



ARTÍCULO ORIGINAL

Estudio molecular de *Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina en un hospital de México

Natividad Castro,* María Salomé Loaiza-Loeza,*
Amparo Calderón-Navarro,** Alejandro Sánchez,*** Jesús Silva-Sánchez***

* Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.

** Hospital General de Acapulco, Secretaría de Salud de Acapulco.

*** Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.

Molecular study of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in a Mexican Hospital

RESUMEN

ABSTRACT

Objective. To perform the molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* (MRSH) clinical isolates from patients in a Mexican hospital. **Methods.** Sixty three *Staphylococcus ssp.* isolates collected from September 2000 to October 2002 were analyzed. Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion method and the presence of the *mecA* gene was detected by PCR technique. Isolates characterization was carried out by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results.** The frequency of *S. haemolyticus* was 25.5% (18 of 63 clinical isolates), all *S. haemolyticus* isolates were methicillin-resistant and they were positive for the *mecA* gene. A major pattern (A) with 8 subtypes was identified. This clone was distributed during the 20 months period. Most of them were isolated from the surgery (55%) and pediatric services (27.5%). **Conclusion.** The methicillin-resistant *S. haemolyticus* permanence as pathogen in this hospital, suggest the implementation of control programs in order to decrease the prevalence of this multiresistant pathogen.

Key words. *Staphylococcus haemolyticus*. Methicillin-resistant. *MecA*. PFGE. Molecular study. Multiresistant pathogen. Mexico.

Objetivo. Caracterizar molecularmente los aislamientos clínicos de *Staphylococcus haemolyticus* resistentes a meticilina (SHRM) obtenidos de pacientes del Hospital General de Acapulco, Guerrero, México. **Métodos.** Se incluyeron 63 aislamientos de *Staphylococcus ssp.*, colectados durante el periodo de septiembre de 2000 a octubre de 2002. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en disco y la presencia del gen *mecA* se detectó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los aislamientos de SHRM fueron caracterizados por electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE). **Resultados.** La frecuencia de *S. haemolyticus* correspondió al 28.5% (18 de 63 aislamientos clínicos), todos los aislamientos fueron resistentes a meticilina confirmándose el genotipo *mecA*. Se identificó una clona mayoritaria A con ocho subtipos. Esta clona fue identificada durante 20 meses, principalmente de los servicios de cirugía en 55%, seguido de pediatría en 27.7%. **Conclusión.** La permanencia de *S. haemolyticus* resistente a meticilina como patógeno nosocomial en este hospital sugiere establecer programas de control para disminuir la prevalencia de este patógeno multirresistente.

Palabras clave. *Staphylococcus haemolyticus*. Resistencia a meticilina. *MecA*. Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE). Estudio molecular. Patógeno multirresistente. México.

INTRODUCCIÓN

El papel de los *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) en las infecciones nosocomiales ha sido reconocido y bien documentado, la tasa de infección se ha correlacionado con el incremento en el uso de catéteres intravasculares y aparatos ortopédicos, así como por el creciente número de pacientes in-

munocomprometidos en los hospitales. Las infecciones nosocomiales producidas por estafilococos son una causa principal de mortalidad y morbilidad.^{1,2} La especie de SCN predominante ha sido *Staphylococcus epidermidis*; sin embargo, *Staphylococcus haemolyticus* ha emergido como una especie clínicamente importante. Así, se han identificado cepas endémicas de estos microorganismos

