

Actividad inhibitoria de la fase líquida del fango termal de Copahue (Neuquén, Argentina) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*

Celia María SCHELL⁽¹⁾, Mónica Delfina SPARO⁽¹⁾, María Marta De LUCA⁽¹⁾, Silvia GRENOVERO⁽²⁾, Daniel de MICHELE⁽²⁾, Marta GIACOMINO⁽²⁾, Ana MONASTERIO⁽³⁾, Andrés BELDERRAIN⁽²⁾, Juan Ángel BASUALDO⁽¹⁾

⁽¹⁾ Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118, 1900 La Plata (Argentina).

⁽²⁾ Departamento de Posgrado, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Entre Ríos, Pablo Lorenz s/n, 3260 - C. del Uruguay, Entre Ríos (Argentina).

⁽³⁾ Ente Provincial de Termas del Neuquén, Láinez y Alcorta 495, 8300 Ciudad de Neuquén, Neuquén (Argentina).

jabasua@atlas.med.unlp.edu.ar

Resumen

El Complejo Termal de Copahue se sitúa a unos 1980 m sobre el nivel del mar, a 18 Km del volcán Copahue, sobre la cordillera de los Andes, Neuquén, Argentina. En él se halla la laguna Madre cuya temperatura oscila entre 70° y 90° C. En el fondo de la laguna se encuentra el fango gris, compuesto principalmente por azufre, silicio, oxígeno y aluminio.

Empíricamente se conocen propiedades antiflogísticas y antibacterianas de los fangos minerales. Actualmente son utilizados en tratamientos de enfermedades de piel, reumáticas, infecciones de heridas quirúrgicas y también con fines estéticos.

Staphylococcus aureus es un microorganismo integrante de la microbiota humana y como colonizante de piel y mucosas está implicado en diferentes procesos infecciosos. Su presencia en la microbiota del hombre aumenta el riesgo de padecer infecciones invasivas. La resistencia a antimicrobianos constituye un problema emergente en el tratamiento de este tipo de infecciones.

El objetivo de éste trabajo fue analizar las propiedades antimicrobianas de la fase líquida (FL) del fango termal de Copahue, mediante ensayos *in vitro*, sobre cepas de *S. aureus* colonizantes de piel y mucosas, aisladas de pacientes provenientes de la comunidad y hospitales.

El fango se obtuvo a 70 cm de profundidad del borde perimetral de la laguna. Se realizaron pruebas de difusión en agar y velocidad bactericida. Con la prueba de difusión en agar se observó halo inhibitorio frente a seis cepas de *S. aureus* ensayadas. La estimación del efecto inhibitorio frente a todas las cepas evidenció una declinación rápida del recuento de colonias viables antes de las 4 h (en el orden de ≤ 3 log), visualizándose un recrecimiento microbiano a las 24 h. La técnica de *Killing Curve* permitió establecer el tiempo óptimo de contacto para lograr inhibición del crecimiento bacteriano entre los microorganismos y la FL del fango. Este trabajo demuestra la actividad inhibitoria de la FL del fango del volcán Copahue sobre cepas de *S. aureus* colonizantes aisladas de piel y mucosas.

Palabras claves: Actividad inhibitoria, Peloide o Fango, Copahue, *Staphylococcus aureus*

Inhibitory activity of the liquid fase of Copahue Thermal mud (Neuquén, Argentina) on strains of *Staphylococcus aureus*

Abstract

The Copahue Thermal Complex is located at 1,980 m above sea level, at 18 km from the Copahue Volcano, on the Andes mountain range, in Neuquén, Argentina, where Lake Madre, whose temperature ranges from 70°C to 90° C is found. Grey fango composed of sulfur, silicon, oxygen and aluminum is found at the bottom of this lake.

Empirically, mineral fango is known to have antiflogistic and antibacterial properties, which are currently used for treating skin conditions, rheumatic diseases and surgical wound infections and for cosmetic purposes.

