

# Portación Nasal de *Staphylococcus aureus* y su Asociación con Forunculosis a Repetición

## Nasal Portability of *Staphylococcus aureus* and its Association with Furunculosis to Repetition

Miryan Falcón  
Mariel Brítez  
Rosana Ortiz  
Ma. Gloria Centurión  
Carmen Barreto  
Rolando Cáceres  
Antonio Villalba  
Elizabeth Godoy  
Mario Martínez

Laboratorio Central de Salud Pública. Departamento de Bacteriología y Micología, Sección Bacteriología Clínica.

### Resumen

*Staphylococcus aureus* es una bacteria que coloniza la piel y/o fosas nasales de las personas sanas y produce una amplia gama de infecciones, desde forúnculos hasta las más graves como neumonía o sepsis. La portación nasal de *S.aureus* parece ser clave en la epidemiología y la patogenia de la infección. *S. aureus* se caracteriza por presentar el gen *mecA* que confiere resistencia a meticilina pudiendo ser sensible a otros antibióticos no betalactámicos. Su virulencia se asocia principalmente a la toxina Leucocidina de Pantón Valentine (PVL) una citotoxina que provoca destrucción de los leucocitos y necrosis tisular, lo que a su vez facilita la producción de abscesos.

Los objetivos de este estudio fueron, asociar la portación nasal de *S. aureus* con la forunculosis a repetición, determinar por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los genes que codifican la meticilino resistencia y la toxina PVL. Se estudiaron 128 cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes que estuvieron con o sin tratamiento con antibióticos, y que concurrieron al laboratorio entre 2016 y 2017 con diagnóstico de forunculosis a repetición, de las cuales 74 cepas se aislaron de las lesiones y 54 de sus hisopados nasales. Del total de cepas, se obtuvieron 66,4% de meticilino resistencia y 78,9% presentaron la toxina PVL. Se obtuvo una alta asociación entre la portación nasal de *S. aureus* de la comunidad con forunculosis a repetición (OR: 5,3 IC<sub>95</sub>: 1,9 – 14,2%;  $p = 0,0004 < p = 0,02$ ;  $X^2$ )

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, portación nasal, forunculosis, *mecA*, PVL

## Abstract

*Staphylococcus aureus* is a bacterium that colonizes the skin and / or nostrils of healthy people and produces a wide range of infections, from forunculosis to the most serious such as pneumonia or sepsis. The nasal carriage of *Staphylococcus aureus* appear to be key in the epidemiology and pathogenesis of infection. *Staphylococcus aureus* characterizes by presenting the *mecA* gene which confers resistance to methicillin and could be sensitive to other non-beta-lactam antibiotics. Its virulence is mainly associated to the Panton-Valentine Leucocidine (PVL) a cytotoxin that causes destruction of the leukocytes and tissue necrosis, which facilitates the abscess production.

The objectives of this study were, to associate the nasal carriage of *Staphylococcus aureus* with recurrent forunculosis, to determine by the polymerase chain reaction method (PCR) the genes encoding methicillin resistance and the toxin PVL. It was studied 128 strains of *Staphylococcus aureus* from patients with or without antibiotic treatment and went to the laboratory between 2016 and 2017 with recurrent forunculosis, of which 74 strains were isolated from the lesions and 54 from nasal swabs. Of the total strains, 66.4% were methicillin resistance and 78.9% presented PVL toxin. There obtained a high association between the nasal carriage of *Staphylococcus aureus* of the community with recurrent forunculosis (OR: 5,3 IC<sub>95</sub>: 1,9 – 14,2%;  $p = 0,0004 < p=0,02$ ;  $X^2$ )

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, nasal carriage, forunculosis, *mecA*, PVL

Fecha de recepción: 05/08/2017  
Fecha de aceptación: 10/10/2017

### Correspondencia:

Dra. Miryan Falcón  
Laboratorio Central de Salud Pública  
miryanfalcon@gmail.com

## Introducción

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es un microorganismo ubicuo, con predilección por la piel, glándulas cutáneas y membranas mucosas de mamíferos. En el ser humano, *S. aureus* coloniza la piel y las mucosas de distintas localizaciones del cuerpo humano. El lugar más frecuente de colonización de *S. aureus* se encuentra en la parte anterior de las fosas nasales, seguidas del área perineal-ingles, de la orofaringe y de las axilas. Esta bacteria puede aislarse, además, en otros sitios como en la piel, especialmente de las manos (1).