causantes de bacteriemia en las unidades de cuidados intensivos.³⁻⁵

Desde la introducción de la meticilina en 1961 para el uso clínico, la frecuencia de cepas de estafilococos resistentes a meticilina (SRM) ha aumentado gradualmente, generando resistencia a todos los agentes β -lactámicos, estos aislamientos se han convertido en un problema de salud pública mundial.⁶ En México, se han reportado cepas de SRM provenientes de pacientes que sufrieron infecciones intrahospitalarias, predominando los SCN con una frecuencia de 53.4%, mientras que *S. aureus* con 14.2%.^{7,8} La resistencia a meticilina (RM) en *S. aureus* y especies SCN está mediada principalmente por la sobreproducción de la PBP-2a, proteína de unión a penicilina alterada con baja afinidad a los antibióticos β -lactámicos y la cual es codificada por el gen *mecA*.^{6,9} Este gen presenta una alta similitud en *S. aureus* y SCN resistentes a meticilina y está ausente en aislamientos de estafilococos sensibles. El gen *mecA* es considerado un marcador molecular de RM en todos los estafilococos.¹⁰ Entre los SCN la resistencia a meticilina se expresa principalmente en *S. haemolyticus* con resistencia heterogénea a vancomicina, dificultando una terapia exitosa en pacientes neonatos, neutropénicos y de cuidados intensivos.¹¹

Diversos estudios han demostrado que las infecciones por SCN son causadas por tipos moleculares predominantes, los cuales están ampliamente distribuidos en los hospitales, sugiriendo contaminación cruzada en su diseminación. Los tipos moleculares predominantes pueden persistir en unidades de cuidados intensivos por periodos prolongados y la capacidad de desarrollar resistencia a antibióticos y colonizar una amplia variedad de huéspedes pueden ser factores clave para la selección y persistencia de tipos de SCN.^{5,12}

La electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) es el método más confiable para la tipificación molecular y el estudio de la epidemiología local y global de los SRM, que contribuye a definir las rutas de transmisión y controlar la diseminación de resistencia entre estafilococos, así como identificar infecciones nosocomiales.^{3,12,13}

En este trabajo se describen las características moleculares de aislamientos clínicos de *S. haemolyticus* resistentes a meticilina (SHRM) portadores del gen *mecA*, obtenidos de pacientes de un hospital de segundo nivel de atención de Acapulco, Guerrero, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción del hospital

Este estudio se realizó en el Hospital General de Acapulco, Guerrero. El hospital cuenta con 120 camas y tiene cinco áreas de hospitalización (Cirugía, Ginecología-obstetricia, Medicina Interna, Pediatría y Cuidados Intensivos) y Servicio de Consulta Externa general y especializada. Tiene un promedio de 600 egresos hospitalarios al mes, pertenece al segundo nivel de atención y depende de la Secretaría de Salud de Guerrero.

Cepas bacterianas

Se analizaron 63 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. colectados durante el periodo comprendido de septiembre de 2000 a octubre de 2002 (26 meses). Los cultivos fueron tomados sólo cuando los signos clínicos sugerían la presencia de infección. Se incluyó un aislamiento por paciente y se obtuvieron los datos de hospitalización y la fuente de aislamiento. Las especies de estafilococos se identificaron con el sistema API STAPH (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron por la técnica de difusión en agar Mueller-Hinton de discos con antibióticos, siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), utilizando los siguientes antibióticos: azitromicina (15 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), cloranfenicol (30 μ g), gentamicina (10 μ g), oxacilina (1 μ g), penicilina (10 unidades), rifampicina (5 μ g), tetraciclina (30 μ g), trimetoprima/sulfametoxazol (1.25/23.75 μ g) y vancomicina (30 μ g). La interpretación de los halos de inhibición fue de acuerdo con el decimoquinto suplemento informativo del año 2005 del CLSI/NCCLS.¹⁴

Amplificación del gene *mecA*

La presencia del gene *mecA* se detectó mediante la técnica de PCR con los iniciadores: M1, 5' TGGC-TATCGTGTCAATCG 3' y M2, 5' CTGGAAGTT-GTTGAGCAGAG 3', reportados previamente por Vannuffel, *et al.*¹⁰ el producto esperado amplificado fue de 310 pb. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 50 μ L con una concentración final de 10 mM de Tris HCl (pH 8.8), 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM

de KCl, 0.1% de tritón X-100, 0.25 mM de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato, 50 pmol de cada iniciador, 1.25 unidades de *taq* polimerasa (Applied Biosystems, NJ, EUA) y 3 µg de DNA molde. Después de un paso inicial de desnaturalización de cinco minutos, a 94 °C, se realizaron 30 ciclos de amplificación como se indica: desnaturalización a 94 °C, durante un minuto, alineamiento a 56 °C, durante un minuto; y extensión a 72 °C durante tres minutos y finalmente una extensión a 72 °C, durante 10 minutos; se empleó un termociclador Gene Amp PCR System 2400 Applied Biosystems, Foster City, California, EUA. Como control negativo se incluyeron DNA total de *S. aureus* ATCC 25923, y como control positivo DNA total de *S. aureus* NCTC 8325. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Genotipificación clonal de SHRM

Para determinar el origen clonal de los aislamientos clínicos se empleó el método de PFGE descrito por Chung M, *et al.*¹⁵ el DNA fue digerido con la enzima de restricción *Sma*I (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA); los fragmentos obtenidos se separaron en un sistema CHEF Mapper II (BioRad, Her-

cules, California, EUA). La interpretación se realizó de acuerdo con los criterios de Tenover, *et al.*¹⁶

Análisis de los resultados genotípicos

El análisis de agrupación del patrón de bandas electroforéticas se realizó con base en el coeficiente de similitud de Dice. El coeficiente de similitud, el dendrograma y la probabilidad fueron generados con el software NTSYSpc versión 2.0 (Applied Bio-statistics Inc. Setauket, Nueva York, EUA).

RESULTADOS

Cepas bacterianas

Durante el periodo de estudio (26 meses), se colectaron 63 aislamientos clínicos de estafilococos. Las muestras clínicas correspondieron principalmente a los servicios de Cirugía 24 (38%) y Pediatría 18 (28%). Los aislamientos fueron recuperados de los siguientes sitios: herida quirúrgica 21 (33%), punta de catéter y líquido cefalorraquídeo 10 (15%) cada uno, y de otras localizaciones 22 (37%). Se identificaron 19 aislamientos como *S. aureus* (30%) y 44 SCN (70%). En este último grupo, 18 fueron identificados como *S. haemolyticus* (41%), nueve *S.*

Cuadro 1. Datos epidemiológicos y moleculares de los aislamientos de *Staphylococcus haemolyticus*, del Hospital General de Acapulco, Guerrero, México, noviembre de 2000 a octubre de 2002.

Número de aislamiento	Fecha de aislamiento	Origen	Servicio	Patrón de resistencia	Fenotipo de resistencia	Perfil de PFGE
203	13/11/2000	Orina	Consulta externa	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, TE	5	A1
644	13/03/2001	Sonda hemodiálisis	Pediatría	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, RD	6	A6
661	02/04/2001	Punta de catéter	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A
731	30/08/2001	Punta de catéter	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM,	2	A
732	31/08/2001	Punta de catéter	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, C, TE, RD	8	A7
735	05/09/2001	Penrose	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP	1	A8
754	17/09/2001	Aspiración transtraqueal	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A3
756	17/09/2001	Venodisección	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C, TE	7	A7
827	04/12/2001	Herida quirúrgica	Ginecología	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM	2	A
829	08/01/2002	Herida quirúrgica	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A3
832	13/01/2002	Herida quirúrgica	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A3
889	21/05/2002	Sangre	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A
951	22/05/2002	Punta de catéter	Cirugía	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A2
893	02/06/2002	Punta de catéter	Pediatría	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A4
897	17/06/2002	Punta de catéter	Pediatría	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A
899	25/06/2002	Sangre	Pediatría	P, OX, SXT, CN, AZM, TE	3	A5
969	17/09/2002	Aspiración bronquial	Cuidados intensivos	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, TE	5	A
981	21/10/2002	Punta de catéter	Pediatría	P, OX, SXT, CN, CIP, AZM, C	4	A

P: penicilina. OX: oxacilina. SXT: trimetoprima/sulfametoxazol. CN: gentamicina. CIP: ciprofloxacina. AZM: azitromicina. C: cloranfenicol. TE: tetraciclina. RD: rifampicina.

epidermidis (20%), cuatro *S. capitis* (9%), cuatro *S. hominis* (9%), y nueve (20%) de otras especies.