Staphylococcus aureus is a microorganism which forms part of the human microbiota, and as a skin and mucous membranes colonizer, it is involved in several infectious processes. Its presence in the human microbiota increases the risk of invasive infections. Antimicrobial resistance is a consequence arising from the treatment of this type of infections.

The purpose of this work was to analyze the antimicrobial properties of the liquid phase of Copahue thermal fango by means of *in vitro* assays using skin and mucous membranes colonizer strains of *S. aureus*, isolated from community and hospital patients.

The fango was obtained from the perimeter edge of the lake at a depth of 70 cm. Agar diffusion and bactericidal effect tests were conducted. The agar diffusion test showed an inhibition zones for six assayed strains of *S. aureus*. The estimated inhibitory effect for all the strains showed a fast decline in the viable colony count before 4 hs. (≤ 3 log order), visualizing a microbial regrowth at 24 hs. The *Killing Curve* technique allowed to establish the optimum contact time to achieve bacterial growth inhibition among microorganisms and the fango liquid phase. This work shows the antimicrobial properties of the liquid phase of fango from the Copahue Volcano against colonizer strains of *S. aureus*.

Key words: Inhibitory activity, Peloid or Mud, Copahue, *Staphylococcus aureus*

REFERENCIA NORMALIZADA

Schell CM, Sparo MD, De Luca MM, Grenóvero S, De Michele D, Giacomino M, Monasterio A, Belderrain A, Basualdo JA. Actividad inhibitoria de la fase líquida del fango termal de Copahue (Neuquén, Argentina) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. (Inhibitory activity of the liquid fase of Copahue Thermal mud (Neuquén, Argentina) on strains of *Staphylococcus aureus*). Anal Hidrol Med, 2008-2010, vol. 3, 21-33

INTRODUCCIÓN

Los fangos o peloides son considerados sistemas dispersos heterogéneos, termodinámicamente inestables, en los que el medio de dispersión es agua mineral y la fase dispersa es una mezcla de sólidos orgánicos e inorgánicos, resultantes de acciones geológicas y/o biológicas¹.

Hace más de 25 siglos que se conocen empíricamente algunas propiedades antiflogísticas y antibacterianas de los fangos minerales². Actualmente son utilizados en tratamientos empíricos de enfermedades reumáticas degenerativas, reumatismo de partes blandas, afecciones de la piel, infecciones de heridas quirúrgicas de pared abdominal y también con fines estéticos³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

El Complejo Termal de Copahue se sitúa a 1580 Km. de Buenos Aires y a unos 1980 metros sobre el nivel del mar, a 18 Km. del volcán Copahue (“lugar del azufre”) sobre la cordillera de los Andes, en la provincia de Neuquén, Argentina. En este Complejo se halla una laguna llamada Madre ó Sulfurosa, no apta para baños, dado que su temperatura oscila entre 70° y 90° C. En el fondo de la laguna se encuentra el fango gris, compuesto principalmente por azufre, silicio, oxígeno y aluminio¹².

Staphylococcus aureus es un microorganismo integrante de la microbiota humana (¹³⁻¹⁴). Las personas sanas, niños y adultos pueden estar colonizadas en piel y fosas nasales, de manera persistente o transitoria con esta bacteria, y un 25 y 50 % también puede colonizar introito vaginal, axilas, perineo y buco-faringe¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸. Los sitios de colonización son reservorios de cepas que podrían estar implicadas en futuras infecciones, por lo tanto las personas colonizadas presentan mayor riesgo de sufrir infecciones que las no colonizadas¹⁸. La frecuencia de la colonización es mayor en individuos diabéticos insulino-dependientes, sujetos infectados por HIV, usuarios de drogas inyectables, pacientes sometidos a hemodiálisis e individuos con lesiones cutáneas¹⁹⁻²⁰.

S. aureus como colonizante de piel está implicado en diferentes procesos infecciosos como foliculitis, abscesos, síndrome de la piel escaldada, celulitis y otras. Las lesiones de impétigo son causadas principalmente por esta bacteria y pueden diseminarse por auto-inoculación²¹.

