos a partir de cepas analizadas pueden indicar el grado de relación que existe entre ellas. Por ejemplo, si una cepa es epidémica, los aislados deben tener patrones idénticos y fácilmente diferenciables de los aislamientos epidemiológicamente no relacionados. Sin embargo, con frecuencia cambios genéticos, que ocurren muchas veces de forma aleatoria, alteran el perfil de los patrones de la cepa epidémica en el curso de un brote.

En ocasiones, aislamientos no relacionados epidemiológicamente pueden presentar un genotipo idéntico o muy parecido, particularmente si pertenecen a una especie o subtipo con una diversidad genética limitada. Este es el caso de ciertos microorganismos multirresistentes, endémicos en ciertos hospitales o áreas sanitarias (por ejemplo, *S. aureus* resistente a meticilina) o de ciertos subtipos bacterianos que, en una especie dada, se han hecho más prevalentes en todo el mundo (por ejemplo, ciertos serotipos de *Streptococcus pneumoniae*). En estos casos puede ser difícil discernir si las cepas que se están estudiando pertenecen a un brote, especialmente si la cepa es endémica.

A la hora de interpretar los patrones de PFGE, debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón epidémico, que sería el más común entre los aislamientos. A continuación todos los otros patrones deben compararse con éste y a la vez entre sí. Es preciso contabilizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás, fragmento a fragmento (Singh y col. 2006; Tenover y col. 1995).

En función del número de diferencias entre dos patrones se clasifican los aislamientos según Tenover y col. (1995) en:

**Idénticos.** Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma clona.

**Genéticamente relacionados.** Cuando el número de bandas diferentes entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

**Posiblemente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de DNA; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos de tiempo (> 6 meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas. En estos casos, antes de llegar a una conclusión sería interesante analizar las características fenotípicas de los aislamientos, su sensibilidad antibiótica y aplicar otros marcadores genotípicos si fuera necesario.

**No relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clonas distintas, sin relación epidemiológica.

Esta clasificación de la relación genética entre microorganismos, pretende ser sólo orientativa. Es preciso individualizar cada situación, tener en cuenta otras

características de los microorganismos y sobre todo, la información epidemiológica que deriva de una investigación clínica cuidadosa (Tenover y col. 1995).

Se pueden también analizar los patrones de PFGE mediante sistemas informáticos que objetivan el número de diferencias entre dos aislamientos y les asignan una "distancia genética". En estos sistemas, se precisa captar la imagen del gel primero, normalizarlo e identificar las bandas que quieren ser incluidas en el análisis. Son sistemas muy útiles para analizar colecciones que incluyen muchos microorganismos.

## **HIPOTESIS.**

Se tiene un bajo porcentaje de cepas MRSA, en la comunidad mexicana.

*S. aureus* puede permanecer de manera persistente en la faringe.

Las cepas de *S. aureus* que se encuentra en la cavidad nasal son diferentes a las cepas que colonizan la faringe.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

*S. aureus* se localiza predominantemente en las narinas anteriores, donde el epitelio no es ciliado, a diferencia de las demás parte del sistema respiratorio, que presentan un epitelio ciliado. Una gran cantidad de individuos también son portadores de *S. aureus* en faringe y estos también representan una fuente de infección (Berkovitch y col. 2002, Christensen y col. 1977, Shopsin y col. 2001). Por lo tanto, no está claro si los portadores de *S. aureus* en faringe es un subgrupo de la población que puede mantener el *S. aureus* en este sitio anatómico, o si los microorganismos son sólo residentes temporales, y si estas bacterias son iguales o diferentes a las encontradas en la cavidad nasal. Además, los recientes reportes de cepas de *S. aureus* meticilina-resistentes aisladas en la comunidad han permitido la especulación de un cambio en la epidemiología de *S. aureus* (Brosera y col. 2006).

Por lo que se plantean tres preguntas:

1. ¿*S. aureus* puede permanecer de manera persistente en faringe o sólo es un residente temporal?
2. ¿Las cepas de *S. aureus* que se encuentran en cavidad nasal, son iguales o diferentes a las que colonizan la faringe?
- 3.- ¿Se encuentran cepas de *S. aureus* meticilina-resistentes, tanto MRSA como CA-MRSA, en la comunidad mexicana y en qué proporción se encuentran los portadores sanos de estas cepas?

El realizar una tipificación molecular de cepas de *S. aureus* aisladas de nariz y faringe de individuos aparentemente sanos de la comunidad, contestaría las preguntas aquí planteadas.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Identificación, caracterización molecular y determinación de factores de virulencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en una comunidad mexicana.

### **Objetivos Específicos.**

1. Analizar aspectos epidemiológicos de *S. aureus* en la población estudiada.
2. Determinar los patrones de resistencia a los antibióticos de las cepas de *S. aureus* aisladas.
3. Detectar cepas MRSA.
4. Realizar una tipificación molecular clonal de las cepas de *S. aureus* aisladas de la faringe y de la nariz.
5. Estudiar la persistencia de cepas de *S. aureus* en faringe.
6. Realizar la genotipificación del elemento *SCCmec* de las cepas de *S. aureus* Meticilina Resistentes (MRSA).
7. Detectar el gen de la exotoxina leucocidina Pantón-Valentine en las cepas MRSA aisladas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Población de estudio.**

Se llevó a cabo un estudio desde el año 1998 hasta el año 2006, en el Distrito Federal. Los voluntarios fueron seleccionados de locaciones a donde se pudiera llevar un estudio a largo plazo, como fueron escuelas y fábricas, las personas dieron el consentimiento para esto. Un grupo de voluntarios fue muestreado durante un periodo de 6 años. Los criterios de inclusión que se utilizaron fueron que no tenían que haber sido hospitalizados recientemente y también no debían tener enfermedades crónicas.

Se estudiaron 1243 voluntarios y se tomaron muestras de las narinas anteriores y de la faringe. Cuando sólo se aislaba *S. aureus* de una de las dos partes del voluntario, se clasificaban como portadores exclusivos de la nariz o de la faringe.

El rango de edad de los voluntarios fue de 1 a 96 años, con una media de edad de 21 años. 54% fueron mujeres y 46% fueron hombres. La población fue dividida en seis grupos con un rango de 10 años. El primero incluyó un rango de 1 a 10 años, el segundo de 11 a 20 años y así sucesivamente hasta los 50 años y el último grupo contiene a todos los individuos mayores de 50 años.

Por otro lado, se tomaron muestras de la garganta de 108 voluntarios a lo largo de seis años (1998 a 2003). Se definió como portador persistente a aquel individuo que fue infectado por *S. aureus* al menos por cinco años de manera continúa a lo largo de los 6 años del estudio y el portador intermitente al que fue portador de *S. aureus* en más de dos ocasiones pero no consecutivas, durante el tiempo que duró el estudio. Aquellos voluntarios que nunca presentaron *S. aureus* se consideraron como no portadores.

### **Cepas de Colección.**

Cepas control de *S. aureus* SCCmec tipo II y SCCmec tipo IV de la colección de cepas del Departamento de Evaluación de Vacunas del CISEI-Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

Además se emplearon como controles las cepas *S. aureus* ATCC BAA-44 (cepa Ibérica, SCCmec tipo I), *S. aureus* ATCC BAA41 (New York/Japón, SCCmec II), *S. aureus* ATCC BAA-39 (cepa Húngara, SCCmec tipo III) y *S. aureus* ATCC BAA-1556 (cepa USA 300, SCCmec tipo IV, luk<sup>+</sup>), *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 y *S. epidermidis* ATCC 14990. *S. aureus* NCTC 8325 fue la cepa control para PFGE.

### **Identificación de *Staphylococcus aureus*.**

Las muestras se obtuvieron con un hisopo de algodón estéril y fueron transportadas en tubos de caldo nutritivo de soya tripticaseína (Peptona de caseína 17.0g/L; Peptona de soya, 3.0g/L; Cloruro de sodio; 5.0g/L; Fosfato dipotásico 2.5g/L; Dextrosa, 2.5g/L pH final 7.3±0.2) (Bioxon). Las muestras se incubaron a 37°C durante toda noche. Posteriormente se sembraron en agar de sal y manitol (Extracto de carne 1.0g/L; Mezcla de peptonas 10.0g/L; Cloruro de sodio 75.0g/L; D-Manitol 10.0g/L; Agar 15.0g/L; Rojo de Fenol 0.025g/L; pH final 7.4±0.2) (Bioxon). Las colonias de los estafilococos coagulasa positiva aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante por la degradación del manitol. *Staphylococcus* spp. coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o rosado.

Las muestras también se sembraron en el medio de agar sangre (Bioxon) (Extracto de Levadura 5.0 g/L, infusión de musculo cardíaco 2.0 g/L, peptona de caseína 13 g/L, cloruro de sodio 5.0 g/L, Agar 15 g/L; pH final 7.4±0.2; adicionado con el 5% sangre de borrego). Las muestras, fueron incubadas a 37°C durante toda noche. Las colonias de estafilococos son redondas, blancas, bordes enteros, superficie lisa, brillantes, consistencia variable, sin olor y en algunas ocasiones, hemolíticas.

### **Pruebas Bioquímicas.**

#### **Prueba de coagulasa**

La prueba de coagulasa se llevó a cabo adicionando 0.3 mL de plasma humano (utilizando una mezcla de plasma de cinco individuos) a 0.8 mL de un cultivo de 24



horas en caldo soya tripticaseína de una cepa pura y se incubó a 37°C. Se debe de tener en cuenta que las muestras fuertemente positivas pueden producir el coágulo dentro de las primeras 4 horas, se debe entre las 3 y 4 horas de incubación, ya que después de este tiempo se pueden producir fibrinolisinias que pueden romper el coágulo y dar falsos negativos. Cabe mencionar que pueden existir cepas que producen una reacción de coagulasa débil. Se consideró la reacción positiva si se presentaba cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo en el tiempo estipulado (Koneman y col. 2001).

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

La catalasa cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba se llevó a cabo colocando una asada del microorganismo en un portaobjetos, se agregó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (recién preparada) y se observó la liberación de burbujas de oxígeno.

#### **Identificación de estafilococos mediante galerías API Staph System.**

La identificación de los aislados de estafilococos se realizó utilizando las galerías API Staph System (bioMérieux, France), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizó un precultivo en una caja de agar soya tripticaseína, se incubó de 18 a 24 horas a 37°C. Se abrió una ampollita de medio API Staph y se preparó una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 de McFarland. Con la ayuda de una pipeta, se rellenaron los microtubos y no las cúpulas, sin sobrepasar el nivel del tubo de las galerías previamente armadas en su cámara de incubación. Se debe crear anaerobiosis en las pruebas ADH y URE, rellenando la cúpula con aceite de parafina para provocar un menisco convexo. Las galerías se incubaron durante 18 a 24 horas a 37°C. Después de la incubación, se llevaron a cabo las siguientes reacciones:

Prueba de VP (Voges-Proskauer). Agregar una gota de reactivos VP1 y VP2. Un color violeta indica la reacción positiva.

Prueba de NIT. Agregar una gota de reactivo NIT 1 y otra gota de reactivo NIT 2. Esperar 10 minutos, un color rojo indica la reacción positiva.

Prueba PAL. Colocar una gota de reactivo de ZYM A y ZYM B. Esperar 10 minutos, un color violeta indica una reacción positiva.

Al final se obtuvo un perfil numérico de acuerdo a las reacciones que resultaron positivas. El perfil numérico se comparo en la página <http://apiweb.org>.

### **Conservación de las cepas de *Staphylococcus aureus*.**

Las cepas se conservaron en congelación en caldo soya tripticaseína con glicerol al 20% a -70°C. Para recuperarlas se sembraron en caldo soya tripticaseína, se incubaron a 37°C, durante 24 horas y posteriormente fueron resembradas en agar sal manitol e incubadas a 37°C durante 24 horas. Se verificó la morfología colonial y celular.

### **Determinación de patrones de resistencia a los antibióticos.**

#### **Identificación de cepas MRSA.**

La sensibilidad a la oxacilina se determinó por los siguientes métodos: difusión por discos; screening en agar Mueller-Hinton con oxacilina 6 ug/mL y NaCl al 4% y concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar a diferentes concentraciones de oxacilina hasta 516 µg/mL (CLSI, 2006). Se consideraron cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina sensibles (MSSA) aquellas que presentaron una resistencia a la oxacilina  $\leq 2\mu\text{g/mL}$  y cepas MRSA aquellas con una resistencia a la oxacilina  $\geq 4\mu\text{g/mL}$ , según las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2006).

### **Susceptibilidad antimicrobiana.**

#### **Método de Kirby-Bauer.**

Las cepas de *S. aureus* aisladas fueron examinadas para la resistencia a diferentes antibióticos. La susceptibilidad fue determinada por difusión de discos de antibióticos en agar Mueller-Hinton, de acuerdo al método recomendado por el Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínica (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2006) manual M7-A9. Se utilizaron discos (BD BBL Sensi-Disc;

Becton Dickison and Comp. Sparks MD). Las concentraciones de los discos fueron penicilina (10U); eritromicina (15 µg); gentamicina (10 µg); cefalotina (30 µg); trimetropim-sulfametoxazol (25 µg); fosfomicina (50 µg); ciprofloxacina (5 µg); tetraciclina (30 µg); clindamicina (2 µg); oxacilina (1 µg) y vancomicina (30 µg).

Las cepas control que se utilizaron fueron *S. aureus* ATCC 29213 (sensible a la oxacilina) y *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a la oxacilina).

#### **Método de Cribado (screening en placa en agar sal-oxacilina).**

Para la detección de cepas MRSA se realizó un screening de acuerdo al método del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006), M7-A7 Vol. 26. No. 2. Se utilizó agar Mueller-Hinton adicionado con oxacilina 6 µg/mL y NaCl al 4%. Se inocularon las placas de agar Mueller-Hinton con una suspensión bacteriana en caldo soya tripticaseína a una concentración de 0.5 McFarland, se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C y se verificó el crecimiento que presentaban en este medio. Las cepas control que se utilizaron fueron *S. aureus* ATCC 29213 (sensible a la oxacilina) y *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a la oxacilina).

#### **Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).**

Se preparó agar Muller-Hinton con NaCl al 4%, adicionado con oxacilina a diferentes concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 32, 64, 128, 256 y 516 µg/mL. Con estas concentraciones se puede determinar si las cepas presentan resistencia heterogénea o resistencia homogénea, se consideran cepas con resistencia heterogénea cuando se tiene una resistencia menor a 16 µg/mL de oxacilina y una resistencia homogénea cuando las cepas presentan una resistencia mayor a esta concentración. Se preparó un inóculo ajustando la suspensión bacteriana a 0.5 de McFarland en un tubo con caldo soya tripticaseína (Bioxon) utilizando un Densitómetro celular bioMérieux. Para la inoculación, se utilizó un hisopo estéril y se sembró en un cuadrante de la placa dividida en 9. Las placas ya inoculadas se incubaron a 37°C, durante 24 horas. Se utilizó la cepa control de *S. aureus* ATCC 25923 (sensible a la oxacilina) y *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a la oxacilina). Esta prueba se realizó de acuerdo a lo indicado

por los lineamientos del CLSI del año 2006, sin embargo, en los lineamientos actuales del CLSI del 2010, se recomienda colocar una alícuota de 10  $\mu$ L del inóculo bacteriano en el área del agar Mueller-Hinton con oxacilina.

#### **Extracción de DNA Genómico.**

Las bacterias de *S. aureus* se crecieron en 5 mL de caldo soya tripticaseína y se incubaron con agitación a 37°C, durante 16 a 18 horas. El DNA genómico de las cepas se extrajo utilizando el equipo comercial Wizard® Genomic DNA Purification de Promega (No. Catálogo A1123), siguiendo las recomendaciones del proveedor, a la extracción se le agregó 5  $\mu$ L de solución de lisostafina (Sigma) 0.5  $\mu$ g/mL.

El DNA obtenido se cuantificó y se evaluó la pureza por espectrofotometría, las absorbancias se leyeron a 230 nm, 260 nm y 280 nm. Se analizó la integridad del DNA corriendo 5 $\mu$ L del DNA extraído en geles de agarosa al 1%, TAE 1X (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA), a 90 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg/mL concentración final) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta, el DNA se guardó a -20°C hasta el momento de utilizarlo.

#### **Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa.**

Se corrieron electroforéticamente los productos de amplificación de los genes *nucA*, gen *mecA*, gen *lukPV*; en un gel de agarosa al 1% con TBE al 0.5X (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA), el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL concentración final) y se visualizó en un transiluminador marca BioRad. La purificación se llevó a cabo utilizando un equipo comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Marca Promega, (No. de Catálogo A9281), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se cortó el gel de agarosa adonde se encuentra la banda que se requiere purificar, se colocó en un tubo de microcentrífuga y se le agregaron aproximadamente 150  $\mu$ L de solución de Membrane Binding, en una relación de 10  $\mu$ L por 10 mg de agarosa. Se mezcló y se incubó a 50° a 65°C por 10 minutos hasta la disolución de la agarosa. Se transfirió el contenido del tubo de microcentrífuga a la columna

de purificación SV Minicolumna ensamblada en otro tubo de microcentrifuga (tubo de colección) y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó la SV Minicolumna ensamblada en una microcentrifuga a 14000 rpm durante 1 minuto. Se removió la SV Minicolumna y descartó el líquido del tubo de colección. Se regresó la SV Minicolumna al tubo de colección, posteriormente se lavó la columna adicionando 700 µL de solución Membrane Wash, que previamente se diluyó con etanol al 95%, la SV Minicolumna nuevamente se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm. Se repitió el lavado con 500 µL y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 14000 rpm.

Se transfirió la SV Minicolumna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm. Se retiró la SV Minicolumna y se congeló el tubo de microcentrifuga que contiene el DNA eluido a 4°C o 20°C. Se realizó nuevamente una electroforesis para poder tener una referencia de concentración y tamaño para proceder a la secuenciación.

#### **Detección de genes por PCR.**

#### **Detección del gen *nucA* por PCR.**

Las cepas de *S. aureus* producen una enzima extracelular, la nucleasa termoestable (termonucleasa [TNase]) con una frecuencia similar a la que se produce la enzima coagulasa. Por lo que se utiliza la detección del gen *nuc* como control de la especie *aureus*. Para la detección de este gen se utilizaron los iniciadores que se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen *nucA*.**

| <b>Nombre</b>   | <b>Secuencias de los iniciadores</b> | <b>Tamaño de Amplificado</b> |
|-----------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>nuc</i> A fw | 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTI-3'          | 447 pb                       |
| <i>nucA</i> rev | 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'       |                              |

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador marca (BioRad) usando Go *Taq*® Flexi DNA Polimerasa (Promega). La mezcla de la reacción se llevo a cabo en un volumen final de 20 µL. Se utilizó buffer 1X de amplificación

para PCR, 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 8  $\mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores *nucA* Fw y *nucA* Rev (solución de 20  $\mu\text{M}$ ), 4  $\mu\text{L}$  de cada desoxinucleótidos trifosfatos, 0.16  $\mu\text{L}$  de *Taq*. polimerasa (5 U/  $\mu\text{L}$ ).

Las condiciones de corrida de la PCR fueron: desnaturalización por 5 min, 37 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 30 s y una extensión a 72°C por 90 s posteriormente se llevó a cabo una extensión final a 72°C por 5 min (Brakstad y col. 1992).

Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TBE 0.5X (Tris, 50 mM, ácido bórico 50 mM y EDTA 0.2 mM, a pH 8) y posteriormente fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL concentración final). La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta marca Gel Doc XR de Bio-Rad, usando el software Quantity One para capturar la imagen.