*S. aureus* es uno de los patógenos humanos más importantes, responsable de una amplia variedad de procesos infecciosos, tanto nosocomiales como adquiridos en la comunidad, algunos de los cuales con una mortalidad elevada. La infección suele comenzar con la colonización previa de *S. aureus*, principalmente en las fosas nasales. Una vez rota la barrera natural de la piel, las bacterias pueden diseminarse hacia sitios más profundos, bien por contigüidad o bien por vía hematológica (2).

*S. aureus* es un patógeno con gran capacidad de adquirir diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos. Este microorganismo había desarrollado la capacidad de

producir B-lactamasas, que descomponen el anillo B-lactámico de la penicilina e impiden su unión con las proteínas de unión a la penicilina (PBP). Las PBPs son enzimas localizadas en la membrana bacteriana que están implicadas en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. Su producción está codificada por el gen *mecA* (3).

*S. aureus* es capaz de producir una amplia variedad de toxinas y factores de virulencia. En relación con la emergencia de *Staphylococcus aureus metilino resistente* (MRSA), el más importante es la Leucocidina de Panton-Valentine o PVL (por sus siglas en inglés) (4).

La toxina PVL es una exotoxina formadora de poros, presente en algunas cepas de *S. aureus* tanto sensibles como resistentes a la metilino. La presencia de PVL está asociada con mayor severidad local de las infecciones de piel y tejidos blandos, mayor respuesta inflamatoria (fiebre y otras manifestaciones sistémicas) y complicaciones en las osteomielitis; y mayor mortalidad de las neumonías. Los forúnculos y abscesos son las formas clínicas más frecuentes (5).

El tratamiento de las infecciones por *S. aureus* depende del tipo y severidad de la infección, la prevalencia de MRSA y la sensibilidad antibiótica. También, se considera la gravedad de las infecciones atribuida a la presencia de la toxina PVL.

La emergencia de MRSA de la comunidad ha llevado al cambio de las políticas antibióticas en zonas de alta prevalencia, y a la aparición de nuevas guías de tratamiento orientadas al manejo de las infecciones por estas nuevas cepas resistentes (6,7)

El objetivo de este trabajo fue determinar la portación nasal de *S. aureus* y su asociación con forunculosis a repetición en pacientes con o sin tratamiento con antibióticos y que concurren al Laboratorio Central de Salud Pública por solicitud médica para el estudio de portación, entre mayo de 2016 a mayo de 2017.

## Materiales y Métodos

**Diseño:** estudio retrospectivo de corte transversal

**Población enfocada:** cepas de *S. aureus* aisladas de hisopados nasales y lesiones de piel o abscesos de pacientes con diagnóstico de forunculosis a repetición que estén con o sin tratamiento con antibióticos.

**Población accesible:** cepas de *S. aureus* aisladas de hisopados nasales y lesiones de piel o abscesos de pacientes con diagnóstico de forunculosis a repetición que estén con o sin tratamiento con antibióticos y que concurren en el Laboratorio Central de Salud Pública entre mayo de 2016 a mayo de 2017.

**Criterios de inclusión:** muestras de hisopados nasales y/o lesiones de piel o abscesos de las cuales fueron aisladas *S. aureus*

**Criterios de exclusión:** muestras de hisopados nasales y lesiones de piel o abscesos en las cuales no fueron aisladas *S. aureus*.