La presencia de este microorganismo en la microbiota habitual del ser humano aumenta el riesgo de padecer infecciones invasivas. La resistencia a los antibióticos en *S. aureus* constituye un problema emergente en el tratamiento de este tipo de infecciones. Es importante destacar que tanto la colonización ocurre con cepas de *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) como con *S. aureus* meticilino sensibles (SAMS). Alrededor del 1% de los portadores nasales tienen cepas de SAMR²².

La infección por SAMR de la comunidad (Ca-SAMR) es un problema particularmente grave en niños y adolescentes, registrándose en los últimos años un aumento en el número de casos. La introducción de la vacuna con polisacáridos de neumococo transformó a *S. aureus* en el patógeno aislado con mayor frecuencia en niños con neumonía extrahospitalaria complicada con empiema, siendo SAMR

responsable del 78% de estos casos. Es de destacar que Ca-SAMR ocasiona esencialmente infecciones en pacientes más jóvenes mientras que SAMR intra-hospitalario (IH-SAMR) afecta fundamentalmente a gerontes²³⁻²⁴.

El objetivo de esta investigación fue analizar *in vitro* la actividad inhibitoria de la fase líquida (FL) del fango termal de Copahue sobre cepas de *S. aureus* colonizantes de piel y mucosas, aisladas de pacientes provenientes de la comunidad y del medio hospitalario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra del fango gris

Las muestras de fango gris fueron tomadas durante el mes de marzo, en un total de 5 (aproximadamente 2 kg de fango total) y obtenidas de la Laguna Sulforosa o Laguna Madre, ubicada dentro del Complejo Termal. La toma de muestra de fango fue realizada por personal del Ente Provincial de las Termas desde la vereda perimetral, a 70 cm. de profundidad (borde de la laguna). La extracción se hizo utilizando grandes azadas que fueron sumergidas hasta el fondo para atrapar el fango. Luego fueron izadas hasta la superficie.

Las muestras se recogieron en recipientes de vidrio estériles de boca ancha, los cuales fueron colocados en sus respectivos contenedores, para optimizar su traslado al laboratorio, el cual se efectuó a temperatura ambiente.

Origen de las cepas

Las cepas de *S. aureus* utilizadas en este estudio fueron provistas por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Ramón Santamarina de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Las mismas fueron aisladas de pacientes de la comunidad y del ámbito hospitalario y se identificaron mediante pruebas fenotípicas convencionales para cocos gram positivos catalasa positiva y catalasa negativa²⁵. Las mismas se almacenaron a -70° C en caldo cerebro corazón (BHI, Laboratorio Britania, Argentina) con glicerol al 20%.

La nomenclatura utilizada para la individualización de cada cepa de *S. aureus* (SA) fue la sigla SM (indicando procedencia: Santamarina), seguido de un número arábigo identificatorio.

Las cepas utilizadas fueron: SA-SM2, recuperada de ampolla por quemadura de mano de un paciente internado por linfoma, SA-SM6, proveniente de piel intacta de la zona axilar de un paciente sometido a estudio de portación para la futura colocación de marcapasos, SA-SM4, aislada de aspirado traqueal de un paciente con asistencia respiratoria mecánica (recuento aprox. 1×10^3 UFC/ml), internado en sala de cuidados intensivos, debido a neumonía por *Streptococcus pneumoniae* adquirida en la comu-

nidad, SA-SM16 recuperada de piel de mano de un paciente ambulatorio con indicación de cirugía programada por síndrome del túnel carpiano, SA-SM21 y SA-SM28, aisladas de fosas nasales de pacientes ambulatorios con indicación de cirugía cardíaca programada.

Ninguna de las cepas involucradas en este estudio fue aislada de procesos infecciosos, todas correspondieron a colonizantes de piel y mucosas.

