



Infectio

Asociación Colombiana de Infectología

www.elsevier.es/infectio



ORIGINAL

Microbiota bacteriana asociada al papel moneda de circulación en Colombia



Pilar Ximena Lizarazo-Medina^a, Felipe Cabarcas Jaramillo^{b,c} y Juan F. Alzate^{c,d,*}

^a Grupo de Ecología Microbiana y Bioprospección, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^b Grupo SISTEMIC, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^c Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG), Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^d Grupo de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Recibido el 13 de agosto de 2015; aceptado el 27 de octubre de 2015

Disponible en Internet el 4 de febrero de 2016

PALABRAS CLAVE

Pirosecuenciamiento
454;
Librería amplicones
16S;
Comunidad
bacteriana;
Billete en circulación;
Fómite;
Microbiota

KEYWORDS

454 pyrosequencing;
16S amplicon library;
Pyrotags;
Microbiota;
Banknote;
Fomite

Resumen Diariamente los seres humanos están en interacción con objetos de uso continuo, como el papel moneda, sin el conocimiento de que estos almacenan microorganismos y de que nos exponemos al contacto con potenciales patógenos. La composición de la comunidad bacteriana en un billete colombiano fue determinada mediante el secuenciamiento profundo de librerías de amplicones 16S. Se encontraron 233 géneros bacterianos; 12 de estos géneros corresponden a especies con potencial patogénico. El género más abundante fue *Propionibacterium*, seguido de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*.

Este es el primer reporte de la diversidad bacteriana que puede ser alojada en este objeto de alta circulación en Colombia. Pocos estudios en el mundo han mostrado este nivel de detalle de la microbiota en billetes de circulación y ofrece un panorama mucho más amplio de la exposición diaria a microorganismos al utilizar papel moneda en las condiciones en las que se utiliza en Colombia.

© 2016 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

bacterial microbiota on circulating Colombian banknotes

Abstract Commonly used objects such as currency paper can be colonised by bacteria and can serve as carriers of microbes. This colonisation might expose us to unnoticed pathogenic bacteria. In this study, the researchers obtained a detailed panorama of the microbes that can be carried on currency notes in Colombia by using 454 next-generation deep sequencing of 16S amplicon libraries. A total of 233 bacterial genera were detected and classified, 12 of which are potential human pathogens. The most abundant genera were *Propionibacterium*,

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jfernando.alzate@udea.edu.co (J.F. Alzate).

Streptococcus, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. To date, this is the first in-depth analysis of the microbiota carried by circulating banknotes in our continent and it offers insights into daily exposure to microbes when using banknotes in Colombia.

© 2016 ACIN. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Desde que Luis Pasteur en 1859 refutó la teoría de la generación espontánea, fue evidente que los microorganismos se encuentran, establecen y desarrollan en diferentes hábitats. Actualmente, es claro que la diversidad bacteriana es amplia y está determinada por su potencial genético, que permite una versatilidad metabólica de estos organismos, que a lo largo del tiempo, les ha permitido establecer una serie diversa de nichos. De esta diversidad microbiana se conoce muy poco debido a que aproximadamente el 1% ha sido cultivado en las condiciones de laboratorio dada la limitación en las metodologías de cultivo¹. Se estima que en un gramo de suelo es posible encontrar una abundancia de 10^6 - 10^9 células bacterianas en sitios prístinos, es decir entre 2.000 y 8.300.000 especies bacterianas^{2,3}.