**Muestreo:** Se realizó un muestreo no probabilístico de casos consecutivos que presentaron los criterios de inclusión.

**Variables:** las variables operativas utilizadas fueron: hisopado nasal, forunculosis, fenotipo de sensibilidad, gen *mecA*, toxina PVL.

**Instrumento de medición:** Se llenó una ficha en el momento de la toma de muestra para obtener los datos mínimos del paciente requeridos para el estudio, al cual se le asignó un código numérico.

**Aspectos éticos:** La toma de muestra fue realizada como procedimiento de rutina, en forma única y sin requerimiento de muestras adicionales. Este trabajo empleó

bacterias para la realización del estudio analítico, por lo tanto no conlleva riesgos para el paciente. Los resultados fueron entregados individualmente al paciente por escrito.

**Análisis estadísticos:** Todos los datos y resultados obtenidos fueron guardados en una planilla Microsoft Excel 2010, la cual fue utilizada para el análisis por el sistema Epi Info 7 ®. Para establecer la asociación de la portación nasal con forunculosis a repetición y poder evaluar diferencias estadísticas entre las variables, se utilizaron los cálculos de  $\chi^2$ .

#### **Toma de muestra y análisis microbiológicos y moleculares:**

A todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión se les obtuvo muestras de hisopado nasal y una aspiración por punción de la lesión o absceso, o por hisopado según el caso.

El cultivo se realizó en los medios de agar sangre de carnero al 5% y agar manitol sal con incubación a 35°C. La identificación se realizó por métodos manuales utilizando tinción de Gram y las pruebas de catalasa, coagulasa, DNAsa, PYR, urea, sensibilidad a la novobiocina 5 ug, bacitracina 10 ug y polimixina B.

El estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos se realizó por el método de difusión en agar con discos según el método de Kirby Bauer siguiendo la interpretación de los puntos de corte establecidos por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) (9).

Los antibióticos testados fueron: cefoxitina 30 µg, gentamicina 10 µg, rifampicina 5 ug, cloranfenicol 30 µg, trimetoprim sulfametoxazol 25 ug, La caracterización fenotípica de la resistencia a macrólidos (MLSb inducible) se realizó mediante la prueba de doble disco; eritromicina 15 µg y clindamicina 2 µg. Las zonas de inhibición fueron interpretadas según su diámetro y detectando la presencia de un achatamiento en la zona de la clindamicina (D-test), indicando resistencia inducible. Si no se producía un efecto D-test, se interpretó que la cepa era sensible o resistente a clindamicina en función al diámetro de los halos de inhibición. La caracterización molecular se realizó en el área de biología molecular del LCSP. La técnica utilizada fue de la reacción en cadena de la polimerasa clásica múltiple (PCR Multiplex) siguiendo un protocolo descrito para la detección del gen *mecA* y PVL (10,11)

La extracción del ADN se realizó con el equipo de extracción *Magpurix*, de este extracto se tomó 3 ul como DNA molde o templado para la reacción de amplificación.

Para la realización de esta técnica se utilizaron dos iniciadores o *primers* que son complementarios del gen *mecA* (*mecA1* y *mecA2*) y dos iniciadores para la detección del gen *luk-PV* (*Luk-PV1* y *Luk-PV2*) descritos por Lina et al (10).

Para la mezcla de reacción (Mix) se utilizó por cada tubo: Desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTPs) 2,5 mM;  $\text{CaCl}_2$  50 mM: 3 ul; Buffer PCR 10X: 5 ul; Taq DNA polimerasa 2,5 U/ul: 0,2 ul; Primers 30 pmoles/ul: 1 ul; agua grado molecular: 34,8 ul; ADN templado: 3 ul La amplificación se realizó en un termociclador siguiendo los siguientes parámetros: 95 °C, 5 minutos; 47°C, 10 min; 72°C, 6 min; 95°C, 5 min; seguidos de 35 ciclos de 30 seg a 95 °C; 30 seg. a 60°C; 1 minuto a 72 °C y un período de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. El gel se preparó con 2 gr de agarosa, 100 ml de buffer TE 0,5X (50 mM Tris y 0,2 mM EDTA pH8) y 10 ul de una solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml). El gel fue cargado con 3,5 ul del producto amplificado con el buffer de corrida (Loading buffer) y con un control de peso molecular de 1 kb (Ladder). La corrida se realizó en buffer TE 0,5X a 100 voltios durante 45 min.

