

# Colonización y factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una población infantil de Montería

Dina Marcela Ricardo-Caldera<sup>1</sup>, Francisco Alberto Buelvas-Doria<sup>1</sup>, Javier Antonio Escobar-Pérez<sup>2</sup>, Catalina Tovar-Acero<sup>1</sup>

## RESUMEN

**Introducción:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) puede colonizar el cuerpo humano, con mayor frecuencia en las fosas nasales, pero también en las manos, el periné y la faringe. Además, se ha propuesto que la colonización puede ser un factor de riesgo para adquirir infecciones futuras.

**Objetivo:** determinar la prevalencia y las características microbiológicas y moleculares del SARM en una población infantil sana.

**Metodología:** se hizo un estudio descriptivo transversal para determinar la tasa de colonización nasal por SARM en 150 niños pertenecientes a 13 hogares infantiles de la ciudad de Montería. Los aislamientos se hicieron a partir de hisopados nasales y faríngeos, se identificaron mediante pruebas microbiológicas convencionales y se confirmaron y caracterizaron por métodos moleculares.

**Resultados:** la tasa de colonización por SARM fue del 9,3% (14/150). El 62,5% de los aislamientos portaban el SCC*mec* subtipo IVc; 87,5% de los aislamientos presentaron los genes que codifican para PVL y Sek, mientras que 81,2% portaban el gen *bsaB*.

**Conclusión:** el porcentaje de colonización hallado es uno de los más altos reportados para la población infantil de la región Caribe colombiana, y los aislamientos presentaron factores de virulencia relacionados con cuadros clínicos agresivos.

## PALABRAS CLAVE

*Factores de Virulencia; Jardines Infantiles; Preescolar; Staphylococcus Aureus Resistente a Meticilina*

---

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Enfermedades Tropicales y Resistencia Bacteriana, Universidad del Sinú, Montería, Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Correspondencia: Dina Marcela Ricardo Caldera; dinaricardoc@unisinu.edu.co

Recibido: julio 17 de 2014

Aceptado: noviembre 11 de 2014

Cómo citar: Ricardo Caldera DM, Buelvas Doria FA, Escobar Pérez JA, Tovar Acero C. Colonización y factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una población infantil de Montería. *Iatreia*. 2015 Jul-Sep;28(3): 259-268. DOI 10.17533/udea.iatreia.v28n3a04.

## SUMMARY

### Colonization and virulence factors of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric population in Montería, Colombia

**Introduction:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is able to colonize the human body, most frequently the nostrils, but also the hands, perineum and throat. Such colonization has been proposed as a risk factor to acquire future infections.

**Objective:** To determine the prevalence, and the microbiological and molecular characteristics of MRSA in healthy children.

**Methodology:** A cross-sectional descriptive study was done of 150 children from 13 day care centers in Montería, Colombia. Nasal and throat swabs were obtained. The isolates were identified and characterized by microbiological and molecular methods.

**Results:** The MRSA colonization rate was 9.3% (14/150). 62.5% of the isolates carried the subtype IVc of SCCmec, and 87.5% had the genes encoding for PVL and Sek, while 81.2% carried the gene *bsaB*.

**Conclusion:** The percentage of colonization found is one of the highest reported among children from the Colombian Caribbean region, and the isolates have virulence factors that have been associated with an aggressive clinical course.

## KEY WORDS

*Child; Child Day Care Centers; Methicillin resistant Staphylococcus aureus; Virulence Factors*

## RESUMO

### Colonização e fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina numa população infantil de Montería

**Introdução:** *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) pode colonizar o corpo humano, com maior frequência nas fossas nasais, mas também nas mãos, o perineo e a faringe. Ademais, propôs-se do que a colonização pode ser um fator de risco para adquirir infecções futuras.

**Objetivo:** determinar a prevalência e as características microbiológicas e moleculares do SARM numa

população infantil sã. Metodologia: fez-se um estudo descritivo transversal para determinar a taxa de colonização nasal por SARM em 150 crianças pertencentes a 13 lares infantis da cidade de Montería. Os isolamentos se fizeram a partir de amostras com suabe nasais e faríngeas, identificaram-se mediante provas microbiológicas convencionais e se confirmaram e caracterizaram por métodos moleculares.

