



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN CON *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA EN ALUMNOS DE LA UNAM

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

Presenta:

ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ

TUTOR: DR. ENRIQUE ACOSTA-GÍO

MÉXICO, D.F. A 6 DE JULIO DEL 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| MRSA | 29 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> en el ambiente odontológico | 31 |
| JUSTIFICACIÓN | 32 |
| OBJETIVOS | 33 |
| HIPOTESIS | 33 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| Población de estudio | 34 |
| Cuestionario | 34 |
| Recolección de muestras | 35 |
| Estudio bacteriológico | 35 |
| Aislamiento selectivo de MRSA | 36 |
| Pruebas confirmatorias | 37 |
| Seguimiento de portadores | 38 |
| Preservación de bacterias | 38 |
| Extracción de DNA | 39 |
| Análisis estadístico | 39 |
| RESULTADOS | 40 |
| DISCUSIÓN | 44 |
| CONCLUSIONES | 47 |
| BIBLIOGRAFÍA | 49 |
| ANEXO | 50 |

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) es un patógeno resistente a múltiples antibióticos. La infección con MRSA ocurre con mayor frecuencia entre personas que acuden a establecimientos de atención a la salud. MRSA es un problema de salud pública en todo el mundo. MRSA es el más problemático patógeno que causa infecciones adquiridas en sitios de atención a la salud (MRSA-Nosocomial) y en los últimos diez años se ha convertido en la causa de infecciones adquiridas en la comunidad (MRSA-Comunitario)¹. La prevención de la transmisión horizontal de MRSA se ha vuelto más importante al mismo tiempo que la prevalencia de este patógeno aumenta.²

Staphylococcus aureus esta emergiendo como un prominente colonizador y patógeno bucal. Es posible que las poblaciones de *Staphylococcus aureus* en boca incluyan MRSA, ocasionando un riesgo para los odontólogos y sus pacientes. La transmisión de MRSA de dentista a pacientes ha sido reportada.³

En las clínicas de la Facultad de Odontología, diariamente se realizan más de cinco mil procedimientos clínicos, muchos de ellos invasivos. Durante estas actividades existen múltiples oportunidades para la transmisión de infecciones. Una de las estrategias propuestas para combatir MRSA es tamizar a los trabajadores de la salud.⁴ Esta encuesta microbiológica proporcionó información que nos permitió evaluar la posible transmisión de MRSA como un riesgo ocupacional para los alumnos de esta facultad con práctica clínica, y se obtuvieron datos sobre la prevalencia de la infección con MRSA en la población universitaria. La evidencia fundamenta medidas específicas para evitar que las actividades clínicas en nuestra Facultad contribuyan a la diseminación de MRSA.

ANTECEDENTES

AMBIENTE CLINICO ODONTOLÓGICO

En consultorios odontológicos la transmisión de agentes infecciosos puede ocurrir ya sea del dentista al paciente, del paciente al dentista o entre pacientes. En las clínicas de enseñanza de la Facultad de Odontología estudiantes y profesores efectúan procedimientos clínicos y quirúrgicos cada día. Muchos de estos procedimientos son invasivos y existe un riesgo para la transmisión de infecciones.

ABUSO DE ANTIBIÓTICOS

En México, es posible comprar antibióticos sin una prescripción médica, y tanto trabajadores de la salud como pacientes utilizan antibióticos de manera arbitraria.

Es probable por lo tanto, que la resistencia a antibióticos haya sido inducida en diversas especies bacterianas. Es necesario vigilar la aparición de bacterias resistentes y es crítico establecer lineamientos para la prescripción de antibióticos².

Staphylococcus aureus

En 1880, Alexander Ogston, cirujano inglés, demostró que un agente microbiano de bacterias agrupadas en racimos, era el causante de ciertos abscesos piógenos en el hombre. En 1882 nombró al microorganismo *Staphylococcus*, derivado del griego “Staphyle”, racimo de uva y “coccus”, grano. (fig 1)

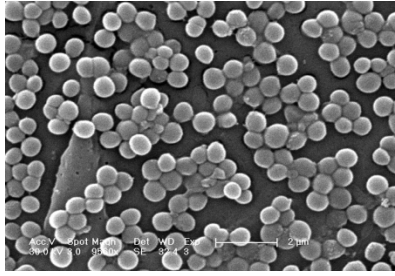


Fig 1. Morfología microscópica de *S. aureus*

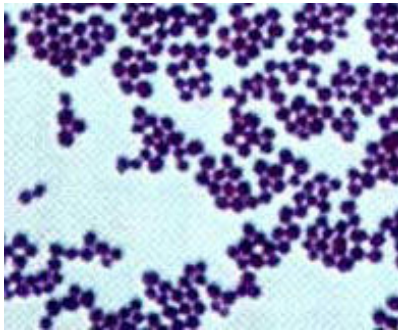


Fig 2. *S. aureus* es positivo a la tinción de Gram.⁵

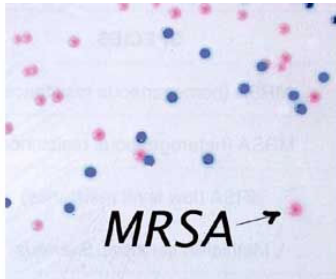


Fig 3 La identificación de MRSA fenotípicamente se da en medios de cultivo cromogénicos⁵.



Fig 4. Crecimiento de *S. aureus* en medio Baird Parker (Chromagar Microbiology, Paris)

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Cápsula y capa de polisacárido extracelular

La capa más externa de la pared celular estafilocócica se puede recubrir de una cápsula de polisacárido. Se han identificado once serotipos capsulares de *S. aureus*, y casi todas las infecciones se asocian a los serotipos 5 y 7. Los serotipos 1 y 2 se asocian a cápsulas de gran grosor y colonias de aspecto mucoso. La cápsula protege a las bacterias al inhibir la fagocitosis de estos microorganismos por los leucocitos polimorfonucleares (PMN). La mayor parte de los estafilococos producen una biopelícula hidrosoluble laxa (capa de polisacárido extracelular) formada por monosacáridos, proteínas y pequeños péptidos en una cantidad que depende de factores genéticos y de las condiciones de crecimiento. Esta sustancia extracelular une las bacterias a tejidos y cuerpos extraños, como catéteres, injertos, prótesis valvulares y articulares y derivaciones. Esta propiedad es particularmente importante para la supervivencia de los estafilococos coagulasa-negativos, los cuales son relativamente avirulentos⁵

Peptidoglucano

El peptidoglucano representa la mitad de la pared celular en peso, característica que comparten todas las bacterias gram-positivas. El peptidoglucano está formado por capas de cadenas de glucanos construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Las cadenas laterales de oligopéptidos están unidas a las subunidades de ácido N-acetilmurámico y se entrecruzan por medio de puentes peptídicos. Por ejemplo, las cadenas de glucanos de *S. aureus* se entrecruzan mediante puentes de pentaglicina unidos a la lisina en una cadena oligopeptídica y a la D-alanina en la cadena adyacente. A diferencia de lo que sucede en las bacterias gramnegativas, la capa de peptidoglucano en los microorganismos grampositivos se compone de numerosas capas entrecruzadas, lo que confiere una mayor rigidez

a la pared celular. El peptidoglucano posee una actividad de tipo endotoxina, ya que estimula la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento, la formación de interleucina-1 por parte de los monocitos y la agregación de los leucocitos PMN (un proceso que origina la formación de abscesos).⁵

Ácidos teicoicos

Constituyen otro destacado componente de la pared celular, en la que representan entre un 30% y un 50% de su peso seco. Los ácidos teicoicos son polímeros fosfatados específicos de especie que se unen de manera covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de peptidoglucano o a través de una unión lipídica a la membrana citoplásmica (ácidos lipoteicoicos). El ácido teicoico de ribitol con residuos de N-acetilglucosamina («polisacárido A») se encuentra presente en *S. aureus*, mientras que el ácido teicoico de glicerol con residuos glucosilo («polisacárido B») aparece en *S. epidermidis*. Los ácidos teicoicos median en la unión de los estafilococos a las superficies mucosas a través de su unión específica a la fibronectina. Aunque los ácidos teicoicos son poco inmunogénicos, estimulan una respuesta humoral específica cuando se encuentran unidos al peptidoglucano. Se ha vigilado esta respuesta humoral con el fin de detectar la enfermedad estafilocócica sistémica, si bien dispone de una sensibilidad menor que otras pruebas diagnósticas y no se utiliza actualmente.⁵

Proteína A

La superficie de la mayoría de las cepas de *S. aureus* (pero no la de los estafilococos coagulasa-negativos) está recubierta de la proteína A. Esta proteína se une a la capa de peptidoglucano o a la membrana citoplásmica y tiene afinidad de unión especial el receptor Fc de las inmunoglobulinas IgG, IgG2 e IgG4, lo que previene de forma eficaz la eliminación inmunitaria del microorganismo mediada por anticuerpos. La proteína A extracelular se puede unir también a los anticuerpos, formando inmunocomplejos con el consiguiente consumo de complemento. La proteína A se ha usado en ciertas pruebas serológicas en las que se ha utilizado *S. aureus* recubierto de proteína A como portador inespecífico de anticuerpos frente a otros antígenos.

Además, la detección de la proteína A puede utilizarse en pruebas específicas de identificación de *S. aureus*.⁵

Coagulasa y otras proteínas de superficie

En los estafilococos se han identificado numerosas proteínas de superficie. La superficie externa de la mayoría de las cepas de *S. aureus* contiene un factor de agregación (también llamado coagulasa ligada). Esta proteína constituye un destacado factor de virulencia en *S. aureus*. Se une al fibrinógeno y lo convierte en fibrina insoluble, lo que hace que los estafilococos se agreguen o formen grupos. La detección de esta proteína constituye la prueba principal de identificación de *S. aureus*. Hay otras proteínas de superficie importantes también para la adherencia a las proteínas de la matriz del hospedero, que a su vez se une a los tejidos del mismo (p. ej., fibronectina, fibrinógeno, elastina, colágeno). Las proteínas adhesivas de superficie presentes en estafilococos y otras bacterias se han denominado proteínas MSCRAMM (componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz).⁵

Membrana citoplásmica

La membrana citoplásmica se compone de un complejo de proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de carbohidratos. Actúa de barrera osmótica para la célula y proporciona una sujeción para la biosíntesis celular y las enzimas respiratorias.