La visualización de los amplificadores se realizó con un equipo transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados con el mismo equipo que posee un fotodocumentador (BioRad) incorporado a una computadora para el posterior análisis.

Interpretación de los resultados de la PCR: las cepas que poseen el gen *mecA*, en el producto de PCR presentan una banda de 286 pb. Las cepas que poseen el gen *luk-PV* presentan una banda de 433 pb

## Resultados

### Portación nasal de *S. aureus* y su asociación con forunculosis

Se analizaron en total 168 muestras, 84 hisopados nasales y 84 lesiones de piel o abscesos.

El 45,2% (76/168) de las muestras dieron cultivo positivo para *S. aureus* en ambos tipos de muestras en un mismo paciente; 38 se aislaron del hisopado nasal y 38 de sus lesiones de piel.

El 23,8% (40/168) dieron cultivo negativo en ambos tipos de muestras

De los hisopados nasales que dieron cultivo positivo para *S. aureus* y cultivo negativo en sus lesiones fue del 9,5% (16/168).

De las lesiones de piel o abscesos que dieron cultivo positivo para *S. aureus* y cultivo negativo para sus hisopados nasales fue del 21,4% (36/168).

Se pudo observar un asociación altamente significativa (OR: 5,3 IC<sub>95</sub>: 1,9 – 14,2%;  $p = 0,0004 < p = 0,02$ ;  $\chi^2$ ) entre la portación nasal de *S. aureus* y la formación de forúnculos a repetición.

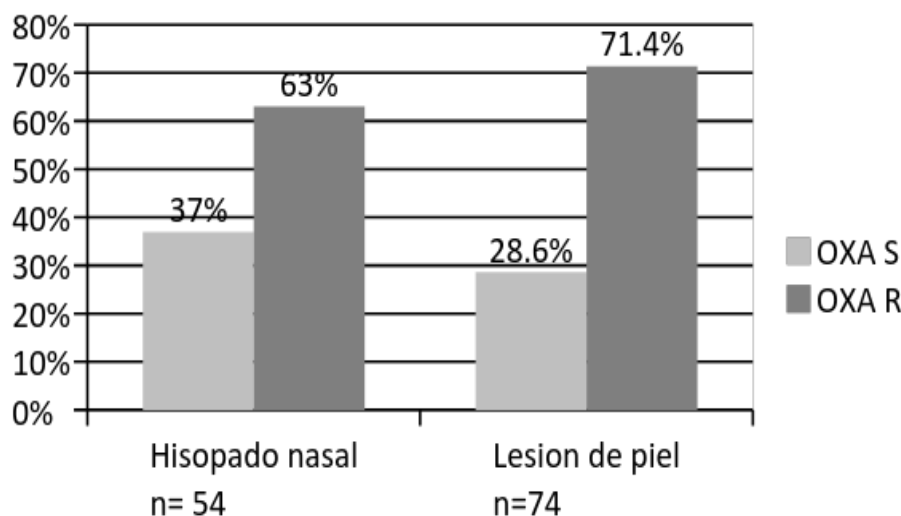
### Resistencia a meticilina

Del total de muestras se aislaron 128 cepas de *S. aureus*, el 66,4% (85/128) fueron resistentes a oxacilina, y el 33,6% (43/128) fueron sensibles.

De las 128 cepas, 54 cepas se aislaron de los hisopados nasales, de los cuales el 63% (34/54) fueron oxacilina resistentes y el 37% (20/54) fueron sensibles. (Figura 1)

De las 128 cepas, 74 cepas se aislaron de las lesiones de piel, de los cuales el 71,4% (53/74) fueron oxacilina resistentes y el 28,6% (21/74) fueron sensibles.