Detección de la actividad inhibitoria

Los ensayos de inhibición fueron realizados utilizando la FL del fango obtenida a partir de un volumen del mismo, por sedimentación a temperatura ambiente, durante 24 horas. La FL, previo a su uso, fue esterilizada a 121°C, por 5 minutos, a 1 atmósfera de presión y almacenadas a 4°C.

La prueba de sensibilidad *in vitro* fue realizada mediante la técnica de difusión estandarizada por el CLSI²⁶, utilizando 45 µl de FL. Las alícuotas fueron depositadas en discos de papel de filtro estériles (10 mm de diámetro) los cuales fueron colocados en placas de Petri. Las placas fueron previamente inoculadas con cada cepa bacteriana a estudiar en Agar Müeller-Hinton (AMH, Laboratorio Britania, Argentina) e incubadas a 35 °C por 24 hs. Los inóculos utilizados fueron de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, correspondiendo al 0,5 de la escala de Mc. Farland. La actividad inhibitoria fue medida como el diámetro de la zona clara de inhibición del crecimiento alrededor de los discos.

Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Estudio de curva de muerte (Killing curve)

Para estimar la velocidad bactericida se utilizó la técnica de curva de muerte microbiana sin agitación, por el método estandarizado de *Killing curve*²⁷⁻²⁸. Se agregaron 100 µl de cada microorganismo (inóculo aproximado de 1×10^5 UFC /ml) a volúmenes iguales de FL y de caldo Müeller-Hinton (MHB, Lab. Britania, Argentina) y se incubaron a 35 °C. Las alícuotas fueron tomadas a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas (100 µl), realizando diluciones seriadas al décimo en NaCl 0,85 g%. Los recuentos fueron realizados en superficie en placas conteniendo agar Trypticase Soya (ATS, Lab. Britania, Argentina). Las mismas se incubaron en atmósfera ordinaria para su posterior lectura. La totalidad de los experimentos se realizó por triplicado.

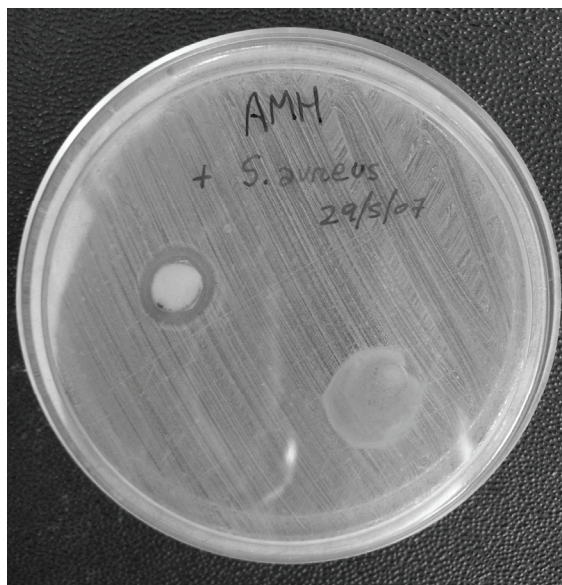
Análisis Estadístico

Para estimar la correlación de los resultados obtenidos en las curvas de muerte se utilizó el análisis de regresión lineal simple²⁹, utilizando el programa SPSS 11.5 para Windows.

RESULTADOS

Las placas conteniendo AMH inoculadas con *S. aureus* mostraron halos de inhibición alrededor de los discos impregnados con la FL del fango termal (Figura 1).

Figura 1 – Acción inhibitoria de discos impregnados con FL del fango termal de Copahue sobre *S. aureus*. Año 2007



El promedio del diámetro del halo de inhibición fue de $11,0 \pm 0,9$ mm.

El diámetro de los halos obtenidos de cada cepa estudiada se detalla en la tabla 1

No se observó inhibición de crecimiento bacteriano cuando se utilizaron discos impregnados con fango total y diluido.