Susceptibilidad antimicrobiana

Todos los 63 estafilococos resultaron sensibles a vancomicina. En relación con la resistencia a la meticilina, 28 de los 63 aislamientos resultaron resistentes (44%), de los cuales sólo un aislamiento correspondió a *S. aureus*. Del grupo que incluyó a los 44 aislamientos identificados como SCN, 61% (27) resultaron RM, resaltando el hecho de que todas las cepas de *S. haemolyticus* fueron RM. Adicionalmente este grupo fue resistente a más de cinco antibióticos, con lo cual se identificaron ocho perfiles de resistencia y se asignó un número para cada grupo (Cuadro 1). Con base en estos resultados realizamos los estudios moleculares únicamente a los 18 aislamientos de SHRM.

Detección del gen *mecA* en SHRM

Los 18 aislamientos clínicos correspondientes a *S. haemolyticus* fueron ensayados para la detección del gen *mecA*, en todos los casos el resultado fue positivo mediante la amplificación del fragmento esperado de 310 pb (Figura 1).

Tipificación molecular de SHRM

En relación con la detección del posible origen clonal mediante la técnica de PFGE, se identificó un grupo mayoritario denominado A con ocho subtipos (A1-A8), los cuales estuvieron conformados en la siguiente proporción: El tipo A estuvo representado por siete aislamientos, el subtipo A7 por dos aislamientos, el subtipo A3 por tres aislamientos y los

subtipos A1, A2, A4, A5, A6 y A8 estuvieron representados por un solo aislamiento cada uno (Cuadro 1). El coeficiente de similitud en los diferentes perfiles de PFGE fue de 72%, el valor cofenético de 0.95 indicó una buena correlación entre la matriz de similitud y el dendrograma (Figura 2). Se observó una buena concordancia entre los perfiles de PFGE identificados visualmente y el coeficiente de similitud de Dice.

Relación del tipo clonal con el servicio del hospital y el origen de la muestra clínica

Los diferentes tipos de PFGE de SHRM estuvieron distribuidos en los distintos servicios del hospital durante marzo de 2001 a octubre de 2002. En su mayoría, fueron recuperados del Servicio de Cirugía (55%), seguido del Servicio de Pediatría (28%). Sólo un aislamiento de SHRM fue recuperado de un paciente procedente de Consulta Externa. Las fuentes clínicas de los aislamientos fueron heterogéneas, el tipo A fue aislado de puntas de catéter (cuatro), herida quirúrgica (uno), aspiración bronquial y sangre (uno) en los servicios de Cirugía, Ginecología, Cuidados Intensivos y Pediatría, los cuales se aislaron durante un periodo de 20 meses.

DISCUSIÓN

Durante la última década los SCN han incrementado su importancia como una causa de infección adquirida en el hospital, particularmente en bacteriemia asociada con el uso de catéteres intravasculares. Asimismo, la mayoría de SCN recuperados de infecciones nosocomiales son resistentes a meticilina.^{3,4,6,17-20} En el Hospital General de Acapulco se identificó una clona mayoritaria de *S. haemolyticus* resistente a meticilina en pacientes hospitalizados.