Las 76 cepas de *S. aureus* aisladas de las lesiones y de sus hisopados nasales correspondientes, el 89,5% (68/76) fueron meticilino resistentes, coincidiendo la resistencia en ambos tipos de muestra.



### Figura 1. Frecuencia de sensibilidad a la Oxacilina en los hisopados nasales y lesiones de piel.

#### Detección del gen *mecA* y PVL

Todas las 85 cepas de *S. aureus* que fueron resistentes a la Oxacilina por el método de difusión por discos de Cefoxitina, se confirmaron por métodos moleculares coincidiendo con la portación del gen *mecA* que confiere dicha resistencia por el mecanismo de producción de PBP2, evidenciados por el producto de amplificación de 288 pb (Figura 2), confirmándose así la frecuencia del 68,3% de MRSA del total de aislados.

De las 128 cepas de *S. aureus*, el 78,9 % (101/128) portaron el gen que codifica la PVL.

De las 54 cepas aisladas de los hisopados nasales 72,2% (39/54) portaron el gen para PVL, y de las 74 cepas aisladas de las lesiones 83,7% (62/74) portaron PVL, detectados por los productos de amplificación de 433 pb (Figura 2).

#### Sensibilidad a los antimicrobianos

En cuanto a la sensibilidad a los antimicrobianos, de los 128 aislamientos, el 66,4% (85/128) fueron resistentes a Cefoxitina y por tanto resistentes a Oxacilina, y el 33,6% (43/128) presentaron sensibilidad a la misma.

Las 128 cepas presentaron 100% de sensibilidad a Trimetoprim sulfametoxazol. El 15,6% (20/128) fueron resistentes a Gentamicina; el 20,3% (26/128) fueron resistentes a Clindamicina, y el 21,8 % (28/128) fueron resistentes a Eritromicina. Se encontró un 1,6% (2/128) de resistencia a Ciprofloxacina y 1,2% (1/128) de sensibilidad intermedia a Rifampicina. (Figura 3).

El 10,9% (14/128) de los aislados presentaron MLSb inducible (D-Test +) (no mostrado en el gráfico).