#### **Detección del gen *mecA* por PCR.**

La determinación del gen *mecA*, se realizó mediante PCR. Se utilizaron iniciadores diseñados con el programa Primer3 Output. Se utilizó la secuencia nucleotídica del gen *mecA* con número de acceso: Gene ID. 2861157.

Para cada reacción de PCR se utilizaron los componentes para un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , utilizando 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM de cada uno de los dNTP's (200  $\mu\text{M}$ ), en el caso de los iniciadores *mecA* Fw y *mecA* Rev a una concentración de 800 nM, 1 U/ $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase Promega (No. catálogo M8291), y aproximadamente 5 ng de DNA de las muestras. La secuencia de los iniciadores se muestra en la Tabla 6.

Las condiciones para realizar la PCR fueron: Pre-desnaturalización a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s, y elongación a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min.

**Tabla 6. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen *mecA*.**

| Iniciadores    | Secuencias                  | Tamaño del amplificado |
|----------------|-----------------------------|------------------------|
| <i>mecA</i> Fw | 5'CTTTGCTAGAGTAGCACTCG 3'   | 500 pb                 |
| <i>mecA</i> Rv | 5'GCTAGCCATTCCCTTTATCTTG 3' |                        |

También se utilizó la reacción de PCR, descrita por Oliveira y Lencastre en 2002, utilizando los iniciadores MECA P4 y MECA P7, previamente diseñados por las secuencias del gen *mecA* con No. de acceso Y00688, que se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen *mecA*. (Oliveira y Lencastre. 2002).**

| Iniciadores | Secuencias                  | Tamaño del amplificado |
|-------------|-----------------------------|------------------------|
| MECA P4     | 5'TCCAGATTACAACCTTCACCAGG3' | 162 pb.                |
| MECAP7      | 5' CCACTTCATATCTTGTAACG3'   |                        |

En cada reacción los componentes agregaron para un volumen final de 25  $\mu$ L, utilizando buffer de amplificación 1X, 1.5 mM de  $MgCl_2$ ; 200  $\mu$ M de cada dNTP's, los iniciadores MECAP4 y MECAP7a una concentración de 800 nM, *Taq* polimerasa 1 U/ $\mu$ L y aproximadamente 5 ng de DNA de las muestras.

Las condiciones para la PCR fueron: Pre-desnaturalización a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 30 s, y elongación a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min.

El control utilizado para la reacción fue: control positivo *S. aureus* ATCC 43300 y control negativo *S. aureus* ATCC 29213 (*mecA*<sup>-</sup>, *oxa*<sup>-</sup>).

Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando buffer TBE 0.5X (Tris, 50 mM, ácido bórico 50 mM y EDTA 0.2 mM, a pH 8) y posteriormente fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL concentración final). La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta marca Gel Doc XR de Bio-Rad, usando el software Quantity One para capturar la imagen.

Los productos se purificaron con el equipo comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Marca Promega, (No. de Catálogo A928), se mandaron secuenciar en el Lab. de Biología Molecular, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y en la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Se analizó el alineamiento de la secuencia del gen *mecA*, utilizando el programa de análisis de secuencias BLAST del Genbank y en la página <http://www.staphylococcus.net/>. Departamento de Bacteriología, de la Escuela de Medicina, Universidad de Juntendo, Japón.

### Detección del gen de la exotoxina Leucocidina Panton-Valentine por PCR.

Para detectar la presencia del gen de la toxina Leucocidina Panton- Valentine (PVL), en una reacción de PCR en todas las cepas previamente identificadas como MRSA, se utilizaron los iniciadores para PVL que se muestran en la tabla 8. Las condiciones se mencionan en Lina, 1999.

**Tabla 8. Secuencias de los iniciadores que amplifican los genes de la exotoxina Leucocidina Panton- Valentine (PVL).**

| Iniciador       | Secuencias                           | Tamaño Amplificado |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------|
| <i>lukPVL-1</i> | 5'ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3' | 433 pb             |
| <i>lukPVL-2</i> | 5' GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC-3'.   |                    |

La cepa control para la detección del gen *lukPV* fue *Staphylococcus aureus* meticilina resistente ATCC BAA1556 (cepa USA 300, SCC*mec* Tipo IV, LKP<sup>+</sup>) y *S. aureus* ATCC BAA 1680 (SCC*mec* IV, LKP<sup>+</sup>).

Los productos de PCR se analizaron y separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando buffer TBE 0.5X (Tris, 50 mM, ácido bórico 50 mM y EDTA 0.2 mM, a pH 8) y posteriormente fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL concentración final). La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta marca Gel Doc XR de BioRad), usando el software Quantity One para capturar la imagen.



Los productos de PCR se purificaron utilizando una columna Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se mandaron secuenciar utilizando los oligonucleótidos *lukPVL-1* y *lukPVL-2*, en la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en un secuenciador, Mod. 3100, de Applied BioSystems.

Se analizó el alineamiento de la secuencia del gen *lukPV* utilizando el programa de análisis de secuencias BLAST del Genbank.

### **Identificación y Genotipificación del elemento *SSCmec*.**

Para realizar la identificación del elemento *SSCmec* se utilizó una PCR multiplex descrita por Henegariu y col. y las modificaciones propuestas por Oliveira y Lecastre, 2002. La PCR Multiplex se realizó en un volumen final de 25 µl, buffer 1X de GoTaq® Flexi, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 400 nM de los iniciadores CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 F13, pUB110 R1 y pT181 R1; 800 nM de los iniciadores DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7, y IS431 P4; y 200 nM de los iniciadores KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 y RIF4 R9; 1.25 U GoTaq® Hot Start Polymerasa (Promega) y aproximadamente 5 ng de DNA. La secuencia nucleotídica de los iniciadores se muestran en la tabla 9. Las condiciones del termociclador son: 94°C por 4 min, seguido de .30 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por min y una post-extensión de 4 min a 72°C.

**Tabla 9. Secuencias de los iniciadores que amplifican los diferentes tipos de SCCmec. (Oliveira, 2002).**

| Locus       | Iniciadores           | Secuencia de ( 5'-3')                              | Localización  | Tamaño del Amplicon (pb) | Tipo SCCmec     |
|-------------|-----------------------|--|---|--------------------------|-----------------|
| A           | CIF2 F2<br>CIF2 R2    | TTCGAGTTGCTGHATGAAGAGGG<br>ATTTACCACAAGGACTACCAAGC | 18398-18419 <sup>a</sup><br>18892-18871 <sup>a</sup>  | 495                      | I               |
| B           | KDP F1<br>KDP R1      | AATCATCTGCCATTGGTGATGC<br>CGAATGAAGTAAAAGAAAGTTGG  | 10445-10467 <sup>b</sup><br>10728-10707 <sup>b</sup>  | 284                      | II              |
| C           | MEC1 P2<br>MEC1 P3    | ATCAAGACTTGCATTCAGGC<br>GCGGTTTCAATTCATTGTC        | 42428-42244 <sup>b</sup><br>42636-42617 <sup>b</sup>  | 209                      | II, III         |
| D           | DCS F2<br>DCS R1      | CATCCTATGATAGCTTGGTC<br>CTAAATCATAGCCATGACCG       | 38011-37992 <sup>a</sup><br>37670-37689 <sup>a</sup>  | 342                      | I, II, IV       |
| E           | RIF4 F3<br>RIF4 R9    | GTGATTGTTTCGAGATATGTGG<br>CGCTTTATCTGTATCTATCGC    | 45587-45607 <sup>c</sup><br>45829-45809 <sup>c</sup>  | 243                      | III             |
| F           | RIF5 F10<br>RIF5 R13  | TTCTTAAGTACACGCTGAATCG<br>GTCACAGTAATCCATCAATGC    | 59573-59594 <sup>c</sup><br>59986-59965 <sup>c</sup>  | 414                      | III             |
| G           | IS431 P4<br>pUB110 R1 | CAGGTCTCTTCAGATCTACG<br>GAGCCATAAACACCAATAGCC      | 49963-49982 <sup>b</sup><br>50343-50323 <sup>b</sup>  | 381                      |                 |
| H           | IS431 P4<br>pT181 R1  | CAGGTCTCTTCAGATCTACG<br>GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC      | 29654-29673 <sup>c</sup><br>29976- 29956 <sup>c</sup> | 303                      |                 |
| <i>mecA</i> | MECA P4<br>MECA P7    | TCCAGATTACAACCTCACCAGG<br>CCACTTCATATCTTGTAACG     | 1190-1211 <sup>d</sup><br>1351-1332 <sup>d</sup>      | 162                      | Control Interno |

<sup>a</sup> No. de Acceso AB033763, Tipo SCCmec I. (Ito. y col. 1999).

<sup>b</sup> No. de Acceso D86934, Tipo SCCmec II. (Ito y col. 2001).

<sup>c</sup> No. de Acceso AB037671, Tipo SCCmec III. (Ito y col. 2001).

También se realizó la PCR multiplex para la tipificación del SCCmec descrita por Boye y col. en 2007. La PCR se llevó en un volumen final de 25 µl, utilizando 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada uno dNTP's (10 mM), en el caso de los iniciadores β y α3 a una concentración de 0.2 µM cada uno, *ccrCF* y *ccrCR* 0.25 µM, 1272F1 y 1272R1 , 0.08 µM y 5RmecA y 5R431 de 0.1 µM, se utilizó 1 U/µl de Hot-Start-Taq<sup>®</sup> DNA Polimerasa (Promega) y aproximadamente 5 ng de DNA de las muestras. La secuencia de los iniciadores se muestra en la Tabla 10.

Las condiciones para la PCR fueron: Pre-desnaturalización a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 60 s y elongación a 72°C por 1 min con una final extensión a 72°C por 5 min.

**Tabla 10. Iniciadores usados para del PCR multiplex y el resultado de los patrones de los diferentes tipos de SCCmec I al V (Boye, 2007).**

| Iniciadores  | Secuencias de los (5'-3')                 | Tamaño del Amplicón | Secuencia blanco       | Tipos de SCC mec |    |     |    |   |
|--------------|---|---------------------|------------------------|------------------|----|-----|----|---|
|              |   |                     |                        | I                | II | III | IV | V |
| $\beta$      | ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT <sup>a</sup>       | 937 pb              | <i>ccrA2-B</i>         | X                |    |     | X  |   |
| $\alpha 3$   | TAAAGGCATCAATGCACAAACT <sup>a</sup>       |                     |                        |                  |    |     |    |   |
| <i>ccrCF</i> | CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT <sup>b</sup>  | 518 pb              | <i>ccrC</i>            |                  |    | X   |    |   |
| <i>ccrCR</i> | CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT <sup>b</sup> |                     |                        |                  |    |     |    |   |
| 1272F1       | GCCACTCATAACATATGGAA <sup>c</sup>         | 415 pb              | IS1272                 | X                |    |     | X  |   |
| 1272R1       | CATCCGAGTGAAACCCAAA <sup>c</sup>          |                     |                        |                  |    |     |    |   |
| 5RmecA       | TATACCAAACCCGACAACACTAC <sup>c</sup>      | 359 pb              | <i>mecA</i> -<br>IS431 |                  |    |     |    | X |
| 5R431        | CGGCTACAGTGATAACATCC <sup>c</sup>         |                     |                        |                  |    |     |    |   |

a. Ito y col. 2001.

b. Ito y col. 2004.

c. Boye y col. 2007.

Los productos de PCR se analizaron y separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, utilizando buffer TBE 0.5X (Tris, 50 mM, ácido bórico 50 mM y EDTA 0.2 mM, a pH 8) y posteriormente fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL concentración final). La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta marca BioRad). El tipo de SCCmec fue determinado con los perfiles de bandas obtenido.

Se utilizaron para ambas PCR multiplex, las cepas control de *S. aureus* SCCmec tipo II y SCCmec tipo IV de la colección de cepas del departamento de evaluación de vacunas del CISEI-INSP. Las cepas *S. aureus* ATCC BAA-44 (cepa Ibérica, SCCmec tipo I), *S. aureus* ATCC BAA41 (cepa New York/ Japón SCCmec tipo II), *S. aureus* ATCC BAA-39 (cepa Húngara, SCCmec tipo III) y *S. aureus* ATCC BAA-1556 (cepa USA 300, SCCmec tipo IV).

## **Electroforesis de campos pulsados (PFGE)**

El análisis del genotipo de las cepas de MRSA por PFGE se realizó con la metodología propuesta por Mulvey y col. (Oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (2001).

Se cultivo una colonia de cada cepa en tubos con 5mL de caldo soya tripticaseína con el fin de obtener un cultivo joven de bacterias y su DNA en excelentes condiciones, se incubó toda la noche a 37°C y se agitó a 100 rpm.

Se verificó la densidad óptica a 610 nm para tener una concentración equivalente de  $1 \times 10^9$  bacterias/mL o una concentración McFarland de 3. Se tomaron 300µL de cultivo en tubos de microcentrifuga estéril de 1.5mL. Se centrifugó a 13000 rpm por 4 minutos y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 500µL de buffer PIV (10mM Tris base, 1M NaCl, pH 7.6), se centrifugó a 13000 r.p.m. por 4 minutos, se retiró el sobrenadante, y se verificó que el paquete celular midiera aproximadamente 2mm de diámetro. Se adicionaron 150µL de buffer PIV y se incubó a 50°C por 5 minutos. Se agregaron 150µL de agarosa de bajo punto de fusión (Certified™ de Bio-Rad) 1.6% en buffer PIV, se mezcló completamente el paquete celular con el pipeteo. Se depositó la agarosa con las células en los moldes dejando un menisco y se refrigeró por 15 minutos a 4°C.

Los bloques de agarosa se colocaron en un tubo de 1.5mL de microcentrifuga. Se adicionaron 500µL de buffer de Lisis Celular [6mM Tris pH 7.6, 100mM EDTA, 51M NaCl, 5.0g Brij 58 (polioxietilen 20 cetyl ether), 17mM Lauril Sarcosil de Sodio (pH 7.6); 0.05mg/mL de Ribonucleasa A, 1.0 mg/mL de Lisozima, 50µg/mL de lisostafina]. Se incubó a 35°C toda la noche. Posteriormente se lavó con buffer TE 1X (TE 10X: 50mM Tris pH 7.6, 50mM EDTA pH 7.5) y se adicionaron 500µL de buffer ESP (398mM EDTA, 34mM Lauril Sarcosil de Sodio, 500mg Proteínasa K) y se incubó a 50°C toda la noche. A continuación se lavó con TE 1X, incubándose por 30 minutos a 35°C, este lavado se repitió de 3 a 5 veces (mantener el bloque en TE 1X). Medio bloque se dejó estabilizando durante 30 minutos con el buffer J de la enzima de restricción 10X [100mM Tris-HCl, 70 mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl, 10mM DTT (1-4 Dithiothreitol) pH 7.5].

La digestión enzimática se llevó a cabo con 25 U de la enzima de restricción *Sma* I, a temperatura ambiente durante toda la noche.

Se prepararon 100mL de agarosa al 0.8% para PFGE (Pulsed Field Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade Agarosa, Bio-Rad) en TBE 0.5X. Una vez solidificado el gel se incorporaron los bloques en los pozos y se aplicó una capa de agarosa al 2% como un sellador. La corrida se realizó en el equipo de electroforesis con campos pulsados CHEF-RD® II de Bio-Rad. El buffer de corrida fue TBE 0.5X, con las siguientes condiciones: voltaje 6 volts, cambio de orientación inicial 5s, final 45s, durante 21h. Posteriormente se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL concentración final), por 20 minutos y se observó en un Transiluminador Gel Doc XR de Bio-Rad, usando el software Quantity One para capturar la imagen.

#### **Análisis de los patrones de PFGE**

Los patrones se normalizaron utilizando el patrón de la cepa de *S. aureus* NCTC 8325 y las cepas de la colección del Departamento de Evaluación de vacunas del CISEI-INSP. Para el análisis de los geles se utilizó el Software Gene Tools de Syngene versión 3.07. Los patrones de la PFGE se analizaron con el software Gene Directory de Syngene versión 1.02.0, utilizando el coeficiente de similitud de Dice y para el dendograma el método de medias aritméticas por pares no ponderados (Unweighted Pair Group Method of Averages; UPGMA) con un límite de tolerancia del 1.25%. Se designaron los tipos en función de una o más diferencias en las bandas entre cepas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Portadores de *Staphylococcus aureus*.

En el período de 1998 a 2006, se aislaron e identificaron cepas de *Staphylococcus aureus* a partir de 1243 voluntarios sanos de una población mexicana. Las cepas de *Staphylococcus aureus* se aislaron en placas de medio de agar sal manitol y agar sangre. Se confirmó la pureza de los cultivos. A todas las cepas que presentaron las características morfológicas de dicha bacteria, se les realizaron las pruebas de catalasa y coagulasa, aquellas cepas que dieron positivas las pruebas se confirmó la identificación para *Staphylococcus aureus* mediante las galerías API Staph System.

Se encontró que 743 voluntarios eran portadores sanos de este microorganismo, que corresponde al 59.8% del total de la población estudiada y no portadores al 40.2% como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de portadores de *Staphylococcus aureus*.

| Tipo de Portadores           | No. de voluntarios (n= 1243) | Porcentajes          |            |
|------------------------------|------------------------------|----------------------|------------|
|                              |                              | Total de Voluntarios | Portadores |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 743                          | 59.8                 | 100        |
| Nasal                        | 461                          | 37.1                 | 62         |
| Faringe                      | 578                          | 46.5                 | 77.8       |
| Nasal y Faringe              | 296                          | 23.8                 | 39.8       |
| Nasal exclusivamente         | 165                          | 13.3                 | 22.2       |
| Faringe exclusivamente       | 282                          | 22.7                 | 38         |
| MRSA                         | 107                          | 8.6                  | 14.4       |

Se encontró que *S. aureus* coloniza la faringe en un porcentaje del 46.5% que es un porcentaje más alto que el de la colonización de la nariz, que es del 37.1% ( $P < 0.001$ ), esto es muy importante porque Kluytmans y col. en 1997 y Lowy en 1998 reportan que las narinas anteriores es uno de los sitios principales de colonización primaria, donde alrededor del 30% de las personas sanas son portadores de esta bacteria, en este trabajo se reporta un porcentaje de

colonización más elevado en la faringe. El 39.8% de la población estudiada comparten la colonización de *S. aureus* en las dos cavidades nariz y faringe. Los resultados reportados por Nilsson y Ripa en el 2006, concuerdan con los obtenidos en este trabajo, estos investigadores hicieron un estudio en el 2003, en donde la población en estudio eran pacientes de una unidad de ortopedia en Suecia y encontraron que *S. aureus* fue aislado en el 48% de la población de cualquiera de los dos sitios nariz o faringe. El 40% eran portadores faríngeos de *S. aureus*, mientras que tan solo el 31% eran colonizados en la cavidad nasal ( $P = 0.037$ ). Esta similitud es importante debido a que este hecho se repite pesar de las diferencias respecto a las condiciones sociales y económicas que imperan entre Suecia y México.

De los 743 portadores de *S. aureus*, 296 (39.8%) fueron portadores de este microorganismo en la nariz y faringe al mismo tiempo; 165 (22.2%) portadores exclusivos de la nariz y 282 (38%) fueron portadores exclusivos de la faringe (Tabla 11).

La presencia de *S. aureus* en las narinas fue mayor en los hombres (40.9%) que en las mujeres (33.9%;  $P = 0.011$ ). También se encontró que el mayor grupo de edad que presentaba colonización de este microorganismo eran los comprendidos entre 1 a 10 años con un 45.9%, mientras que otros grupos de edad presentan un porcentajes entre el 31 a 37%;  $P = 0.0077$ . El mismo análisis se realizó para los portadores de la faringe y se encontró un porcentaje de 50,82% para el grupo de las edades entre 1 a 10 años mientras que para las edades entre 11 y 20 fue 50,39%. Los otros grupos de edades presentaron porcentajes entre el 33 y el 43% ( $P = 0,0077$ ).