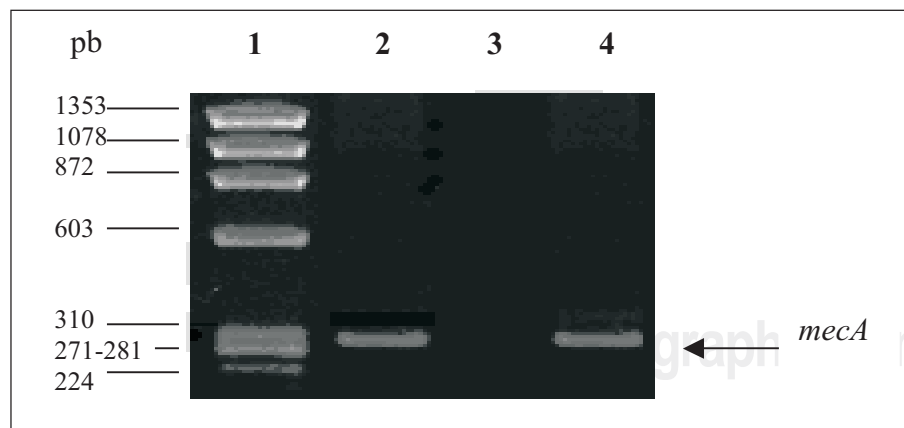


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al gen *mecA*. Carril 1, marcador de ϕ X174 RF DNA/HaeIII; carril 2, *S. aureus* 8325 control positivo del gen *mecA*; carril 3, *S. aureus* ATCC 29213 control negativo del gen *mecA*; carril 4 aislamientos 731 de *S. haemolyticus*.

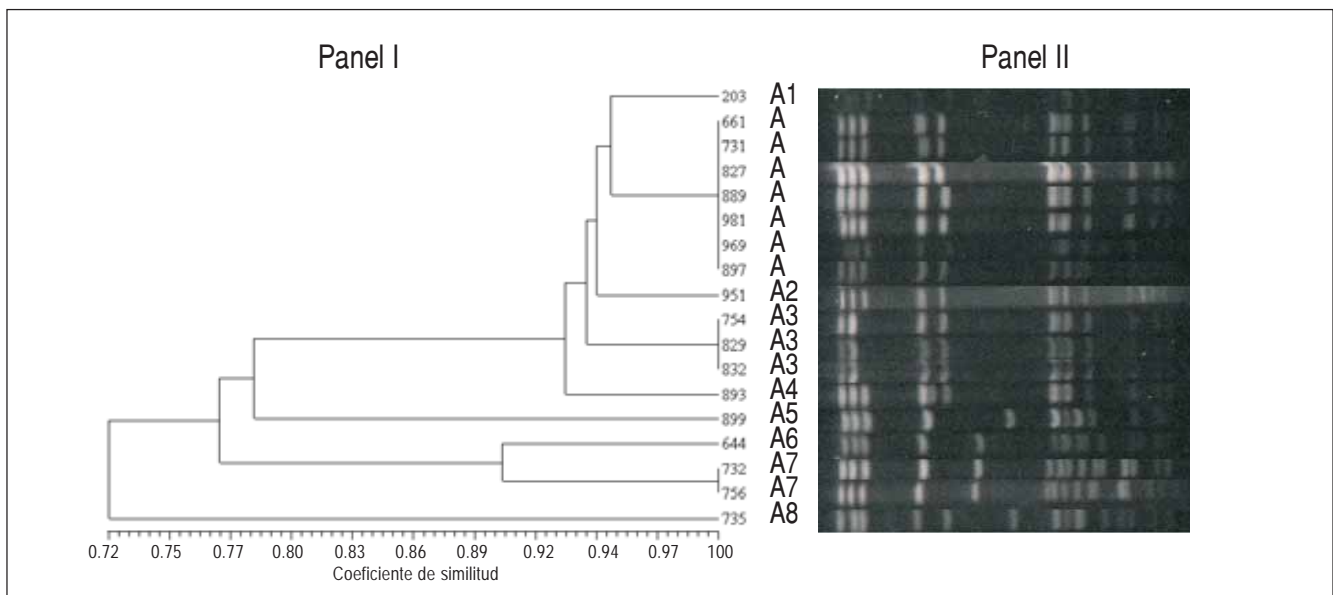


Figura 2. Panel I. Dendrograma de patrones de similitud de los aislamientos de *S. haemolyticus* resistente a meticilina de acuerdo con el coeficiente de Dice. Panel II. Imagen de los patrones generados por electroforesis en gel por campos pulsados de DNA cromosómico digerido con SmaI. Hospital General de Acapulco.