Patogenia e inmunidad

La patología de las infecciones estafilocócicas depende de la producción de proteínas de superficie que intervienen en la adhesión de las bacterias a los tejidos del organismo anfitrión y la fabricación de proteínas extracelulares, como toxinas específicas y enzimas hidrolíticas. La expresión de los genes que codifican exoproteínas se encuentra controlada fundamentalmente por un regulador global, el cual está controlado, a su vez, por factores ambientales, la densidad celular y la disponibilidad de energía.⁵

Toxinas estafilocócicas

S. aureus produce un gran número de factores de virulencia, entre los que figuran cinco toxinas citolíticas que dañan la membrana (alfa, beta, delta, gamma y leucocidina de Panton-Valentine), dos toxinas exfoliantinas (A y B), ocho enterotoxinas (A a E, G a I) y la toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1). Las toxinas citolíticas se han descrito también como hemolisinas, aunque no constituye un nombre adecuado debido a que las actividades de las cuatro primeras toxinas no se restringen únicamente a los hematíes y la leucocidina P-V es incapaz de lisar estas células. Las cito-toxinas pueden provocar la lisis de los neutrófilos, lo que da lugar a la liberación de las enzimas lisosomales que posteriormente dañan los tejidos circundantes. La citotoxina, la leucocidina de P-V. se han relacionado con infecciones cutáneas graves.

La toxina exfoliantina, las enterotoxinas y TSST-1 pertenecen a una clase de polipéptidos conocidos como superantígenos. Estas toxinas se unen en los macrófagos a moléculas del Complejo principal de Histocompatibilidad de clase II (CPH II), las cuales interaccionan con la subunidad b de los receptores específicos de los linfocitos T y originan una proliferación inespecífica de estos linfocitos y la liberación de citocinas, las cuales provocan daño tisular ulterior.

Toxina alfa

La toxina alfa (a), la cual puede estar codificada tanto en el cromosoma bacteriano como en un plásmido, es un polipéptido de 33.000 D producido por la mayoría de las cepas de *S. aureus* que causan enfermedad en el ser humano. La toxina altera el músculo liso de los vasos sanguíneos y es tóxica para muchas células, como hematíes, leucocitos, hepatocitos y plaquetas. Se integra en regiones hidrofóbicas de la membrana de la célula del huésped y forma poros de 1 a 2 nm. El rápido flujo de salida de K^+ y de entrada de Na^+ Ca^{2+} y otras moléculas pequeñas conduce a aumento de volumen por osmosis y a lisis. La sensibilidad varía según la especie animal (los hematíes del conejo tienen una sensibilidad 1000 veces mayor que las células del ser humano) y el tipo de célula (p. ej., los fibroblastos pueden reparar el daño en la membrana de una forma más eficaz que los hematíes). Se cree que la toxina a es un mediador importante del daño tisular en la enfermedad estafilocócica.

Toxina beta

La toxina beta (P), conocida también como esfingomielinasa C, es una proteína termolábil de 35.000 D producida por la mayoría de las cepas de *S. aureus* que provocan enfermedad en el ser humano y los animales. Esta enzima presenta especificidad para la esfingomielina y la lisofosfatidilcolina, y es tóxica para diversas células, entre las que se encuentran los hematíes, los fibroblastos, los leucocitos y los macrófagos. Cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana en las células susceptibles, y la lisis es proporcional a la concentración de esfingomielina expuesta en la superficie celular. Se cree que este mecanismo es responsable de las diferencias de sensibilidad de las distintas especies a la toxina. En el ser humano no se ha demostrado aún la función de la toxina p aunque se cree que es responsable, junto con la toxina a, de la destrucción tisular y la formación de los abscesos característicos de la enfermedad estafilocócica.⁵

Toxina delta

La toxina delta (8) es un polipéptido de 3000 D producido por casi todas las cepas de *S. aureus* y la mayoría de las restantes especies estafilocócicas (p. ej., *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*). La toxina tiene un amplio espectro de actividad citolítica, afecta a los hematíes, muchas otras células de los mamíferos y las estructuras de las membranas intracelulares. Esta toxicidad de membrana relativamente inespecífica concuerda con la noción que afirma que la toxina actúa como un surfactante que altera las membranas celulares mediante una acción de tipo detergente.

Toxina gamma y leucocidina de Pantón-Valentine

La toxina gamma (Y) (fabricada por la mayoría de las cepas de *S. aureus*) y la leucocidina P-V (elaborada por <5% de las cepas de esta especie) son toxinas formadas por dos componentes que constan de dos cadenas de polipéptidos: el componente S (proteínas de evolución lenta) y el componente F (proteínas de evolución rápida). Se han identificado tres proteínas S (HlgA [hemolisina g A], HlgC, LukS-PV) y dos proteínas F (HlgB, LukF-PV). Las bacterias que producen ambas toxinas codifican todas estas proteínas y podrían producir seis toxinas distintas. Estas seis toxinas pueden lisar los neutrófilos y los macrófagos y la actividad hemolítica más intensa se asocia a HlgA/HlgB, HlgC/HlgB y HlgA/LukF-PV. La toxina leucocidina P-V (LukS-PV/LukF-PV) es leucotóxica, pero carece de actividad hemolítica. La lisis celular provocada por estas toxinas está mediada por la formación de poros con aumento de la permeabilidad a los cationes y la inestabilidad osmótica.⁵

Toxinas exfoliativas

El síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SPEE) es un espectro de enfermedades que se caracteriza por dermatitis exfoliativa, está mediado por toxinas exfoliativas. La prevalencia de la producción de toxina en las cepas de *S. aureus* varía en función de la distribución geográfica, pero generalmente se encuentra entre menos de un 5% y un 10%. Se han identificado dos formas distintas de toxina exfoliativa (ETA y ETB), y ambas pueden producir enfermedad. ETA es termoestable y codificada por un gen cromosómico, mientras que ETB es termolábil y mediada por

un plásmido. Los estudios ultraestructurales han puesto de manifiesto que la exposición a las toxinas, las cuales son serina proteasas, se sigue de separación de los puentes intracelulares (desmosomas) en el estrato granuloso de la epidermis. Se ignora cuál es el mecanismo preciso de esta acción. Las toxinas no se asocian a procesos de citólisis ni inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no están presentes estafilococos ni leucocitos (lo cual constituye un importante dato diagnóstico). Después de la exposición de la epidermis a la toxina, se desarrollan anticuerpos neutralizantes protectores, lo que lleva a la resolución del proceso tóxico. El SPEE se observa fundamentalmente en niños pequeños, y rara vez se describe en niños mayores o en adultos. Ello podría deberse al hecho que ETA y ETB se unen a los glucolípidos del tipo GM4, los cuales se encuentran en la epidermis de los neonatos susceptibles, pero no en la de los niños mayores o los adultos.⁵

Enterotoxinas

Se han identificado ocho tipos de enterotoxinas estafilocócicas (A a E; G a I) y tres subtipos de la enterotoxina C. Las enterotoxinas son estables a 100 °C durante 30 minutos y resistentes a la hidrólisis de las enzimas gástricas y yeyunales. Por ello, cuando un alimento se ha contaminado por estafilococos productores de enterotoxinas y se han producido las toxinas, el hecho de volver a calentar ligeramente la comida o la exposición a los ácidos gástricos carecen de capacidad protectora frente a la acción de estos compuestos. Estas toxinas son producidas por una proporción de cepas de *S. aureus* comprendida entre el 30 y el 50%. La enterotoxina A es la toxina que se asocia con mayor frecuencia a la enfermedad. Las enterotoxinas C y D se encuentran en los productos lácteos contaminados, y la enterotóxina B produce colitis pseudomembranosa estafilo-cócica. Se conoce en menor medida la prevalencia de las restantes toxinas. Se ignora cuál es el mecanismo exacto de acción de la toxina, ya que no se dispone de ningún modelo animal adecuado. Estas toxinas son superantígenos capaces de inducir la activación inespecífica de los linfocitos T y la liberación de citocinas. Los cambios histológicos característicos observados en el estómago y el yeyuno consisten en la infiltración de neutrófilos en el epitelio y la lámina propia

subyacente, con pérdida de las células en borde de cepillo del yeyuno. Se cree que la estimulación de la liberación de los mediadores inflamatorios por parte de los mastocitos origina la nemesi característica de la intoxicación alimentaria estafilocócica.⁵

Toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)

La TSST-1, antes conocida como exotoxina pirogénica C y enterotóxina F, es una exotoxina termoestable y resistente a la proteólisis de 22.000 D y codificada por un gen cromosómico. Se estima que el 90% de las cepas de *S. aureus* causantes del síndrome del shock tóxico (SST) asociado a la menstruación y la mitad de las cepas causantes de otras formas de SST producen TSST-1. Tan sólo el 15% de las restantes cepas de *S. aureus* producen esta toxina. La enterotóxina B y, rara vez, la enterotóxina C, originan la mitad de los casos de SST no asociados a la menstruación. TSST-1 es un superantígeno que estimula la liberación de citocinas y provoca extravasación de células endoteliales, mientras que a altas concentraciones tiene efecto citotóxico en las células. La capacidad de TSST-1 para atravesar las barreras mucosas, incluso cuando la infección está localizada en la vagina o la herida, provoca los efectos sistémicos del SST. La muerte de las pacientes aquejadas de SST se produce como consecuencia de un shock hipovolémico que origina insuficiencia multiorgánica.⁵

Enzimas estafilocócicas

Coagulasa

Las cepas de *S. aureus* poseen dos formas de coagulasa: ligada y libre. La coagulasa que se une a la pared del estafilococo puede convertir directamente el fibrinógeno en fibrina insoluble para forzar la agregación de los estafilococos. La coagulasa libre logra el mismo resultado al reaccionar con un factor del plasma (una globulina, factor que reacciona con la coagulasa) para originar una estafilotrombina, un factor semejante a la trombina. Este factor cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina insoluble. El papel de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad es especulativo, pero la coagulasa puede provocar la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, de forma que la infección quede localizada, y los microorganismos estén

protegidos de la fagocitosis. Algunas especies de estafilococos fabrican coagulasa, pero se trata fundamentalmente de patógenos animales que rara vez participan en la infección en el ser humano.⁵

Catalasa

El peróxido de hidrógeno se puede acumular durante el metabolismo bacteriano o con posterioridad a la fagocitosis. Todos los estafilococos producen catalasa, la cual cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Hialuronidasa

La hialuronidasa hidroliza los ácidos hialurónicos, los mucopolisacáridos ácidos que se encuentran en la matriz celular del tejido conectivo. La enzima favorece la diseminación de *S. aureus* en los tejidos. Más del 90% de las cepas de *S. aureus* es capaz de producir esta enzima.