Se estima que el número total de células de un ser humano está alrededor de un billón, mientras que 10 billones corresponden a las bacterias, que se desarrollan en el intestino o en la piel⁴. El proceso de adquisición de la microbiota oral, intestinal y cutánea se encuentra bien documentado y es la microbiota materna la que inicialmente coloniza los tejidos del recién nacido durante el nacimiento, la lactancia y la interacción diaria en los cuidados rutinarios del neonato⁵. Los niños cuyo nacimiento se produce atravesando el tracto vaginal adquieren poblaciones de *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, o *Sneathia spp.*, microbiota normal de la vagina de la madre, y cuando el nacimiento se realiza mediante cesárea los niños adquieren especies que se encuentran comúnmente en la piel de la madre, específicamente, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Staphylococcus spp.*⁶. Así mismo, posteriores modificaciones de esta se han asociado sobre todo a la dieta y a la exposición a microorganismos presentes en los alimentos⁷. En el caso de la piel, la microbiota se modifica según las condiciones abióticas de cada zona del cuerpo (axilas, conductos, pliegues) de acuerdo con variables como temperatura, concentración de sal, etc. Igualmente es influida por el contacto constante con diferentes objetos, animales u otros humanos⁴. Uno de los elementos que continuamente pasa de mano en mano es el papel moneda, el cual es inoculado con la microbiota de las manos de quienes lo manipulan. En Colombia el papel moneda está compuesto por algodón 100%, siendo así una matriz absorbente y favorable para la colonización y mantenimiento de microorganismos. Las condiciones ambientales propias del trópico donde se encuentra localizado el país, la sudoración del usuario y las variadas condiciones de almacenamiento también permiten que el billete sea hábitat de bacterias y hongos. Estudios

previos desarrollados en la ciudad de Medellín en billetes de diferente denominación, utilizando métodos de cultivo, detectaron 9 géneros bacterianos dentro de los que se cuentan: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pantoea*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*⁸. Un estudio desarrollado en Nigeria en 2011, mostró que el 50% de los billetes estudiados estaban colonizados con *E. coli*⁹. En un estudio similar realizado en México se reportó que el 69% de los billetes presentaron bacterias patógenas o potencialmente patógenas¹⁰.

El objetivo de este estudio fue conocer la estructura de la comunidad microbiana residente en un billete colombiano de baja denominación utilizando métodos independientes de cultivo mediante el secuenciamiento profundo y determinar la presencia de poblaciones potencialmente patógenas para los seres humanos.

Material y método

Papel moneda

Se seleccionaron 2 billetes deteriorados de 1.000 pesos colombianos (\$ 1.000) los cuales tenían como últimos números de su serie 908 (acuñado el 15 agosto de 2007) y 115 (acuñado el 28 agosto del 2008). La revisión del estado físico del billete mostró evidencias de decoloración y pérdida de la rigidez. Los billetes fueron obtenidos en 2 cafeterías universitarias de la ciudad de Medellín.

Extracción de ADN

El procedimiento para la extracción de ADN total se desarrolló empleando el kit de extracción para bacterias retenidas en papel de filtro de MoBio (PowerWater DNA Isolation Kit CAT# 14900). A partir de la parte central de cada billete se recortó un fragmento de 27 mm de diámetro aproximadamente y se siguieron las indicaciones del kit para la obtención del ADN.

Amplificación y purificación de las regiones variables V1-V3 y V6-V9 y pirosecuenciamiento

Para la amplificación por PCR se utilizaron oligonucleótidos descritos más abajo, con los adaptadores recomendados por Roche 454 para librería tipo «L» y códigos de barras de 10 bases (recomendados por Roche).

Iniciador (secuencia 5'- 3')

Oligo V1-V3, *forward*, adaptador A: CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG AGA CTC GAC GTA TTA CCG CGG CTG CTG G.

Oligo V1-V3, *reverse*, adaptador B: CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG.

Oligo V6-V9, *forward*, adaptador A: CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG AGT GTA GTA AAC TYA AAK GAA TTG ACG G.

Oligo V6-V9, *reverse*, adaptador A: CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG ACG GGC GGT GTG TRC.

La reacción se realizó durante 35 ciclos, así: 95 °C un minuto, 55 °C 30 s y 72 °C 45 s. La amplificación fue verificada por electroforesis en gel de agarosa y los amplicones fueron purificados con el kit Ampure XT (Bechman Coulter). Los productos purificados fueron cuantificados por fluorimetría con Picogreen y la pureza fue evaluada por electroforesis capilar en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent) con el kit High Sensitivity DNA.