**Resultados:** a taxa de colonização por SARM foi de 9,3 % (14/150). 62,5% dos isolamentos portavam o SCCmec subtipo IVc; 87,5% dos isolamentos apresentaram os genes que codificam para PVL e Sek, enquanto 81,2% portavam o gene *bsaB*.

**Conclusão:** a porcentagem de colonização achado é um dos mais altos reportados para a população infantil da região Caribe colombiana, e os isolamentos apresentaram fatores de virulência relacionados com quadros clínicos agressivos.

## PALAVRAS CHAVE

*Fatores de Virulência; Jardins Infantis; Pré-escolar; Staphylococcus Aureus Resistente a Metilicina*

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que puede encontrarse colonizando el cuerpo humano, principalmente las fosas nasales, pero también las manos, el periné y la faringe. Se considera que dicha colonización es uno de los principales factores responsables de la diseminación del germen y de la generación de infecciones estafilocócicas tanto comunitarias como nosocomiales (1). Las más frecuentes son las infecciones de la piel y los tejidos blandos, pero también puede ocasionar enfermedades sistémicas (2-4). Además, *S. aureus* cuenta con un arsenal de factores de virulencia que contribuyen a su supervivencia y desarrollo, y que son desencadenantes de las manifestaciones clínicas y responsables de la gravedad de sus infecciones (5); entre dichos factores se encuentran varias hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), la leucocidina de Pantón Valentine (PVL por la sigla en inglés de *Panton Valentine Leukocidin*), las toxinas exfoliativas A y B, el grupo de las toxinas pirógenas superantígenos (PTSAg) que incluye la toxina del choque tóxico y las enterotoxinas estafilocócicas (SE) y las modulinas

solubles en fenol, descritas recientemente (6,7). Tiene además la capacidad de adquirir plásmidos, transposones y secuencias de inserción que le confieren resistencia a múltiples antibióticos (5); todo esto en conjunto le ha permitido a este microorganismo posicionarse como un patógeno de gran importancia en salud pública.

La resistencia de *S. aureus* a los antibióticos beta-lactámicos es causada principalmente por la adquisición del gen *mecA*, que se encuentra en un elemento genético móvil llamado casete estafilocócico cromosómico *mec* (*SCCmec*) (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). El gen *mecA* codifica para una proteína modificada de unión a penicilina conocida como PBP2a (*Penicillin Binding protein 2a*), que se caracteriza por su afinidad disminuida a los antibióticos beta-lactámicos (8). En un principio, las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) se asociaron con infecciones intrahospitalarias, pero desde el año 1990 se las ha reportado en la comunidad como causa de infecciones en la piel y los tejidos blandos, en niños y en adultos jóvenes sin factores de riesgo predisponentes a infecciones hospitalarias; los primeros casos se informaron en Australia (9) y Estados Unidos (10), y desde entonces se han diseminado por todo el mundo (11-14).

En los últimos años ha ido cambiando la epidemiología del SARM; en un comienzo las infecciones por SARM adquiridas en los hospitales (SARM-AH) generalmente ocurrían en personas con factores de riesgo asociados a hospitalización reciente, terapia con antibióticos, cirugías y estancias largas en la unidad de cuidado intensivo; mientras que las infecciones producidas por SARM adquirido en la comunidad (SARM-AC) ocurrían en personas sanas de comunidades cerradas como grupos familiares, militares, reclusos, niños en guarderías y deportistas sin factores de riesgo hospitalarios, en condiciones de hacinamiento y con prácticas de higiene inadecuadas. Actualmente esta distinción no está clara puesto que se han publicado informes según los cuales las cepas comunitarias han migrado a los hospitales reemplazando a las cepas tradicionalmente hospitalarias (15,16). En la ciudad de Medellín se reportaron cepas comunitarias que han migrado al hospital, las cuales albergan el *SCCmec* de subtipo IVc con tasas de prevalencia hasta del 68,2%, y que han desplazado las cepas tradicionalmente hospitalarias que portaban el *SCCmec* de los tipos I, II y III (16).