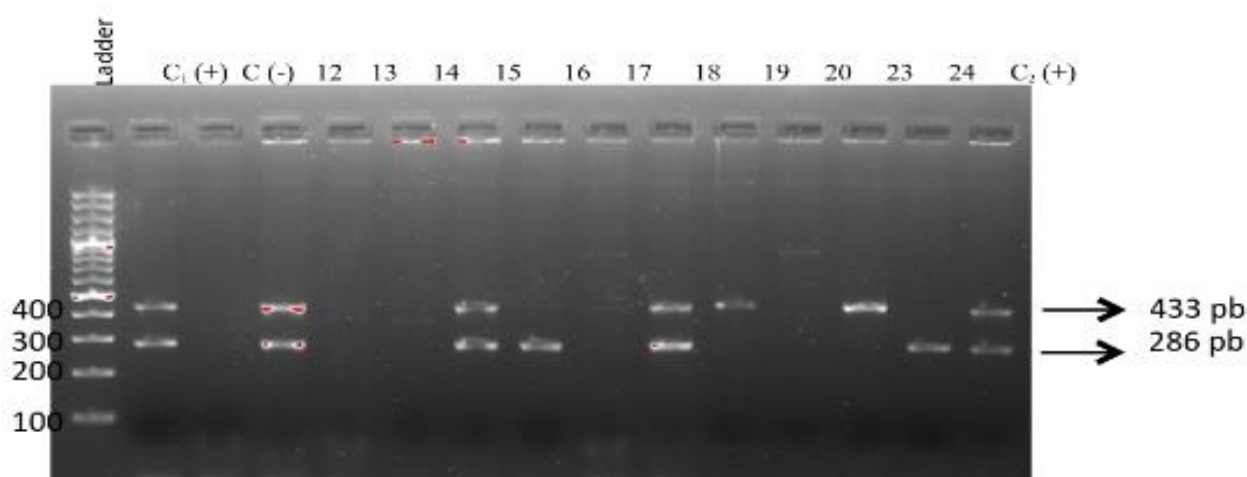
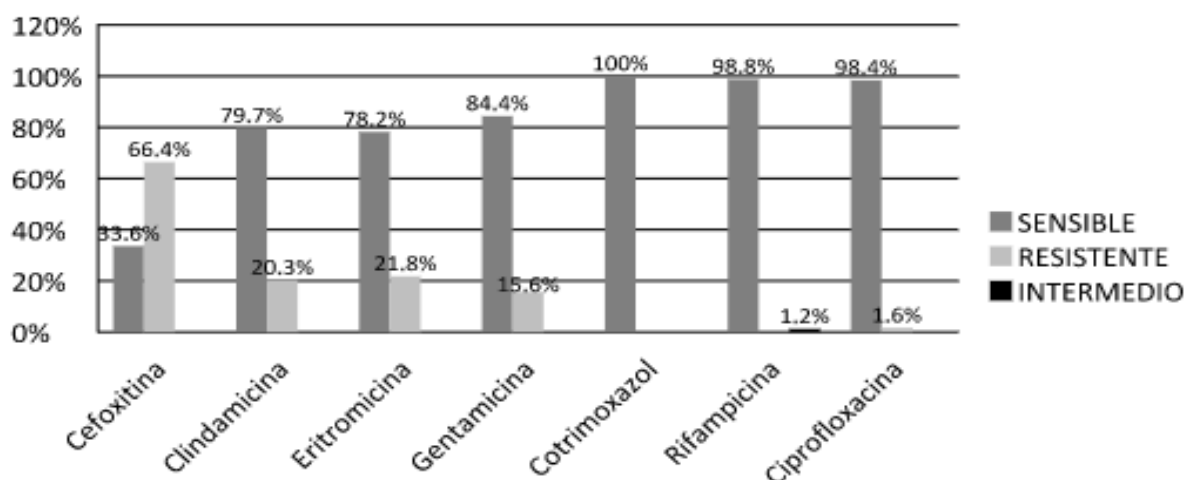


Figura 2. PCR para la detección de *mecA* y PVL



**Figura 3. Porcentaje de sensibilidad y resistencia a los diferentes antimicrobianos en *S. aureus*. n=128**

## Discusión

Este estudio fue realizado para asociar la portación nasal de *S. aureus* con la forunculosis a repetición, conocer la prevalencia de cepas meticilino resistentes y la portación de la toxina PVL.

El informe anual de los datos del 2015 de la Red Nacional de Laboratorios de Paraguay, enviado anualmente por el laboratorio de referencia Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP) a la OPS/OMS, informó una prevalencia de MRSA del 71,2% de diferentes sitios de infección (12)

En este estudio obtuvimos una frecuencia de MRSA del 66,4% en el total de cepas estudiadas. La meticilino resistencia de las cepas aisladas de las lesiones de piel coincidió con las aisladas de sus hisopados nasales

Otros estudios a nivel nacional, comunicaron la frecuencia de MRSA y la presencia de PVL en diferentes sitios de infección y también en portadores nasales de trabajadores de la salud (14)

La frecuencia de infecciones en general, por cepas portadoras de PVL en este estudio, fue del 78,9% del total de cepas estudiadas. Frecuencia bastante elevada en comparación con otro estudio realizado en el 2010 en Paraguay donde analizaron cepas de *S. aureus* adquiridos de la comunidad obtenidos a partir de muestras clínicas de secreciones de piel, partes blandas o líquidos corporales de pacientes menores de 17 años donde la portación del gen codificante de la PVL se observó en un 58% del total de los aislados (15).

A pesar de la alta meticilino resistencia, se observó una alta sensibilidad a las sulfonamidas, tratamiento de elección para infecciones de piel y tejidos blandos.

