

## Efecto del bromuro de etidio sobre el fenotipo y perfil plasmídico de *Staphylococcus aureus*: estudio preliminar

Lorena Atencio B.<sup>1\*</sup>, Mary Álvarez G.<sup>2</sup>, Laugeny Díaz B.<sup>3</sup>, Jorge Guiñez O.<sup>2</sup>,  
Xiomara Montiel <sup>3</sup> y Jhoandry Rivera S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular. <sup>2</sup>Colección Anibal Zaindenberg.

<sup>3</sup>Laboratorio de Biología, Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, apartado postal 526, Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 08-09-06 Aceptado: 08-10-08

### Resumen

La multiresistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* ha sido reportada en plásmidos, información transmisible intergéneros e intragéneros bacterianos, lo que la ha convertido en un problema de salud pública. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del bromuro de etidio (EtBr) sobre el fenotipo y el perfil plasmídico de *S. aureus*. Se evaluaron la susceptibilidad a antibióticos, la resistencia a meticilina (SARM), la producción de  $\beta$ -lactamasas, el número y tamaño de plásmidos en las cepas antes y después del crecimiento con EtBr. Se observaron 10 patrones de resistencias, siendo P<sup>R</sup> (84,61%) y OX<sup>R</sup> (61%) los más frecuentes. El 50% de los aislados resultaron ser SARM y el 61,53%, productores de  $\beta$ -lactamasas. Todas las cepas mostraron plásmidos cuyos tamaños oscilaron entre 1,1 kb hasta > 23 kb. Cuatro cepas, luego de ser expuestas al EtBr, cambiaron sus fenotipos y perfil plasmídico. La resistencia a la penicilina y la producción de  $\beta$ -lactamasas permanecieron en algunas cepas que llevaban la banda plasmídica de > 23 kb, pero esos fenotipos también fueron perdidos en algunas colonias que tenían la misma banda. La curación de plásmidos es usada mundialmente para estudiar localizaciones genéticas de marcadores moleculares en *S. aureus*. Se requiere estandarizar las condiciones del protocolo, así como aplicar técnicas genéticas que permitan reforzar los resultados obtenidos.

**Palabras claves:** antibióticos, curación, plásmidos, resistencia, *Staphylococcus aureus*.

## Ethidium bromide effect on phenotype and plasmidic profile of *Staphylococcus aureus*: preliminary study

### Abstract

The antibiotics multiresistance in *Staphylococcus aureus* has been reported in plasmids, transmissible information inter and intra bacterial genes turning into a public health problem. The aim for research was evaluate the effect of the Ethidium bromide (EtBr) on phenotypes and plasmidic profile of *S. aureus*. Susceptibility to antibiotics, resistance to methicillin (MRSA), producing  $\beta$ -lactamases, numbers and sizes of plasmids in the strains were evaluated pre and post growth with EtBr. Were observed 10 resistance patterns, being P<sup>R</sup> (84,61%) y OX<sup>R</sup> (61%) more frequent. 50% of the isolated turned out to be MRSA and 61,53% producing  $\beta$ -lactamases.

\* Autor para la correspondencia. E-mail: lbatencio@yahoo.com.

All strains showed plasmids whose sizes oscillated from 1.1 kb to > 23 kb. Four strains after of to be exposed to EtBr changed its phenotypes and plasmidic profile. The resistance to Penicillin and production of  $\beta$ -lactamases remained in some strains that carried the band of > 23 kb, but these phenotypes also were lost in some colonies that had the same band. The curing plasmid is used throughout the world to study genetic locations of molecular markers in *S. aureus*, is required to standardize the conditions of the protocol, as well as to apply genetic methodologies that allow to reinforcing the results obtained.