La colonización puede llegar a ser un factor de riesgo predisponente para adquirir infecciones, desde leves, como las de la piel y los tejidos blandos, hasta graves como enfermedades sistémicas. Por su condición inmunológica y hábitos de cuidado, la población infantil es vulnerable a este tipo de infecciones y constituye un escenario ideal para la diseminación de clones con perfiles de resistencia. En la región de la costa Atlántica colombiana existe poca información sobre el comportamiento del SARM en la población infantil de la comunidad; por ello, en nuestro estudio se determinaron la prevalencia y las características microbiológicas y moleculares de este microorganismo en una población infantil sana de la ciudad de Montería, para caracterizar las cepas circulantes en la ciudad y contribuir al análisis de la epidemiología local de este patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio descriptivo transversal de 150 niños pertenecientes a 13 hogares infantiles de Montería ubicados en los barrios Rancho Grande y Sucre, en el período comprendido entre agosto del 2010 y marzo del 2011. Previa autorización del acudiente se procedió a la obtención de dos hisopados, uno nasal y otro faríngeo, que se almacenaron y transportaron en caldo tripticasa soya. Se analizaron las variables edad y sexo empleando herramientas del *software* Epi Info.

### Identificación microbiológica

Las muestras se incubaron 24 horas en caldo tripticasa soya y se sembraron en agar salado manitol; las colonias morfológicamente compatibles con *S. aureus* se analizaron por coloración de Gram, se sembraron en agar sangre de cordero al 5% (17), y se les hicieron pruebas bioquímicas corrientes (catalasa, coagulasa y DNasa) (18) complementadas con pruebas en el sistema *MicroScan PC29* (Dade Behring, CA, EE. UU.). Como control se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

### Perfiles de susceptibilidad

La sensibilidad a los antimicrobianos se determinó por el sistema *MicroScan PC29* (Dade Behring, CA, EE. UU.) y por la técnica de difusión en agar empleando

los siguientes antibióticos: penicilina (10 µg), oxacilina (1 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg) y cefocitina (30 µg). Como control se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Se analizaron la presencia de resistencia inducible a clindamicina mediante la prueba del D-Test (19), y la susceptibilidad a mupirocina (200 µg) (20,21) y tigeciclina (15 µg), siguiendo las recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) 2013. Los aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina se conservaron en caldo LB (Luria Bertani) con glicerol al 10% a -70 °C.

### Caracterización molecular

*Extracción de ADN:* se hizo por medio de lisis por ebullición: se tomaron 1 a 5 colonias y se suspendieron en

100 µL de agua destilada estéril; la mezcla se llevó a 95 °C por 10 minutos y luego se centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos; 1 µL del sobrenadante se utilizó como molde para la reacción de PCR y el resto se conservó a -20 °C.

*Detección de los genes nuc y mecA y determinación del tipo de SCCmec:* para la detección del gen *nuc* se utilizaron los iniciadores descritos por Lina y colaboradores, y para la del gen *mec*, los iniciadores utilizados por McClure y colaboradores (22,23). Para la determinación de los tipos de SCCmec se diseñaron iniciadores dirigidos al complejo de genes *ccr* (tabla 1); en cuanto a la determinación de los subtipos, se emplearon los iniciadores y las condiciones reportados por Escobar y colaboradores y por Milheirico y colaboradores (24,25).