La curva de muerte realizada con la FL del fango frente a las seis cepas ensayadas evidenció una declinación rápida del recuento de colonias viables antes de las 4 horas (en el orden ≤ 3 log), visualizándose un recrecimiento microbiano a las 24 horas. Los resultados obtenidos se detallan en el Grafico 1 y 2.

Para descartar la presencia de bacterias resistentes, las colonias recrecidas a las 24 h fueron repicadas y enfrentadas nuevamente a la FL, donde se observó idéntico comportamiento al descrito.

Tabla 1 – Sulfatos de los halos de inhibición (mm) obtenidos utilizando discos impregnados con FL de fango termal de Copahue

Cepas ensayadas	Diámetro del halo de inhibición (mm)
SA-SM2	10 ± 1
SA-SMMR4*	10 ± 1
SA-SM6	10 ± 1
SA-SM16	11 ± 1
SA-SM21	10 ± 1
SA-SM28	12

**S. aureus* Meticilino Resistente

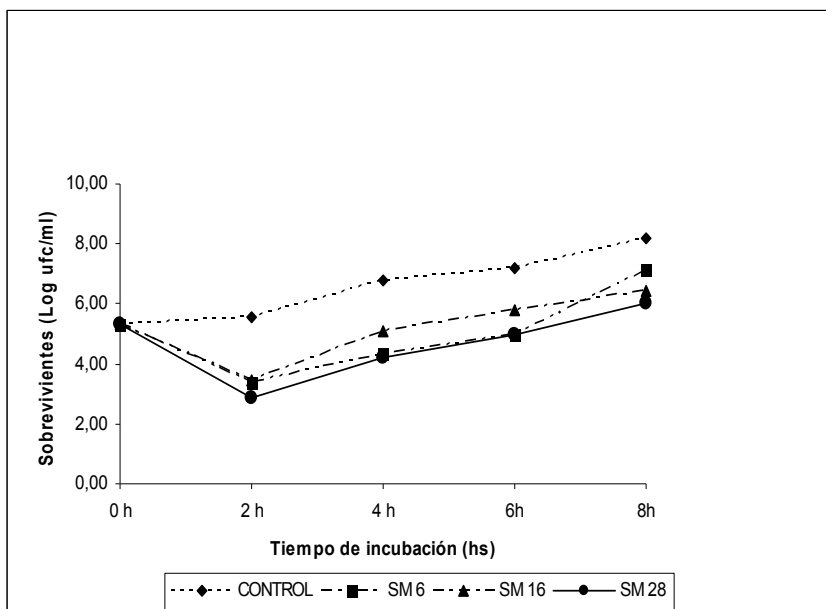
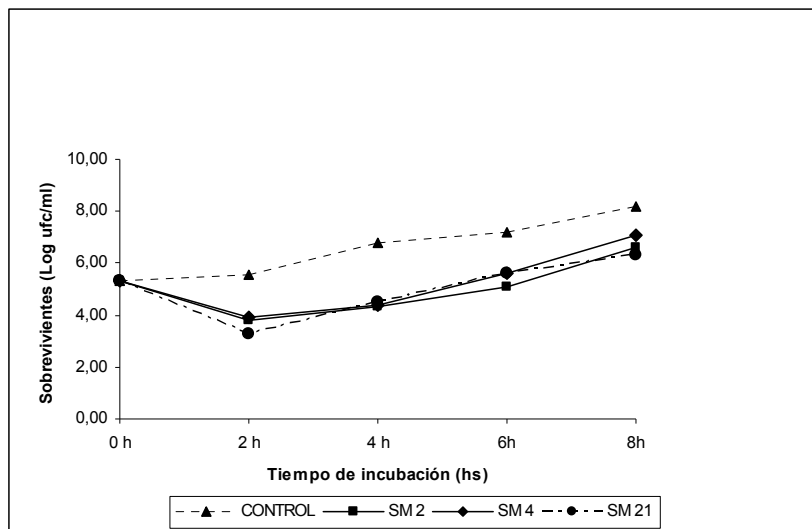
Gráfico 1 – Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue frente a cepas de *S. aureus* recuperadas de pacientes de la comunidad

Gráfico 2 – Velocidad bactericida de la FL del fango termal de Copahue frente a cepas de *S. aureus* recuperadas de pacientes hospitalizados



En la Tabla II se indica Δ Caída del \log_{10} UFC/ml desde el inóculo inicial para cada cepa ensayada.