Fibrinolisisina

Prácticamente todas las cepas de *S. aureus* fabrican fibrinolisisina, conocida también como estafilocinasa, la cual puede disolver los coágulos de fibrina. La estafilocinasa es diferente de las enzimas fibrinolíticas producidas por los estreptococos.

Lipasas

Todas las cepas de *S. aureus* y más del 30% de las cepas de *Staphylococcus* coagulasa-negativos producen diferentes lipasas. Como indica su nombre, estas enzimas hidrolizan los lípidos, una función esencial para garantizar la supervivencia de los estafilococos en las zonas sebáceas del organismo. Se cree que la presencia de estas enzimas es necesaria para que los *estafilococos* puedan invadir los tejidos cutáneos y subcutáneos, y para el desarrollo de infecciones cutáneas superficiales (p. ej., forúnculos, carbunco).⁵

Nucleasa

La nucleasa termoestable es otro marcador de *S. aureus*, si bien otras especies también producen esta enzima. Se desconoce la función de esta enzima en la patogenia de la infección.

Penicilinasa

Más del 90% de los estafilococos aislados eran sensibles a la penicilina en 1941, el año en que el antibiótico se usó en clínica por primera vez. Los microorganismos desarrollaron con rapidez resistencia a la penicilina por su producción de penicilinasa (p-lactamasa). La amplia distribución de esta enzima se aseguró por la presencia en plásmidos transmisibles.⁵

Epidemiología

Todas las personas portan estafilococos coagulasa-negativos en la piel, y es frecuente la colonización transitoria de los pliegues cutáneos húmedos con *S. aureus*. En los neonatos se observa con frecuencia la colonización del ombligo, la piel y la región perianal por *S. aureus*. *S. aureus* y los estafilococos coagulasa-negativos se encuentran, igualmente, en la bucofaringe, el aparato digestivo y el sistema genitourinario. El estado de portador permanente o temporal de *S. aureus* en niños mayores y adultos es más frecuente en la nasofaringe que en la bucofaringe. Aproximadamente el 15% de los adultos sanos son portadores permanentes de *S. aureus* en la nasofaringe, aunque se ha descrito una incidencia más elevada en los pacientes hospitalizados, el personal sanitario, los sujetos aquejados de enfermedades eccematosas de la piel y aquellos que utilizan frecuentemente agujas, ya sea de forma ilegal (p. ej., drogadictos) o por motivos médicos (p. ej., pacientes con diabetes insulino dependiente. sujetos que se vacunan frente a la alergia o que se someten a hemodiálisis). La adherencia de estos microorganismos al epitelio mucoso está regulada por las adhesinas estafilocócicas de superficie celular.

La diseminación de bacterias es frecuente y la responsable de muchas de las infecciones adquiridas en el hospital como consecuencia de la presencia de los estafilococos en la piel y en la nasofaringe. Los estafilococos son sensibles a las temperaturas elevadas, así como a los desinfectantes y las soluciones antisépticas; sin embargo, los microorganismos pueden sobrevivir

en las superficies secas durante períodos de tiempo prolongados. Estas bacterias se pueden transferir a una persona vulnerable por contacto directo o a través de fomites (p. ej., ropa contaminada, sábanas). Debido a ello, el personal sanitario debe utilizar técnicas adecuadas de lavado de manos para evitar la transmisión de estafilococos a sus pacientes o entre los propios pacientes.⁵

S. aureus causa enfermedad mediante la producción de toxina o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades estafilocócicas se deben casi exclusivamente a la actividad de la toxina (p. ej., SPEE, intoxicación alimentaria estafilocócica y SST), mientras que otras afecciones son consecuencia de la proliferación de los microorganismos, la cual da lugar a la formación de abscesos y la destrucción tisular (p. ej., infecciones cutáneas, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis y artritis séptica). La producción de enfermedad en presencia de un cuerpo extraño (p. ej., astilla, catéter, anastomosis, prótesis valvular o articular) requiere un número significativamente menor de estafilococos. Del mismo modo, los pacientes con alteraciones congénitas asociadas a defectos en la quimiotaxis o la respuesta fagocítica (como el síndrome de Job-Buckley, el síndrome de Wiskott-Aldrich o la enfermedad granulomatosa crónica) son más vulnerables a las enfermedades estafilocócicas.

Síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SPEE)

En el año 1878, Gottfried Ritter von Rittershain describió 297 lactantes menores de 1 año que presentaban una enfermedad exfoliativa ampollosa. La enfermedad descrita por este investigador, conocida ahora como enfermedad de Ritter o SPEE. Se caracteriza por el inicio brusco de un eritema peribucal localizado (enrojecimiento e inflamación alrededor de la boca) que se extiende por todo el organismo a lo largo de los 2 días siguientes. Una ligera presión desprende la piel (signo de Nikolsky positivo), y poco después se forman grandes ampollas y vesículas cutáneas que se siguen de descamación epitelial. Las ampollas contienen un líquido claro, pero no microorganismos ni leucocitos, un hallazgo compatible con la asociación de la enfermedad con una toxina bacteriana. El epitelio recupera su estructura en un plazo comprendido entre 7 y 10

días, cuando aparecen los anticuerpos protectores. No se forman cicatrices debido a que la necrosis afecta solamente a la capa superior de la epidermis. A pesar de tratarse de una enfermedad fundamentalmente de neonatos y niños pequeños, la tasa de mortalidad es baja. Cuando se produce, la muerte suele deberse a una infección bacteriana secundaria de las zonas de piel afectadas.⁵

Impétigo ampolloso

El impétigo ampolloso es una forma localizada de SPEE. Las cepas específicas de *S. aureus* productoras de toxina (p. ej., el fagotipo 71) se asocian a la formación de ampollas cutáneas superficiales. A diferencia de lo que ocurre en los sujetos con las manifestaciones diseminadas de SPEE. Los pacientes aquejados de impétigo ampolloso muestran ampollas localizadas que arrojan resultados positivos en los cultivos. El eritema no se extiende más allá de los límites de la ampolla y no está presente el signo de Nikolsky. La enfermedad se da principalmente en lactantes y niños pequeños y se transmite con facilidad.

Intoxicación alimentaria estafilocócica

La intoxicación alimentaria estafilocócica, una de las enfermedades más frecuentes transmitidas por los alimentos, representa una intoxicación en mayor medida que una infección. La enfermedad se debe a la acción de una toxina bacteriana presente en los alimentos más que al efecto directo de los microorganismos en el paciente. Los alimentos que se contaminan con mayor frecuencia son las carnes elaboradas, como el jamón y el cerdo curados con sal, los bollos rellenos de crema, la ensalada de patatas y los helados. El crecimiento de *S. aureus* en las carnes curadas con sal se corresponde con su capacidad de proliferar en presencia de concentraciones elevadas de sal. A diferencia de lo que ocurre con muchas otras formas de intoxicación alimentaria, en las que el reservorio animal desempeña una relevante función, la intoxicación alimentaria estafilocócica es consecuencia de la contaminación de los alimentos por un portador humano. Aunque la contaminación se puede evitar al impedir que los sujetos con enfermedades estafilocócicas cutáneas evidentes preparen los comidas, aproximadamente la mitad de las infecciones procede

de portadores con colonización asintomática de la nasofaringe. Cuando los estafilococos se han introducido en los alimentos (a través de un estornudo o una mano contaminada), estos deben permanecer a temperatura ambiente o más elevada para que los microorganismos crezcan y liberen la toxina. Los alimentos contaminados no presentan un aspecto ni un sabor desagradables. El calentamiento posterior de los alimentos comporta la destrucción de las bacterias, pero no inactiva las toxinas termoestables.⁵

El inicio de la enfermedad es abrupto y rápido, con un período medio de incubación de 4 horas tras la ingestión de la comida, lo que también corresponde a una enfermedad producida por una toxina preformada. Los estafilococos ingeridos no producen moléculas adicionales de la toxina, por lo que la evolución de la enfermedad es rápida y sus síntomas duran generalmente menos de 24 horas. La intoxicación alimentaria estafilocócica se caracteriza por la aparición de vómitos importantes, diarrea, dolor abdominal y náuseas. Se ha descrito la presencia de sudoración y cefalea, pero no de fiebre. La diarrea es acuosa y no sanguinolenta, y puede producirse deshidratación como consecuencia de la importante pérdida de líquidos.