**Key words:** antibiotics, curing, plasmids, resistance, *Staphylococcus aureus*.

## Introducción

*Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales y comunitarias, presentando patogenicidad variable y pudiendo causar infecciones desde leves hasta con compromiso vital (1). Su protagonismo ha crecido en los últimos años debido al mayor aislamiento de cepas resistentes a meticilina (SARM), lo cual llama la atención no solo por su resistencia intrínseca a penicilinas y cefalosporinas, sino por su mayor patrón de resistencia a otros antimicrobianos y por su facilidad de transmisión (2), lo que obliga a tomar medidas de control, más aún cuando se ha reportado, en junio del 2002, el aislamiento de la primera cepa con resistencia total a la vancomicina (3).

La mayoría de las cepas de *S. aureus* de ocurrencia natural contienen uno o más plásmidos que oscilan generalmente entre 1 y 60 kpb y están vinculados con la resistencia a una gran cantidad de antibióticos (4, 5). En Venezuela, pocos son los reportes que señalan la ubicación plasmídica de estos determinantes de resistencia a antibióticos en *S. aureus* (6-8).

Sobre la base de lo planteado anteriormente, el objetivo de esta investigación fue determinar la ubicación preliminar en plásmidos de determinantes de resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus*, mediante la exposición al bromuro de etidio (EtBr) como agente intercalante y causante de la curación.

## Materiales y métodos

Se estudiaron 13 cepas de *S. aureus*, previamente caracterizadas morfológicamente y bioquímicamente, aisladas de diferentes muestras de pacientes que asistieron a un hospital y dos laboratorios clínicos ubicados en el municipio Maracaibo del estado Zulia, Venezuela.

### Sensibilidad a antibióticos

La actividad *in vitro* de los antibióticos a evaluar se determinó según recomendaciones de la OMS mediante el National Comité for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (9). Los antibióticos utilizados, manufacturados por Difco (Dispens-O-Disc Susceptibility Test System), fueron los siguientes: penicilina (P) 10  $\mu$ g, oxacilina (OX) 1  $\mu$ g, ceftriazone (CRO) 30  $\mu$ g, imipenen (IPM) 10  $\mu$ g, vancomicina (VA) 30  $\mu$ g, gentamicina (GM) 10  $\mu$ g, eritromicina (E) 10  $\mu$ g, tetraciclina (TE) 30  $\mu$ g, ciprofloxacina (CIP) 5  $\mu$ g, cloranfenicol (C) 30  $\mu$ g, clindamicina (CC) 2  $\mu$ g, rifampicina (RA) 5  $\mu$ g, trimetoprin-sulfametoxazol (SxT) 1,25  $\mu$ g/23,75  $\mu$ g y cefalotina (CR) 30  $\mu$ g. La cepa utilizada para el control de calidad del antibiograma fue *S. aureus* ATCC 25923 (9).

### Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) y productoras de $\beta$ -lactamasas

Se realizó utilizando placas de Agar Mueller-Hinton suplementadas con 4% de cloruro de sodio y 6  $\mu$ g/mL de oxacilina, siguiendo las recomendaciones de la NCCLSI

(9). Para garantizar los resultados de este análisis fueron utilizados los controles *S. aureus* ATCC 25923 (sensible a oxacilina) y *S. aureus* 43300 (resistente a oxacilina) (9). Así mismo, fueron inoculados con 4-5 colonias de las cepas en estudio tubos estériles con 0,1 mL de una solución de penicilina G (1 millón de U/mL) a pH 8,5 con indicador de pH rojo de fenol (0,5%). El cambio del color violeta de esta solución al amarillo antes de los 15 minutos post-inoculación indicó la producción de  $\beta$ -lactamasa (10). Como control se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

#### Extracción de plásmidos

Se utilizó el protocolo de lisis alcalina modificada (11) reportado previamente (12). La separación y observación se realizó por electroforesis en gel de agarosa (13). El tamaño de los plásmidos se determinó utilizando el programa computacional Origin Lab, Origin Pro 7.5 para Windows, basado en la migración de las bandas de ADN de la muestra en estudio, en comparación con las bandas del marcador de peso molecular (PM) Lambda *Hind* III (Promega®), como ha sido reportado previamente (14).