Las personas que son portadores nasales son más propensas a ser también portadores faríngeos, (OR = 3,09,  $P < 0,0001$ ). Esta asociación se incrementa cuando los portadores son menores de 19 años de edad (OR = 1.3,  $P = 0,029$ ).

Estos resultados indican que es importante muestrear no sólo la nariz, también otros sitios de colonización, como puede ser la zona perianal, zona inguinal,

axilas, vagina, sobre todo para personas que están involucradas en áreas hospitalarias, en preparación de alimentos, etc.

### **Susceptibilidad antimicrobiana.**

Cuando se analizó la susceptibilidad antimicrobiana mediante la prueba de difusión en disco (Figura 5), se encontró que las cepas de *S. aureus* aisladas presentaban resistencia para varios antimicrobianos. Se detectó un porcentaje de resistencia muy elevado para la penicilina (91%), para la eritromicina 23.1%, oxacilina 15.9%, tetraciclina 15.5%, cefalotina del 7.1%, y clindamicina del 6.2%. Cuando se probó para ciprofloxacina, fosfomicina, trimetoprim-sulfametoxazol y gentamicina, la resistencia fue menor al 2%. Sólo una cepa de *S. aureus* (66F) presentó una resistencia intermedia a la vancomicina. Estos resultados son muy similares a los descritos por otros autores (Hernández y col. 2003). A nivel mundial se reporta que las cepas de *S. aureus* sólo son sensibles a la penicilina en aproximadamente un 5%. Aires de Souza reportó en el año 2001 que la clona de MRSA hospitalaria (I::NH::M) predominante que circulaba en México presentaba una resistencia del 100% a la penicilina, del 100% a la oxacilina y del 79% a la gentamicina, dicha cepa fue recobrada en un hospital pediátrico. Es importante conocer el fenotipo de resistencia antimicrobiana que presentan los aislados de *S. aureus*, para poder predecir si se trata de una cepa epidémica y poder sugerir un tratamiento.



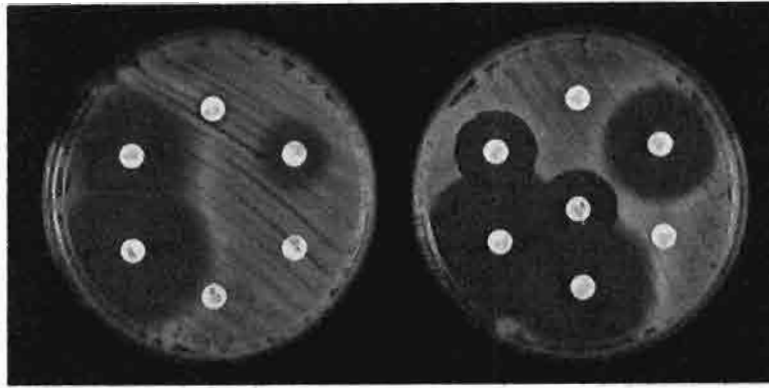


Figura 5. Antibiograma de *S. aureus* realizado mediante difusión en discos para los antibióticos: penicilina (P 10), oxacilina (OX 1), eritromicina (E 15), gentamicina (GM 10), tetraciclina (TE 30), cefalotina (CF 30) , clindamicina (CC 2) vancomicina (VA 30) y ciprofloxacino (CIP 5).

El 15.9% de las cepas de *S. aureus* aisladas resultaron ser resistentes a la meticilina mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Además, se encontraron cepas que presentaban resistencia a más de dos antibióticos, esto es, cepas multiresistentes.

#### Identificación de Cepas MRSA.

##### Concentración inhibitoria mínima (CIM) para oxacilina.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima a la oxacilina de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas. Se consideraron como cepas MRSA a las bacterias que presentaron una concentración inhibitoria mínima mayor o igual a 4µg/mL de oxacilina de acuerdo a los estándares del CLSI (2006). En la Figura 6 se puede observar un ejemplo de la prueba realizada. Esta prueba se realizó utilizando un hisopo de algodón para colocar la muestra, sin embargo en los nuevos lineamientos de CSLI del 2010, se recomienda colocar una alícuota de 10 µL del inóculo previamente estandarizado sobre el área de la caja de agar Mueller-Hinton con oxacilina.

Mediante el CIM se encontró que de las 1039 cepas de *S. aureus* aisladas de la población estudiada, 908 (87.4%) fueron MSSA y 131 (12.6%) resultaron ser MRSA.

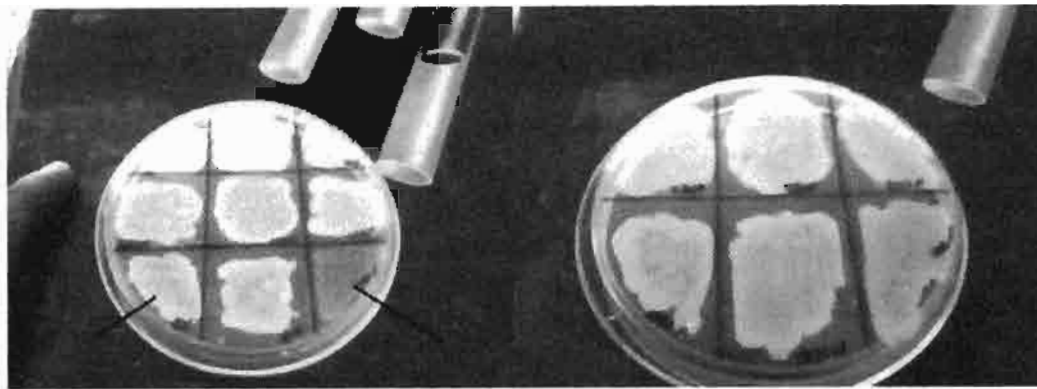


Figura 6. Determinación de la concentración inhibitoria mínima para oxacilina de las cepas de *Staphylococcus aureus*.

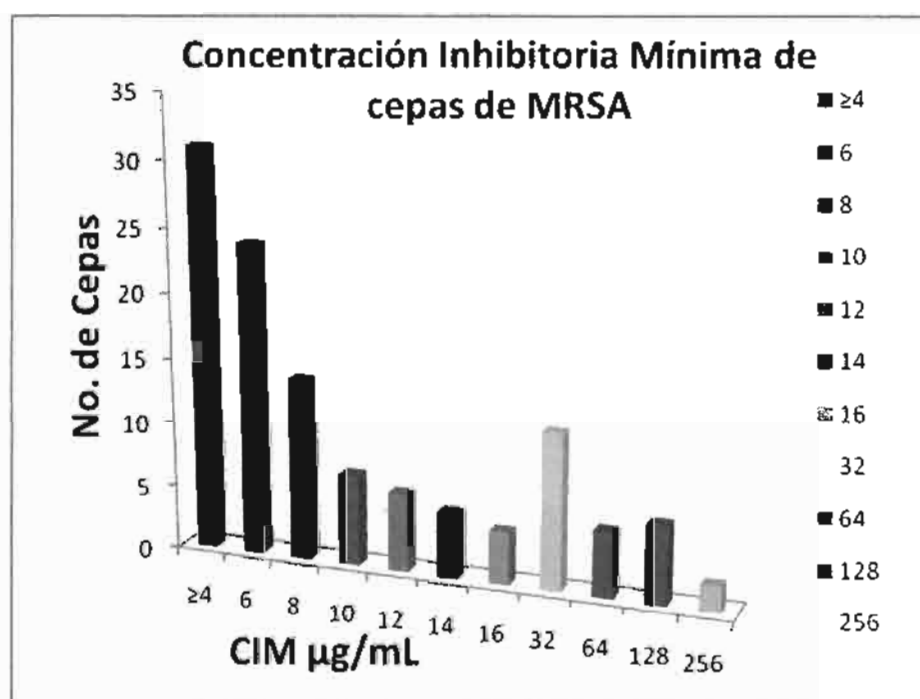
En la grafica 1, se muestra la frecuencia del número de cepas con respecto a las diferentes concentraciones inhibitorias mínimas para la oxacilina. De las 131 cepas aisladas de *S. aureus* meticilina resistentes el 77.6% presentaron una resistencia heterogénea y el 22.4% presentaron una resistencia homogénea.

Tomaz y col., definieron en 1991, cuatro clases de expresión fenotípica de resistencia a la meticilina, la clase 4, que es definida por una resistencia homogénea de alto nivel (CIM > 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y las clases 1, 2 y 3 con resistencia heterogénea con una resistencia a la meticilina de CIM de 1.5 a 3; 6 a 12 y 50 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente. Sin embargo, en este estudio no se encontraron cepas con resistencia mayor a 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo que se siguieron los criterios establecidos por Hartman y Tomasz en 1986.

Sader y col. en 1997 realizó un estudio sobre resistencia a los antimicrobianos de los agentes patógenos causantes de infecciones nosocomiales y comunitarias en América Latina, encontró que un 29.2% de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la meticilina (Sader y Jones, 2000). Reyes y col. mencionan una investigación de infecciones invasivas en 11 Hospitales de Chile, que encontraron un 40% de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, así como dos estudios en Hospitales cubanos en donde se encontraron un 22% y 21.4% de cepas MRSA. (Reyes y col. 2010). Aires de Sousa y col. en el año 2001, reportaron que en Latinoamérica durante los años de 1997 a 1998 el 21% de las infecciones fueron atribuibles a *S. aureus* y que de estas cepas el 29% eran resistentes a la oxacilina.

En México, Comejo y col. en el 2005, encontraron que el 4% de cepas hospitalarias de *S. aureus* eran resistentes a la meticilina, un porcentaje muy bajo a lo reportado en otros lugares. En un estudio reciente también realizado por Comejo y col. en el 2010, encontraron un porcentaje mucho más alto (86.4%) de cepas de HA-MRSA, aisladas entre los años 2006-2007, en un hospital Oncológico de la Ciudad de México (Comejo y col. 2006; Comejo y col. 2010).

Como se puede ver los porcentajes de cepas MRSA que se reportan son diferentes dependiendo del lugar y país donde se realizó el estudio, lo que si queda claro es que la presencia de cepas MRSA es frecuente y es un peligro para la salud pública.



Grafica 1. Frecuencia de la Concentración Inhibitoria Mínima de las cepas MRSA.

#### Portadores de cepas MRSA.

La aparición de cepas MRSA en la comunidad ha aumentado la importancia de la detección de este patógeno entre las población sana. La búsqueda de estas cepas

ha sido tradicionalmente restringida a las fosas nasales (Cole y col. 2001; Kluytmans y col. 1997; Peacock y col. 2001), sin embargo, estudios recientes han demostrado la importancia de la garganta como un sitio muy común de la colonización (Mertz y col. 2009; Nilsson y Ripa, 2006; Ringberg y col. 2006).

Los resultados de este trabajo mostraron que del total de la población estudiada, se encontró que el 8.6% (107 individuos) eran portadores de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA), que representan el 14.4% con respecto a los portadores de *S. aureus*.

Se aislaron un total de 1039 cepas de *S. aureus* de la población estudiada, 908 (87.4%) fueron MSSA y 131 (12.6%) fueron MRSA. Todos los aislamientos de MRSA fueron positivos para los genes *mecA* y *nucA*, mediante detección por PCR. De las cepas aisladas de MRSA, el 31.3% provenían de portadores exclusivos de nariz, el 32.1% de portadores exclusivos de faringe y el 36.6% se aislaron de la nariz y faringe del mismo portador.

El porcentaje de cepas MRSA encontradas entre hombres y mujeres fue similar 52.3% (56 cepas) y 47.7% (51 cepas), respectivamente. Cuando se analizaron por grupos de edad, el 33.6% de las cepas se encontraron en el grupo de 1-10 años, seguida por el grupo de edad 11-20 años (25.2%), para los otros grupos el porcentaje disminuye a medida que aumenta la edad.

Uemura y col. en el 2004, encontraron que de 157 voluntarios sanos de la Universidad de Ryukyus, en Japón, el 22% eran portadores de cepas MRSA exclusivos de nariz, el 15% de portadores exclusivos de faringe y el 14% de portadores en nariz y faringe. Estos resultados son diferentes a los reportados en este trabajo, sin embargo, esta discrepancia puede deberse a que el tamaño de la muestra reportada por Uemura y col. donde se estudiaron 157 voluntarios en comparación con la muestra estudiada en este trabajo, lo cual puede explicar las variaciones en el porcentaje.

En San Francisco, Cal. USA., en el año de 2002, se reportó que en una población urbana de personas marginadas y sin hogar, se tenía una prevalencia del 12.2%

de cepas MRSA. Como se puede ver, se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de portadores de cepas MRSA en las diferentes poblaciones, esto se debe posiblemente a las diferencias económicas y sociales que se presentan en cada país, además de las diferencias de las poblaciones estudiadas (Charlebois y col. 2002).

El Sistema de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales Nacional (National Nosocomial Infectious Surveillance System, NNIS) de USA identificó en hospitales de tercer nivel un incremento de MRSA del 4% en 1980 al 55% en 2001. En Europa, en países como Dinamarca, Alemania y algunos otros países se tiene una prevalencia menor al 1%, mientras que países como Japón y Estados Unidos exceden al 30% (NNIS, 2004).

Calderón y col. en el 2001 y Echaniz y col. en el 2006 reportaron cepas de MRSA aisladas en hospitales de México. El porcentaje de cepas de MRSA reportado por Calderón y col. aisladas de los hospitales de Ciudad de México fue de 14.2% entre 1998 y 2000.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un porcentaje menor, sin embargo, las cepas de MRSA estudiadas por Calderón y col. y Echaniz y col. son cepas aisladas en ambientes hospitalarios. Este es el primer trabajo que investiga la presencia de *S. aureus* en las fosas nasales y la garganta en una comunidad saludable mexicana, por lo que pueden ser diferentes de los reportados para ambientes hospitalarios.

### **Identificación del gen *mecA*.**

En las cepas de *Staphylococcus aureus*, que fueron identificadas previamente como MRSA por las pruebas de sensibilidad microbiana, se determinó la presencia del gen *mecA*, 131 cepas presentaron un amplicón de aprox. 160 pb, como se muestra en la Figura 7. En tres cepas que se habían identificado como MRSA por el método de difusión en disco o por el método CIM, no se pudo amplificar el gen *mecA* por PCR.

Estudios realizados por Aires de Sousa y col. en 2001, sugieren que se encuentran circulando clones provenientes de la clona I Brasileña que tienen deletados los genes *mecA* y *mecI*, posiblemente algunas de nuestras cepas también tienen una delección en el fragmento que amplifican nuestros iniciadores para el gen *mecA*.

Wong y col. 2010, mencionan que se pueden encontrar elementos SCC, con ausencia del gen *mecA*, pero contienen otros genes característicos (por ejemplo cluster de genes para la cápsula, resistencia al ácido fusídico y el operón de resistencia a mercurio), que también se han identificado en los estafilococos. Estos elementos comparten las siguientes características con SCC*mec*: portadores de genes de *ccr* y del complejo de genes *ccr* (*ccrAB* y/o *ccrC*).

Por otro lado, van Griethuysen y col. en el 2005, encontraron que el gen *mecA* se puede perder por el método de conservación por congelación, ellos encontraron que de las cepas conservadas se perdió el gen *mecA* en el 14% de las mismas, en el caso de este estudio se encontraron algunas cepas donde no se pudo detectar el gen *mecA* posiblemente lo perdieron durante la congelación-descongelación de las cepas.

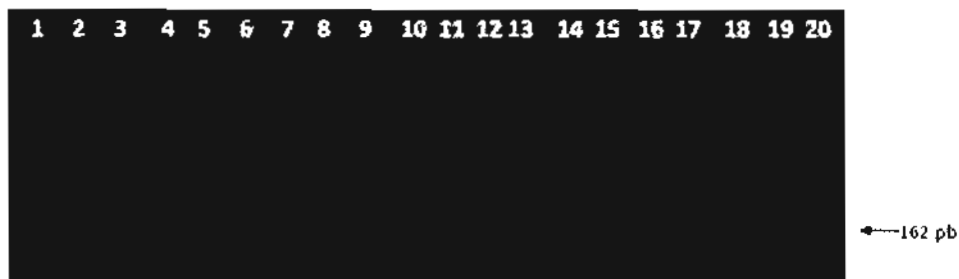


Figura 7. Detección del gen *mecA* por PCR. Carril 1: *S. aureus* ATCC 43300, Carril 2: *S. aureus* ATCC 33591, Carril 3: *S. aureus* ATCC 29213, Carril 4: Cepa 22F, Carril 5: Cepa 22N, Carril 6: Cepa 60 F, Carril 7: Cepa 63N, Carril 8: Cepa 67F, Carril 9: Cepa 80F, Carril 10: Cepa 105 N, Carril 11: Cepa 120N, Carril 12: Cepa 167N, Carril 13: Cepa 192F, Carril 14: Cepa 213F, Carril 15: Cepa 217N, Carril 16: Cepa 220N, Carril 17: Cepa 224F, Carril 18: Cepa 244F, Carriles 10 y 20: Marcador de peso molecular de 100 pb.

### **Tipificación del casete cromosomal SCC*mec*, de las cepas de MRSA aisladas de la comunidad.**

En las 131 cepas previamente identificadas como MRSA, se determinó el tipo de casete cromosomal SCC *mec* que presentaban mediante la técnica de PCR multiplex reportada por Oliveira y col. 2002 y la descrita en Boye y col. 2007.

Mediante la PCR multiplex de Oliveira se encontró que 47 de las cepas correspondían con los tipos de SCC*mec* II y IV (Figura 8), pero había 84 cepas en las que se tenía problema para poder discernir las diferentes bandas que presentaban y por lo tanto, no se podía determinar el tipo de SCC*mec* correspondiente, probablemente debido a que se presentaba amplificación selectiva para algunos de los diferentes fragmentos.

También se utilizó el método de PCR multiplex descrito por Boye y col. en 2007. Con este método se pudo determinar el tipo de SCC*mec* de 49 cepas aisladas, como se muestra en la Figura 9. Los resultados obtenidos con este método concuerdan con los resultados obtenidos con el método de Oliveira.

No se logró determinar por ninguno de los dos métodos de PCR multiplex planteados, el tipo de SCC*mec* de 35 cepas, debido a que las amplificaciones presentaban patrones no compatibles con el bandeo establecido para las diferentes cepas control de los SCC*mec* estudiados.

Para solucionar este problema, se amplificó el gen *mecA* de las cepas con problemas, se obtuvo un producto de amplificación de alrededor de 500 pb como se muestra en la Figura 10, se purificó y se mandó secuenciar y las secuencias obtenidas se compararon en la página <http://www.staphylococcus.net>. Después de todos los métodos utilizados, no se logró identificar el tipo de SCC*mec* presente en únicamente 10 cepas MRSA.