**Tabla 1. Iniciadores utilizados para la tipificación de SCCmec**

Iniciador	Secuencia (5' – 3')	Producto (pb)	Gen	Referencia
ccrA1-F	GCCCAAGACAAAATTGATGC	481pb	<i>ccrA1/ccrB1</i>	Este estudio
ccrB1-R	ACATGCGCTGTAATTCAGGA			
ccrA2-F	TCACCAACGGTAAAGGCTGT	959pb	<i>ccrA2/ccrB2</i>	
ccrB2-R	TGATTGATTGTCCGTCGAT			
ccrA3-F	TGAATGAATCTCGCTTTGTCTG	803pb	<i>ccrA3/ccrB3</i>	
ccrB3-R	CGACATTTTGACGATGAAGG			
ccrA4-F	GCTTATCGTACATGCCATT	650pb	<i>ccrA4/ccrB4</i>	
ccrB4-R	TTCTGGACGTTGCATTGTTT			
ccrC-F	TCAAAAAGGATATCGCACCA	260pb	<i>ccrC</i>	
ccrC-R	CAATAGGTCGACCCGGTTTA			
Mecl-F	GTGAATTGAAACCGCCTTTG	268pb	<i>mecl</i>	
Mecl-R	TCATCTGCAGAATGGGAAGTT			
hsdM-F	GGAATACCAAATTGCCAACG	300pb	<i>hsdM/hsdMV</i>	
hsdM-R	TTGCGGTTTCAGGTGGGATGT			
hsdMV-R	TTGTGGTTTCAGGGGGTATGT			

Para la detección de los genes *nuc*, *mecA* y la tipificación de los SCCmec se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto; para la detección de los genes *nuc* y *mecA*, se utilizó un anillamiento a 52 °C por 1 minuto; para la

tipificación de los SCCmec se utilizó un anillamiento a 55 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 30 segundos y extensión final a 72 °C por 2 minutos.

La mezcla de reacción para la tipificación de los SCCmec contenía 1 µL de ADN molde, los iniciadores se

utilizaron a una concentración de 0,3  $\mu$ M, 200  $\mu$ M de cada dNTP, buffer Taq 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y Taq polimerasa 1U en un volumen final de 25  $\mu$ L.

*Detección de factores de virulencia:* mediante la PCR multiplex descrita por Escobar y colaboradores (26), se hizo la detección de los genes *lukF/S-PV*, *sek*, *sem*, *seo* y *bsaB* que codifican para la PVL, las enterotoxinas K, M y O, y la bacteriocina B, respectivamente. Además, se determinó la presencia de la isla de patogenicidad 5 (SaPI5), por la amplificación del gen *sau-sa500\_0808* (24).

*Establecimiento de la relación genética por electroforesis en gel de campo pulsado:* el protocolo de extracción del ADN cromosómico se efectuó de acuerdo con lo descrito por Mulvey y colaboradores (27), con algunas modificaciones. La restricción de los bloques se llevó a cabo con la enzima *SmaI* por 3 horas a 25 °C. La electroforesis se hizo en el sistema CHEF-DRII con las condiciones descritas por Murchan y colaboradores (28), los patrones electroforéticos registrados se visualizaron y fotografiaron en un transluminador; además, se analizaron mediante la elaboración de una matriz empleando el *software* *Fingerprinting II* versión 3.0, usando el coeficiente Dice y una tolerancia del 1,5%. En la interpretación del dendrograma se tuvieron en cuenta los criterios de Tenover (29).

## RESULTADOS

Los 150 niños hacían parte de trece hogares infantiles en dos barrios de Montería. De ellos, 31 (20,7%) estaban colonizados por *S. aureus* y 14 de estos (45,2%) lo estaban por SARM en las fosas nasales. Sin embargo, el total de aislamientos de SARM fue de 16 porque dos niños estaban colonizados tanto en las fosas nasales como en la faringe. Todos los aislamientos de SARM amplificaron los genes *nuc* y *mecA*. La edad promedio de los niños portadores de SARM fue de 3,3 años (1-5 años). Nueve de los 14 niños colonizados (64,3%) eran del sexo femenino. En todos los hogares infantiles se encontraron niños colonizados por *S. aureus*,

pero solo en seis se halló colonización por cepas SARM. Once de los 16 aislamientos de SARM (68,8%) presentaron resistencia a tetraciclina; nueve (56,3%) a eritromicina y dos (12,5%) a clindamicina. Los 16 mostraron sensibilidad a los demás antibióticos ensayados, incluyendo mupirocina y tigeciclina.