El análisis de regresión lineal simple arrojó una correlación positiva ($R = 0,57$).

DISCUSIÓN

Por medio del ensayo cualitativo de difusión *in vitro* se demostró la actividad inhibitoria de la FL del fango de Copahue sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas.

A pesar de la escasa sensibilidad conocida, evento común, que presentan las técnicas de difusión en placa, esta prueba fue utilizada como *screening* dado que es de fácil reproducibilidad y económica. Estudios preliminares descartaron el uso de fango total debido a la escasa o nula difusión del mismo. Posibles factores como composición del medio de cultivo y cantidad del inóculo bacteriano podrían influenciar en la difusión del componente inhibitorio presente en el fango³⁰.

Los estudios de curva de muerte realizados frente a las distintas cepas de *S. aureus* ensayadas mostraron un importante efecto inhibitorio antes de las 4 horas y permitieron establecer el tiempo óptimo de contacto entre los microorganismos y la FL del fango para lograr inhibición del crecimiento bacteriano.

Tabla 2 – Δ Caída del \log_{10} UFC/ml desde el inóculo inicial para cada cepa ensayada según las horas de exposición a la FL del fango termal de Copahue, Neuquén, Argentina. 2007

Cepas	Δ Caída del \log_{10} UFC/ml desde el inóculo inicial (aprox. 1×10^5 UFC/ml)				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
<i>S. aureus</i> SM 2	5.30	1.52	1.00	0.22	+ 1,28
<i>S. aureus</i> *SMMR 4	5.30	1.40	0.89	+ 0.30	+ 1.78
<i>S. aureus</i> SM 6	5.30	1.90	0.96	0.30	+ 1.85
<i>S. aureus</i> SM 16	5.30	1.82	0.22	+ 0.48	+ 1.15
<i>S. aureus</i> SM 21	5.30	2.00	0.82	+ 0.30	+ 1.00
<i>S. aureus</i> SM 28	5.30	2.45	1.10	0.30	+ 0.70

**S. aureus* meticilino resistente

+: mayor exposición menor efecto

S. aureus es un patógeno piógeno que puede generar la formación de abscesos en los focos de infección tanto locales como metastásicos. Esta respuesta patológica clásica de *S. aureus* define el marco dentro del que evolucionará la infección¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷⁻³¹⁻³². Es conocido que *S. aureus*, además de la resistencia a la meticilina también puede presentar resistencia a glucopéptidos como vancomicina¹⁸. Diversos estudios refieren que la mupirocina es el antibiótico más eficaz para erradicar la colonización y eliminar el estado de portador nasal de *S. aureus*, y su uso sería la forma más efectiva para prevenir en algunos pacientes las infecciones sistémicas. Sin embargo, en hospitales y en comunidades, donde el uso de mupirocina es frecuente, ya se ha comunicado la emergencia de resistencia a esta droga³³⁻³⁴. Por este motivo es necesario investigar nuevos agentes antibacterianos para disminuir la colonización y así lograr un descenso en el riesgo de infección invasiva por *S. aureus*.

La acción de la FL del fango de Copahue sobre cepas de *S. aureus* resultaría un importante aporte dado que en las últimas décadas se han incrementado las infecciones de tejidos profundos y de piel asociadas a esta bacteria³⁵.

La presencia de diferentes minerales y oligoelementos en el fango termal de Copahue y la combinación entre ellos, aportan propiedades queratolítica, antimicrobiana y antiinflamatoria/inmunomoduladora³⁶. En la literatura internacional se destacan reportes de actividad antimicrobiana de los fangos volcánicos de Rusia³⁷ y los fangos salinos del Mar Muerto en Medio Oriente, ubicados en el valle de Jordania, compartido entre Israel y Jordania³⁸.