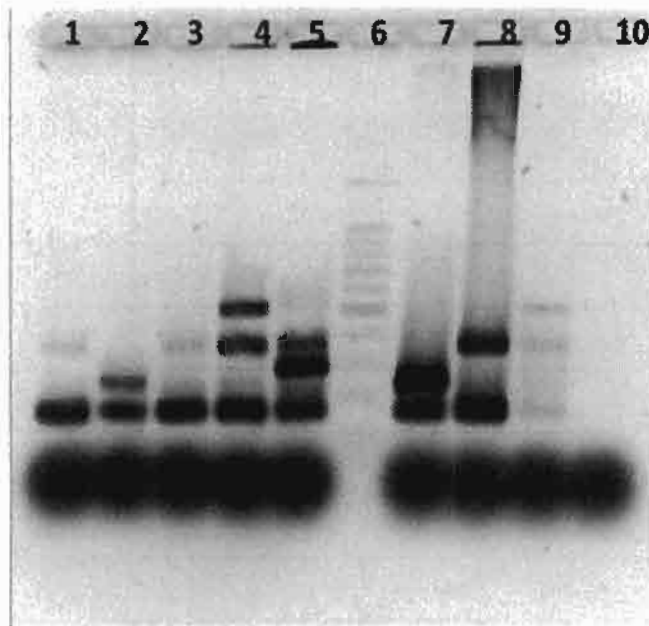


Figura 8. Determinación del tipo de casete cromosomal SCCmec mediante la PCR multiplex de Oliveira. Electroforesis en agarosa al 2%. Carril 1: *S. aureus* SCCmec IV; Carril 2: *S. aureus* SCCmec III; Carril 3: *S. aureus* SCCmec IV; Carril 4: *S. aureus* SCCmec I; Carril 5: *S. aureus* SCCmec II. Carril 6: Marcador de Peso Molecular 100 pb (Promega). Carril 7: *S. aureus* SCCmec III; Carril 8: *S. aureus* cepa 310N. Carril 9: *S. aureus* SCCmec I; Carril 10. Control de reactivos (NTC).

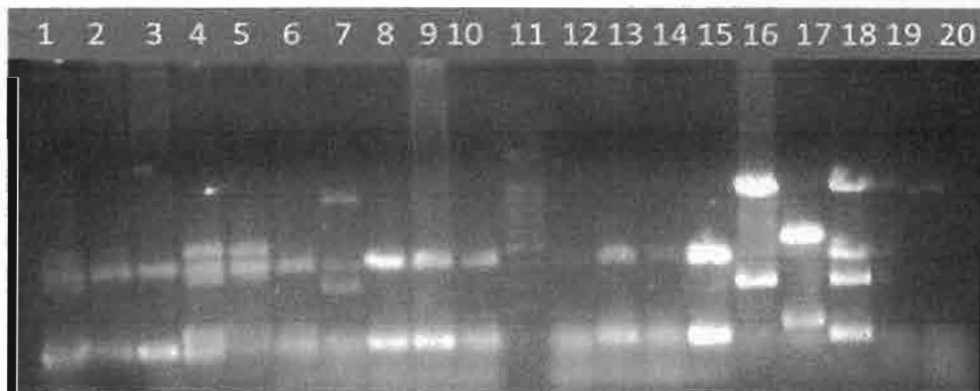


Figura 9. Determinación del tipo de casete cromosomal SCCmec mediante la PCR multiplex de Boye y col (2007). Electroforesis en agarosa al 1.5%. Carril 1: *S. aureus* 1518F; Carril 2: *S. aureus* 1523 F; Carril 3: *S. aureus* 1544 N; Carril 4: *S. aureus* 618 F; Carril 5: *S. aureus* 1620 N; Carril 6: *S. aureus* 1320 F; Carril 7: *S. aureus* 220 N; Carril 8: *S. aureus* 300 N; Carril 9: *S. aureus* 646 F; Carril 10: *S. aureus* 675 N; Carril 11. Marcador de Peso Molecular 100 pb; Carril 12: 218 F; Carril 13: *S. aureus* 991N; Carril 14: *S. aureus* 993 F; Carril 15: *S. aureus* SCCmec tipo I; Carril 16: *S. aureus* SCCmec tipo II; Carril 17: *S. aureus* SCCmec tipo III; Carril 18: *S. aureus* SCCmec tipo IV. Carril 19: Control de Reactivos (NTC).



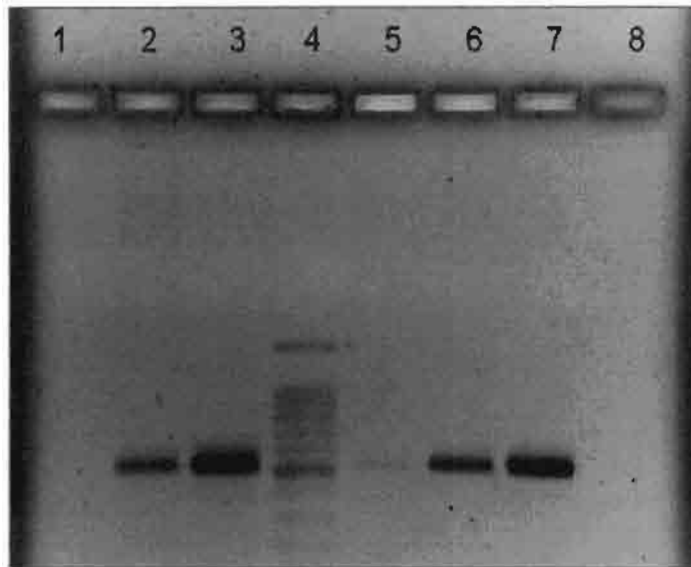


Figura 10. Electroforesis de la detección del gen *mecA* por PCR Carril 1: *S. aureus* ATCC 29213. Carril 2: *S. aureus* ATCC 43300, Carril 3: *S. aureus* ATCC 33591, Carril 4: Marcador de Peso Molecular 100 pb (Promega). Carril 5: *S. aureus* ATCC 33591, Carril 6: *S. aureus* Cepa 22F, Carril 7: *S. aureus* 60F, Carril 8: Control de reactivos (NTC).

En resumen de las 131 cepas de MRSA aisladas, el SCC*mec* tipo IV fue el casete cromosomal más comúnmente encontrado (69% de los aislados), seguido del SCC*mec* tipo II (20.1%), el SCC*mec* tipo V (2.1% de los aislados) y el SCC*mec* tipo III (0.76%) no se encontraron aislados del SCC*mec* tipo I.

Las cepas con SCC*mec* tipo IV por lo general presentan CIM bajos para la oxacilina y rara vez son resistentes a otros antibióticos. El 85% de las cepas aisladas con SCC*mec* tipo IV presentaron un CIM <256 mg/L. Sin embargo, 40 cepas con este casete presentaron resistencia a otros de los antibióticos como eritromicina y tetraciclina.

Aquellos aislados donde se determinó el SCC*mec* por secuenciación, se encontró que la mayoría pertenecen al SCC*mec* tipo IVa, el cual presenta una alta homología con la cepa de *S. aureus* USA300, que corresponde a una clona pediátrica y que se encuentra predominante en ambientes comunitarios.

El 8.6% de los aislados no se pudo tipificar por ninguna de las técnicas de PCR Multiplex ni por secuenciación.

El que no se haya podido tipificar el tipo de SCC*mec* que presentan algunas de las cepas aisladas podría deberse a que tienen una variante diferente a los tipos de SCC*mec* que se buscaron en este estudio, por lo que a futuro se podría ampliar la búsqueda a otras variantes que se han descrito recientemente Berglund y col. 2008, Ito y col. 2004, Ma y col. 2002, Oliveira y col. 2006 y Zhang y col. 2009.

Por otro lado, Wong y col. encontraron cepas con regiones deletadas del casete cromosomal o con deleciones parciales de este casete o tipos de SCC homólogos, que pueden aportar resultados discrepantes. En un esfuerzo por determinar las posibles causas de estas deleciones, se han caracterizado cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina (MSSA) y cepas de *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA), con la colaboración de 10 instituciones en los E.E.U.U y Canadá (Wong y col. 2010).

El Grupo Internacional de trabajo para la clasificación de los elementos del casete cromosomal de estafilococos (IWG-SCC), recomienda determinar la secuencia nucleotídica de cualquiera de los nuevos elementos SCC*mec* que se encuentren (IWG-SCC, 2009).

Dicho grupo recomienda que se presente un informe de los posibles nuevos tipos de elementos SCC con el fin de asignar nuevas clasificaciones de los SCC*mec* encontrados. El grupo de trabajo proporcionará una página Web dedicada al elemento SCC*mec* con información actualizada sobre los elementos SCC*mec*, un detallado sistema de clasificación basado en las diferencias en las regiones J, y actualmente disponible en <http://www.métodos.de.tipificación.Staphylococcus.net> o <http://www.SCCmec.org/> (en construcción). Se espera que todos los investigadores se refieran a este sitio web para obtener la información pertinente sobre los aspectos epidemiológicos de la caracterización de los elementos SCC*mec*.

Por lo que un trabajo a futuro es tratar de caracterizar las cepas a las que no se pudo determinar el tipo de SCC*mec*, para tratar de ver si presentan a uno de los nuevos tipos de SCC*mec* reportados o se trata de uno totalmente diferente.

### **Tipificación molecular de cepas MRSA aisladas de la comunidad.**

De las 131 cepas de MRSA previamente identificadas solamente 87 de estas cepas se sometieron a Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE). Para el análisis del Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de PFGE, se realizaron 3 cortes (cutoff) con respecto al porcentaje de similitud de los patrones de bandas del PFGE: si el porcentaje era <65% se consideran cepas diferentes; del 65% al 80% son cepas posiblemente relacionadas; del 80% al 95% son consideradas cepas genéticamente relacionadas y del 95% al 100% las cepas se consideran idénticas.

El análisis de los patrones genómicos de la restricción del DNA cromosomal de las cepas MRSA con la enzima *Sma* I, generó de 7 a 18 fragmentos de DNA con un tamaño de 10 a 727.5 Kb, como se observa en las Figuras 11 y 12.

En la Figura 13 se muestra el dendrograma generado de los perfiles de PFGE de las cepas MRSA. Se encontró una gran diversidad genética en las cepas estudiadas ya que se observan 18 clusters de cepas posiblemente relacionadas, cuando se realizó el corte de 65% de similitud. Se observan cepas diferentes como la 342 y 475N y cepas relacionadas como la 463F y 1320F. En el mismo portador se tiene cepas idénticas en la nariz y faringe como la 296N y 296F o cepas relacionadas como la 22N y 22F. Esto nos indica que existe una gran diversidad genética en las cepas MRSA que se encuentran circulando por la comunidad estudiada.

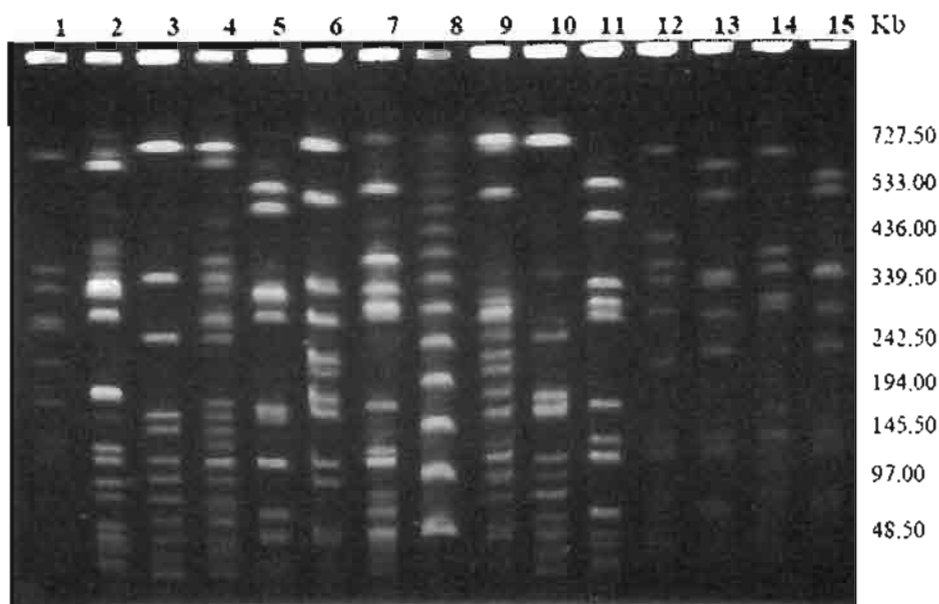


Figura. 11. Electroforesis de los perfiles genómicos por PFGE de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA. Carril 1: *S. aureus* NCTC 8325; Carril 2: *S. aureus* 105N; Carril 3: *S. aureus* 247N; Carril 4: *S. aureus* 252N; Carril 5: *S. aureus* 252N; Carril 6: *S. aureus* 270 N; Carril 7: *S. aureus* 470N; Carril 8: Marcador de PM Lambda ladder (BioLabs); Carril 9: *S. aureus* 611N; Carril 10: *S. aureus* 690N; Carril 11: *S. aureus* 991N; Carril 12: *S. aureus* 1544N; Carril 13: *S. aureus* SCCmec II; Carril 14: *S. aureus* SCCmec III; Carril 15: *S. aureus* SCCmec IV.

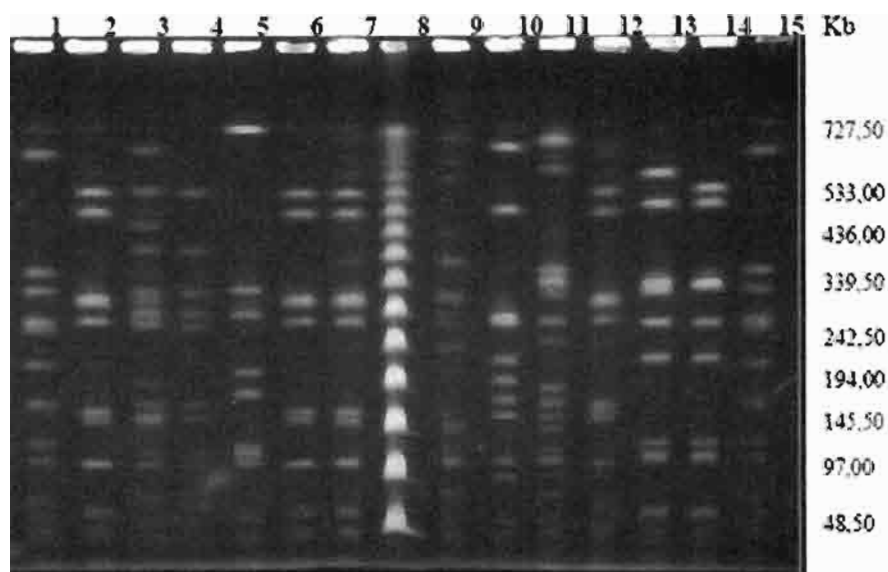


Figura 12. Electroforesis de los perfiles genómicos por PFGE de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA, Carril 8, Marcador de PM Lambda ladder (BioLabs); Carriles 1 y 15: *S. aureus* NCTC 8325; carril 13: *S. aureus* SCCmec II; carril 14: *S. aureus* SCCmec IV; carriles 2 al 7 y 9 al 12: cepas de *S. aureus* 246F, 677F, 217N, 244F, 545F, 608N, 637F, 657F y 662F respectivamente.

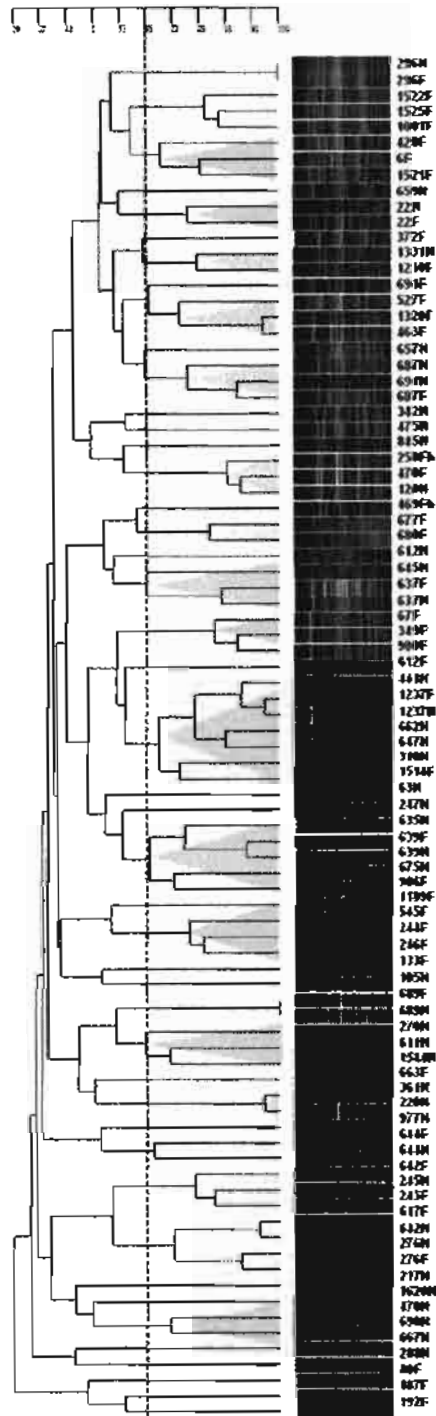


Figura13. Dendrograma generado por los perfiles de PFGE de cepas MRSA.

### Tipificación molecular de cepas MRSA aisladas de nariz y faringe del mismo portador.

Se obtuvieron los perfiles genómicos por PFGE de 14 pares de cepas MRSA aisladas de la cavidad nasal y faríngea del mismo portador como se muestra en la Figura 14 y se realizó el dendrograma a partir de estos perfiles (Figura 15). Se puede observar que existen voluntarios que son portadores de la misma cepa MRSA tanto en la cavidad nasal como en la faríngea, tal es el caso de los portadores 296 y 689 (Figura 15). El portador 1237 tenía cepas MRSA estrechamente relacionadas al 95%. Otros 5 portadores (22, 687, 691, 639 y 637) estaban colonizados por cepas relacionadas (entre el 65% y 85%). También se pueden encontrar portadores con diferentes cepas de MRSA en nariz y faringe, como los portadores 470, 612, 642, 687 y 691 como se muestra en la Figura 15.

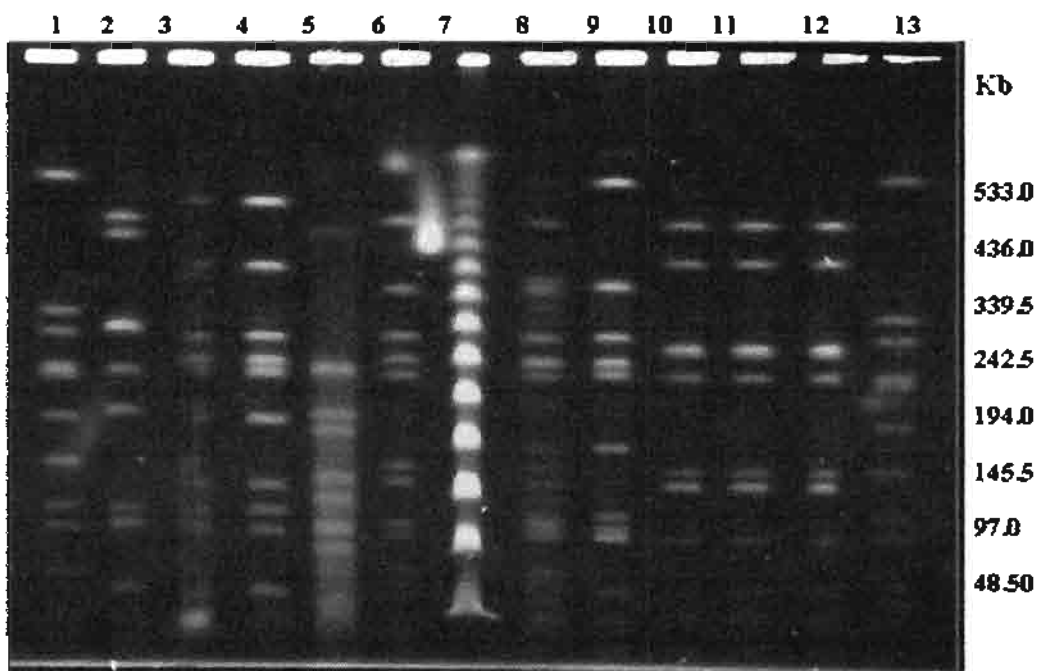


Figura 14. Electroforesis de los perfiles genómicos por PFGE de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA de portadores nasales (N) y faríngeos (F). Carril 1: *S. aureus* NCTC 8325; Carril 2: *S. aureus* SCCmec IV; Carril 3: *S. aureus* 22N; Carril 4: *S. aureus* 22F; Carril 5: *S. aureus* 675N; Carril 6: *S. aureus* 675F; Carril 7: Marcador de PM Lambda ladder; Carril 8: *S. aureus* 691N; Carril 9: *S. aureus* 691F; Carril 10: *S. aureus* 469N; Carril 11: *S. aureus* 469Fa; Carril 12: *S. aureus* 469Fb; Carril 13: *S. aureus* NCTC8325.