#### Eliminación de plásmidos

Para la eliminación de plásmidos se utilizan agentes intercalados en el ADN, como el EtBr. Se utilizó el protocolo propuesto por Asheskov (15) y modificado por Álvarez et ál. (16). Para ello se incubó cada cepa entre 16 y 18 horas a 44°C, utilizando EtBr a una concentración final de 25  $\mu$ g/mL. Luego de esta incubación, se procedió a realizar nuevamente la extracción de ADN plasmídico, así como el antibiograma respectivo y la prueba de producción de  $\beta$ -lactamasa, con el fin de valorar la pérdida de los fenotipos estudiados.

#### Análisis estadístico

Se realizó la determinación del porcentaje de cepas resistentes, resistentes intermedias y sensibles a los antibióticos proba-

dos, así como cepas SARM y producción de  $\beta$ -lactamasas.

### Resultados y discusión

En relación con los fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *S. aureus* estudiadas, se encontró la presencia de 10 patrones diferentes de resistencia (tabla 1), siendo el más frecuente el P<sup>R</sup>OX<sup>R</sup>, con un 23,07%. El 84,61% de las cepas resultó P<sup>R</sup>, seguido por OX<sup>R</sup>, con un 61%. La resistencia observada para el resto de los antibióticos fue: 46,15% para la E; 30,76% para la CIP; 23,07% para la CC y 15,38% para la TE. Es importante resaltar que en el antibiograma se obtuvo resistencia intermedia a la VA en el 15,38% de las cepas. Sin embargo, es necesaria la realización de otras determinaciones microbiológicas como es la CMI a 4  $\mu$ g/mL de VA (17) para corroborar este fenotipo, ya que se conocen pocos aislados de *S. aureus* con resistencia intermedia a la VA en el mundo (18). Los porcentajes de cepas resistentes a los diferentes antibióticos obtenidos durante esta investigación coinciden con lo reportado por otros autores (19, 20).

En cuanto a la presencia del fenotipo SARM, se obtuvo que el 61,53% de las cepas seleccionadas para este estudio fueron OXR en el antibiograma. Por esta razón se sometieron al crecimiento en medio con OX al 6  $\mu$ g/mL, donde el 50% de las aisladas fueron catalogadas como SARM (cepas 4, 8, 9 y 17). En el caso del fenotipo de producción de  $\beta$ -lactamasas, el 61,53% de las cepas valoradas resultaron productoras de esta enzima (tabla 1).

En la determinación del número y tamaño de las bandas plasmídicas en los aislados de *S. aureus*, se pudo observar que todas las cepas presentaron bandas plasmídicas cuyo número osciló entre 3 y 6. Entre las bandas plasmídicas obtenidas, se observaron tamaños que oscilaban entre 1,161 kb hasta valores aproximados que superaban los 23 kb (el valor estimado de estos últimos no pudo lograrse, ya que se mostraban como

Tabla 1  
Patrones de resistencia a antibióticos, perfiles plasmídicos, producción de  $\beta$ -lactamasas y promedio de colonias recuperadas luego del tratamiento con bromuro de etidio en cepas de *S. aureus*.