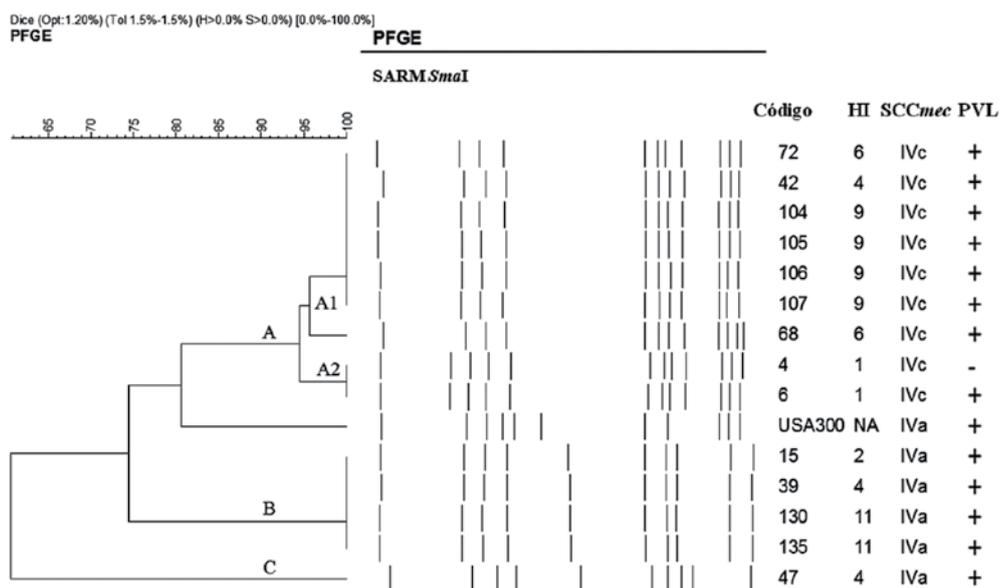
La tipificación del *SCCmec* de los aislamientos SARM mostró que todos ellos amplificaron el fragmento de 959 pb correspondiente a los genes *ccrA2/ccrB2* (*SCCmec* de tipo II y IV), y para diferenciarlos se utilizó el gen *mecI*, que no amplificó lo que define los aislamientos como de tipo IV. Adicionalmente, se determinaron los subtipos del *SCCmec* tipo IV, con el siguiente resultado: 10 (62,5%) portaban el subtipo IVc y 6 (37,5%), el subtipo IVa.

En cuanto a la detección de los factores de virulencia, 14 de los 16 aislamientos (87,5%) presentaron los genes que codifican para PVL y *Sek*; 13 (81,3%) portaban el gen que codifica para la bacteriocina B de *S. aureus*; no se hallaron las enterotoxinas *sem* y *seo* en los 16 aislamientos analizados. Todos los aislamientos portaban el gen *sau-sa500\_0808*, que se encuentra en la isla de patogenicidad 5 (SaPI5) (tabla 2). Sin embargo, los aislamientos con *SCCmec* subtipo IVa albergaron una variante del gen *sau-sa500\_0808* con una inserción de 54pb.

A partir del análisis de restricción del genoma con la enzima *SmaI*, se obtuvieron cinco pulsotipos, que se clasificaron en los grupos A, B y C. El grupo A se dividió en dos subgrupos, a saber: el A1 constituido por seis aislamientos idénticos y uno posiblemente relacionado, que provenían de diferentes hogares infantiles; el subgrupo A2 lo conformaron dos aislamientos idénticos y pertenecientes a un mismo hogar infantil. El grupo A tiene un porcentaje de similitud del 80,6% con el clon USA300 (figura 1). El grupo B lo conformaron cuatro aislamientos provenientes de tres hogares infantiles. Solo hubo un aislamiento del grupo C. Los dos aislamientos restantes (FF104 y FF130) se excluyen de esta información tal como se explica en la leyenda de la figura 1.