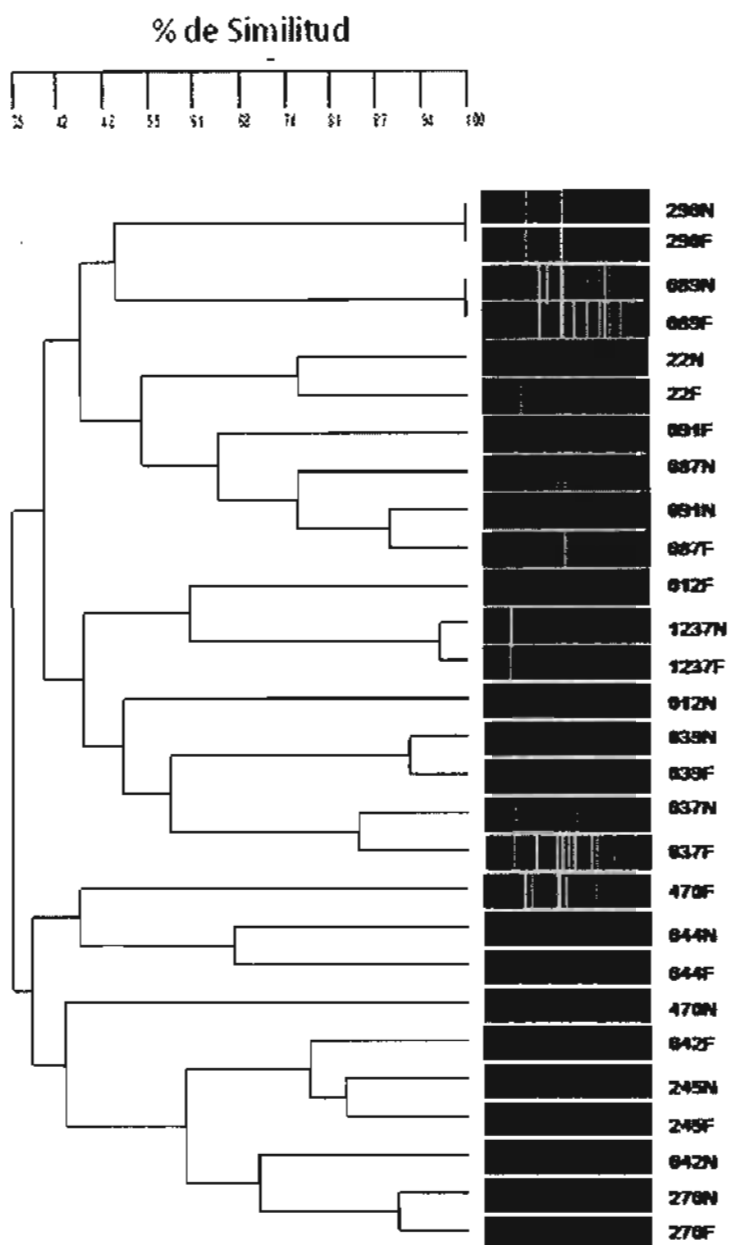


Figura15. Dendrograma donde se comparan los perfiles por PFGE de cepas MRSA aisladas de la nariz (N) y de la faringe (F) de un mismo portador.

### **Tipificación molecular de las cepas *S. aureus* MRSA aisladas de portadores exclusivos de nariz o de faringe**

Se tipificaron cepas MRSA aisladas de 28 portadores exclusivos de faringe y de 26 portadores exclusivos de nariz. Se obtuvo un dendrograma a partir de los perfiles obtenidos por PFGE (Figura 16), se puede observar que se generaron tres regiones principales, dos donde se agruparon principalmente cepas obtenidas de la nariz y otra región donde se tienen cepas provenientes mayoritariamente de la faringe. Estos resultados indican que por alguna razón las cepas se agruparon en relación al nicho ecológico de donde se obtuvieron, esto puede deberse a que las cepas presentan diferentes tipos de adhesinas u otros factores, lo que les permite colonizar diferentes nichos.



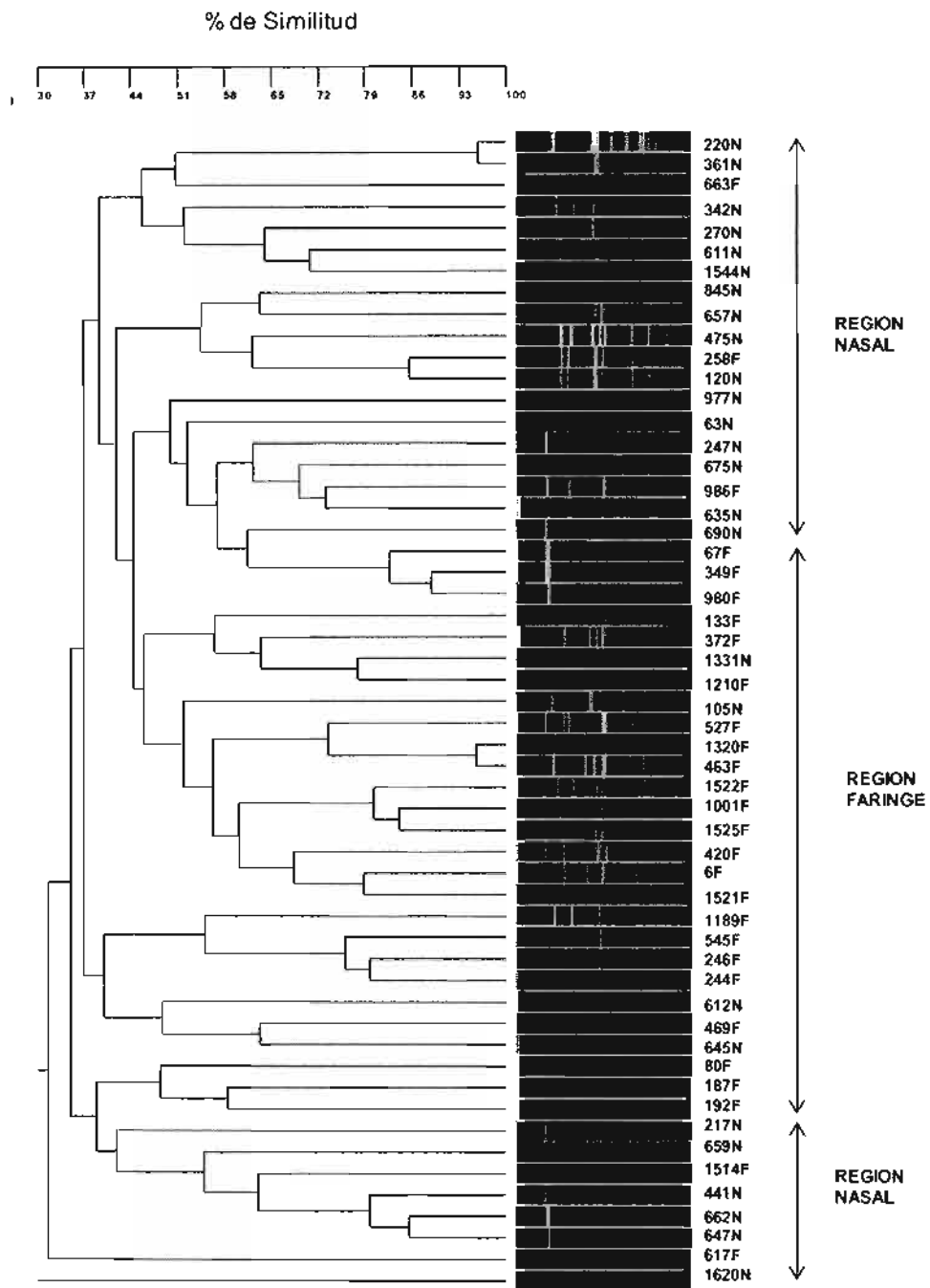


Figura16. Dendrograma generado de los perfiles por PFGE de cepas MRSA aisladas de portadores exclusivos de la nariz (N) y portadores exclusivos de la faringe (F).

**Tipificación molecular de cepas de *S. aureus* sensibles a la metilicina (MSSA), aisladas de la comunidad.**

También se tipificaron cepas de *S. aureus* sensibles a la metilicina (MSSA), para poder tener una visión más completa de las cepas de este microorganismo que circulan en la comunidad. La Figura 17 muestra un ejemplo de los perfiles genómicos por PFGE de cepas MSSA, cuando se digirió con la enzima *Sma*I.

En la Figura 18 se presenta el dendrograma de cepas MSSA aisladas de la comunidad. Se pueden observar diecinueve grupos diferentes, cuando se realizó el corte al 65% de similitud. Se encontraron cepas que están posiblemente relacionadas en diferentes portadores, como por ejemplo las cepas de faringe 63F y 317F y las cepas de nariz 991N y 252N. Las cepas obtenidas de la nariz y faringe del mismo portador resultaron ser idénticas en la mayoría de los portadores, como las cepas 11N y 11F o 1172N y 1172F. Aunque también se encontraron cepas relacionadas o diferentes como la 382N y 382F. Estos resultados indican que se presenta una amplia diversidad genética de las cepas MSSA que circulan en la población estudiada.

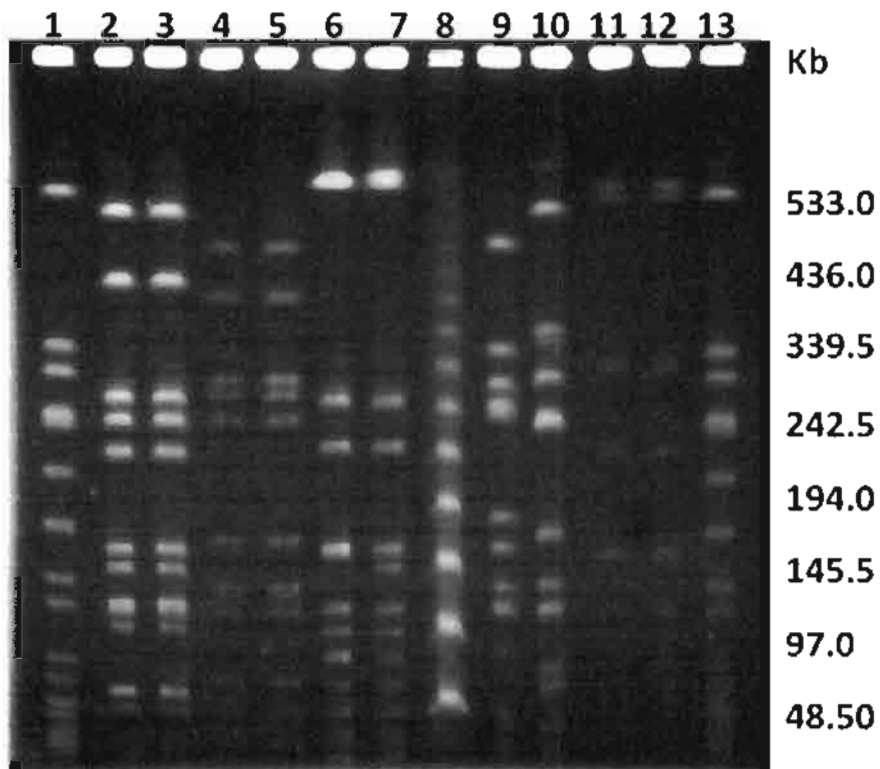


Figura 17. Perfiles genómicos de cepas MSSA aisladas de la nariz y de la faringe de un mismo portador. PFGE generado por digestión del DNA con la enzima *Sma* I. Nasal (N) y faringe (F) Carriles 1 y 13: *S. aureus* NCTC 8325; Carril 2: *S. aureus* 1189N; Carril 3: *S. aureus* 1189F; Carril 4: *S. aureus* 1210N; Carril 5: *S. aureus* 1210F; Carril 6: *S. aureus* 1237N; Carril 7: *S. aureus* 1237F; Carril 8: Marcador de Peso Molecular Lambda ladder. Carril 9: *S. aureus* 1320 N; Carril 10: *S. aureus* 1320F; Carril 11: *S. aureus* 1514N; Carril 12: *S. aureus* 1514F.

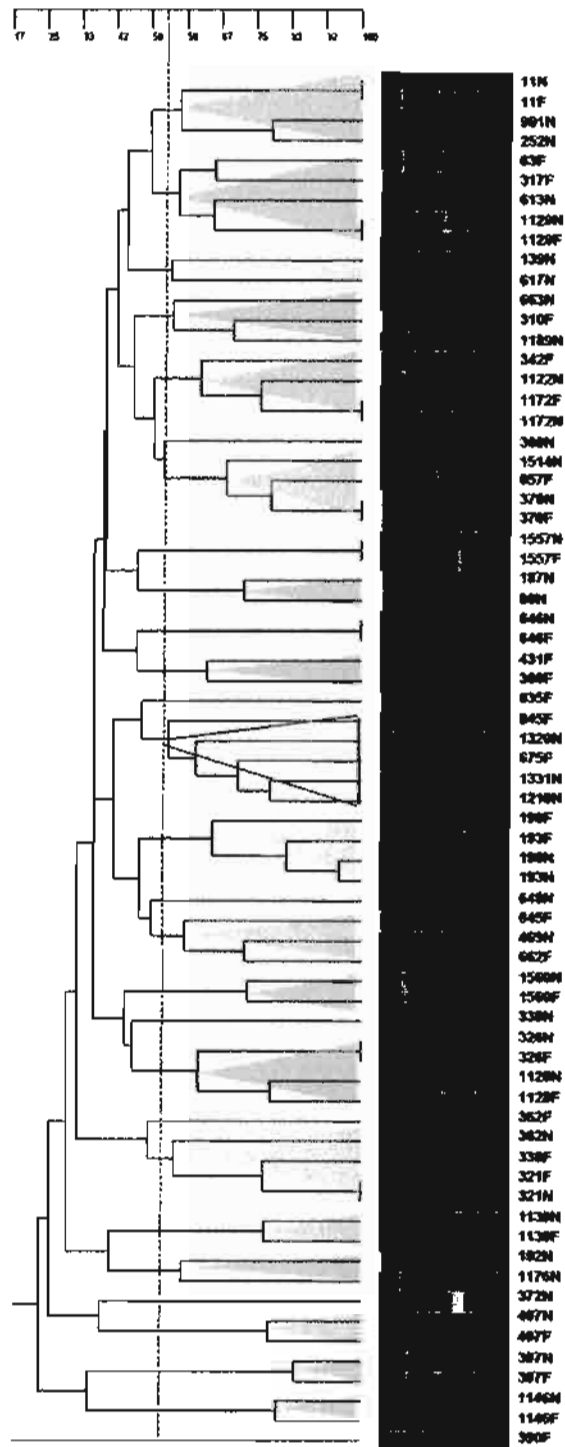


Figura18. Dendrograma generado por los perfiles de PFGE las cepas MSA presentes en la población estudiada. Cepas nasales(N), faríngeas (F).

### **Tipificación molecular de cepas de *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA) aisladas de la nariz y de la faringe del mismo portador.**

Al igual que las cepas MRSA, también se analizaron las cepas MSSA de personas que eran portadores de *S. aureus* tanto en la faringe como en la nariz al mismo tiempo.

En la Figura 19 se observa el perfil de PFGE de algunas de las cepas aisladas de nariz y faringe del mismo paciente. Se puede ver que las cepas 321 N y F, 326 N y F y 338 N y F son clonalmente idénticas, mientras que las cepas 360 y 342 N y F tienen una relación clonal y la cepa 362 N y F son cepas diferentes. Estos resultados muestran que la mayoría de las cepas aisladas de las fosas nasales son las mismas que se presentan en la faringe o tienen relación clonal. Sin embargo, cuatro portadores, presentan cepas diferentes en la garganta y fosas nasales al mismo tiempo. Además, las personas también pueden ser colonizadas por otras especies de estafilococos como los coagulasa negativa que cohabitan en una misma cavidad, lo que puede conllevar a tener transferencia de información genética horizontal.

El análisis de los patrones de PFGE generados por 16 cepas MSSA aisladas de la nariz y faringe de la misma persona se muestra en la Figura 19. Se encontró que 13 (81%) son la misma cepa o clonalmente relacionados, y sólo tres pares eran diferentes o no relacionados (19 %). Esto es muy importante ya que hasta el momento no hay estudios que indiquen diferencias en cuanto a la clonalidad de cepas que colonizan a la nariz y a la garganta. Además nuestros resultados demuestran que *S. aureus* en muchas ocasiones no sólo se encuentra en las narinas anteriores sino que además se presenta en la faringe, resultados similares fueron encontrados por Nilsson y Ripa y col. 2006.

Nuestros datos también confirman la existencia de cepas diferentes de *S. aureus* transportadas en la nariz y faringe de la misma persona, datos que apoyan la idea de Uemura y col. (2004), que la microbiota estafilocócica en la nariz y la garganta se formaron de manera independiente y la atención para evitar la propagación de

este microorganismo y para el control de las infecciones nosocomiales también se debe dirigir a los portadores de *S. aureus* en la faringe.

Diferentes autores sugieren que el portar este microorganismo en las diferentes cavidades de un individuo es un proceso multifactorial, que implica los factores del hospedero y los factores de virulencia de la bacteria. Entre estos factores se pueden encontrar los mecanismos necesarios para la colonización y el tipo de epitelio de las diferentes cavidades. La presencia nasal de *S. aureus* ha sido la más estudiada y es considerada un factor de riesgo en la clínica y en la comunidad (Nilsson y Rippa. 2006). Sin embargo, la incidencia real de *S. aureus* en la faringe puede ser más grande que la encontrada en la nariz, como muestran nuestros datos y los de Uemura y col. (2002), por lo que ser portador faríngeo de *S. aureus* representa también un factor de riesgo.