Patrón de resistencia	Numeración de las cepas	<sup>a</sup> Resistencia a $\beta$ -lactamasas	Producción de $\beta$ -lactamasas	Tamaños de bandas plasmídicas (kb) aprox.	<sup>b</sup> Promedio de colonias recuperadas	<sup>c</sup> Tamaños de bandas plasmídicas (kb) aprox.
1	11	Va <sup>1</sup>	-	>26,111; 26,111; 1,746; 1,428	3,5	26,111; 8,069; 1,746; 1,428
2	3, 8, 12	P, OX	3(-) 8(+) 12(+)	23,127; 2,021; 1,55; 1,24; 1,161 >26,111; 26,111; >26,111; 1,652; 1,39; 1,161	143,5 60 4,5	23,127; 2,021; 1,55; 1,24; 1,161 26,111; 1,652; 1,39; 1,161
3	9	OX, CC	-	23,174; 7,619; 4,603; 1,428	47,5	23,174; 1,428 26,111; 3,968; 2,857; 1,746; 1,39
4	18	P, E	+	>26,111; 26,111; 3,968; 2,857; 1,746; 1,39 23,373; 3,720; 1,825; 1,607, 1,214	6	23,373; 3,720; 1,825; 1,607, 1,214
5	7	P, OX, TE	-	23,127; 2,641; 2,244; 1,55; 1,24	0	ND
6	16, 20	P, CIP, E	16(+) 20(+)	>23,373; >23,373; 23,373; 1,765; 1,607 23,373; 1,765; 1,607	13,5 13,5	23,373; 23,373
7	4	P, OX, E, TE	+	23,127; 1,55; 1,24	1	23,127
8	13	P, OX, CC, Va <sup>1</sup>	+	26,111; 26,111; 1,428	1	ND
9	17	P, OX, CIP, E	-	23,373; 23,373; 23,373; 1,825; 1,607	0	ND
10	24	P, CIP, CC, E	+	23,373; 1,765; 1,607	0	ND

P: penicilina; OX: oxacilina; CIP: ciprofloxacina; CC: clindamicina; VA: vancomicina; E: eritromicina; TE: tetraciclina; I: resistencia intermedia; +: producción de  $\beta$ -lactamasas; -: no producción de  $\beta$ -lactamasas; \*: resultados del antibiograma; <sup>b</sup>: promedio de cepas recuperadas tras el tratamiento con EtBr (25  $\mu$ g/mL) llevado a cabo por duplicado; <sup>c</sup>: tamaños de bandas plasmídicas presentes luego de la curación; ND: no determinado

bandas que superaban el tamaño máximo que permitía determinar el marcador de peso molecular utilizado) (tabla 1, figuras 1, 2 y 3). La aparición de las bandas con tamaño > 23 kb pudiera indicar diferentes estados conformacionales de una misma banda de ADN. Sin embargo, se reportan, en *S. aureus*, plásmidos con tamaños superiores a los 23 kb (21-24). Con la finalidad de comprobar que las bandas de gran tamaño son realmente plásmidos, se requiere de la aplicación de protocolos como la extracción de plásmidos en gradiente de CsCl y su visualización en electroforesis de campo pulsado (25). Los perfiles de bandas obtenidos se encuentran entre los rangos de tamaños reportados para *S. aureus* (6-7, 12, 16, 21-24).

#### Determinación de la ubicación de marcadores plasmídicos de resistencia a antibióticos en *S. aureus*

La exposición de las cepas a la concentración del EtBr utilizado reveló ser un agente bastante agresivo al solo poder recuperar

el 69,23% del total de las cepas tratadas (tabla 1). De cada una de ellas se seleccionaron 2 colonias, con excepción de la cepa 4, a las cuales se les confirmaron nuevamente los fenotipos y carga plasmídica para determinar la ubicación genética de los determinantes de resistencia involucrados.

#### Análisis comparativo del fenotipo de resistencia a antibióticos previo y posterior al proceso de curación plasmídica

En las figuras 1, 2 y 3 pueden observarse los resultados de la extracción de plásmidos luego de la curación. Al comparar los resultados de las colonias obtenidas después de la curación con los fenotipos originales, se observaron cambios en los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos. Solo en las colonias seleccionadas de las cepas PS4, PS11, PS12 y PS20 (40%) se observaron cambios en el número de bandas, así como cambios en el fenotipo posterior a la exposición con el EtBr (tabla 1).