Las terapias naturales ofrecerían una alternativa para la descolonización y tratamiento de infecciones leves que pueden constituir en un futuro infecciones oportunistas sistémicas severas en el hombre. El aprovechamiento de la actividad inhibitoria de estos peloides o fangos podría ser una opción en la prevención de colonización por *S. aureus*, con multirresistencia antibiótica asociada, que provocan enfermedades invasivas.

CONCLUSIONES

La actividad inhibitoria del peloide extraído de Copahue constituiría una alternativa no agresiva, natural, no tóxica, de bajo costo y complementaria a los tratamientos dermatológicos convencionales, disminuyendo el consumo de determinados fármacos con posibles efectos secundarios.

Este trabajo demuestra la acción inhibitoria *in vitro* de la FL del fango del volcán Copahue sobre cepas de *S. aureus* colonizantes de piel y mucosas aisladas de pacientes provenientes de la comunidad y del medio hospitalario.

Agradecimientos

Al Ente Provincial de las Termas de Neuquén (EPROTEN), Argentina.

El presente trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional de Entre Ríos, PID N° 10045-2 UNER.

BIBLIOGRAFIA

1. Vicerias C, Cerezo P. Aplicación de peloides y fangos termales. In "Técnicas y Tecnologías en Hidrología Médica e Hidroterapia". Informe de Evaluación de Tecnologías Sanitarias N° 50. Madrid: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, 2006: 141-146.
2. Knusel O. Balneology; myth versus reality. Ther Umsch. 2001; 8:465-469.
3. Alvarez G. Contribución al estudio de las termas de Copahue (Neuquén) en sus aplicaciones dermatológicas. Bol Asoc Med Argent. 1938; 4:222.

4. Constant F, Collin J, Guillemin F, et al. Effectiveness of spa therapy in chronic low back pain: a randomized clinical trial. *J Rheumatol.* 1995; 22:1315-1320.
5. De Michele DF, Giacomino MI, Untura Filho M, et al. Efectos sistémicos de los fangos minerales. *Anales de Hidrología Médica.* 2006; I:135-142.
6. Martín Díaz L. Utilización de arcillas, peloides, parapeloides y algas en medicina estética. Online document at: www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion. Accessed Dic 13, 2007.
7. Rodríguez Ramírez R, Cabrera Salazar J, González Tuero J, et al. Peloidoterapia en las heridas quirúrgicas infectadas. *Medisan.* 2004; 8: 32-38.
8. Rodríguez Ramírez R, González Tuero J, Cabrera Salazar J, et al. Efectos del Peloide en la cicatrización de heridas abdominales quirúrgicas dehiscentes. *Medisan.* 2005; 9: 3.
9. Ubogui J, Ficoseco H. Ulceras por decúbito e hidroterapia en las Termas de Copahue. *Arch. Arg. Dermatol.* 1990; 40:393-399.
10. Ubogui J, Rodríguez Lupo L, Ficoseco H, et al. Terapéutica no convencional de la Psoriasis en las termas de Copahue (Neuquén, Argentina). Experiencia preliminar. *Arch. Arg. Dermatol.* 1991; 41:25-39.
11. Ubogui J. Balneology for Psoriasis in Argentina. Alternative or complementary dermatologic therapy at Copahue Thermal Basin Complex. Presented at the 35th Congress of the International Society of Medical Hydrology & Climatology Istanbul, June 6-7, 2006.
12. Armijo Castro F, Ubogui F, Corvillo Martín I, et al. Estudio de los peloides de las termas de Copahue (Neuquén-Argentina): Características y propiedades. *Bol. Soc. Española de Hidrología Med.* 2006; I: 9-13.
13. Sharp SE. Commensal and pathogenic microorganisms of humans In Murray P, Baron E, Pfaller M, et al. 7th ed *Manual of Clinical Microbiology.* Washington DC: American Society for Microbiology, 1999: 23-32.
14. Williams R. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.* 1963; 27:56-71.
15. Adcock P, Pastor P, Medley F, et al. T. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. *J. Infect. Dis.* 1998; 178:577-580.
16. Berkovitch M, Bulkowstein M, Zhovtis D, et al. Colonization rate of bacteria in the throat of healthy infants. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngology.* 2002; 63:19-24.
17. Boe J, Solberg C, Vogelsang T, et al. Perineal carriers of Staphylococci. *Brit. Med. J.* 1964; 5404:280-281.
18. Lowy F. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339:520-532.