Los amplicones purificados fueron titulados y posteriormente secuenciados en un GS FLX 454 (Roche) con la tecnología Titanium en un octavo de plato aproximadamente. Este procedimiento se realizó en el Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia).

Procesamiento de las lecturas (*reads*)

El tratamiento de las lecturas para eliminar el ruido introducido durante la reacción de PCR y durante la pirosecuenciación se realizó empleando el paquete Amplicon Noise versión 1.27. Para este proceso el software fue alimentado con los archivos con extensión .sff emitidos como resultado del software del 454. Posteriormente, se aplicó el software Amplicon Noise¹¹ que selecciona las lecturas que no presenten mutación en el código de barras o en el oligonucleótido usado para la amplificación. Finalmente, se eliminaron los *reads* con tamaños inferiores a 250 bases. Para los análisis de asignación taxonómica se emplearon las secuencias depuradas que estuvieron soportadas por un mínimo de 5 lecturas limpias.

Clasificación taxonómica de las secuencias

Para la asignación taxonómica de cada una de las secuencias depuradas se utilizó el programa Classifier de la plataforma Ribosomal Database Project (RDP), de la Universidad de Michigan (<http://rdp.cme.msu.edu>) con un valor mínimo de confianza de 0,8 y un *bootstrap* \geq 0,8. Las tablas de clasificación obtenidas fueron procesadas utilizando los programas de Python y Shell desarrollados en el CNSG para resumir y tabular los resultados en las categorías taxonómicas de *phylum*, clase, orden, familia y género.

Resultados

Procesamiento de las lecturas obtenidas

Se obtuvo un total 108.936 y 56.846 lecturas brutas del rDNA 16S para las 2 regiones estudiadas, V1-V3 y V6-V9, respectivamente. La corrección de errores introducidos por

la reacción de PCR o por el pirosecuenciamiento se llevó a cabo en el paquete Amplicon Noise v. 1.27. El resumen final de este procesamiento computacional reportó un total de 3.767 secuencias depuradas para la región V1-V3, que representaron un total de 40.340 lecturas limpias. Se detectaron 1.248 quimeras que fueron excluidas del grupo de datos. Para la región V6-V9 se obtuvo un total de 3.546 secuencias depuradas, que representan un total de 32.109 lecturas limpias y se removieron del conjunto de datos 1.414 quimeras. Para brindar mayor soporte a los datos en los pasos analíticos posteriores, se eliminaron las secuencias depuradas que estuvieran soportadas por menos de 5 lecturas limpias. Las secuencias que superaron ese filtro se emplearon para el análisis de clasificación taxonómica: 419 secuencias para la región V1-V3 y 477 para la región V6-V9.

Clasificación taxonómica

Para la clasificación taxonómica se utilizó el programa Classifier de la plataforma RDP. Los resultados obtenidos fueron formateados y tabulados según la frecuencia de cada grupo y el número de lecturas limpias asignadas en cada categoría taxonómica.

Con el amplicón de la región V1-V3 se clasificaron 36.130 lecturas limpias (89,6%) a nivel del dominio bacteria, de las que 36.107 (89,5%) fueron asignadas a un *phylum*. El umbral mínimo de valor de *bootstrap* fue de 0,8. La proporción de secuencias clasificadas se mantuvo en porcentajes similares hasta la categoría de familia y género, donde disminuyó al 83,7 y al 75,6%, respectivamente (fig. 1). Empleando los amplicones de la región V6-V9, se obtuvieron resultados considerablemente diferentes. De las 32.109 lecturas limpias, 22.268 fueron clasificadas a nivel de dominio (*bootstrap* \geq 0,8), es decir el 69,4%. Todas las lecturas correspondieron al dominio bacteria y fueron asignadas a nivel de *phylum*. A nivel de familia, las secuencias clasificadas se redujeron al 66,5 y 60% para género. Probablemente este fenómeno se