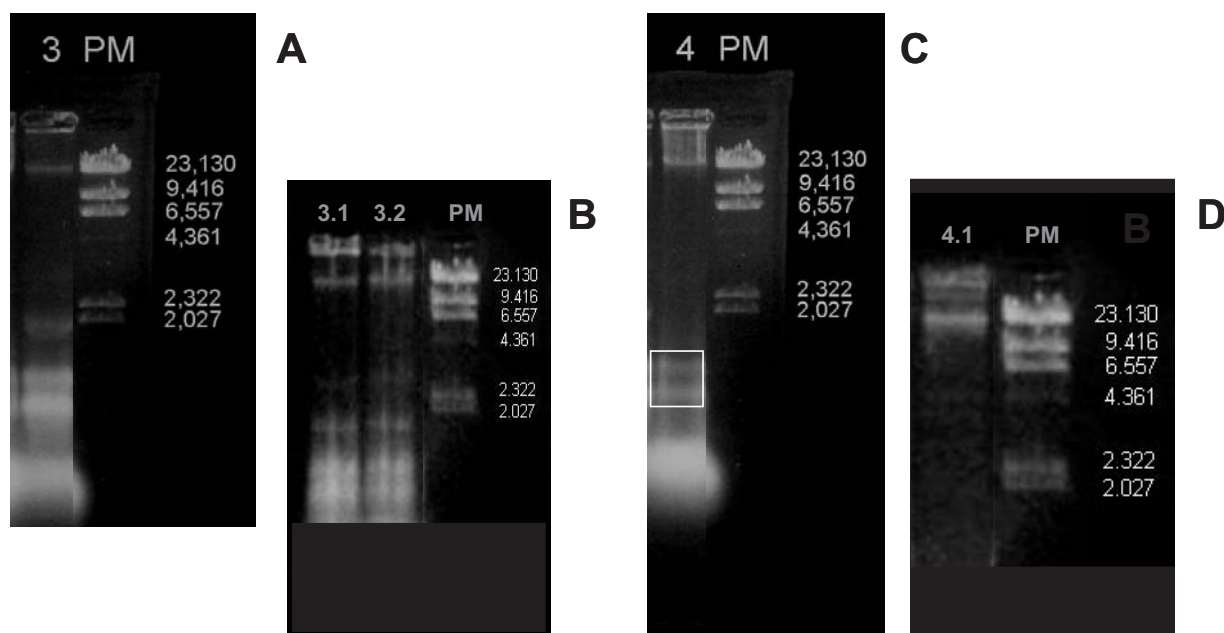


Figura 1. Perfil plasmídico de las cepas de *Staphylococcus aureus* 3 y 4 antes (A, C) y luego (B, D) de ser sometidas al tratamiento con EtBr a una concentración final de 25 µg/mL.