Los microorganismos productores de toxinas se pueden cultivar a partir de los alimentos contaminados cuando el proceso de preparación de los mismos no haya sido capaz de destruirlos. Las enterotoxinas son termoestables. por lo que los alimentos contaminados se pueden analizar para determinar la presencia de toxinas en una institución sanitaria pública, aunque estas pruebas rara vez se llevan a cabo.⁵

El tratamiento se centra en el alivio de los espasmos abdominales y la diarrea, y la reposición hídrica. El tratamiento antibiótico no está indicado debido a que, como se ha comentado, la enfermedad ha sido causada por una toxina preformada y no por microorganismos en proceso de replicación. Los anticuerpos capaces de neutralizar la toxina pueden conferir protección y existe una limitada reactividad cruzada entre las diferentes enterotoxinas. Sin embargo, la inmunidad es de corta duración, y pueden darse episodios posteriores de intoxicación alimentaria estafilocócica, fundamentalmente por enterotoxinas diferentes desde el punto de vista serológico.

Ciertas cepas de *S. aureus* pueden producir también enterocolitis, la cual se manifiesta clínicamente con diarrea acuosa, espasmos abdominales y fiebre. La mayoría de las cepas productoras de enfermedad fabrican tanto enterotoxina A como la leucotoxina de dos componentes LukE/LukD. La enterocolitis afecta principalmente a pacientes que han recibido antibióticos de amplio espectro que alteran la microflora normal del colon y permiten la proliferación de *S. aureus*. El diagnóstico de enterocolitis estafilocócica tan sólo se puede confirmar después de haber descartado otras causas de infección más frecuentes (p. ej., colitis por *Clostridium difficile*). Por lo general, las heces de los pacientes afectados contienen un número elevado de estafilococos y las bacterias normales gramnegativas suelen encontrarse ausentes. Se observa la presencia de leucocitos en las heces, y de placas ulceradas en la mucosa del colon.⁵

Síndrome del shock tóxico (SST)

El primer brote del SST se produjo en Australia en el año 1928, donde la enfermedad se desarrolló en 21 niños, 12 de los cuales fallecieron tras haber recibido una vacuna contaminada con *S. aureus*. Transcurridos 50 años desde este episodio, J. K. Todd describió el llamado síndrome del shock tóxico en 7 niños con enfermedad sistémica, y en el verano de 1980 se publicaron los primeros casos de SST en mujeres menstruales. Estos datos se siguieron de un aumento espectacular de la incidencia de SST, fundamentalmente en mujeres. Posteriormente se descubrió que las cepas de *S. aureus* productoras de TSST-1 se podían multiplicar rápidamente en los tampones superabsorbentes y liberar la toxina. Después de la retirada de estos tampones, la incidencia de la enfermedad, fundamentalmente en las mujeres menstruales, descendió rápidamente. En la actualidad, se estima que se producen alrededor de 6000 casos de SST al año en EE.UU. Aunque en un principio se describió que los estafilococos coagulasa negativos podían originar este síndrome, en la actualidad se cree que la entidad se restringe a *S. aureus*.⁵

Esta enfermedad se inicia con el crecimiento localizado de las cepas de *S. aureus* productoras de la toxina en la vagina o la herida, seguida de la liberación de la toxina en la sangre. La producción de la toxina impone una atmósfera aerobia y un pH neutro. Las manifestaciones clínicas aparecen

de forma brusca y consisten en fiebre, hipotensión y exantema eritematoso macular difuso. Se observa una afectación multiorgánica (nervioso central, digestivo, hematológico, hepático, muscular y renal), y toda la piel se descama, incluyendo las palmas y las plantas. La alta tasa inicial de fallecimientos ha disminuido aproximadamente el 5% al conocerse mejor la epidemiología y la etiología de esta enfermedad. Sin embargo, el índice de recidiva llega a alcanzar el 65%, a no ser que el paciente se trate específicamente con un antibiótico eficaz. Los estudios serológicos han puesto de manifiesto que más del 90% de los adultos portan anticuerpos frente a TSST-1; sin embargo, más del 50% de los pacientes con SST no son capaces de desarrollar anticuerpos protectores con posterioridad a la resolución de la enfermedad. Estos pacientes carentes de protección presentan un riesgo significativo de recidiva del síndrome.

Infecciones cutáneas

Dentro de las infecciones estafilocócicas piogénicas localizadas figuran el impétigo, la foliculitis, los forúnculos y el carbunco. El impétigo, una infección superficial que afecta sobre todo a niños pequeños, se produce fundamentalmente en la cara y las extremidades. Inicialmente se observa una pequeña mácula (una mancha roja aplanada), y luego se desarrolla una pústula (vesícula llena de pus) sobre una base eritematosa. Se forma una costra después de la rotura de la pústula. Es frecuente la existencia de múltiples vesículas en distintas fases de desarrollo como consecuencia de la extensión secundaria de la infección a zonas adyacentes de la piel. El impétigo se debe generalmente a la infección por *S. aureus*, aunque estreptococos del grupo A, de manera independiente o en combinación con *S. aureus*, originan un 20% de los casos.

Foliculitis

La foliculitis es una infección piógena de los folículos pilosos. La base del folículo está elevada y enrojecida, y hay una pequeña acumulación de pus bajo la superficie de la epidermis. Cuando afecta a la base de los párpados se conoce como orzuela. Los forúnculos, una extensión de la

foliculitis, son nódulos elevados, dolorosos y grandes por debajo de los cuales se acumula tejido necrótico. Pueden drenar de forma espontánea o después de una incisión quirúrgica.⁵

Carbunco

El carbunco aparece cuando los forúnculos coalescen y se extienden hasta el tejido subcutáneo más profundo. Suele estar presente un número elevado de fístulas. A diferencia de los pacientes con foliculitis y forúnculos, los pacientes con carbunco presentan escalofríos y fiebre, lo que indica una extensión sistémica a otros tejidos a través de una bacteriemia estafilocócica.

Las infecciones estafilocócicas de las heridas pueden tener lugar con posterioridad a una intervención quirúrgica o a un traumatismo como consecuencia de la introducción en la herida de microorganismos que colonizan la piel. La infección se puede controlar fácilmente mediante la apertura de nuevo de la herida, la extracción del cuerpo extraño y el drenaje del material purulento. El tratamiento antibiótico específico frente a *S. aureus* está indicado cuando se observen signos como fiebre o malestar general, o la herida no mejora después del tratamiento local.

Bacteremia y endocarditis

S. aureus es una causa frecuente de bacteriemia. Aunque las bacteriemias producidas por la mayor parte de los microorganismos tienen su origen en un foco identificable de infección, como una infección pulmonar, del aparato genitourinario o el aparato digestivo, no se conocen los focos iniciales de la infección en aproximadamente un tercio de los pacientes afectados por una bacteriemia por *S. aureus*. Lo más probable es que la infección se extienda a la sangre a partir de una infección cutánea de aspecto inocuo. Más del 50% de los casos de bacteriemia por *S. aureus* se adquieren en el hospital después de una intervención quirúrgica, o como consecuencia del uso continuo de material intravascular contaminado. Aunque los pacientes aquejados de endocarditis por *S. aureus* pueden mostrar inicialmente síntomas inespecíficos de tipo gripal, su situación se

puede deteriorar rápidamente con alteración del gasto cardíaco e indicios de embolizaciones sépticas periféricas. El pronóstico del paciente es desfavorable a no ser que se instaure un tratamiento médico y quirúrgico adecuado de forma inmediata. Una excepción a esta afirmación es la endocarditis por *S. aureus* en los pacientes adictos a drogas por vía parenteral, cuya enfermedad afecta normalmente a las cavidades cardíacas derechas (válvula tricúspide) en mayor medida que a las izquierdas. Los síntomas pueden ser inicialmente leves, pero por lo general se registran fiebre, escalofríos y dolor torácico pleurítico producido por embolización del territorio pulmonar. Generalmente se logra la estabilización clínica de la endocarditis, si bien es frecuente que existan complicaciones como consecuencia de la diseminación secundaria de la infección a otros órganos.⁵

Neumonía y empiema

La enfermedad respiratoria por *S. aureus* se puede producir después de la aspiración de secreciones bucales o la diseminación hematógena del microorganismo desde un foco alejado. La neumonía por aspiración se observa fundamentalmente en los sujetos muy jóvenes, los ancianos y los pacientes aquejados de fibrosis quística, gripe, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o bronquiectasias. Las presentaciones clínicas y radiológicas de la neumonía no son características. El examen radiológico pone de manifiesto la presencia de infiltrados con consolidación o abscesos, los cuales se deben a la capacidad de secreción de toxinas y enzimas citotóxicas y de formar abscesos localizados por parte del microorganismo. La neumonía de diseminación hematógena es frecuente en pacientes con bacteriemia o endocarditis. En los últimos años se ha descrito una forma grave de neumonía necrosante adquirida en la comunidad con hemoptisis masiva, shock séptico y una elevada tasa de mortalidad. La leucocidina P-V presente en las cepas causantes de esta entidad podría constituir un destacado factor de virulencia. A pesar de que esta enfermedad se ha relacionado más a menudo con niños y adultos jóvenes, no se limita a estos grupos de edades.

El empiema afecta al 10% de los pacientes con neumonía, y *S. aureus* es el agente etiológico en un tercio de los casos. En algunos casos resulta difícil llevar a cabo el drenaje del material purulento debido a que los microorganismos se pueden consolidar en áreas aisladas.

Osteomielitis y artritis séptica

La osteomielitis por *S. aureus* puede derivar de la diseminación hematológica en el hueso, o puede constituir una infección secundaria como consecuencia de un traumatismo o bien de la extensión de una infección desde una zona adyacente. La diseminación hematológica en los niños procede generalmente de una infección cutánea estafilocócica, y suele afectar a las metástasis de los huesos largos, una zona de crecimiento óseo muy vascularizada. Esta infección se caracteriza por la presencia de dolor de inicio brusco en la zona ósea afectada y de fiebre elevada.⁵

IDENTIFICACIÓN

Se pueden utilizar pruebas bioquímicas relativamente sencillas (p. ej., reacciones positivas para la coagulasa, proteína A, nucleasa termoestable y fermentación de manitol) para diferenciar *S. aureus* y otros estafilococos. La identificación de los estafilococos coagulasa-negativos resulta más complicada y exige el uso de sistemas comerciales diseñados para ello. No se pueden emplear estos métodos para identificar de forma directa los estafilococos presentes en muestras clínicas o detectados en un hemocultivo. Recientemente se ha superado esta limitación mediante la puesta a punto de un nuevo método de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Se aplican sondas artificiales marcadas con moléculas fluorescentes y específicas para *S. aureus* con el fin de diferenciar esta especie de los estafilococos coagulasa-negativos.