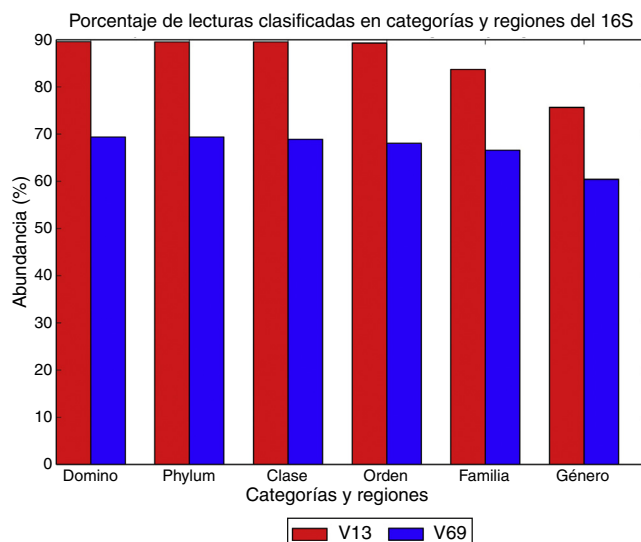


Figura 1 Porcentaje de lecturas clasificadas en categorías y por las regiones del 16S analizadas. La figura muestra el porcentaje de *reads*, respecto al total, asignados con una probabilidad mayor al 80% de cada una de las categorías para cada las regiones V13 y V69.

puede presentar debido a que con este amplicón se tuvieron una cantidad importante de lecturas limpias que fueron asignadas al dominio *Archea* (6.204 lecturas, 19,3%), pero ninguna de estas superó el umbral de corte de *bootstrap* en la asignación taxonómica (fig. 1).

A partir de la región V1-V3 a nivel de *phylum* se determinó que los más abundantes fueron *Actinobacteria* y *Firmicutes*, seguidos de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria/Cloroplasto* y *Bacteroidetes*. Los *phyla* detectados con menor representación fueron *Fusobacteria*, TM7, *Deinococcus-Thermus* y SR1. Con los *reads* de la región V6-V9, los 3 *phyla* más abundantes coincidieron con la región V1-V3, aunque en diferente orden de abundancia, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, los *phyla* menos abundantes fueron los mismos *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria/Cloroplasto* y *Chloroflexi* y también en menor proporción *Fusobacteria* y *Synergistetes* (fig. 2). Los oligonucleótidos utilizados para esta región (V6-V9) permitieron amplificar la región correspondiente del gen ribosomal 16S en *Archea* pero con valores inferiores de *bootstrap* (>0,8), por lo cual fueron eliminadas del estudio.

Para la categoría taxonómica clase se observó con ambos amplicones que el grupo dominante fue *Actinobacteria* con 16.170 y 6.317 lecturas limpias asignadas para las regiones V1-V3 y V6-V9, respectivamente. Todas las lecturas asignadas al *phylum Actinobacteria* correspondieron a la clase del mismo nombre. El *phylum Proteobacteria* estuvo representado por las clases *Alfaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*.

A partir del amplicón de la región V1-V3 se determinaron lecturas de la clase *Epsilonproteobacteria*. La clase *Bacilli*, dominante del *phylum Firmicutes*, representó la segunda abundancia para la región V1-V3 y la tercera para V6-V9. Otra clase que se determinó y que pertenece a este *phylum* correspondió a *Clostridia*, reportada dentro de las clases con menor abundancia (fig. 3).

Con ambas regiones estudiadas, las clases *Flavobacteria*, *Bacteroidia* y *Sphingobacteria* presentaron las mayores abundancias del *phylum Bacteroidetes* (fig. 3). Sin embargo, la mayoría de las lecturas asignadas a este *phylum* no fueron clasificadas con el punto de corte establecido (0,8), lo que no permite hacer un análisis detallado de este grupo.