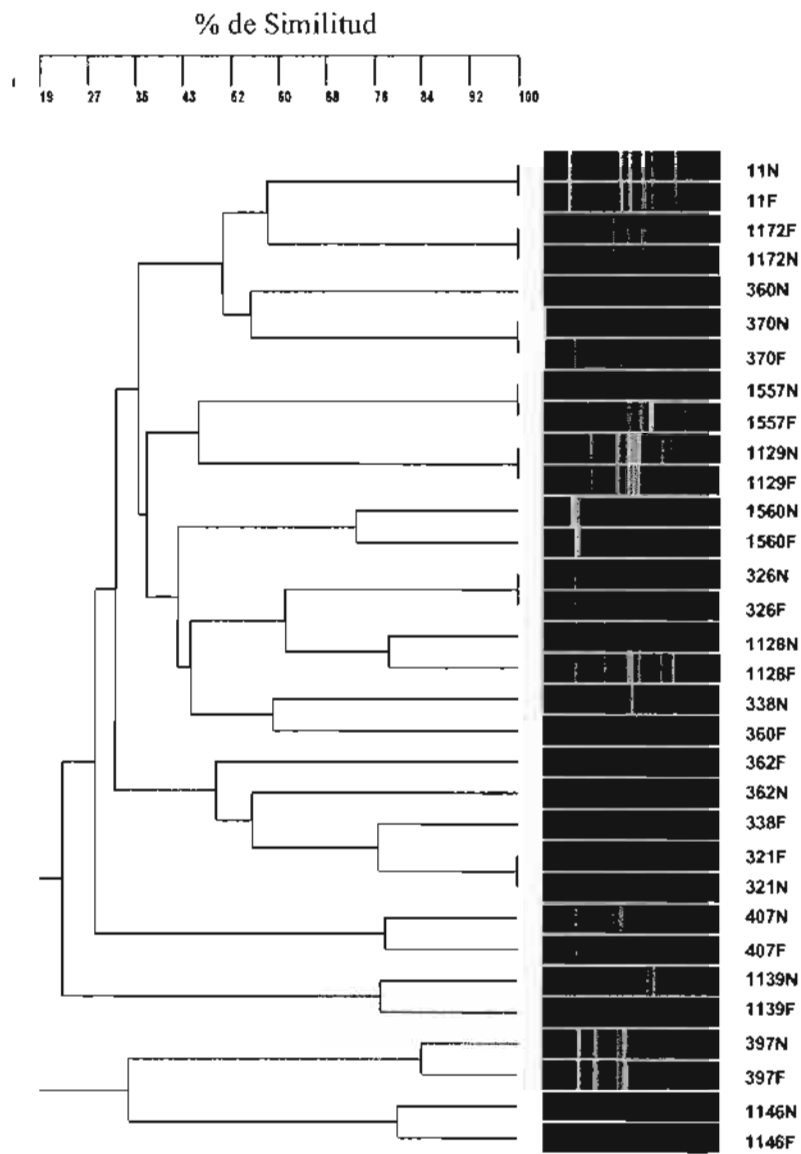


Figura 19. Dendrograma de los perfiles genómicos por PFGE de las cepas MSSA aisladas de la nariz y la faringe del mismo portador. Cepas nasales(N), faringicas (F).

### **Estudio de la persistencia cepas *S. aureus* en la faringe.**

Se estudiaron 108 voluntarios a lo largo de 6 años, de 1998 a 2003. Se encontró que 14 individuos (13%) nunca fueron portadores de *S. aureus*, 80 personas (74%) fueron portadores intermitentes y 14 voluntarios (13%) fueron portadores persistentes. En otros estudios longitudinales, se ha encontrado que entre el 10 y el 35% de los portadores son portadores persistentes, entre el 20 y 75% son portadores intermitentes y entre el 5 y el 70% son no portadores (Armstrong y col, 1976; Hu y col. 1995; Riewerts y col. 1995; VandenBergh y col. 1999). Esta variación en los porcentajes que se encuentra en los diferentes estudios puede deberse a la diferencia de las poblaciones estudiadas, tiempo del estudio, tiempo de toma de las muestras, técnicas de cultivo y criterios para la definición de un portador persistente o intermitente. Sin embargo, este es el primer estudio de persistencia en faringe, los demás estudios son de persistencia en nariz, lo que también puede influir en los porcentajes de los portadores.

El análisis de los perfiles genómicos por PFGE de las cepas de *S. aureus* aisladas de 12 portadores a través de los años del estudio, muestran que dos portadores las cepas son las mismas o relacionadas, como los portadores 9, 10 y 13 (Figura 20). Mientras que en otros casos se observan diferentes clonas a través de los años, como en el caso de los portadores 5, 4 y 15 (Figura 20). También se observa la evolución de la cepa como en los portadores 1 y 6 donde las clonas no son iguales pero se mantienen formando un mismo grupo, lo que sugiere que la cepa presentó cambios durante el tiempo del estudio.



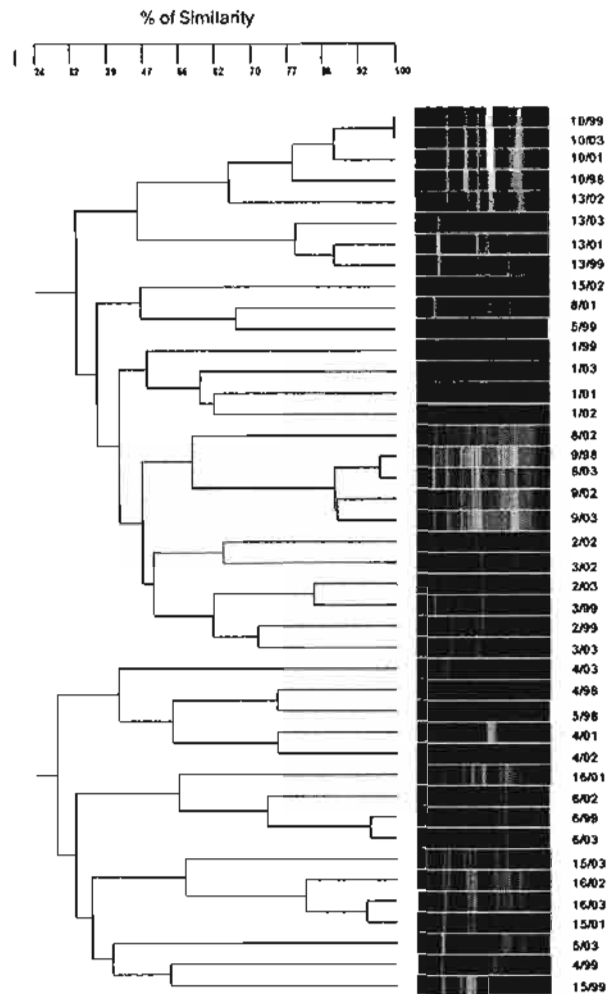


Figura 20. Dendrograma generado por los patrones de bandas de la PFGE cepas de portadores persistentes de *S. aureus* en faringe. Cepas aisladas de 12 portadores persistentes (portador /año).

### Detección del gen de la exotoxina Leucocidina Panton-Valentine en las cepas MRSA.

Se analizaron 131 cepas que previamente habían sido identificadas como *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes, se encontró que 31 (23.66%) de estas cepas presentan el gen de la toxina leucocidina Panton-Valentine. La detección se realizó por PCR, obteniéndose un producto de amplificación de 433

pb, como se muestra en la Figura 21. Para estar seguros que el amplicón pertenece al gen *lukPV*, se mandó secuenciar dicho fragmento, obteniéndose un porcentaje de similitud del 99% con el gen *lukS-PV*, *lukF-PV* de la cepa de *Staphylococcus aureus* NN47 No. GenBank: AB532027.1.

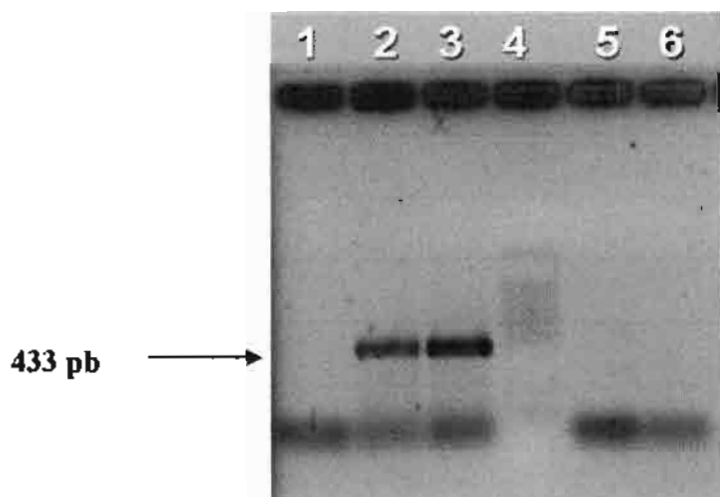


Figura 21. Detección del gen de la toxina *luk PV* por PCR. Carril 1: *S. aureus* SCCmec tipo I, Carril 2: *S. aureus* SCCmec IV *luk+* ATCC CBAA-1556; Carril 3.: *S. aureus* SCCmec IV; Carril 4. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega); Carril 5. *S. aureus* SCCmec II; Carril 6. Control negativo (NTC).

Se encontró que 29 (22.13%) cepas MRSA que previamente habían sido tipificadas como cepas con SCCmec tipo IV y SCCmec tipo V, presentaban el gen de la toxina leucocidina Pantón-Valentine (PVL), por lo que se determinó que son cepas CA-MRSA. Estos resultados son muy parecidos a los encontrados por Valsesia, G. y col. 2010, quienes identificaron tasas muy altas de cepas positivas para PVL-MRSA (28%), porcentaje mayor a lo reportado por Krziwanek y col. en el 2007 y Wannet y col. en el 2005, en países europeos que fue entre un 3 y 15% de las cepas de PVL-MRSA.

La importancia de este estudio es que se determinó que cepas CA-MRSA se encuentran circulando en población mexicana sana.

Por otro lado se observa que las cepas CA-MRSA encontradas en México se encuentran en diferentes grupos del Dendrograma de las cepas MRSA, por lo que

se encuentra una alta heterogeneidad genómica en las cepas que circulan en nuestro país.

También se detectó el gen de la PVL en 4 (3.73%), cepas MRSA que fueron tipificadas como *SCCmec* tipo II. Además, se encontró que estas cepas de *S. aureus* *SCCmec* tipo II que son LKP<sup>+</sup>, presentan un patrón de resistencia a los antibióticos gentamicina, clindamicina y trimetropim- sulfametoxazol, por lo que debe tratarse de cepas HA-MRSA.

Las infecciones producidas por cepas de CA-MRSA parecen ser un problema de infecciones emergentes en todo el mundo. El locus PVL representa un marcador genético estable en las cepas CA-MRSA, lo que explica la frecuencia de las infecciones primarias de la piel y de vez en cuando neumonía necrotizante asociada a estas cepas (Vandenesch y col. 2003). A pesar de la ventaja selectiva conferida por la combinación de los rasgos genéticos es decir, el locus PVL y *SCCmec* IV en un fondo agr3) no está claro, la propagación de un número limitado de clones en cada continente sugiere que estas cepas CA-MRSA son especialmente adecuados para ser con éxito agentes patógenos de la comunidad.

## CONCLUSIONES.

60 % de la población estudiada fueron portadores sanos de *Staphylococcus aureus*.

*S. aureus* coloniza en mayor proporción la faringe de los portadores.

La presencia de *S. aureus* en las narinas fue mayor en los hombres que en las mujeres.

Las cepas de *S. aureus* presentaron un elevado porcentaje de resistencia a la penicilina (91%), seguida de eritromicina, oxacilina y tetraciclina.

Del total de 1039 cepas de *S. aureus*, solamente el 12,6% fueron MRSA.

Las cepas MRSA, colonizan de manera similar la nariz y la faringe.

De las 131 cepas de MRSA aisladas. El SCCmec tipo IV fue el casete cromosomal más comúnmente encontrado, seguido del SCCmec tipo II.

29 cepas MRSA, que tienen el SCCmec tipo IV y SCCmec tipo V, presentaron el gen de la toxina leucocidina Pantón-Valentine (PVL).

Se determinó que existen cepas CA-MRSA circulando en la población mexicana sana.

## **LIMITACIONES DEL ESTUDIO.**

- 1.- La población estudiada en este trabajo fue una comunidad del Distrito Federal, habrá que estudiar diferentes regiones geográficas de nuestro país.
- 2.- La prueba de Concentración Inhibitoria Mínima fue realizada de acuerdo a los lineamientos del CLSI del 2006, ahora se cuentan con nuevos lineamientos para realizar esta prueba y hay que adecuarse a los próximos lineamientos que publique el CLSI en el 2011.
- 3.- La tipificación de las cepas de MRSA por PFGE se realizó en 87 de las 131 cepas identificadas, ya que se seleccionaron estas cepas por el morfotipo que presentaban.
- 4.- Falta realizar una correlación entre el fenotipo de resistencia a antibióticos y el tipo de SCC $_{mec}$  de las cepas MRSA estudiadas.
- 5.- En el estudio de persistencia de *S. aureus*, es difícil control a la población abierta, ya que muchas veces los voluntarios acuden a centros hospitalarios.

## **PERSPECTIVAS.**

En nuestro país se requiere llevar a cabo más estudios sobre la presencia de *Staphylococcus aureus* en diferentes poblaciones sanas, de diversas regiones geográficas, para conocer las clonas predominantes que se encuentran circulando en México.

Comparación del perfil genético de las cepas de *S. aureus* encontradas en la población estudiada con el perfil genético de las cepas pandémicas y todas las cepas USA (100 a la 800), para tratar de identificar si existe una relación entre las cepas aisladas mexicanas y las cepas de referencia.

Caracterización del SCC $_{mec}$  de las cepas de *S. aureus* que no se pudieron tipificar para tratar de determinar si pertenecen a un nuevo tipo de cassette cromosomal.

Detección de factores de virulencia, como adhesinas, toxinas y hemolisinas en las cepas de *Staphylococcus aureus* de la población estudiada.

Investigación del locus *agr*, que presentan las cepas de *S. aureus* estudiadas para conocer el tipo de control de la expresión de los diferentes factores de virulencia.

Se está terminando el manuscrito en el que se reporta los tipos de SCCmec encontrados, junto con la PVL y por lo tanto, asegurar la existencia de cepas de CA-MRSA, en nuestro país.

## BIBLIOGRAFIA

Aires de Sousa M, Miragaia M, Santos I, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, Brandileone MCC, Palacio R, dell'Acqua L, Hortal M, Camou T, Rossi A, Velásquez-Meza ME, Echaniz-Aviles G, Solorzano-Santos F, Heitmann I, de Lancastre H. 2001. Three-Year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2197-2205.

Alouf J E, Müller-Alouf H. 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. Med. Microbiol.* 292: 429-440.

Aly R, Shinelfield HI, Strauss WG, Maibach HI. 1977. Bacterial adherence to nasal mucosa cells. *Infect. Immun.* 17: 546-549.

Armstrong E C A, Smith J E. 1976. Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Ann. Hum. Biol.* 3:221-227

Bannerman T L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. En: *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª Edición. Editor: P.R. Murray. ASM. Press, Washington, D.C. EUA.

Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma X X, Söderquist B, Hiramatsu K. 2008. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3512-3516.

Berkovitch M, Bulkowstein M, Zhovtis D, Greenberg R, Nitzan Y, Barzilay B, Boldur I. 2002. Colonization rate of bacteria in the throat of healthy infants. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 63:19-24.

Biedenback D, Moet G, Roncs R. 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from SENTRY antimicrobial surveillance Program (1997-2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 58-69.

Birren B, Lai E. Pulsed-field gel electrophoresis. 1993. En: Birren B, Lai E, editores. *Pulsed-field gel electrophoresis. A practical guide*. San Diego, CA, EEUU: Academic. Press. Inc.

Bonnstetter K, Wolter D, Tenover F, McDougal L, Goering R. 2007. Rapid multiplex PCR assay for identification of USA300 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microb.* 45:141-147.

Bouza E, San Juan R, Muñoz P, Pascau J, Voss A, Desco M. 2004. A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 838-842.

Boye K, Bartels M D, Andersen I. S, Moller J.A, Westh H. 2007. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. *Clinic. Microbiol. Infect.* 13: 725-727.

Boyle-Vavra S, Daum R. 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón-Valentine leukocidin. *Lab. Invest.* 87: 3-9

Brakstad O D, Aasbakk K, Maeland J A. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene. *J. Clin. Microb.* 30 (7):1654-1660.

Brosera A, Chaves F, Rojo P, Otero JR. 2006. Emergence of a single clone of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24(1):31-35.

Bustos M J A, Hamdan P A, Gutiérrez C M. E. 2006. *Staphylococcus aureus*: the reemergence of a pathogen in the community. *Rev. Biomed.* 17:287-305.

Calderón Jaimes E, Espinosa de los Monteros L. E, Avila Beltrán R. 2002. Epidemiology of drug resistance: the case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *Salud Publica Mex.* 44:108–112.

Chambers HF. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microb. Rev.* 10:781-791.

Charlebois E D, Bangsberg D R, Moss N J., Moore M R., Moss A R, Chambers H F, Perdreau-Remington F. Population bases community prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. *Clin. Infect. Dis.* 34: 425-433.

Christensen P, Haeger-Aronsen B, Kamme C, Nilsson NI, Welinder H. 1977. *Staphylococcus aureus* in the throat: A saprophyte or a pathogen? *Scand. J. Infect. Dis.* 9:27-30.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test, 9 ed., vol 26, no 1. Approved standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. EUA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grown aerobically, 7th ed., vol. 26, no. 2. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. EUA.

Coello R, Jiménez J, García M, Arroyo P, Domínguez, Fernández C, Cruzet F. Gaspar C. 1994. Prospective study of infection, colonization and carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a outbreak affecting 990 patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 74-81.

Cole A M, Dewan P, Ganz T. 1999. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun.* 67:3267-3275.

Coleman D.C, Arbuthnott J, Pomeroy P H M, Birbeck H. 1986. Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the beta-lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. *Microb. Pathog.* 1:549–564.



- Corbella X, Domínguez M A, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Pallares R, Ariza J, Gudiol F. 1997. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16:351-357.
- Cornejo-Juárez P, Velásquez-Acosta C, Díaz-González A, Volkow-Fernández P. 2005. Tendencia del perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de sangre en un hospital oncológico (1998-2003) *Salud Pública Mex.*47: 288-293.
- Cornejo-Juárez P, Volkow-Fernández P; Sifuentes-Osornio J, Echániz-Aviles G, Díaz-González A, Velásquez-Acosta C, Bobadilla-Del-Valle M, Gordillo-Molina P, Velázquez Meza ME. 2010. Tracing the source of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary-care oncology hospital by epidemiology and molecular methods. *Microb. Drug Resist.* 16 (3): 203-208.
- Diep B A, Perdreau R F, Sensabaugh G F. 2003. Clonal characterization of *Staphylococcus aureus* by Multilocus restriction fragment typing, a rapid screening approach for molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10): 4559-4564.
- Dinges M M, Orwin P M, Schlievert P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microb. Rev.* 13 (1):16-34.
- Dong E B, Soo H K, Jong H S, Soon P S, Dong W R. 1997. Molecular epidemiologic analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *J. Korean Med. Sci.* 12:190-198.
- Echániz-Aviles G, Velázquez-Meza M. E, Aires de Sousa M, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Carnalla-Barajas N, Esparza-Ahumada S, Lencastre H. 2006. Molecular characterisation of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican hospital (1999–2003). *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 22-28.
- Fischetti V A, Novick R P, Ferretti J J, Portnoy D A, Rood J. I. Eds. 2006. Gram-Positive Pathogens, ASM Press. Washington.EUA.
- Fueyo Mendoza J M. 2005. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos TESIS DOCTORAL Universidad de Oviedo.
- García-Rodríguez J A, Picazo J J. 1996. Compendio de Microbiología Médica General. *Staphylococcus*. Ed. Harcourt-Brake, Madrid, España.
- Gil DM. 2000. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilina. *Rev. Chil. Infec.* 17(2): 145-152.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J C, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piemont Y, Brousse N, Floret D, Etienne. J. (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 359:753-759.
- Glenny A T, Stevens N F. 1935. Staphylococcal toxins and antitoxins. *J. Pathol. Bacteriol.* 40:201–210.