**Tabla 2. Características moleculares de los aislamientos de SARM**

Fuente/Código	SCCmec	Genes de virulencia					
		<i>lukS/F-PV</i>	<i>sek</i>	<i>sem</i>	<i>seo</i>	<i>bsaB</i>	SaPI5
FN4	IVc	-	-	-	-	-	+
FN6	IVc	+	+	-	-	+	+
FN15	IVa	+	+	-	-	+	+
FN39	IVa	+	+	-	-	+	+
FN42	IVc	+	+	-	-	+	+
FN47	IVa	+	+	-	-	+	+
FN68	IVc	+	+	-	-	+	+
FN72	IVc	+	+	-	-	+	+
FF104	IVc	+	+	-	-	-	+
FN104	IVc	+	+	-	-	+	+
FN105	IVc	+	+	-	-	+	+
FN106	IVc	+	+	-	-	+	+
FN107	IVc	+	+	-	-	+	+
FF130	IVa	-	-	-	-	-	+
FN130	IVa	+	+	-	-	+	+
FN135	IVa	+	+	-	-	+	+



**Figura 1. Dendrograma de 14 aislamientos a partir de los fragmentos de ADN genómico obtenidos con la enzima *Sma*I. Se excluyeron del dendrograma los aislamientos FF104 y FF130, incluidos en la tabla 2, por presentar los mismos patrones de bandeo de los aislamientos nasales FN104 y FN130**

## DISCUSIÓN

Mundialmente, la tasa de prevalencia de portación de SARM en niños sanos que asisten a hogares infantiles varía entre 0,14% y 29% (30-34). En un estudio en India se halló un porcentaje del 29% de portación nasal en niños que asistían a guarderías, y se encontró que el riesgo de ser portador aumenta con la edad en niños de familias numerosas (31). En Brasil, Lamaro y colaboradores (32) informaron en el 2009 un porcentaje de colonización por *S. aureus* del 31,2% en la población infantil de 62 guarderías, de los cuales 1,2% correspondieron a cepas de SARM con casetes de los tipos III, IV y V, sin hallazgos positivos para PVL; caracterizaron variables individuales y sociodemográficas del núcleo familiar y los factores de riesgo potenciales para la portación nasal de SARM; esta se relacionó en mayor proporción con el sexo masculino, mientras que el alto nivel de escolaridad de las madres fue un factor protector para la colonización. En nuestro estudio no se encontró significancia estadística de las variables edad y sexo con la portación de SARM; entre los portadores hubo predominio del sexo femenino, lo que coincide con lo reportado por Castro y colaboradores en Cartagena (35).

En Colombia se han publicado cuatro estudios en niños entre los años 2010 y 2012, dos de estos en la ciudad de Cartagena; uno en el 2010, de Rebollo y colaboradores (36), y el otro en el 2011, de Castro y colaboradores (35); se encontraron tasas de portación de SARM de 4,8% y 9%, respectivamente. En Montería, Lozano y colaboradores (37) hallaron en 2010 una prevalencia del 3,3%; en el 2012 Rodríguez y colaboradores en Medellín (38) reportaron una tasa del 4,75%; en el presente estudio se halló un porcentaje de colonización del 9,3 %, que hasta el momento es el más alto informado en el país en esta población; ello puede estar relacionado con la elección del sitio anatómico para la toma de muestra, lo que concuerda con estudios anteriores que describen las fosas nasales como uno de los sitios anatómicos con mayor porcentaje de colonización por SARM (1,39). En nuestro estudio se tomaron muestras tanto de las fosas nasales como de la faringe, y se obtuvo el mayor porcentaje de colonización en las primeras.