Se pueden utilizar los patrones de sensibilidad antimicrobiana (antibiogramas), los patrones bioquímicos (biotipaje o caracterización bioquímica), la sensibilidad a los bacteriófagos (fagotipaje) y el análisis de ácidos nucleicos con el propósito de caracterizar a las especies aisladas con fines

epidemiológicos. Los antibiogramas y los biotipos se llevan a cabo en la mayor parte de los laboratorios para la identificación habitual de una cepa. Sin embargo, estas pruebas no tienen una gran capacidad de discriminación y tan sólo son útiles cuando dos cepas poseen un patrón de sensibilidad antibiótica o un perfil bioquímico diferente. El fagotipaje diferencia las cepas de estafilococos por su patrón de susceptibilidad a la lisis por una colección internacional de bacteriófagos específicos. Esta prueba únicamente se efectúa en laboratorios de investigación y ha sido sustituida en los estudios epidemiológicos por el análisis de ácidos nucleicos. El análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) u otras técnicas similares se han desarrollado rápidamente hasta convertirse en la forma más sensible de caracterización de las cepas a nivel de especie y de subespecie. Estos métodos se utilizan en la actualidad en muchos laboratorios clínicos y de investigación.⁵

Cultivo

Las muestras clínicas se deben inocular en medios de agar enriquecidos complementados con sangre de carnero. Los estafilococos crecen rápidamente en los medios no selectivos, tanto aerobios como anaerobios, y se pueden apreciar colonias lisas de gran tamaño en el plazo de 24 horas. Como se ha mencionado anteriormente, las colonias de *S. aureus* adquieren gradualmente una coloración dorada, en especial cuando los cultivos se incuban a temperatura ambiente. Casi todas las cepas de *S. aureus* y algunas cepas de estafilococos coagulasa-negativos producen hemólisis en el agar sangre de carnero.

La hemólisis se debe sobre todo a citotoxinas, fundamentalmente la toxina a. Cuando la muestra contiene una mezcla de varios microorganismos (p. ej., una muestra respiratoria o de una herida), se puede aislar de forma selectiva *S. aureus* en un medio de agar complementado con cloruro sódico al 7,5% (el cual inhibe el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos), y de manitol (fermentado por *S. aureus*, pero no por la mayoría de las restantes especies de estafilococos).

Serología

Los anticuerpos frente a los ácidos teicoicos de la pared celular están presentes en muchos pacientes con infecciones prolongadas por *S. aureus*. Los anticuerpos se desarrollan durante las 2 primeras semanas siguientes al inicio de la enfermedad y se detectan en la mayor parte de los pacientes aquejados de endocarditis estafilocócica. Sin embargo, esta prueba es menos fiable en los pacientes con osteomielitis o portadores de heridas infectadas, ya que el foco de infección se encuentra secuestrado en estas localizaciones y los microorganismos no suelen estimular la respuesta inmunitaria humoral.⁵

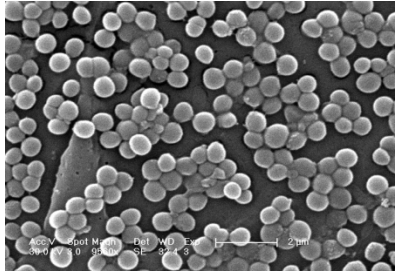


Fig 1. Morfología microscópica de *S. aureus*

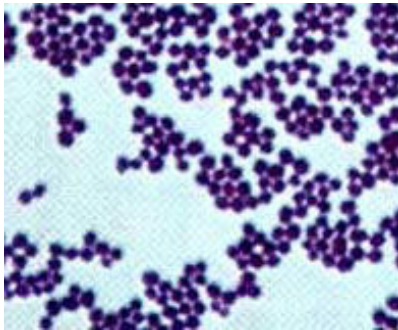


Fig 2. *S. aureus* es positivo a la tinción de Gram.⁵

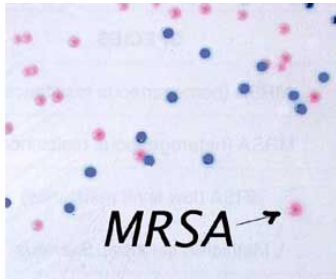


Fig 3 La identificación de MRSA fenotípicamente se da en medios de cultivo cromogénicos⁵.



Fig 4. Crecimiento de *S. aureus* en medio Baird Parker (Chromagar Microbiology, Paris)

MRSA

Staphylococcus aureus resistente a meticilina surgió como un patógeno de importancia mundial.^{6,19}

Staphylococcus aureus era originalmente sensible a penicilina. Cuando apareció la resistencia a penicilina debido a una beta lactamasa (generalmente codificada en plásmidos), se introdujo la meticilina (de la familia de la cloxacilina) como antibiótico resistente a esta penicilinasas

Sin embargo, en 1961 se identificó *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) en Inglaterra. En U.S.A. apareció esporádicamente en 1965 hasta que en 1981 emergió en forma importante causando numerosos brotes. Actualmente, la mayoría de los hospitales presentan una situación de endemia en relación a este microorganismo. Si bien se le considera un agente de infección intrahospitalaria (MRSA nosocomial), el 15% de los pacientes lo adquieren en la comunidad (MRSA comunitario). La meticilino-resistencia es de origen cromosomal e involucra a todos los beta lactámicos incluyendo a las cefalosporinas. Se asocia con la aparición de una proteína fijadora de penicilina (PBP) alterada. Estas proteínas son muy importantes en la síntesis de la pared celular y generalmente presentan alta afinidad con los antibióticos beta lactámicos. Sin embargo, en las cepas meticilino resistentes, aparece una PBP llamada PBP2a asociada a la presencia del gen *mecA*. Si bien todos los MRSA tienen la habilidad genética de expresar resistencia frente a los antibióticos beta lactámicos, frecuentemente sólo una célula en 10⁸ la manifiesta. Este fenómeno, llamado hetero-resistencia, constituye un problema en el laboratorio, pues si no se considera podría formarse una cepa resistente como sensible. Para reducir este riesgo lo máximo posible, se estimula la expresión del gen de resistencia in vitro, incubando el antibiograma por 24 horas y a temperaturas menores (30°-35° C), entre otras técnicas.

La mayoría de las cepas de MRSA son resistentes a una diversos antimicrobianos (macrólidos, quinolonas, etc.), por lo que se denominan también *Staphylococcus aureus* multi-resistentes. En los casos de MRSA no es posible usar cloxacilina, antibiótico de elección para el tratamiento de

infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino sensible, por lo que se debe recurrir a la vancomicina. Actualmente, ya se han descrito cepas de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina. Esta situación refuerza la necesidad de un uso racional de los antimicrobianos y de la aplicación rigurosa de las medidas de precaución estándar (lavado de manos) en forma rutinaria²⁰.

La infección con MRSA ocurre con mayor frecuencia entre personas que acuden a establecimientos de atención a la salud.⁷ Tanto MRSA como *Staphylococcus* coagulasa negativos han sido aislados en hospitales de tercer nivel en México⁸.

MRSA ya sea nosocomial o en la comunidad, es un problema de salud pública, como lo hacen constar cifras del European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) cuyo registro, de resistencia antimicrobiana obtenida de 800 laboratorios de salud pública al servicio de 1300 hospitales en 31 países europeos, reporta un aumento en la prevalencia de bacteremias ocasionadas por MRSA en Alemania de 8.5% en 1998 hasta 20% en 2006. En Francia adultos previamente sanos están siendo admitidos con severos casos de celulitis necrotizante y neumonía ocasionados por MRSA, según este mismo registro⁹.

La prevención de la transmisión horizontal de MRSA se ha vuelto más importante al mismo tiempo que la prevalencia de este patógeno, tanto nosocomial como comunitario, aumenta¹⁰.

Tamizar poblaciones de trabajadores al servicio de la salud, así como pacientes en busca de MRSA, en instituciones de salud, son medidas en control de infecciones de vital importancia para impedir la diseminación de este organismo, identificar a los portadores y remitirlos a tratamiento².

(fig 3)

Staphylococcus aureus EN EL AMBIENTE ODONTOLÓGICO

Esta bacteria esta emergiendo como un prominente colonizador y patógeno bucal, como ha sido reportado por A.J Smith. et al, al analizar la base de datos de estudios diagnósticos en

microbiología oral de la escuela y clínica dental Glasgow donde reportó una incidencia de 19% para *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina (MSSA por sus siglas en inglés) y 0.9% para MRSA. Dicho estudio se realizó retrospectivamente a tres años (1998-2000)¹¹.

Es posible que las poblaciones de *Staphylococcus aureus* en boca incluyan MRSA. Se han reportado casos de infecciones orales ocasionadas por MRSA, generando un riesgo para los odontólogos y sus pacientes. Martín MV, reporta dos casos de transmisión de MRSA de dentista a pacientes en junio de 1991, en el Liverpool Dental Hospital³.