La detección del gen *mecA* en los aislamientos clínicos fue realizada por dos métodos: difusión en disco de oxacilina y amplificación del gen por PCR. En este hospital, la prevalencia de SCN-RM (61%) fue mayor que la obtenida en aislamientos clínicos de *S. aureus* RM (5.2%), resultados similares se han reportado por Calderón, *et al.* en México,⁸ y la frecuencia de SHRM difieren a lo identificado por otros autores.^{7,17,18} La presencia de SCN-RM se ha asociado con la resistencia a otros compuestos antiestafilocócicos.¹⁹ En el presente estudio *S. haemolyticus* se identificó como un patógeno multirresistente, ya que el fenotipo de resistencia fue variable. Esta multirresistencia ha sido reportada por diferentes autores;^{13,20,21} sin embargo, en el presente hospital se propone que el fenotipo de resistencia puede ser un posible marcador epidemiológico debido a que 50% de los aislamientos de *S. haemolyticus* (9/18) presentaron resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol, gentamicina, ciprofloxacina, azitromicina y cloranfenicol (fenotipo 4). Por otra parte, se ha documentado el surgimiento de cepas de *S. haemolyticus* con reducida sensibilidad a vancomicina, sugiriendo ser el único entre los SCN en ser un candidato para desarrollar la resistencia a glucopéptidos.¹¹ Aunque en el presente estudio todos los aislamientos clínicos fueron sensibles a vancomicina, es importante realizar una vigilancia epidemiológica para este tipo de microorganismos.

La clona A de *S. haemolyticus* multirresistente fue aislada de diferentes pacientes en los servicios de Ci-

rugía, Ginecología, Cuidados Intensivos y Pediatría, esto indica una posible diseminación clonal en el hospital, sugiriendo una posible transmisión cruzada de este patógeno multirresistente en el nosocomio. Asimismo, la prevalencia de esta clona y su distribución durante un periodo de 20 meses, sugieren que sea endémica en el hospital. La capacidad de SCN para persistir en un hospital durante largos periodos ha sido documentada por varios autores,^{4,5,12,21} y es probable que el uso de antibióticos haya sido un factor para la selección de esta clona en el hospital como ha sido sugerido por Krediet, *et al.*^{12,22}

La persistencia y diseminación de clonas de SCN dentro de los hospitales ha sido explicada mediante un origen en la comunidad o por ser endémicas en el hospital.¹³ Esto sugiere que SHRM puede ser aislado de infecciones de origen nosocomial o de origen comunitario, y así su diseminación puede realizarse en ambos sitios (ambiente hospitalario y comunidad). En este estudio, uno de los aislamientos de SHRM, perteneciente a la clona mayoritaria, fue obtenido de una muestra de orina de un paciente de Consulta Externa, pudiendo ser éste un ejemplo de una diseminación geográfica.

La inclusión de aislamientos de pacientes con sintomatología clínica de infección nosocomial sin hemocultivos periféricos positivos, es una limitante del presente estudio, ya que predominaron aislamientos de diferentes procesos invasivos (sondas y catéteres) principalmente de las áreas de cirugía y pediatría

del hospital. Sin embargo, el método semicuantitativo utilizado en muestras de punta de catéter puede ser indicativo de una colonización y transmisión cruzada entre pacientes hospitalizados.^{23,24}

Las técnicas de biología molecular son herramientas muy útiles en la caracterización de aislamientos clínicos. En el presente trabajo se identificó una clona mayoritaria de *S. haemolyticus* resistente a meticilina que se aisló de pacientes hospitalizados y la comunidad. Aunque la transmisión de bacterias no necesariamente conduce a infección, estos resultados sugieren que es necesario establecer programas de control para evitar la diseminación de este patógeno multirresistente en este hospital.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Gerardo Aparicio Azores, el apoyo en la revisión de este escrito. Este trabajo se desarrolló parcialmente con apoyo de los Fondos mixtos CONACYT-Gobierno del estado de Guerrero (clave: GUE-2002-C01-5586) y la subvención de CONACYT Salud 2003-C01-009.