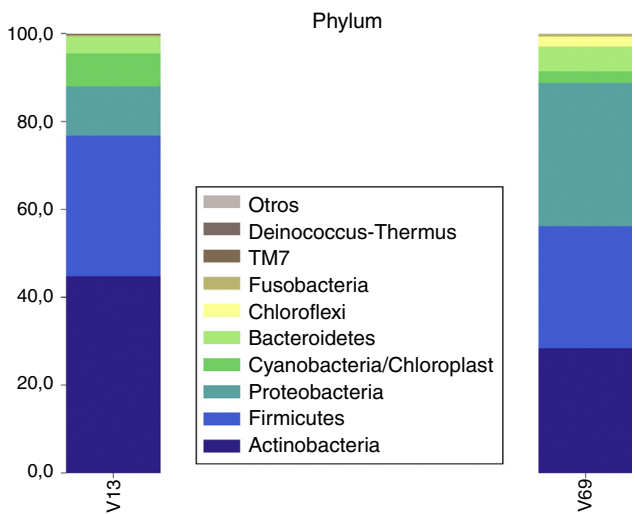


Figura 2 La figura muestra el porcentaje de *reads* de las regiones V13 y V69 asignados a las 9 *phyla* más frecuentes.

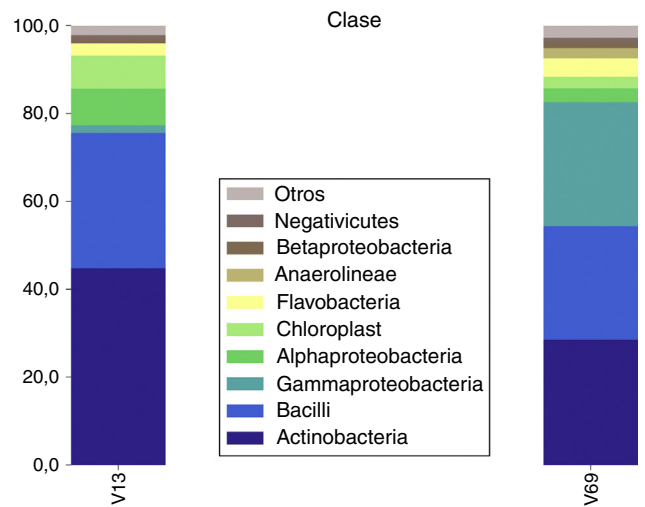


Figura 3 La figura muestra el porcentaje de *reads* de las regiones V13 y V69 asignados a las 9 clases más frecuentes.

Dentro del grupo clasificado por la RDP como *Cyanobacteria/Chloroplast*, se encontró que la mayoría de los *reads* se clasificaron como pertenecientes a cloroplasto en ambas regiones estudiadas. Solamente para el amplicón de la región V1-V3 se detectaron 9 lecturas asignadas al grupo de las *Cyanobacteria*.

La clase *Fusobacteria* es la única representante de su respectivo *phylum* y con una abundancia menor en ambas regiones. El amplicón de la región V6-V9 detectó bacterias de la clase *Anaerolineae*, las cuales constituían el 100% de las lecturas asignadas para su *phylum*. Siguiendo este mismo grupo en las categorías taxonómicas más bajas, se observó que todas estas se clasificaron en la familia *Anaerolineaceae* (figs. 3-5).

A nivel de clase, ambos amplicones coincidieron en mostrar a los grupos *Actinomycetales*, *Lactobacillales*, *Bacillales* y *Flavobacteriales* como los grupos más abundantes. Sin embargo, con el amplicón V6-V9, la clase *Pseudomonadales* se ubicó segunda en el ranking, en