Los aerosoles generados por el agua de los instrumentos pueden jugar un rol en la diseminación de MRSA en clínicas y consultorios dentales sobre todo en casos donde estos requieren de depósitos de agua¹². Ya que se ha observado MRSA asociado a la proliferación de *Acanthamoeba polyphaga* en agua, dado que MRSA se reproduce dentro de esta amiba.¹³

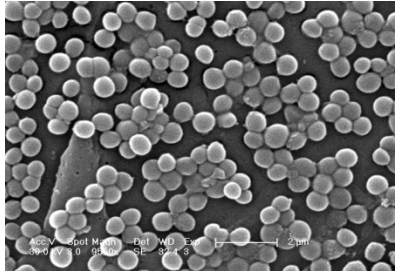


Fig 1. Morfología microscópica de *S. aureus*

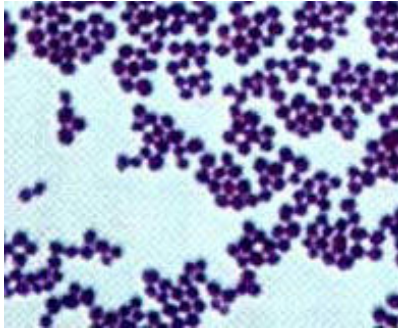


Fig 2. *S. aureus* es positivo a la tinción de Gram.⁵

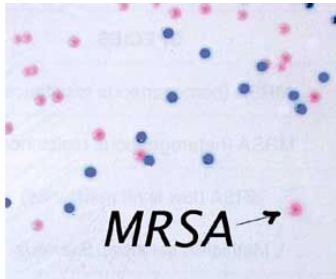


Fig 3 La identificación de MRSA fenotípicamente se da en medios de cultivo cromogénicos⁵.



Fig 4. Crecimiento de *S. aureus* en medio Baird Parker (Chromagar Microbiology, Paris)

JUSTIFICACIÓN

El ambiente odontológico representa un conjunto de condiciones idóneas para la diseminación de diversas infecciones por la naturaleza de los tratamientos orales, debido a esto, resulta de gran importancia evaluar a los profesionales de la salud y estudiantes, y determinar el factor de riesgo ocupacional en la profesión odontológica.

A la fecha no existe en México un registro de la prevalencia de *Staphylococcus aureus* ni MRSA en población de estudiantes del área clínica odontológica.

Esta encuesta microbiológica nos permite conocer la prevalencia de *Staphylococcus aureus* y MRSA para determinar si constituyen un riesgo ocupacional hacia los alumnos de esta facultad. También nos permite conocer la prevalencia de la infección con MRSA en la población de alumnos universitarios que cursan carreras sin relación con el área clínica u hospitalaria y en pacientes que acuden a las clínicas del posgrado para recibir atención odontológica.

OBJETIVOS

Primera encuesta microbiológica.

Determinar la prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en una muestra de conveniencia de estudiantes de posgrado de Odontología, pacientes de las clínicas de la División de Estudios de Posgrado e Investigación y estudiantes de carreras no relacionadas con el ambiente clínico.

Segunda encuesta microbiológica.

Establecer la prevalencia de la infección con MRSA en una muestra de conveniencia de 112 estudiantes de la Facultad de Odontología así como en un grupo de 82 estudiantes no relacionados con el ambiente clínico.

Determinar si existen diferencias significativas en la prevalencia de la infección con MRSA entre los dos grupos a investigar.

Conocer por medio de un cuestionario impreso aquellos hábitos y prácticas que sugieran un riesgo de contraer la infección por MRSA nosocomial o comunitario.

HIPÓTESIS

Staphylococcus aureus se encuentra presente en un alto porcentaje de la población universitaria, parte de esta población es portadora de MRSA.

La prevalencia de MRSA en esta muestra de alumnos de la Facultad de Odontología es igual o mayor a la reportada para la población general en los Estados Unidos.

MRSA es un riesgo de infección presente entre los alumnos en clínicas de enseñanza de la Facultad de Odontología de la UNAM.

La población no relacionada con el ambiente clínico también puede ser portadora de MRSA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Para la encuesta bacteriológica de *Staphylococcus aureus* se tamizó a una muestra de conveniencia de alumnos de posgrado de Odontología (n=60) con exposición clínica, pacientes de las clínicas de posgrado (n=40) que se encontraban en las salas de espera previo a su tratamiento y alumnos de carreras ajenas al campo de la salud (n=60).

Para la encuesta de MRSA se tamizó una nueva muestra de conveniencia de 200 estudiantes de la UNAM. No se incluyó individuo alguno que hubiese participado en la primer encuesta. La segunda muestra incluyó 100 alumnos de la carrera de Cirujano Dentista que cursan el último año de la licenciatura (Grupo Clínico) y 100 estudiantes de carreras sin relación con el ambiente clínico (Grupo Control).

En cada encuesta y con cada individuo, se explicó el propósito del estudio y se pidió su consentimiento informado.

CUESTIONARIO

Se aplicó un cuestionario a los individuos correspondientes a la encuesta de MRSA (anexo 1), por medio de este, se obtuvo información acerca de sus tratamientos antibióticos previos, así como de algunos de sus hábitos que descartan o representan posibles vías de transmisión de MRSA.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se tomó un frotis nasal a cada individuo de ambos grupos de estudio. Un hisopo estéril fue introducido aprox. 1 cm en ambas narinas haciendo un movimiento rotatorio, los hisopos fueron introducidos individualmente en tubos estériles con tapón de rosca para su transporte al laboratorio.

Un número consecutivo les fue asignado a cada tubo y al respectivo cuestionario contestado por cada individuo, para su identificación en una base de datos.

La apertura de los tubos y la siembra de muestras se realizaron dentro de un gabinete de bioseguridad nivel II bajo estricta técnica aséptica.

Las muestras clínicas obtenidas fueron sembradas por medio de la técnica de aislamiento. Para conseguir colonias aisladas, estas muestras se sembraron llevando la punta del hisopo a un extremo de la placa de cultivo, haciendo un embarre girando el hisopo sobre su propio eje en contacto con el agar. Se extendió la muestra sobre el gel utilizando un tercio de la placa, a continuación se realizaron estrías con un asa¹⁴.

ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

Staphylococcus aureus

Las muestras fueron sembradas en agar cromogénico específico para *Staphylococcus aureus* (TA-670 Chromagar Microbiology. Paris, Francia) suplementado con una mezcla patentada de antibióticos (SU-625 Chromagar Microbiology).

AISLAMIENTO SELECTIVO DE MRSA

En un intento inicial por reducir los volúmenes de Chromagar MRSA y así abatir los costos, se utilizaron dos pasos para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*. Primero se hizo un aislamiento en agar cromogénico Baird Parker ¹⁵ específico para *Staphylococcus aureus*, enriquecido con yema de huevo y telurito de potasio. El agar fue preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las placas sembradas fueron incubadas aeróbicamente durante 72 horas a 37°C. Las que presentaron crecimiento bacteriano fueron observadas al microscopio estereoscópico para la identificación fenotípica de colonias de *Staphylococcus aureus* y se consideran resultados positivos a aquellas colonias color negro con crecimiento de 1 a 1.5 mm de diámetro con límites bien definidos de superficie convexa y un halo blanco delimitándolas. (fig. 4)

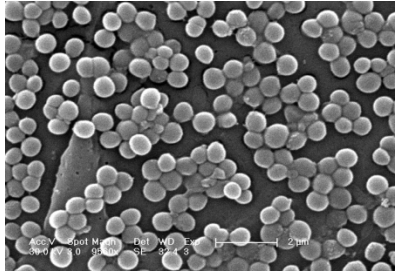


Fig 1. Morfología microscópica de *S. aureus*

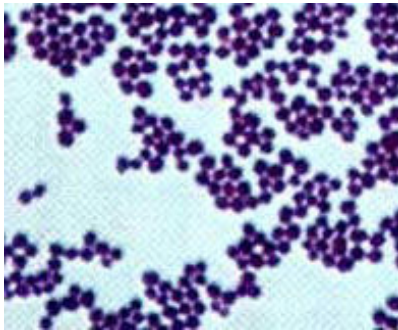


Fig 2. *S. aureus* es positivo a la tinción de Gram.⁵

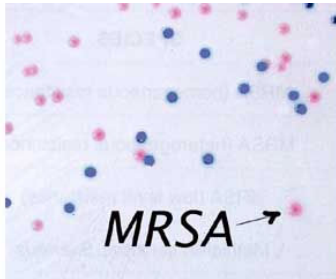


Fig 3 La identificación de MRSA fenotípicamente se da en medios de cultivo cromogénicos⁵.



Fig 4. Crecimiento de *S. aureus* en medio Baird Parker (Chromagar Microbiology, Paris)

Como segundo paso, las colonias obtenidas sobre el medio Baird Parker fueron transferidas a un agar cromogénico para el aislamiento específico e identificación de MRSA, Chromagar MRSA (Chromagar Microbiology, Paris).¹⁶ El agar fue preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las placas fueron incubadas aeróbicamente a 37°C durante 48 horas. Estas fueron observadas al microscopio, se consideran como positivas aquellas con crecimiento de colonias con diámetro bien definido, entre 1 y 1.5 mm de color rosa.

PRUEBAS CONFIRMATORIAS

TINCIÓN DE GRAM: Esta coloración divide a los organismos en dos grandes grupos, Gram positivos y Gram negativos, según retengan o no el cristal violeta utilizado en la tinción. *Staphylococcus aureus* se encuentra en el grupo de los microorganismos Gram positivos.

TÉCNICA: Se fijó el frotis al calor, se dejó enfriar antes de proceder a su tinción, se cubrió la preparación con el cristal violeta y se dejó actuar 30 seg. Se lavó con agua eliminando el exceso, se cubrió la preparación con solución de lugol y se dejó actuar durante 1 min, se lavó con agua y se eliminó el exceso. Se decoloró con una solución de alcohol acetona hasta arrastrar el colorante. Se lavó de nuevo con agua y se eliminó el exceso. Se cubrió la preparación con fuscina diluida (colorante de contraste) y se dejó actuar durante 30 seg. Se volvió a lavar con agua. Se secó al aire a temperatura ambiente. Se observó al microscopio con objetivo de inmersión.

SEGUIMIENTO DE PORTADORES

Los resultados positivos y negativos fueron reportados confidencialmente vía telefónica a los interesados. Los individuos cuyas muestras nasales manifiestan la presencia de MRSA fueron remitidos con su médico de cabecera para su posible tratamiento.

Se confirmó vía telefónica el resultado positivo de estos 7 individuos y se concertó una cita para una nueva toma de frotis nasal.