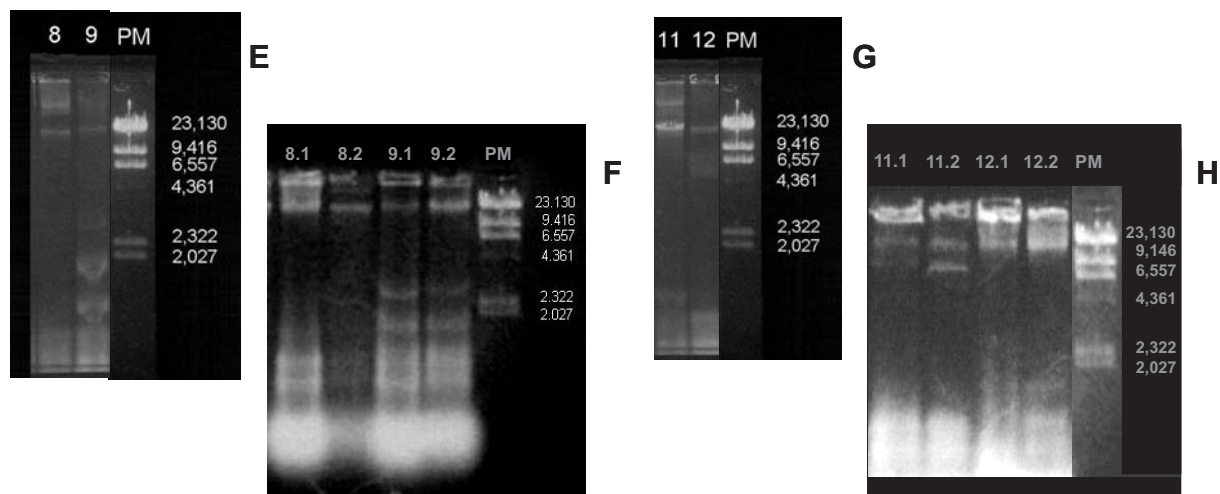


Figura 2. Perfil plasmídico de las cepas de *Staphylococcus aureus* 8 y 9/11 y 12 antes (E/G) y luego de ser sometidas al tratamiento con EtBr a una concentración final de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (F/H), respectivamente.

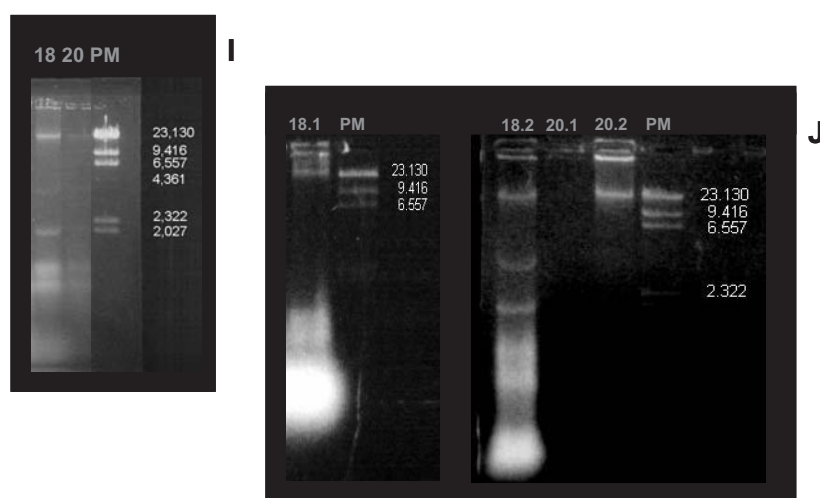


Figura 3. Perfil plasmídico de las cepas de *Staphylococcus aureus* 18 y 20 antes (I) y luego de ser sometidas al tratamiento con EtBr a una concentración final de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (J), respectivamente.

**Cepa PS4.** La cepa original fue  $\text{P}^{\text{R}}\text{-OX}^{\text{R}}\text{-E}^{\text{R}}\text{-TE}^{\text{R}}$  y productora de  $\beta$ -lactamasas. Luego de la curación, el fenotipo de resistencia a la TE desapareció (tabla 1). Esta cepa perdió las dos bandas pequeñas, lo cual pudiera indicar que alguna de ellas está involucrada en la resistencia a la TE. Estu-

dios realizados por Sidhu et ál. (2007) señalan que las bandas plasmídicas menores a 5 kb presentes en *S. aureus* están relacionadas con resistencia a tetraciclina, macrólidos y cloranfenicol. Sin embargo, la resistencia a la E se mantuvo, pudiéndose señalar que, o bien este fenotipo se encuentra ubica-

do en el genoma (26), o el daño en el ADN plasmídico ocasionado por el agente curante provocó la pérdida de la resistencia a la TE. La cepa mantuvo la banda de 23 kb y la capacidad de producir  $\beta$ -lactamasas.

**Cepa PS11.** Esta cepa solo presentó originalmente resistencia intermedia a la VA y no fue productora de  $\beta$ -lactamasas. Luego de someterla a curación se observó sensibilidad a la VA, pudiendo indicar que la cepa en realidad es susceptible a este antibiótico, por lo que se recomienda determinar dicho fenotipo mediante un *screening* en un medio con VA a 4  $\mu$ g (17). Se observó la aparición de una nueva banda de 8,069 kb aproximadamente, lo que hace inferir la observación de distintas conformaciones de superenrollamiento de la banda desaparecida, sin relacionarse con el cambio de fenotipo. Esta información solo podrá ser develada luego de la digestión de dichos ADN plasmídicos con enzimas de restricción. El tratamiento con EtBr generó un número muy pequeño de colonias, lo que indica que la concentración utilizada afectó fuertemente a la cepa bacteriana.