- Grady R, Desai M, O'Neill G, Cookson B, Stanley J. 1999. Genotyping of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage type 15 isolates by fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 37:3198-3203.
- Gordon R J; Lowy F.D. 2008. Pathogenesis of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection. Clin. Infect. Dis.* 46: Suppl. 5: S350-S359.
- Gray G S, Kehoe M. 1984. Primary sequence of the a-toxin gene from *Staphylococcus aureus*. *Wood* 46. *Infect. Immun.* 46:615–618.
- Hartman B, Tomasz A. 1986. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 29 (1): 85-92
- Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, Vance G H, Vogth P H 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step Protocol. *Biotechniques.* 23: 504-511.
- Hernández V T, Torano P G, González M, González B L. 2003 *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina: detección de portadores entre niños hospitalizados y niños sanos de la comunidad. *Rev. Cub. Med. Trop.* 55(3):153-161.
- Higuchi W, Takano T, Ten L J, Yamamoto T. 2008. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (3): 752-756.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover F C. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:135-136.
- Howe RA, Brown NM, Spencer RC. 1996. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. *J. Clin. Pathol.* 49: 444-449.
- Hu L, Umeda A, Kondo S, Amako K. 1995. Typing of *Staphylococcus aureus* colonising human nasal carriers by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* 42: 127-132.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2009. Classification of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC *mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(12): 4961- 4967.
- Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1449–1458
- Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1323–1336.
- Ito T, Ma X X, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu, K. 2004. Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (7): 2637-2651.

- Ito T, Kuwahara K, Hiramatsu K. 2007. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) analysis of MRSA. *Methods Mol. Biol.* 391: 87-102.
- Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H., Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70, p: 631-641.
- Jensen S O; Lyon B R. 2009. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 4: 565-582.
- Kanafani Z A, Fowler V G. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24(3): 182-193.
- Kloos W E, Bannerman T L. *Staphylococcus and Micrococcus*. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. 1995. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C, pp 282-298.
- Kluytmans J A, van Belkum, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 505–520.
- Kluytmans J, van Leeuwen W, Goessen W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, van Leeuwen N. 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 33:1121-1128.
- Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W C. 2001. *Diagnóstico Microbiológico*. 5ta. ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Krzywanek K, Luger C, Sammer B, Stumvoll S, StammLer M, Metz-Gercek S, Mittermayer H. 2007. PVL-positive MRSA in Austria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 931–935.
- Labarca J. 2002. Utilización del antibiograma como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev. Chil. Infect.* 19 (2): S157-160.
- Lambris J D, Ricklin D, Geisbrecht B.V. 2008. Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2): 132 -142.
- Larson E J, Hakovirta J R, Cai H, Jett J H, Burde S, Keller R A, Marrone B L. 2000. Rapid DNA fingerprinting of pathogens by flow cytometry. *Cytometry.* 41:203-208.
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne. 1999. Involvement of Pantón-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29: 1128-1132.
- Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339: 520–532.
- Ma X X, Ito T, Tienasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R. S, Hiramatsu K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1147-1152.

- Mandell G L; Bennett J E. Dolin, R. 2000. En: Principles and practice of infectious diseases. 5ta. Edición. Editorial Churchill Livingstone (Philadelphia, Pennsylvania) EUA.
- Mansilla E C. 2006; Epidemiología de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos. Rev. Esp. Quimioterap. 19 (1): 83-84.
- Marcos J Y, Soriano A C, Salazar M S, Moral C H, Ramos S S, Smeltzer M S, Carrasco G. 1999. RAPD identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. J. Clin. Microbiol. 37:570-574.
- Martins A y Cunha, M. de L. 2007. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol. Immunol. 51(9): 787-795.
- Maslow J N, Mulligan M E. 1996. Epidemiologic typing systems. Infect. Control. Hosp. Epidemiol.; 17: 595-604.
- Mertz D, Frei R, Periat N, Zimmerli M, Battegay M, Flückiger U, Widmer A. F. 2009. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage at-risk populations. Arch. Intern. Med. 169:172-178.
- Miller M B, Bassler L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 55: 165-199.
- Montserrat I, March F, de Simon M, Llovet T, Ferrer MD, Coll P, Prats G. 1994. Aplicaciones de técnicas de biología molecular en el estudio de intoxicación alimentaria causada por *Staphylococcus aureus*. Med Clin. 103:361-365.
- Mulvey MR, Chui L, Ismael J, Louis L, Murphy C, Chang N, Alfa M, The Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods. 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 39:3481-3485.
- Naimi T S, LeDell K H, Como-Sabetti K, Borchardt S. M, Boxrud D J, Etienne J, Johnson S K, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila R N, Lynfield R. 2003. Comparison of community and health care-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA 290: 2976-2984.
- National Nosocomial Infectious Surveillance System (NNIS) 2004. System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am. J. Infect. Control. 32: 470-485.
- Nilsson P, Ripa T. 2006. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in anterior the nares. J. Clin. Microbiol. 44:3334-3339.
- Okuma K, Iwakawa K, Tumidge J D, Grubb W B, Bell J M, O'Brien F G, Coombs G W, Pearman J W, Tenover F C, Kapi M, Tiensasitom Ch, Ito T, Hiramatsu K. 2002. Dissemination of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. J. Clin. Microbiol. 40 (11): 4289-4294.
- Olive D M, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol. 37:1661-1669.

- Oliveira D C, de Lencastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2155-2161.
- Oliveira D, Milheirico C, Lencastre H. 2006. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (10): 3457–3459.
- Peacock S J, de Silva I, Lowy F D. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends in Microbiol.* 9:605-610.
- Projan S. J, Komblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. L, Eisner W, Novick R. P. 1989. Nucleotide sequence: the *b*-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 17: 3305.
- Reyes R I, Chamero S, Flores L M, Ortega M S, Farias D T 2010. Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina en el Hospital Provincial Clínico Quirúrgico Cienfuegos. *Microbiología y Parasitología. Enfermedades Infecciosas.* <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/2352/1/Deteccion-deStaphylococcus-aureus-resistente-a-la-metilina>. (Consultado el 16 de enero del 2011).
- Riewerts Eriksen N H, Espersen F, Rosdahl V T, Jensen K. 1994. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19 month period. *Epidemiol. Infect.* 115: 51-60.
- Ringberg H, Petersson A C, Walder M y Johansson P J H. 2006. The throat: an important site for MRSA colonization. *Scand. J. Infect. Dis.* 38:888–893.
- Sander H S, Jones R N. 2000. Resistencia a los antimicrobianos de los agentes patógenos causales de infecciones nosocomiales y comunitarias en América Latina: Reseña general de las estadísticas de 1997. En: Organización Panamericana de la Salud. Resistencia Antimicrobiana en las Américas. Magnitud del Problema y su contención. Washington; OPS; p 54-73.
- Sanford M D, Widmer A F, Bale M J, Jones R N, Wenzel R P. 1994. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 19 (6):1123-1128.
- Sanjay K. S. 2005. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Its Emerging Virulence. *Clin. Med. Res.* 3 (2): 57-60.
- Schwartz D C, Cantor C R. 1984. Separation of yeast chromosome sized ADNs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67-75.
- Shopsin B, Kreiswirth B N. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect. Dis.* 7:323-326.
- Shore A, Rossney S, Keane T C, Enright M. C, Coleman D C. 2005. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Ireland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: (5): 2070-2083.
- Shuter J, Hatcher V B, Lowy F D. 1996. *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. *Infect. Immun.* 64:310-318.

- Singh A, Goering R V, Simjee S, Foley S L, Zervos M J. 2006. Application the molecular techniques to the study of Hospital Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3): 512-530.
- Tenover F C, Arbeit R.D, Goering R V, Mickelsen P A, Murray B E, Persing D H, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- Tomaz A, Nachman S, Leaf H. 1991. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 124-129.
- Tondo E C, Guimaraes M C, Henriques J A, Ayub M A. 2000. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can. J. Microbiol.* 46:1108-1114.
- Torres B A, Kominsky S, Perrin G Q, Hobeika A C, Johnson H. M. 2001. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp. Biol. Med.* 226: 164-176.
- Urwin R, Maiden M. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology.* 11 (10): 479- 487.
- Uemura E, Kakinohana S, Higa N, Toma C, Nakasone N. 2004. Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:21-24.
- Valsesia G, Rossi M, Bertschy S, Pfyffer G. 2010. Emergence of SCCmec Type IV and SCCmec Type V methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine Leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators? *J. Clin. Microbiol.* 48 (3): 720-727.
- VandenBergh M F Q, Yzerman, E P F, van Belkum A, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J. Clin. Microb.* 37:3133-3140.
- Vandenesch F, Naimi T, Engrigh M C, Lina G, Nimmo G R, Heffer-nan H, Liassine N, Greeland M, Bes. T, Reverdy M. E, Etienne J. 2003. Community-acquired methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: world emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 978-984.
- van Griethuysen A, Van Loo I, Van Belkum A, Vandenbroucke- Grauls Ch, Wannet W, van Keulen P, Kluytmans J. 2005. Loss of the mecA Gene during Storage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 43 (3): 1361–1365.
- van Leeuwen W, Sijmons M, Sluijs J, Verbrugh H, van Belkum A. 1996. On the nature and use of randomly amplified DNA from *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 34:2770-2777.
- van Leeuwen W, Verbrugh H, van der Velden J, van Leeuwen N, Heck M, van Belkum A. 1999. Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37:664-674.
- Velásquez-Meza M. E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilicilinoresistente. *Salud Pública. Mex.* 47:381-387.

- Velásquez M. E, Aires de Sousa M, Echaniz G, Solórzano S F, Miranda N.G, Silva S.J, De Lencastre H. 2004. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico city a 7 year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3877-3880.
- Wang L, Archer G L. 2010. Roles of Ccr A and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome mec, a *Staphylococcus aureus* genomic island. *J. Bacteriology.* 192 (12): 3204-3212.
- Wannet W J B, Spalburg E, Heck M E O C, Pluister G. N, Tiemersma E, Willems R J L, Huijsdens X. W, Neeling A J de, Etienne J. 2005. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3341-3345.
- Ward T T. 1992. Comparison of *in vitro* adherence of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human nasal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 166:400-404.
- Weber T. J. 2005. Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 41: 269-272.
- Wenzel R P; Reagan D R, Bertino J S, Baron E J, Arias K. 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. *Am. J. Infect. Control.* 26 (2): 102-110.
- Wong H, Louie L, Lo Y.C R, Simor A. E. 2010 Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates with Partial and Complete Absence of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. *J. Clin. Microbiol.* JCM Accepts, published online ahead of print on 28 July 2010.
- Yungueros, J. Temprano A, Sánchez M. Luengo, J N, Naharro G. 2001. Identification of *Staphylococcus spp.* by PCR-restriction fragment length polymorphism of *gap* gene. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3693 -3695.
- Zhang K, McClure J. A., Elsayed S y Conly J. M. 2009. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:531-540.

## Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares and Throats of Healthy Carriers in a Mexican Community<sup>†</sup>

Aída Hamdan-Partida,<sup>1</sup> Teresita Sainz-Espuñes,<sup>1</sup> and Jaime Bustos-Martínez<sup>2\*</sup>

*Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 04960 Mexico City, Mexico,<sup>1</sup> and Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 04960 Mexico City, Mexico<sup>2</sup>*

Received 29 September 2009/Returned for modification 11 December 2009/Accepted 14 March 2010

Healthy carriers of *Staphylococcus aureus* strains have an important role in the dissemination of this bacterium. To investigate the presence of *S. aureus* in the throat and anterior nares, samples from 1,243 healthy volunteers in a Mexican community were examined. The percentage of healthy carriers was 59.8%. Results showed that colonization of the throat occurred more frequently than that of the nares (46.5% versus 37.1%,  $P < 0.0001$ ). Of the *S. aureus* carriers, 22.2% were exclusive nasal carriers and 38% were exclusive throat carriers. A total of 1,039 strains were isolated; 12.6% were shown to be methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Of MRSA strains, 32.1% were isolated from exclusive throat carriers. Most of the strains isolated from the anterior nares and throat of the same carriers were the same or related; however, some were different. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern analysis of the MRSA strains isolated from the exclusive nasal carriers or exclusive throat carriers showed that they belong to different clusters. A 6-year prospective study was performed to investigate the persistence of *S. aureus* in the throat. Results showed that 13% of subjects were persistent carriers. Most of them were colonized with the same clone of *S. aureus* throughout the time of the study, and just three had different clones. Antimicrobial susceptibility testing showed that 91.1% of the strains were penicillin resistant. The presence of *mecA* and *nucA* genes (in order to confirm methicillin resistance) and of thermostable nuclease of *S. aureus* was examined. This study showed that some strains of *S. aureus* regularly colonized the throats of healthy people and could persist for years.

*Staphylococcus aureus* remains one of the most frequently occurring community-acquired as well as hospital-acquired pathogens, with high rates of hospital-acquired infections (11).

Recently, the epidemiology of *S. aureus*, in particular methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), has changed with the emergence of community-acquired MRSA (CA-MRSA) (6, 10). Reports from different parts of the world indicate that CA-MRSA has emerged as a new pathogen (3, 26, 32).

*S. aureus* is a transient or persistent part of the resident flora in the anterior nares of the population (15). The anterior nares are considered to be the primary colonization site, and approximately 30% of healthy people carry this bacterium (15).

The human throat is less well studied than the nares as a carriage site; nevertheless, some isolations have been reported (19, 22, 25). Colonization of the throat but not of the nares may be more common than is currently acknowledged. Recent studies confirmed the observation that the throat may be selectively colonized and escape current routine screening programs (1, 16, 18, 27, 33). Unrecognized carriers may spread MRSA and render infection control programs futile (18, 19, 27).

Three main carriage patterns have been described when individuals are repeatedly sampled in the anterior nares for *S. aureus* over longer periods of time: the so-called noncarriers,

who were never reported to carry the organism; the persistent carriers, who repeatedly cultured positive; and the occasional or intermittent carriers, who from time to time yielded positive cultures (31). The persistence of single *S. aureus* clones in some of the carriers confirms previous reports on the exchange of *S. aureus* strains over time in nasal carriers (5, 13, 24). It is unclear, therefore, whether throat carriers are a subgroup of the population who can maintain *S. aureus* in this anatomical site or whether the microorganisms are temporary residents.

The aim of this work was to determine the frequency and persistence of carriage of *S. aureus*, especially the MRSA strains, in the throat in relation to anterior nares in a Mexican open population and also to determine the clonal relationships of nasal and throat strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis as well as the persistence of carriage over the years, which has not been documented.

### MATERIALS AND METHODS

**Population study.** A prospective observational study from 1998 to 2006 was carried out. Volunteers were selected from locations where we could follow them for a long period of time, such as schools or factories; we explained the reason for the study, and we asked them for consent. Volunteers were enrolled at equal time intervals over the 6-year period. All volunteers were not recently hospitalized and claimed not to have chronic diseases. After providing informed consent, 1,243 volunteers who were not aware of any ailment at the time of the sampling were screened for nasal and throat carriage. If isolates of *S. aureus* were from only one of these two parts of the body, we defined the carriage as exclusive nasal or exclusive throat carriage. Age ranges were from 1 to 96 years, with a mean age of 21 years. Fifty-four percent were females, and 46% were males. The entire population was divided into six groups: the first five each included a 10-year age range (1 to 50 years total) and the last one consisted of individuals over 50 years old. Among all volunteers, a group of 108 were annually sampled for throat

\* Corresponding author. Mailing address: Depto. Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. Del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán 04960, Mexico City, Mexico. Phone: (52) 55 54837502. Fax: (52) 55 54837218. E-mail: jrbustos@correco.xoc.uam.mx.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 24 March 2010.



strains for up to 6 years (1998 to 2003). We defined persistent carriage as carriage by the volunteer of the *S. aureus* strains for all 6 years of the study and defined intermittent carriage as evidence of the bacteria on at least two occasions but not consecutively during the 6 years in which we sampled the volunteer.

**Screening for nasal and throat carriage.** Specimens were obtained with sterile cotton swabs moistened with sterile saline; samples were taken at the same time from the anterior nares and from the posterior wall of the pharynx—first the throat and then (using a different swab) the nares, always in that order.

Soy Trypticase broth (Bioxon) was inoculated with the swab samples; after overnight incubation at 35 to 37°C, the broth was subcultured onto 5% blood agar plates and phenol red mannitol salt agar (Oxoid) and incubated at 35 to 37°C for 24 h. Mannitol fermentation-positive isolates were further analyzed. Hemolysis was scored as positive if a clear zone of beta-hemolysis was observed on blood agar.

**Biochemical identification.** Using standard microbial protocols, five colonies from pure cultures were subjected to Gram staining reaction, catalase test, and tube coagulase test. The biochemical properties were determined using the API Staph system (bioMérieux, France). *S. aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 were used as positive and negative controls, respectively.

**Antimicrobial susceptibility testing.** All isolates were screened for resistance to different antibiotics: penicillin (10 U), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), cephalothin (30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg), fosfomicin (50 µg), ciprofloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), clindamycin (2 µg), oxacillin (1 µg), and vancomycin (30 µg) (BD BBL Sensi-Disc; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD). Susceptibility was determined by the disk diffusion method as recommended by the CLSI publication M2-A9 (7), and for oxacillin, MIC was determined according to the CLSI publication M7-A7 (8); a homemade broth microdilution tray was used, and oxacillin was supplied by Sigma. *S. aureus* ATCC 43300 was the positive control, and *S. aureus* ATCC 29213 was the negative control.

**PFGE typing.** Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) and MRSA isolates were typed by PFGE. Preparation of DNA and resolution of the SmaI-digested fragments were performed as described by Mulvey et al. (21). Samples were run on a CHEF-DR II system (Bio-Rad). Gels were photographed and digitized using a Bio-Rad Gel Doc. The PFGE patterns were compared following the criteria of Tenover et al. (28) for bacterial strain typing.

**Data analysis.** PFGE patterns were analyzed with Gene Tool software and Gene Directory software (Syngene, United Kingdom). The reference standard *S. aureus* NCTC 8325 was included in each gel for band normalization. Percent similarities were obtained from the unweighted pair group with mathematical average (UPMGA) based on Dice coefficients. Band position tolerance was set at 1.25%. A similarity coefficient of 80% was selected to define the pulsed-field type clusters (17).

**Detection of *mecA* and *nucA* genes by PCR amplification.** Genomic DNA from staphylococcal cultures was extracted with the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI), following the supplier's instructions. PCR assays were performed for *mecA* and *nucA* genes using a PCR kit (Qiagen); primers and conditions for *mecA* were as reported by Oliveira and de Lencastre (23), and those for *nucA* were as reported by Brakstad et al. (2). Using a J Personal Thermocycler (Biometra), PCR products were analyzed using a 1% ethidium bromide-stained agarose gel.

**Statistical analysis.** Results were analyzed using statistical software JMP version 7 (SAS Institute Inc.), using the chi-square independent test, likelihood ratio, for  $P < 0.05$ .

## RESULTS

***S. aureus* carriers.** Of the 1,243 volunteers analyzed, the percentage of healthy *S. aureus* carriers considering the nares, the throat, and both sites was 59.8% (743 volunteers). *S. aureus* was found mainly colonizing the throat (46.5%), while the anterior nares colonization was 37.1% ( $P < 0.001$ ). Of the 743 *S. aureus* carriers, 296 (39.8%) were nasal and throat carriers, 165 (22.2%) were exclusive nasal carriers, and 282 (38%) were exclusive throat carriers (Table 1). The presence of *S. aureus* in the nares was greater in male carriers (40.9%) than in female carriers (33.9%;  $P = 0.011$ ), and it was greater in the age group 1 to 10 years (45.9%) than in the other age groups (31 to 37%;  $P = 0.0077$ ). The same analysis was made for the throat carriers, and percentages of 50.82% for ages 1 to 10 years and

TABLE 1. Percentages of *Staphylococcus aureus* carriers

| Type of carrier              | No. of volunteers<br>(n = 1,243) | Rate (%) of positivity among: |          |
|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|
|                              |                                  | Total volunteers              | Carriers |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 743                              | 59.8                          | 100      |
| Nasal                        | 461                              | 37.1                          | 62       |
| Throat                       | 578                              | 46.5                          | 77.8     |
| Nasal and throat             | 296                              | 23.8                          | 39.8     |
| Exclusive nasal              | 165                              | 13.3                          | 22.2     |
| Exclusive throat             | 282                              | 22.7                          | 38       |
| MRSA                         | 107                              | 8.6                           | 14.4     |

50.39% for ages 11 to 20 years were obtained. The other age groups had percentages between 33 and 43% ( $P = 0.0077$ ).