En comparación con otros autores (15), observamos una disminución de la sensibilidad a otros tipos de antibióticos, especialmente a la clindamicina (20,3%), alternativa de tratamiento especialmente en pediatría.

Si bien, hay otros tipos de estudios donde no encontraron una asociación significativa entre la portación nasal y las afecciones sistémicas (16), en este trabajo, se pudo establecer una alta asociación de la portación nasal de *S. aureus* con la forunculosis a repetición (OR: 5,3 IC95: 1,9 – 14,2%;  $p = 0,0004 < p=0,02$ ;  $\chi^2$ ).

## Conclusión

Se pudo establecer una alta asociación de la portación nasal de *S. aureus* con la forunculosis a repetición.

Todas las cepas meticilino resistentes portaron el gen *mecA*, lo que confirmó la resistencia por este mecanismo.

A través de la detección del gen Luk-PV se pudo determinar la frecuencia de portación de la toxina PVL.

Todas las cepas de *S. aureus* estudiadas fueron sensibles a las sulfonamidas, pero con menor sensibilidad a los macrólidos y lincosaminas, y con sensibilidades variables a otros tipos de antibióticos.

## Referencias bibliográficas

1. Mermel L, Cartony J, Covington P. et.al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization at different body sites: a prospective, quantitative analysis. J Clin Microbiol 2011 Mar;49(3):1119-21
2. Coello R, Jiménez J, García M, et.al. Prospective study of infection and carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an outbreak affecting 990 patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994;13(1):74-81.
3. De Leo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2010; 375:1557-68
4. Voug C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of quorum-sensing system to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2000;182: 1688-1693.
5. Vandeshesh F, Naimi TS, Enright M, Lina G, Nimmo G, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 2003; 9:978-84.
6. Martínez-Aguilar G, Hammerman WA, Mason EO, Kaplan SL. Clindamycin treatment of invasive infections caused by community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in children. Pediatr Infect Dis J 2003; 22:593-8.
7. Frank AL, Marcinak JF, Mangat PD, Tjho JT, Kelkar S, Schreckenberger, et al. Clindamicina treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. Pediatr Infect Dis J 2002; 21:530-34.
8. Creech CB, Kernodle DS, Alsentzer A, Wilson C, Edwards KM. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. Pediatr Infect Dis J. 2005 Jul;24(7):617-21.
9. Patel J, Weinstein M, Eliopoulos G, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S26-2016; Vol.26(1).
10. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Pantón-Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-32
11. Gardella N, Picasso R, Predari SC, Lasala M, Foccoli M, Benchetrit G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires Teaching Hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. Rev Argent Microbiol 2005; 37:156-60.
12. Organización Panamericana de la Salud. Washinton, DC; 2013 [fecha de acceso enero 2017] Informe Anual de la Red de Monitoreo/ Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=5542&Itemid=40740&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5542&Itemid=40740&lang=es)
13. Informe Anual de la Red Nacional de la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos. [base de datos] Dpto. de Bacteriología y Micología. Laboratorio Central de Salud Pública. Asunción, Paraguay. Noviembre 2016. contacto: antimicrobiano@lcsp.gov.py
14. Abente S, Carpinelli L, Guillén R, Rodríguez F, Fariña N, Laspina F, et al. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes



ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. Rev.Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2016; 14(2): 8-16

15. Guillen RM, Rodriguez F, Carpinelli L, Basualdo W, Castro H, Quiñonez B. et al.Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, durante el año 2010.Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud (Py). Abril 2015; Vol. 13(1): 58-66

16. Calderini M, Sanabria G, Taboada A, Samaniego S, Irala J. Colonización nasal de *Staphylococcus aureus* y su relación con afectación sistémica en pacientes adultos internados en el Instituto de Medicina Tropical. Rev. Inst.Med.Trop2015;10(2)13-16. <http://dx.doi.org/10.18004/imt/201510213-16>