REFERENCIAS

- Kloss WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 117-40.
- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 231-43.
- Burnie JP, Naderri-Nasab M, Loudon KW, Matthews RC. An epidemiological study of blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci demonstrating hospital-acquired infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1746-50.
- Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1740-6.
- Low DE, Schmidt BK, Kirpalani HM, Moodie R, Kreiswirth B, Matlow A, Ford-Jones EL. An endemic strain of *Staphylococcus haemolyticus* colonizing and causing bacteremia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatrics* 1992; 89: 696-700.
- Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 173-86.
- Urdez-Hernández E, Sifuentes-Osornio J, Calva JJ, Villalobos-Zapata Y. Epidemiological and biological characteristics of methicillin-resistant staphylococcal infections in a Mexican hospital. *Arch Med Res* 1999; 30: 325-31.
- Calderón-Jaimes E, Espinosa-Monteros LE, Avila-Beltrán R. Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *Salud Pública Méx* 2002; 44: 108-12.
- Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984; 158: 513-16.
- Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, Gala JL. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2864-7.
- Biavasco F, Vignaroli C, Lazzarini R, Varaldo P. Glycopeptide susceptibility profiles of *Staphylococcus haemolyticus* bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11): 3122-6.
- Krediet TG, Mascini EM, Van Rooij E, Vlooswijk J, Paaau A, Gerards LJ, Fleer A. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 992-5.
- Miragaia M, Couto I, Pereira S, Kristinsson K, Westh H, Jarlov J, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: Evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 430-8.
- CLSI/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S15. Wayne Philadelphia U.S.A: CLSI; 2005.
- Chung M, de Lencastre H, Tomasz A, Adamson I, Aires de Sousa M, Camou T, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: Comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 2000; 6: 189-98.
- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
- De Giusti M, Pacifico L, Tufi D, Panero A, Boccia A, Chiesa C. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase negative staphylococci from neonates. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 351-8.
- Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagne D, Fitzgerald SS, Lannigan R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 752-4.
- Santos Sanches I, Mato R, De Lencastre H, Tomasz A. CEM/NET Collaborators and the International Collaborators. Patterns of multidrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci collected in the international multicenter study RESIST in 1997 and 1998. *Microb Drug Resist* 2000; 6: 199-211.
- García de Viedma D, Martín-Rabadán P, Díaz M, Cercenado E, Bouza E. Heterogeneous antimicrobial resistance pattern in polyclonal populations of coagulase-negative staphylococci isolated from catheters. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1359-63.
- Spiliopoulou I, Santos Sánchez I, Bartzas Vali C, Ludovice AM, Aires de Sousa M, Dimitracopoulos G, De Lencastre H. Application of molecular typing methods to characterize nosocomial coagulase-negative staphylococci collected in a greek hospital during a three-year period (1998-2000). *Microb Drug Resist* 2003; 9(3): 273-82.
- Krediet TG, Jones MA, Janssen K, Gerards LJ, Fleer A. Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: Relation to nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 3376-8.
- Aires de Sousa M, Santos Sanches I, Ferro ML, De Lencastre H. Epidemiological study of staphylococcal colonization and cross-infection in two west African hospitals. *Microb Drug Resist* 2000; 6(2): 133-41.
- Agvald-Öhman C, Lund B, Edlund C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Critical Care* 2000; 8(1): 42-7.

Reimpresos:

M. en C. Natividad Castro

Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas,
Facultad de Ciencias Químico Biológicas,
Universidad Autónoma de Guerrero.
Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria,
39090 Chilpancingo, Guerrero.
Tel./fax: +52 (747)4725503.
Correo electrónico: natycaastro2@hotmail.com

Recibido el 28 de septiembre de 2005.

Aceptado el 23 de agosto de 2006.