**Cepa PS12.** La cepa original presentó  $P^R$ - $OX^R$ , además de producir  $\beta$ -lactamasas. Tras la curación, la resistencia a la P y la producción de  $\beta$ -lactamasas se mantuvo, haciéndose sensible a la oxacilina. Las colonias curadas perdieron las bandas de aproximadamente 7 kb y 4,6 kb, permaneciendo la banda de 23 kb y la de 1,428 kb. En vista de que la resistencia a la OX está codificada en el cromosoma bacteriano, la pérdida de las bandas de 7 kb y 4,6 kb no está relacionada con la desaparición del fenotipo de resistencia a la OX, sino más bien a un producto del daño en el ADN cromosomal por la exposición al agente intercalante.

**Cepa PS20.** Esta cepa inicialmente presentó un fenotipo  $P^R$ ,  $E^I$  y  $CIP^I$ . Luego de la curación, el 100% de las colonias fueron sensibles a los antibióticos probados, perdiendo los dos plásmidos pequeños. En el caso de las colonias seleccionadas luego de

la curación de la cepa PS20, se puede mencionar que el EtBr pudiera haber afectado también el funcionamiento del plásmido de 23 kb (que permaneció en la colonia 20.2), ya que se perdieron las resistencias a antibióticos así como la producción de  $\beta$ -lactamasas. La pérdida de la resistencia a la E pudiera deberse a la pérdida de una de las bandas más pequeñas, cuyos tamaños han sido reportados como transportadores de este fenotipo de resistencia (4). Sin embargo, en el caso de la resistencia a la CIP, se ha demostrado que se encuentra ubicada en el cromosoma bacteriano, por lo que su pérdida pudiera implicar daño en este cromosoma, debido a lo agresivo de la curación con EtBr.

La permanencia de la resistencia a la P y la producción de  $\beta$ -lactamasas en el 66,66% de las colonias curadas pudiera explicarse por la persistencia de la banda de aproximadamente 23 kb. Este resultado coincide con los resultados preliminares obtenidos en nuestro entorno (16) y con los reportados en otros países (4, 21, 24), que señalan que los plásmidos de Clase II que oscilan entre 15 y 46 kb y que existen en bajo número de copias son determinantes en diferentes combinaciones que codifican  $\beta$ -lactamasas.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que el proceso de curación solo fue parcialmente útil, ya que la pérdida de las bandas no es controlada absolutamente en cada experimento, perdiéndose varias bandas a la vez sin posibilidad de estudiarlas a cada una por separado. La exposición al EtBr ocasionó daños que generan la aparición de nuevos fenotipos que dificultan el análisis posterior. Por tal razón, el proceso de curación utilizado para estudiar los fenotipos de resistencia a antibióticos codificados en plásmidos en aislados de *S. aureus* no se recomienda, a menos que se sometan las cepas a otros análisis genéticos moleculares, como son la conjugación bacteriana (23) y la digestión de las bandas de ADN con enzi-

mas de restricción (4), entre otros. Igualmente se puede concluir que las multiresistentes a los antibióticos están presentes en nuestro entorno, así como las cepas SARM.

### Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por el financiamiento de esta investigación.