Individuals with nasal carriage are more likely to have throat carriage also (odds ratio [OR] = 3.09,  $P < 0.0001$ ). This association increases when individuals are under 19 years old (OR = 1.3,  $P = 0.029$ ).

**Antimicrobial susceptibility.** *S. aureus* isolated strains were penicillin (91.1%), erythromycin (23.1%), tetracycline (15.5%), cephalothin (7.1%), and clindamycin (6.2%) resistant. With other antimicrobial agents tested (ciprofloxacin, fosfomicin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and gentamicin), resistance was  $\leq 2\%$ . No vancomycin resistance was found.

**MRSA carriers.** Of 743 *S. aureus* carriers, 107 (14.4%) were MRSA carriers. Percent carriage of MRSA strains was similar between males and females, 52.3% and 47.7%, respectively. When analyzed by age group, 33.6% was found in the 1- to 10-year-old group, followed by the 11- to 20-year-old group (25.2%), and for the other groups, the percentage decreased as the age increased.

A total of 1,039 *S. aureus* strains were isolated from the studied population; 908 (87.4%) were MSSA, and 131 (12.6%) were MRSA. All MRSA isolates were positive for *mecA* and *nucA* genes as tested by PCR. Of the MRSA isolates 31.3% were isolated from exclusive nasal carriers, 32.1% were isolated from exclusive throat carriers, and 36.6% were isolated from the nares and the throat of the same carrier.

**PFGE analysis.** Using PFGE pattern analysis, results showed that when 16 pairs of MSSA strains isolated from the nares and the throat of the same carriers were compared, 13 (81%) were the same strain or clonally related and only three pairs were different or not related (19%). These results show that most of the strains isolated from the nares are the same carried in the throat or clonally related; however, some carriers have different strains colonizing the throat and the nares at the same time.

A dendrogram of PFGE patterns (Fig. 1) showed 14 MRSA pairs of strains isolated from both nares and throat of the same carrier, and it was found that 9 pairs were the same strain or related and only 5 pairs showed different band patterns and were not related, showing that MRSA strains could be different when they are isolated from different niches of the same carrier (volunteers 470, 612, 642, 687, and 691).

When 54 MRSA strains isolated from 28 exclusive throat carriers or 26 exclusive nares carriers were analyzed, results from the PFGE dendrogram showed three regions (Fig. 2): one in which most of the strains were isolated from the nares,

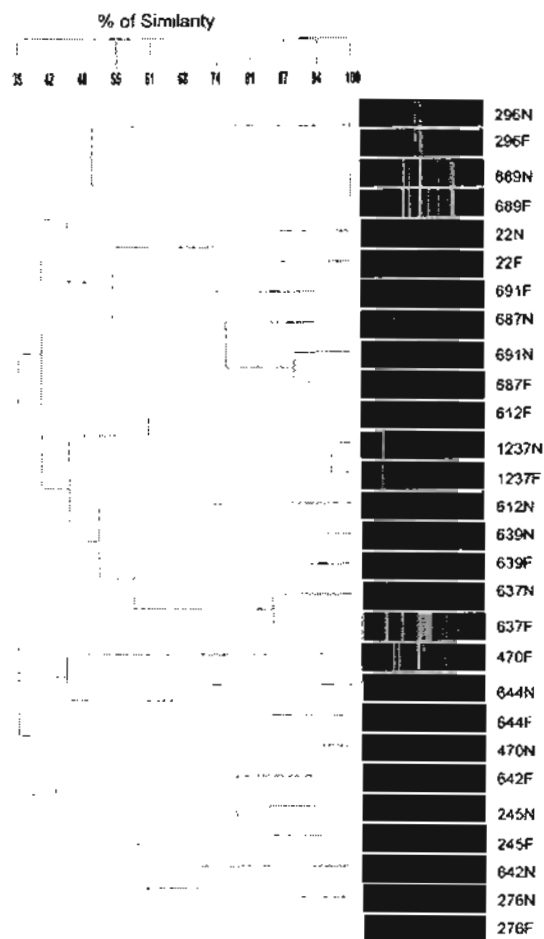


FIG. 1. Smal-PFGE dendrogram comparing pairs of MRSA strains isolated from the nares and the throat. Fourteen carriers were analyzed for *S. aureus* strains in the nares (N) and the throat (F). Most N and F pairs are carrying the same or related *S. aureus* strains.

a second in which most of the strains were from the throat, and a smaller, third one where nares strains predominated. These results may indicate that some special features make these MRSA strains prefer to colonize either the nares or the throat.

**Persistence of *S. aureus* in the throat.** To determine the persistence of throat carriage, a group of 108 volunteers were screened for 6 years (1998 to 2003); 14 (13%) never carried *S. aureus*, 80 (74%) were intermittent carriers, and 14 (13%) were persistent carriers.

When *S. aureus* strains isolated from 12 persistent throat carriers were analyzed using PFGE, nine carriers showed the same or clonally related persistent strains during the period of the study. When the dendrogram obtained was analyzed, results showed that some carriers held the same strains for long periods of time, while others were colonized with different clones (data not shown).

## DISCUSSION

The emergence of MRSA in the community has increased the importance of screening for this pathogen among the healthy population. Screening to search for such strains has

been traditionally restricted to the nares (9, 15, 24, 34); however, recent studies have demonstrated the importance of the throat as a very common site of colonization (19, 22, 25).

Previous investigations had found a variable frequency of *S. aureus* throat carriage ranging from 4% up to 64% (34). Several studies had shown that individuals may have colonization exclusively in the throat that would be missed on screening limited to the anterior nares (18, 20, 27, 33).

As in a previous study by Nilsson and Ripa (22), our results also suggest that the presence of *S. aureus* is more frequent in the throat than in the nares. Percentages reported by them (40% for the throat and 31% for the nares) were similar to those found in this study (Table 1). This is important because social and economic circumstances are different for Sweden and Mexico.

If only the nares were tested, 38% (282) of the total of *S. aureus* carriers would be missed, and also the 32.1% of the MRSA strains isolated from the exclusive throat carriers, suggesting that a great percentage of them are excluded from the screenings, and as Mertz et al. (19) reported, we also think that an additional throat screening is important during the investigation of carriers within a community.

An interesting result was that the presence of *S. aureus* was greater in the nares of men than in the nares of studied women ( $P = 0.011$ ), which suggests that gender is relevant as a colonization feature, as has been reported previously (14). However, when throat colonization was compared between men and women, no statistical significance was observed.

Gorwitz et al. (14) reported that carriers less than 20 years of age are more frequently colonized than the older ones; our results showed the same frequency, with 63.3% (471) of carriers being 20 years or younger. Results showed that colonization with *S. aureus* decreases as people grow older, as Mertz et al. (19) also found.

As expected, most of the *S. aureus* strains (91.1%) were penicillin resistant due to the extended use of this antibiotic worldwide in the past.

PFGE of most of the MSSA strains isolated from the nares and the throat of the same carrier showed identical or related profiles; however, a few were different. Our data confirm the existence of different clones of *S. aureus* carried in the nares and the throat, a finding which supports the idea of Uemura et al. (29) that staphylococcal flora in the nose and the throat were independently formed and that attention should also be directed to the carriers of *S. aureus* in the throat for the control of nosocomial infection.

Like the MSSA strains, the MRSA strains isolated in this study from the nares and the throat of the same carrier have the same PFGE profile or a related one, a finding which is in agreement with the results reported by Small et al. (27); however, we also found different MRSA strains in the throat and the nares, and these data support the fact that *S. aureus* has to be screened in both the nares and the throat.

When PFGE profiles for exclusive nasal carriers or exclusive throat carriers were analyzed, we determined that exclusive nasal types were grouped mostly in two different regions and exclusive throat isolates were grouped mostly in one region (Fig. 2). Here we are comparing two different environments with different features that could determine the preference for colonization of each particular strain.

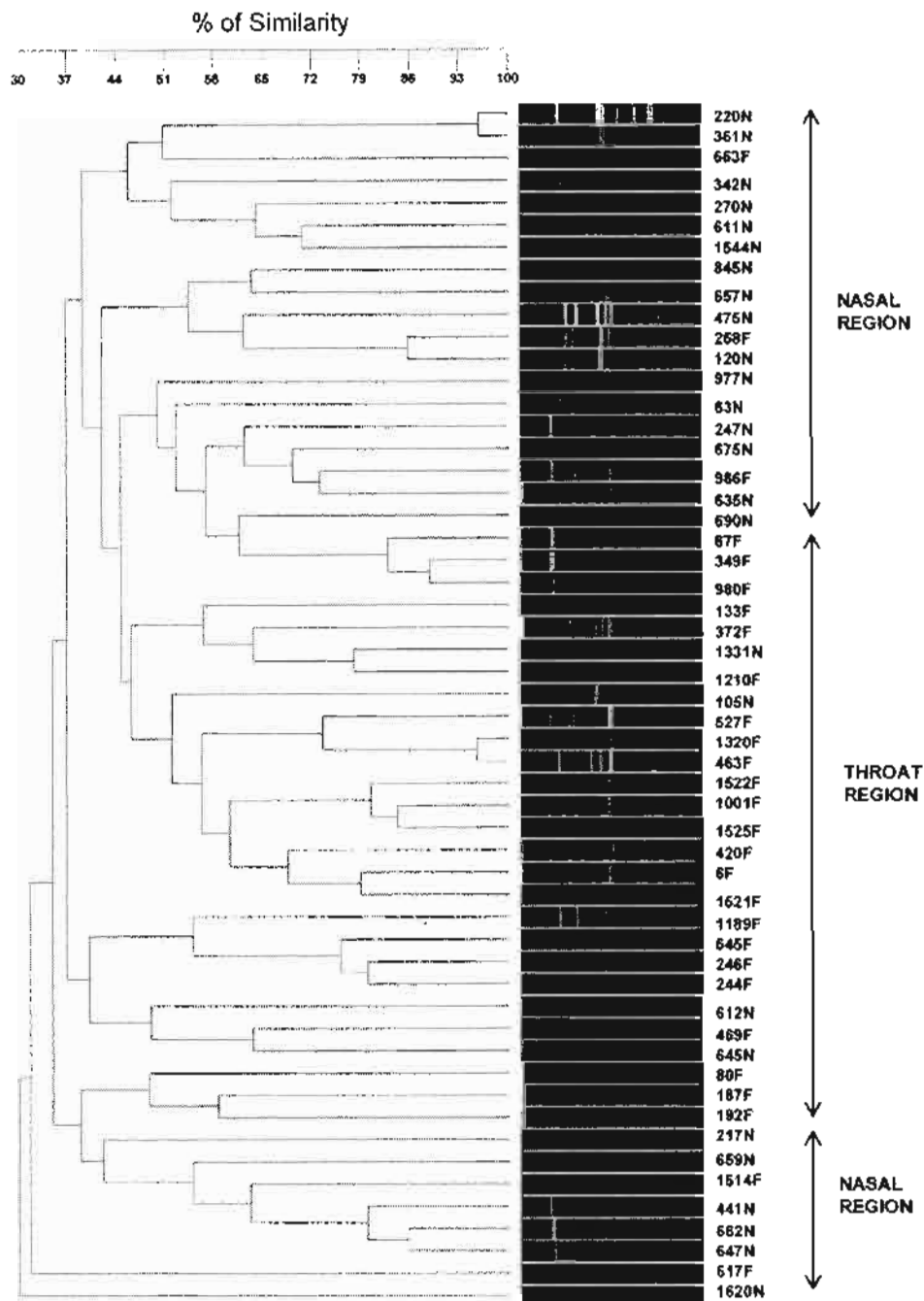


FIG. 2. SmaI-PFGE dendrogram comparing MRSA strains of exclusive nasal (N) or exclusive throat (F) carriers. Two major regions are observed with mainly throat or nasal strains.

Isolation of MRSA strains from hospitals in Mexico has been reported (4, 12). The percentage of MRSA strains reported by Calderón-Jaimes et al. (4) isolated from hospitals in Mexico City was 14.2% between 1998 and 2000. Our results showed a smaller value, but MRSA strains are preferentially isolated from hospital environments. This is the first work that studies the presence of *S. aureus* in the nares and throat within a healthy Mexican community, and so it may be different from those reported for hospital environments.

Persistence of *S. aureus* in the anterior nares has been extensively studied (9, 15, 24, 30, 31); however, few works had studied persistence in the throat. VandenBergh et al. (31) reported persistent and intermittent carriage and noncarriage for nasal samples. The same pattern was found in our results when throat carriers were studied. Results showed that 13% of the studied population never carried *S. aureus*, 74% were intermittent carriers, and 13% were persistent carriers. Nilsson and Ripa (22) reported 31% persistent carriers in their study in

a 2-year period; we continued sampling some carriers for a longer period of time, and we believe that this was the reason for a lower value.

Persistence of *S. aureus* in the throat in some cases for up to 6 years was found; few persistent carriers were colonized with different clones of *S. aureus* over time. However, the present data showed that most *S. aureus* persistent strains produce PFGE patterns that are relatively stable over the years, suggesting that these strains remain genetically unchanged during the time of colonization.

The present study investigated the clonality of *S. aureus* nasal and throat carriage; results demonstrated strain diversity among carriers colonized with *S. aureus*.

Much work has been done to identify nasal MRSA carriers; however, throat carriers may contribute to spread MRSA infections and the decolonization schemes could fail (18). Our results support what was previously reported (18, 27, 33): culturing the anterior nares alone is insufficient for efficient detection of MRSA carriers.

This study showed that the throat is an important habitat of *S. aureus*, including MRSA, and the bacteria could persist as colonizers for many years. In conclusion, any screening for *S. aureus*, in particular screening for MRSA within a community, should include cultures from both the anterior nares and the throat.

#### ACKNOWLEDGMENTS

A. Hamdan-Partida is a Ph.D. student at the Doctorado en Ciencias Biológicas de Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, and was supported by grant 103369 of CONACYT, Mexico. Partial support for this study was provided by Acuerdo del Rector 12/2008, UAM.

We thank Esther Irigoyen for statistical analysis support. We thank Rocío Martínez-Colula, Carmen Galicia-Galicia, and Gabriela Ramírez-Benítez for technical support.

#### REFERENCES

- Batra, R., A. C. Eziefule, D. Wyncoll, and J. Edgeworth. 2008. Throat and rectal swabs may have an important role in MRSA screening of critically ill patients. *Intensive Care Med.* 34:1703-1706.
- Brakstad, O. G., K. Aasbakk, and J. A. Maeland. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol.* 30:1654-1660.
- Bustos-Martínez, J. A., A. Hamdan-Partida, and M. E. Gutiérrez-Cárdenas. 2006. *Staphylococcus aureus*: the reemergence of a pathogen in the community. *Rev. Biomed.* 17:287-305.
- Calderón-Jalimes, E., L. E. Espinosa de los Monteros, and R. Avila-Beltrán. 2002. Epidemiology of drug resistance: the case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *Salud Pública Mex.* 44:108-112.
- Céspedes, C., B. Said-Salim, M. Miller, S.-A. Lo, B. N. Kreiswirth, R. J. Gordon, P. Vavagiakis, R. S. Klein, and F. D. Lowy. 2005. The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J. Infect. Dis.* 191:444-452.
- Chambers, H. F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* 7:178-182.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 9th ed., vol. 26, no. 1. Approved standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed., vol. 26, no. 2. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cole, A. M., S. Tahk, A. Orea, D. Yoshioka, Y. Kim, A. Park, and T. Ganz. 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:1064-1069.
- Davis, S. L., M. B. Perri, S. M. Donabedian, C. Manlinski, A. Singh, D. Vager, N. Z. Paque, K. Speirs, R. R. Muder, B. Robinson-Dunn, M. K. Hayden, and M. J. Zervos. 2007. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Clin. Microbiol.* 45:1705-1711.
- DeLeo, F. R., and H. F. Chambers. 2009. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J. Clin. Invest.* 119:2464-2474.
- Echániz-Aviles, G., M. E. Velázquez-Meza, M. Aires de Sousa, R. Morfín-Otero, E. Rodríguez-Noriega, N. Carnalla-Barajas, S. Esparza-Ahumada, and H. de Lencastre. 2006. Molecular characterization of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican hospital (1999-2003). *Clin. Microbiol. Infect.* 12:22-28.
- Eriksen, N. H., F. Espersen, V. T. Rosdahl, and K. Jensen. 1995. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol. Infect.* 115:51-60.
- Gorwitz, R. J., D. Kruszon-Moran, S. K. McAllister, G. McQuillan, L. K. McDougal, G. E. Fosheim, B. J. Jensen, G. Killgore, F. C. Tenover, and M. J. Kuehnert. 2008. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J. Infect. Dis.* 197:1226-1234.
- Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:505-520.
- Marshall, C., and D. Spelman. 2007. Is throat screening necessary to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in patients upon admission to an intensive care unit? *J. Clin. Microbiol.* 45:3855.
- McDougal, L. K., C. D. Steward, G. E. Killgore, J. M. Chaitram, S. K. McAllister, and F. C. Tenover. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* 41:5113-5120.
- Mertz, D., R. Frei, B. Jauss, A. Tietz, C. Stebler, U. Flückiger, and A. F. Widmer. 2007. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 45:475-477.
- Mertz, D., R. Frei, N. Periat, M. Zimmerli, M. Büttegay, U. Flückiger, and A. F. Widmer. 2009. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage at-risk populations. *Arch. Intern. Med.* 169:172-178.
- Meurman, O., M. Routamaa, and R. Pellonen. 2005. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: which anatomical sites to culture? *J. Hosp. Infect.* 61:351-353.
- Mulvey, M. R., L. Chui, J. Ismail, L. Louie, C. Murphy, N. Chang, M. Alfa, and the Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods. 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulse-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 39:3481-3485.
- Nilsson, P., and T. Ripa. 2006. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *J. Clin. Microbiol.* 44:3334-3339.
- Oliveira, D. C., and H. de Lencastre. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2155-2161.
- Peacock, S. J., I. de Silva, and F. D. Lowy. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol.* 9:605-610.
- Ringberg, H., A. C. Petersson, M. Walder, and P. J. H. Johansson. 2006. The throat: an important site for MRSA colonization. *Scand. J. Infect. Dis.* 38:888-893.
- Said-Salim, B., B. Mathema, and B. N. Kreiswirth. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:451-455.
- Small, H., A. L. Casey, T. S. J. Elliott, J. Rollason, and S. Ball. 2007. The oral cavity an overlooked site for MRSA screening and subsequent decolonisation therapy? *J. Infect.* 55:378-383.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- Uemura, E., S. Kakinohana, N. Higa, C. Toma, and N. Nakasone. 2004. Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:21-24.
- van Belkum, A., N. J. Verkalk, C. P. de Vogel, H. A. Boelens, J. Verveer, J. L. Nouwen, H. A. Verbrugh, and H. F. L. Werthelme. 2009. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J. Infect. Dis.* 199:1820-1826.
- VandenBergh, M. F. Q., E. P. F. Yzerman, A. van Belkum, H. A. M. Boelens, M. Sijmons, and H. A. Verbrugh. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 3 years: redefining the persistent carrier state. *J. Clin. Microbiol.* 37:3133-3140.
- Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Bøffrenon, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, and J. Etienne. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 9:978-984.
- Widmer, A. F., D. Mertz, and R. Frei. 2008. Necessity of screening of both the nose and the throat to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in patients upon admission to an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 46:835.
- Williams, R. E. 1963. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.* 27:56-71.