De los 7 individuos citados para la toma de su segunda muestra, asistieron al laboratorio 5 de ellos, de quienes se obtuvieron frotis nasales para su cultivo directamente en medio Chromagar MRSA.

Las 5 placas sembradas resultaron positivas a crecimiento de colonias rosas características de MRSA.

Criopreservación de bacterias viables

Para su preservación a -70°C , se tomó de cada placa una colonia identificada fenotípicamente como MRSA, y se le transfirió a medio S110 (Difco) para su incubación aeróbica a 37°C por 72 hrs, del crecimiento resultante una pequeña cantidad fue depositada en crioviales con medio Micoplasma broth base (BBL,) suplementado con di-metilo sulfóxido (DMSO, Sigma Chemical, Saint Louis MO). Las muestras congeladas podrán ser reestablecidas en un futuro para realizarles pruebas de resistencia a antibióticos

EXTRACCIÓN DE DNA

Mediante la extracción del DNA de estas muestras se creó un banco de material genético correspondiente a la población estudiada para la determinación de prevalencia de la infección con *Staphylococcus aureus* y MRSA.

Todas las placas de medio Baird Parker para *Staphylococcus aureus* que presentaron crecimiento en los aislados iniciales, fueron almacenadas en refrigeración. Estas placas fueron lavadas con solución de Tris-EDTA (Sigma) para obtener la totalidad de las colonias presentes. Las colonias disueltas en la solución de Tris-EDTA fueron depositadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL y llevadas al vórtex (VWR) para obtener una mezcla homogénea.

Se colocaron 44 μL de la solución en tubos para microcentrifugación de 1 mL. Se agregó a cada tubo 5 μL de Tween 20 (concentración final 0.5%), y se llevó la muestra al vórtex. Luego se agregó 1 μL de proteinasa K (Invitrogen) y se agitó nuevamente. Los tubos se colocaron en el incubador ThermoStat (Eppendorf) a 55°C por 2 horas, y después a 95°C por 10 minutos para inactivar la

proteínasa K. Las muestras fueron centrifugadas por 10 segundos en la microcentrífuga (Eppendorf), para condensar el DNA obtenido.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la posible asociación entre la actividad clínica u otros factores de riesgo reportados y el estatus de portador de MRSA, los resultados fueron analizados mediante χ^2 , con un valor crítico de $P < 0.05$.

RESULTADOS

S. aureus

Se observó una alta prevalencia de *S. aureus* con rasgos de resistencia a antibióticos (Tabla 1). De 160 individuos muestreados 97 (61%) son portadores de *S. aureus* con resistencia a los antibióticos presentes en la fórmula patentada que se agregó al medio Chromagar *Staph aureus*.(fig 5)

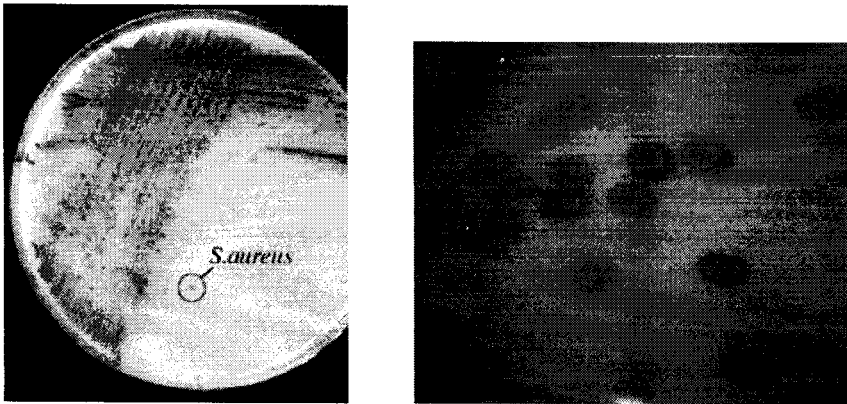


Fig 5 Crecimiento de *S. aureus* (medio Chromagar *staph aureus*) según el fabricante, izq.
Y crecimiento obtenido de la encuesta, der.

La prevalencia de portadores en el grupo de estudiantes dentales (68%) fue significativamente más alta ($\chi^2=6.64$, $P<0.01$) que la observada en el grupo de estudiantes no dentales (45%). La prevalencia en el grupo de pacientes (73%) fue significativamente más alta que en grupo de estudiantes dentales ($\chi^2=4.16$, $P<0.05$) y estudiantes no dentales ($\chi^2=11.07$, $P<0.001$).

Tabla 1 Distribución de la población y porcentaje de individuos portadores de *S. aureus*

| | N | positivos | % |
|--------------------------------|----------|------------------|----------|
| Estudiantes dentales | 60 | 41 | 68 |
| Pacientes de posgrado | 40 | 29 | 73 |
| Estudiantes no dentales | 60 | 27 | 45 |
| Total de muestra | 160 | 97 | 61 |

MRSA

De las 192 muestras obtenidas en medio de cultivo Baird-Parker 96% (n=186) mostró crecimiento de colonias características de *S. aureus* color negro de 1 a 1.5 mm de diámetro con límites bien definidos de superficie convexa y un halo blanco delimitándolas.

De cada una de las placas con crecimiento se transfirieron colonias características de *S. aureus* al medio Chromagar MRSA. De las 186 muestras transferidas, en 7 (3.7%) se observó crecimiento de colonias color rosa características de MRSA. (fig 6).

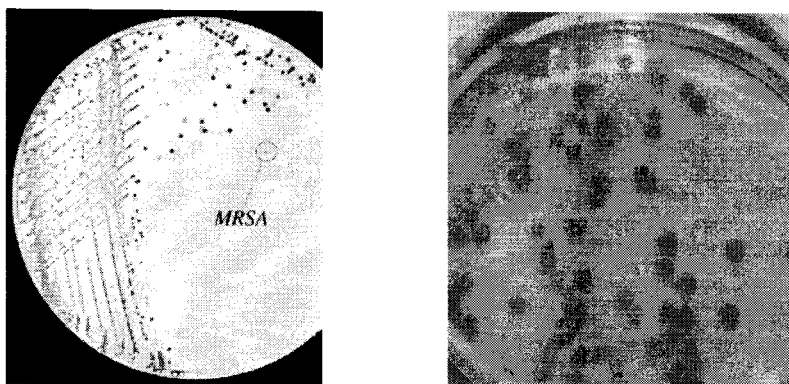


Fig 6 Crecimiento de colonias características de MRSA según el fabricante izq. Y crecimiento obtenido en la encuesta der.

Cuatro (57%) de los siete positivos pertenecen al grupo Clínico, y 3 (43%) al grupo Control. La prevalencia de portadores de MRSA en el grupo clínico fue 3.5% y 3.6% en el grupo control.

CUESTIONARIO

La encuesta impresa no arrojó información que pudiese asociar el estatus de portador de MRSA con alguno de los factores de riesgo conocidos. Los resultados obtenidos del cuestionario no muestran asociaciones ni diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ni entre individuos portadores de MRSA y aquellos que resultaron negativos.

De los encuestados 78% reporta no haber sido hospitalizado en los últimos seis meses, el grupo de los positivos se encuentra en su totalidad entre los individuos sin hospitalizaciones recientes (Fig 7).

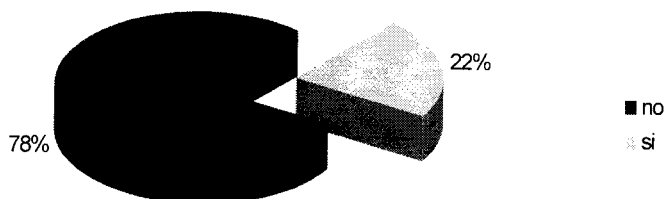


Fig 7 Porcentaje de individuos que han sido hospitalizados en los últimos 6 meses. Los portadores de MRSA se encuentran en el área azul

Poco más de la mitad de la muestra (56%) ha visitado alguna instalación hospitalaria recientemente, incluidos seis de los siete positivos. (fig. 8)

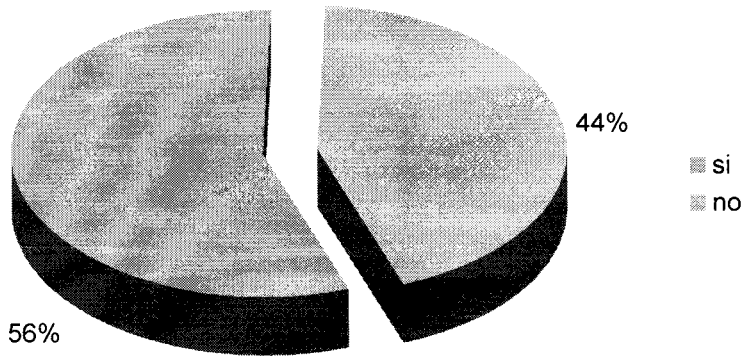


Fig 8 porcentajes de pacientes que han tenido contacto con áreas clínicas recientemente.

Del grupo de individuos portadores de MRSA se reporta en un 57% consumo de amoxicilina como antibiótico tomado en los últimos tres meses en padecimientos diversos. El restante 43% de los portadores de MRSA no tenía historia reciente de tomar antibióticos.

Mediante la extracción del ADN de estas muestras se creó un banco de material genético para confirmar la prevalencia de portadores de *S. aureus* y del gen *mecA* mediante una Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) empleando los primers para los genes *nuca* y *mecA*.

DISCUSIÓN

S. aureus.

Los resultados de esta encuesta bacteriológica nos muestra una prevalencia elevada (61%) de *S. aureus*. Los medios de cultivo empleados para la identificación de *S. aureus* tienen sensibilidad del 100% a las 48 hrs y una especificidad del 100% a las 24 hrs, contra la prueba Gene-Probe (Accu Probe, San Diego Ca).¹⁷ Se desconoce la prevalencia de *S. aureus* en la población mexicana. En los Estados Unidos, 31.6% de la población general son portadores nasales.¹⁸

Es de particular importancia que el medio empleado en el aislamiento primario de *S. aureus* estaba suplementado con una mezcla patentada de antibióticos diseñada para seleccionar bacterias resistentes. Por lo anterior descartamos aquellos *S. aureus* con bajo factor de resistencia y consideramos solo aquellos con un factor de resistencia a antibióticos bien definido.

La prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos resultó significativamente más alta en los pacientes del área odontológica que en los dentistas y que la población de estudiantes no clínicos. Se pueden aplicar algunos análisis genómicos (como el "DNA finger printing") para intentar establecer las posibles rutas de transmisión de *S. aureus* entre estos tres grupos. Sin embargo la presencia de este tipo de bacterias resistentes queda establecido en el entorno clínico dental representando un factor de riesgo ocupacional en los profesionales de la salud y un peligro de infección latente entre los pacientes.

MRSA

Basados en el aislamiento e identificación fenotípica de MRSA en agar cromogénico específico (Chromagar MRSA), la prevalencia de MRSA de 3.7% entre 192 estudiantes del campus universitario resultó parecida a la observada entre la población general de los Estados Unidos (3.5%), y en algunos países de Europa (3%).¹⁸ No se observó asociación significativa entre el estatus de portador de MRSA y el laborar en el ambiente clínico. Merino et al. calibraron y compararon niveles de sensibilidad y susceptibilidad en otros medios de cultivo específicos para MRSA sin obtener los niveles del Chromagar MRSA.^{16,20}

Se reportaron diferencias entre el patrón de resistencias/susceptibilidades a diversos antibióticos entre MRSA nosocomial y MRSA comunitario¹⁹. En EU por medio de antibiogramas y determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC's) es posible diferenciar los orígenes de los aislados, entre nosocomial y comunitario. Sin embargo, no se ha establecido si estas diferencias también son observables en México, pues en este país los antibióticos están disponibles libremente sin prescripción, y tanto los profesionales de la salud como el público en general posiblemente los usan indiscriminadamente, y en algunos casos usando como tratamiento de primera elección en procesos infecciosos diversos, antibióticos de amplio espectro generando resistencia en microorganismos.

El uso irracional de antibióticos así como la automedicación es una de las principales razones para inducir resistencia antimicrobiana²¹. MRSA es una de las muestras más claras del fenómeno de resistencia a antibióticos, lo que lo convierte en uno de los patógenos de mayor preocupación a nivel mundial, y un

objetivo más a combatir por medio de prácticas en control de infecciones en sitios de atención a la salud.

Al determinar la prevalencia de portadores de MRSA entre estudiantes universitarios, debemos considerar que en México no se consume metilina. Es posible que los estafilococos resistentes identificados contengan el gen mec A expresando resistencia a diversos medicamentos incluida la metilina (MRSA)²².

Naimi y col. reportan una prevalencia de MRSA nosocomial mayor a la de MRSA comunitario 85% y 12% respectivamente,⁷ lo que fundamenta el análisis de los patrones de resistencia o susceptibilidad a diversos antibióticos, así como la determinación de las MIC's en los aislados de nuestra muestra, preservados en congelación y así diferenciar los casos de MRSA comunitarios de nosocomiales.

La detección de crecimientos de MRSA se realizó por identificación fenotípica lo que sugiere la realización de pruebas moleculares futuras para su caracterización genotípica, origen epidemiológico y patrones de resistencia a antimicrobianos.

La población de estudio fue dividida en dos grupos según la carrera que cursaran, si esta estaba o no relacionada con el ambiente clínico, sin embargo los resultados obtenidos de la encuesta escrita, no difieren en mucho entre estos.

Resulta muy claro el fácil acceso a fármacos sin prescripción médica en México, por lo que es necesario implementar estrategias y normas en cuestión de venta y consumo de antibióticos.

CONCLUSIONES

Se debe reforzar la enseñanza y vigilancia de métodos y prácticas adecuadas en control de infecciones, así como de prescripción de antibióticos en la Facultad de Odontología UNAM.

Los resultados obtenidos demuestran que de todos los individuos tamizados una proporción importante es portador de *S. aureus* con patrones de resistencia a los antibióticos. Sin un adecuado control de infecciones y medidas de seguridad ocupacional en el ambiente clínico, la alta prevalencia de *S. aureus* implica un factor de riesgo incrementado para los servidores de la salud, así como para sus pacientes.

Los resultados indican una prevalencia importante de *S. aureus* en los tres grupos evaluados, debido a las condiciones establecidas para el crecimiento de las muestras, sabemos que los *S. aureus* presentes en esta población son resistentes a algunos antibióticos, y que dentro de este grupo podría haber individuos portadores de MRSA, lo que representaría una ruta clara de transmisión por infecciones cruzadas debido a la interrelación entre estos tres grupos.

Este trabajo de investigación reportó la prevalencia de MRSA en dos grupos de jóvenes universitarios, el primero relacionado con el ambiente clínico odontológico (3.5%) y 3.6% en un grupo de universitarios sin actividad clínica de ningún tipo.

Al encontrar profesionales de la salud portadores de MRSA, deducimos: riesgo ocupacional paciente-odontólogo, así como riesgo de infecciones cruzadas odontólogo-paciente y entre pacientes, por lo que resulta imperativo la elaboración y aplicación de protocolos de medidas en control de infecciones y seguridad ocupacional, para su prevención como para el manejo de portadores tanto en el grupo de profesionales de la salud como en los pacientes, y así limitar la transmisión de la infección por MRSA.

ANEXO 1

ID _____

La siguiente es una encuesta microbiológica para establecer la prevalencia de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a metilina) entre alumnos de la UNAM. El resultado del análisis del frotis nasal será informado de manera individual y confidencial al interesado vía telefónica. La participación en este estudio no condiciona sus calificaciones de ninguna forma.

TELÉFONO: _____ EDAD: _____ OCUPACION: _____
GENERO: _____ Estoy conforme y conciente de la información que se me ha dado y
acepto participar en esta encuesta.

_____ FIRMA

1. ¿Ha estado hospitalizado en los últimos 6 meses?
SI NO
2. ¿Ha visitado algún hospital o cualquier instalación medica en los últimos seis meses?
SI NO
3. ¿Convive con algún familiar que labore en el ambiente hospitalario o clínico?
SI, especifique su profesión _____ NO
4. ¿hace cuanto fue su última visita al dentista?
1-3 meses 4-6 meses mas de 6 meses mas de 1 año
5. ¿Cuál fue el último motivo por el cual asistió a consulta médica?

6. ¿Cuál fue el ultimo antibiótico que tomo y hace cuanto tiempo?

7. ¿Ha trabajado, pertenecido o asistido a alguno de los siguientes grupos comunitarios en el último año?
Internado escolar, orfanato, plataforma petrolera, prisión, asilo, baños públicos, balneario.
CUAL _____ NO
8. ¿Convive o trabaja con animales?
SI NO

BIBLIOGRAFÍA

1. Erdenizmenli, M., et al., *Investigation of colonization with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in an outpatient population in Turkey*. Jpn J Infect Dis, 2004. **57**(4): p. 172-5.
2. WHO, *Antimicrobial resistance*, in Geneve. 2002.
3. Martin, M.V. and P. Hardy, *Two cases of oral infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Br Dent J, 1991. **170**(2): p. 63-4.
4. *National US inpatient health care facility methicillin-resistant Staphylococcus aureus survey 2006*.
5. Murray, P.R., E. Baron, and M.A. Pfaller, *Manual of clinical Microbiology* A. Press, Editor. 1995.
6. Kuehnert, M.J., et al., *Prevalence of Staphylococcus aureus nasal colonization in the United States, 2001-2002*. J Infect Dis, 2006. **193**(2): p. 172-9.
7. Naimi, T.S., et al., *Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Jama, 2003. **290**(22): p. 2976-84.
8. Urdez-Hernandez, E., et al., *Epidemiological and biological characteristics of methicillin-resistant staphylococcal infections in a Mexican hospital*. Arch Med Res, 1999. **30**(4): p. 325-31.
9. Borg, A., *MRSA Situation in Europe: A Recent Phenomenon* APIC News, 2006. **25**(2) : p. 14-16
10. Harbarth, S., et al., *Control of multiply resistant cocci: do international comparisons help?* Lancet Infect Dis, 2001. **1**(4): p. 251-61.
11. Smith, A.J., et al., *Staphylococcus aureus in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data*. Br Dent J, 2003. **195**(12): p. 701-3; discussion 694.
12. Bernardo, W.L., et al., *Staphylococcus aureus ampicillin-resistant from the odontological clinic environment*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2005. **47**(1): p. 19-24.
13. Huws, S.A., et al., *Amoebae promote persistence of epidemic strains of MRSA*. Environ Microbiol, 2006. **8**(6): p. 1130-3.
14. Delgado, I., S.A. Amich, and S. Prieto, *Laboratorio Clinico Microbiologia*. 1a ed, ed. M.G. Hill. 1994.
15. Baird, P.A., *An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci* Journal of applied Bacteriology, 1962. **25**(1): p. 12-19.

16. Perry, J.D., et al., *Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(10): p. 4519-23.
17. Graham, P.L., 3rd, S.X. Lin, and E.L. Larson, *A U.S. population-based survey of Staphylococcus aureus colonization*. Ann Intern Med, 2006. **144**(5): p. 318-25.
18. Nakamura, M.M., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage in the community pediatric population*. Pediatr Infect Dis J, 2002. **21**(10): p. 917-22.
19. Hart, I., *A test for the early detection of MRSA: clinical benefits and financial savings* Clinical Laboratory 2004 **28**(7): p. 36,37,.
20. Rubinovitch, B. and D. Pittet, *Screening for methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the endemic hospital: what have we learned?* J Hosp Infect, 2001. **47**(1): p. 9-18.
21. Malhotra-Kumar, S., et al., *Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study*. Lancet, 2007. **369**(9560): p. 482-90.
22. Deurenberg, R.H., et al., *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(3): p. 222-35.