El hallazgo de SCCmec subtipo IVc en la mayoría de los aislamientos de este estudio coincide con los resultados descritos por Rebollo y colaboradores en Cartagena (36) en el 2011 y por Rodríguez y colaboradores en Medellín (38) en el 2012, en los que se evidenció que el subtipo de SCCmec más prevalente en las cepas de la comunidad sigue siendo el IVc; en el estudio de Rebollo se aislaron cinco cepas SARM, dos de las cuales (40%) portaban el tipo IV, mientras que ocho de los 19 SARM obtenidos por Rodríguez (42,1%) portaban el SCCmec subtipo IVc; estos datos concuerdan con los de estudios en otros países: Portugal, Taiwán y Estados Unidos (30,33,34).

Escobar y colaboradores (26) diseñaron en el 2012 una PCR basada en el hallazgo de cinco factores de virulencia que ayudan a identificar rápidamente los aislamientos de SARM adquiridos en la comunidad: los genes *lukS/F-PV*, *sek* y *bsaB* son marcadores genéticos específicos para los aislamientos de SARM-AC, mientras que los genes *sem* y *seo* lo son para los aislamientos de SARM-AH. En nuestro estudio 14 de los 16 aislamientos analizados presentaron los genes específicos para los SARM-AC.

Es preocupante encontrar niños sanos colonizados por cepas de SARM portadoras de genes de virulencia como los de la PVL, que están asociados con infecciones graves como la neumonía necrosante, porque los niños son susceptibles a ser colonizados por el contacto cercano con otros niños, y a desarrollar infecciones por ser inmunológicamente inmaduros; los niños colonizados por SARM pueden diseminarlo y dar lugar a infecciones tanto comunitarias como hospitalarias, con el agravante que estas cepas poseen factores de virulencia que pueden aumentar la gravedad de las infecciones. Dado lo anterior, es necesario hacer estudios multicéntricos de seguimiento continuo de esta población altamente susceptible, con el fin de monitorizar las cepas circulantes de SARM, evaluar los factores de riesgo para la colonización en cada comunidad y diseñar e implementar estrategias que permitan contener la diseminación de estas cepas.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Jul;10(3):505-20.
2. Stryjewski ME, Chambers HF. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun;46(Suppl 5):S368-77.
3. Gómez CH, Perilla AM, González C, Valderrama SL, Vanegas N, Chavarro B, et al. Neumonía necrosante por *Staphylococcus aureus* extrahospitalario resistente a la meticilina : reporte de dos casos en Colombia. *Biomédica*. 2009 Dec;29(4):523-30.
4. Vayalunkal JV, Whittingham H, Vanderkooi O, Stewart TE, Low DE, Mulvey M, et al. Necrotizing pneumonia and septic shock: suspecting CA-MRSA in patients presenting to Canadian emergency departments. *CJEM*. 2007 Jul;9(4):300-3.
5. Jiménez Quiceno JN, Ochoa Correa MM. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina : bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *Iatreia*. 2009 Jun;22(2):147-58.
6. Orwin PM, Leung DYM, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. Biochemical and biological properties of *Staphylococcal enterotoxin K*. *Infect Immun*. 2001 Jan;69(1):360-6.
7. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Oct;11(10):667-73. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*. 2013 Nov;11(11):814.
8. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 May;45(5):1323-36. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Dec;45(12):3677.
9. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect*. 1993 Oct;25(2):97-108.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1999 Aug 20;48(32):707-10.
11. Ito T, Iijima M, Fukushima T, Nonoyama M, Ishii M, Baranovich T, et al. Pediatric pneumonia death caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1312-4.
12. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*. 2002 Oct;35(7):819-24.
13. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr;43(4):1985-8.
14. Alvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincón S, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2006 Dec;12(12):2000-1.
15. Alvarez CA, Yomayusa N, Leal AL, Moreno J, Mendez-Alvarez S, Ibañez M, et al. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *Am J Infect Control*. 2010 May;38(4):315-8.
16. Jimenez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodríguez EA, Mediavilla JR, Chen L, et al. Cepas de SARM genotípicamente diversas con SCCmec IVc desplazan las cepas tradicionales de SARM-AH en los hospitales de Medellín. En: VIII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Armenia 2012 May 23-26. *Infectio*. 2012;16(Suppl 1):S19.
17. Sharp SE, Searcy C. Comparison of mannitol salt agar and blood agar plates for identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* in specimens from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec;44(12):4545-6.
18. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010 Aug;9:23.
19. Montoya I, Mira M, Álvarez I, Cofré J, Cohen J, Donoso G, et al. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev Chil Pediatr*. 2009 Feb;80(1):48-53.