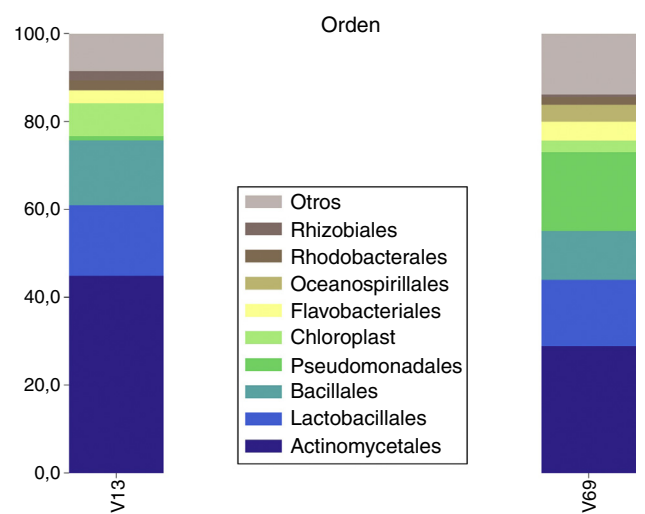


Figura 4 La figura muestra el porcentaje de *reads* de las regiones V13 y V69 asignados a las 9 órdenes más frecuentes.

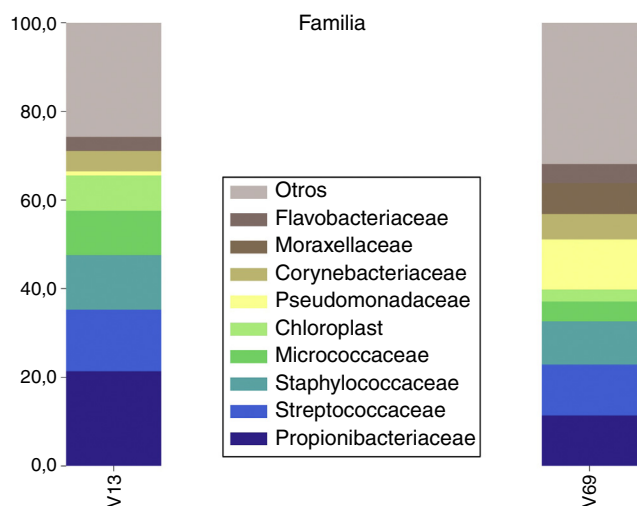


Figura 5 La figura muestra el porcentaje de *reads* de las regiones V13 y V69 asignados a las 9 familias más frecuentes.

discordancia con el amplicón V1-V3 que la ubicó en la décima posición (fig. 3).

Los órdenes más abundantes detectados por ambos amplicones fueron *Actinomycetales*, *Lactobacillales*, *Bacillales* y *Flavobacteriales*. Con la excepción de que el orden *Pseudomonadales* subió a la segunda posición del ranking en el amplicón V6-V9 (fig. 4).

Para la categoría familia igualmente se observó una buena concordancia, ya que de manera similar se detectaron con ambos amplicones que los grupos más abundantes fueron *Propionibacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae* y *Corynebacteriaceae* (fig. 5). Estas familias representaron, respectivamente, el 62 y el 43% de las lecturas limpias de la región V1-V3 y V6-V9. Nuevamente, el grupo *Pseudomonadaceae* no coincidió en el ranking de ambos amplicones, ya que para el V6-V9 es el 2.º en abundancia mientras que para el V1-V3 está en la posición 18. Igualmente ocurrió para la familia *Moraxellaceae*, la cual fue 5.ª en el amplicón V6-V9 y la 44.ª con la región V1-V3.

El análisis de los amplicones derivados en la región V1-V3 logró detectar 127 géneros, mientras que en la región V6-V9 logró detectar 109. De estos, se detectaron entre ambas un total de 233 en común. Con ambas regiones del rDNA 16S analizadas, se observó que el organismo más abundante es *Propionibacterium*, el cual acumula el 23% de las lecturas limpias de la región V1-V3 y el 12% de la región V6-V9. Asimismo, fueron comúnmente detectados con ambas regiones del rDNA 16S los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Micrococcus*. Estos acumularon el 36% de las lecturas V1-V3 y el 32% de las V6-V9. El género *Pseudomonas* fue detectado con ambos amplicones aunque, siguiendo en la misma línea de los resultados ya mostrados, la región V6-V9 tuvo un enriquecimiento preferencial para este grupo, que fue el 2.º en abundancia de lecturas, mientras que para la región V1-V3 fue el 17.º (fig. 6).