### Referencias Bibliográficas

1. SHAH A., MOND J., WALSH S. *Antimicrob. agents. and chemother.* 48: 2704-2707, 2004.
2. KOCH L. *Crit. Rev. Microbiol.* 26: 205-20, 2000.
3. APPELBAUM P., BOZDOGAN B. *Clin. Lab. Med.* 24: 381-402, 2004.
4. UDO A., AL-SWEIH N., MOKADDAS E., JOHNY M., DHAR R., GOMAA H., AL-OBALD I., ROTIMI V. *BMC infectious diseases* 6:168-175, 2006.
5. LESKI T., GNIADKOWSKI T., HRYNIEWICZ W. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 287: 363-373, 1998.
6. ARANAGA V. *Relación de la producción de beta-lactamasas y plásmidos presentes en cepas de Staphylococcus aureus aislados de portadores nasales sanos.* Trabajo especial de grado. Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, 97 pp., 2007.
7. NAVARRO C. *Comparación de protocolos para la curación de plásmidos de ocurrencia natural en Staphylococcus aureus.* Trabajo especial de grado. Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, 100 pp., 2007.
8. GONZÁLEZ J. *Perfiles plasmídicos de Staphylococcus aureus aislados de infecciones de heridas postoperatorias ginecológicas y patrones de susceptibilidad a antimicrobianos.* Trabajo especial de grado. Maestría en Microbiología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, 78 pp., 2007.
9. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: approved standard.* 5.ª ed. Wayne (PA), National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS document M7-A4, 2000.
10. GARCÍA RODRÍGUEZ J., CANTÓN R., GARCIA J., GOMEZ M., MARTINEZ L., RODRÍGUEZ C., VILA J. *Procedimientos en microbiología clínica.* Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: **métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, p. 15, 2001.**
11. MACRINA F., WOOD P., JONES K. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1070-1073, 1980.
12. ATENCIO L., ALVAREZ M., GUIÑEZ J., MONTIEL X., SALAS M. *Ciencia* 13: 5-13, 2005.
13. AUSUBEL F., BRENT R., KINGSTONE R., MOORE D., SELMAN J., SMITH J. y STRUHL K. *Short protocols in Molecular Biology.* A compendium of methods from currents in Molecular Biology. 3.ª ed. John Wiley Son, Inc., USA, pp. 250, 1997.
14. MUJICA I., DÍAZ L., GUIÑEZ J., RIVERA J., GIMÉNEZ C. Y ATENCIO L. *Ciencia* 15: 1-8, 2007.
15. ASHESHOV E. *Journal Genetic Microbiology* 42: 403-410, 1966.
16. ÁLVAREZ M., ATENCIO L., GUIÑEZ J., SUÁREZ J. *Boletín del Centro de INVESTIGACIONES Biológicas* 36: 79-93, 2002.
17. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.* Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. Vol. 27 (1). Replaces M100-S16. Vol. 26 (3). 2007.
18. WEIGEL L.M., CLEWELL D.B., GILL S.R., CLARK N.C., MCDUGAL L.K., FLANNAGAN S.E., KOLONAY J.F., SHETTY J., KILLGORE G.E., TENOVER F.C. *Science* 302: 1569-71, 2003.
19. HOEGER P.H. *Pediatr. Allergy Immunol.* 15 (5):474-477, 2004.
20. UDOU T. *Am. J. Infect. Control* 32: 215-219, 2004.



- 
21. MLYNARCZYK A., MLYNARCZYK G., JEL-  
JASZEWICZ J. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 51:  
1-8, 1999.
  22. SIDHU M., OPPEGAARD H., DEVOR T.P.,  
SORUM H. *Microb. Drug Resist. Winter* 13:  
271-80, 2007.
  23. UDO E.E., JACOB L.E. *Microb. Drug Resist.*  
**4**: 185-193, 1998.
  24. TENOVER F., MCDUGAL L., GOERING R.,  
KILLGORE G., PROJAN S., PATEL J., DUN-  
MAN P. *Journal of Clinical Microbiology* 44:  
108-118, 2006.
  25. WEIGEL L., DONLAN R., HYEON D., JENSEN  
B., CLARK N., MCDUGAL L., ZHU W.,  
MUSSER K., THOMPSON J., KOH-  
LERSCHMIDT D., DUMAS N., LIMBERGER  
R., PATEL J. *Antimicrobial agents and che-  
motherapy* 51: 231-238, 2007.
  26. AKTAS Z., ARIDOGAN A., KAYACAN C., AYDIN  
D. *J. Microbiol.* 45: 286-90, 2007.