20. Hogue JS, Buttke P, Braun LE, Fairchok MP. Mupirocin resistance related to increasing mupirocin use in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric population. *J Clin Microbiol*. 2010 Jul;48(7):2599-600.
21. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Oct;10(4):781-91.
22. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999 Nov;29(5):1128-32.
23. McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2006 Mar;44(3):1141-4.
24. Escobar Pérez JA, Castro BE, Márquez Ortiz RA, Charvarro B, Moreno J, Leal AL, et al. Aislamientos de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina relacionados genéticamente con el clon USA300: ¿Origen de los aislamientos SARM de genotipo comunitario en Colombia? *Biomédica*. 2014;34(Supl 1):S124-36.
25. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: "SCCmec IV multiplex". *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2007 Jul [cited 2014 Feb 2]; 60(1):[42-8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468509>
26. Escobar JA, Gómez IT, Murillo MJ, Castro BE, Charvarro B, Márquez RA, et al. Design of two molecular methodologies for the rapid identification of Colombian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Biomedica*. 2012 Apr-Jun;32(2):214-23.
27. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, et al. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2001 Oct;39(10):3481-5.
28. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr;41(4):1574-85.
29. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1994 Feb;32(2):407-15.
30. Tavares DA, Sá-Leão R, Miragaia M, de Lencastre H. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. *BMC Infect Dis*. 2010 May;10:110.
31. Dey S, Rosales-Klitz S, Shouche S, Pathak JP, Pathak A. Prevalence and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in children attending anganwaris (preschools) in Ujjain, India. *BMC Res Notes*. 2013 Jul;6:265.
32. Lamaro Cardoso J, de Lencastre H, Kipnis A, Pimenta FC, Oliveira LSC, Oliveira RM, et al. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):3991-7.
33. Chen CJ, Hsu KH, Lin TY, Hwang KP, Chen PY, Huang YC. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2011 Jan;49(1):131-7.
34. Miller MB, Weber DJ, Goodrich JS, Popowitch EB, Poe MD, Nyugen V, et al. Prevalence and risk factor analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in children attending child care centers. *J Clin Microbiol*. 2011 Mar;49(3):1041-7.
35. Castro-Orozco R, Villafañe-Ferrer LM, Álvarez-Rivera E, Martínez De Arco M, Rambaut-Donado CL, Vitola-Heins GV. *Staphylococcus aureus* metilino resistente en niños escolares de Cartagena. *Rev Salud Pública*. 2010 Jun;12(3):454-63.
36. Rebollo Pérez J, Ordoñez Tapia C, Herazo Herazo C, Reyes Ramos N. Nasal carriage of Panton Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. *Rev Salud Pública*. 2011 Oct;13(5):824-32.

37. Lozano D, Díaz L, Echeverry M, Pineda S, Máttar S. Staphylococcus aureus resistentes a meticilina ( SARM ) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba. Univ Sci. 2010;15(2): 159-65.
38. Rodríguez EA, Cañas AF, Giraldo Fonnegra A, Atehortúa SL, Ospina Ospina S, Correa MM, et al. Epidemiología molecular de la colonización nasal por Staphylococcus aureus sensible a la meticilina (SASM) y resistente a la meticilina (SARM) en la población pediátrica proveniente de un hospital universitario y de la comunidad, Medellín, 2011. En: VIII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Armenia 2012 May 23-26. Infetio. 2012;16(1S):20.
39. Lautenbach E, Nachamkin I, Hu B, Fishman NO, Tolomeo P, Prasad P, et al. Surveillance cultures for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: diagnostic yield of anatomic sites and comparison of provider- and patient-collected samples. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009 Apr;30(4):380-2.