19. Kenner J, O'Connor T, Piantanida N, et al. Rates of carriage of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an outpatient population. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 24 (6):439-44.
20. Miller M, Cespedes C, Vavagiakis R, et al. Incidence and persistence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in sample of HIV-infected and – uninfected drug users. *Clin. Infect. Dis*. 2007. 45 (3):343-6.
21. McCaig L, McDonald L, Mandal S, et al. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis*. 2006. 12 (11):1715-23.
22. González Alemán M, Juárez Gámez I, González Mesa L, et al. Frecuencia de colonización de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un grupo de niños en edad escolar. Online document at: www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/pediatria/stafilococo.pdf.
23. Chambers H. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerg. Infect. Dis*. 2001; 7:178-182.
24. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge J, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. Clin. Microbiol*. 2002.40 (11):4289-4294.
25. Ruoff KL. Algorithm for identification of aerobic Gram - Positive Cocci. In Murray P, Baron E, Pfaller M, et al. 7th ed Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1999: 262-263.
26. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, et al. Methods for disk diffusion antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. In Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Document M2-A9. Wayne, Pennsylvania, USA, 2006; 26 (1): 1-35.
27. García Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, et al. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana. In Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2000. Online document at: www.seimc.org. Accessed Aug 7, 2007.
28. Barry AL, Craig WA, Nadler H, et al. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. In Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Document M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999; 19 (18): 1- 29.
29. Dawson B, Trapp RG. Research questions about relationship among variables. In Basic & Clinical Biostatistics, McGraw-Hill Professional. 2004, 8: 190-220.
30. De Michele D, Sparo MD, Giacomino M, Schell CM, De Luca MM, Grenóvero S, Belderrain A, Basualdo JA. Acción inhibitoria de la fase líquida del fango del volcán Copahue, Neuquén, Argentina sobre la microbiota de piel, fosas nasales, intestinal y vaginal. *Anal Hidrol Med*, 2007: 2, 85-93.

31. Charlebois E, Bangsberg D, Moss N, et al. Population-based community prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. Clin. Infect. Dis. 2002; 34:425-433.
32. Eriksen N, Espersen F, Rosdahl V, et al. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. Epidemiol. Infect. 1995;115 (1):51-60.
33. Dupeyron C, Campillo B, Bordes M, et al. A clinical trial of mupirocin in the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a digestive disease unit. J Hosp Infect. 2002; 52(4):281-7.
34. Polgreen P, Herwaldt L. *Staphylococcus aureus* colonization and nosocomial infections: Implications for prevention. Currents Infectious Disease Report. 2004; 6:435-441.
35. Halcón L, Milkus K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. Am J Infect Control. 2004; 32(7):402-8.
36. Accorinti J, Wenzel M. Biological essays in Argentine thermal algal. Dominguezia. 1995; 12:7-15.
37. Abdrakhmanov AR, Brudastov IuA, Abdrakhmanov RA, et al. The effect of therapeutic mud on the viability and persistence properties of bacteria Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1997; 4:89-92.
38. Ma'or Z, Henis Y, Alon Y, et al. Antimicrobial properties of Dead Sea black mineral mud. Int J Derm. 2006; 45:504-511.