Géneros potencialmente patógenos

Empleando ambas regiones del rRNA 16S, fue posible detectar los mismos 10 géneros más abundantes que

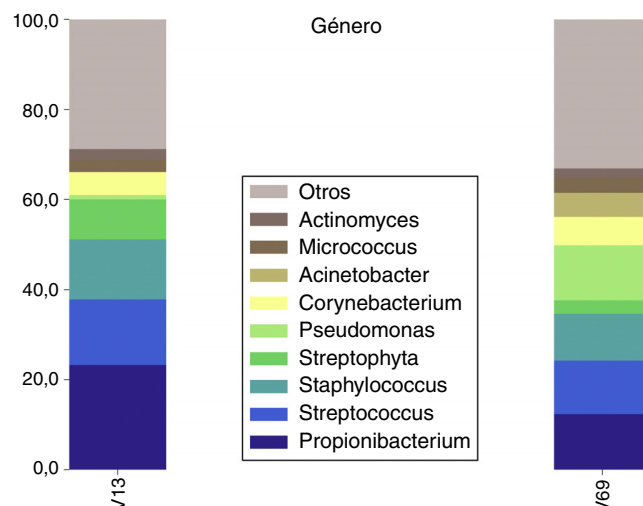


Figura 6 La figura muestra el porcentaje de *reads* de las regiones V13 y V69 asignados a las 9 géneros más frecuentes.

contienen especies patógenas: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus* y *Enterococcus*. Adicionalmente, los análisis con la región V6-V9 mostraron la presencia de bacterias de los géneros *Vibrio* y *Escherichia/Shigella*, aunque en muy baja representación, 20 y 6 lecturas, respectivamente. Los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* fueron los potencialmente patógenos más abundantes y, a su vez, unos de los grupos más abundantes en general de la microbiota presente en el billete. Estos 3 géneros acumularon el 28,9% de las lecturas del amplicón V1-V3 y el 34,5% de las de la región V6-V9.

Discusión

Las tecnologías de secuenciación de 2.ª generación (NGS, *next generation sequencing*) han revolucionado muchos aspectos de las investigaciones en ciencias biomédicas, al permitir ver con gran detalle las características genéticas de los seres vivos y las mezclas complejas de estos en los ambientes naturales o artificiales^{12,13}. Estudios basados en el análisis de librerías de amplicones, como el 16S, han extendido profundamente nuestra frontera de visión del mundo microbiano¹⁴. Aplicamos estas tecnologías a un billete en circulación en Colombia, uno de los artículos más usados en el día a día de los colombianos, y encontramos una gran riqueza de especies allí alojadas y no observadas hasta el día de hoy. Ningún estudio previo publicado en una revista científica había detectado la presencia del género *Propionibacterium* en billetes¹⁵, y con este estudio demostramos que es la bacteria más abundante en este objeto.

La clasificación usando los amplicones V1-V3 y V6-V9 mostró diferencias en los grupos detectados y en sus abundancias. Esta diferencia se debe, primero, al sesgo introducido por las regiones de hibridación de los cebadores. Esto explica los perfiles diferenciales de grupos amplificadas entre ambos amplicones, lo cual ya ha sido reportado en otros trabajos¹⁶. Segundo, la limitación que tiene la clasificación del programa del RDP en función de las diferentes

regiones variables del gen 16S estudiadas¹⁷. A pesar de esto, la mayoría de los grupos analizados en este trabajo se detectaron simultáneamente con ambas regiones estudiadas e incluso se observó coincidencia en las abundancias relativas de la mayoría de los grupos clasificados, lo que respalda adecuadamente los resultados, a pesar de las diferencias. La menor proporción de secuencias clasificadas con el amplicón V6-V9 se debe primordialmente al alto número de secuencias de *Archaea* detectadas con esta región, las cuales fueron descartadas de este trabajo, dado el bajo poder de clasificación observado por programa Classifier (*bootstrap* $\geq 0,8$).

Los billetes y monedas pueden ser colonizadas por microorganismos cuya fuente es dependiente del contacto continuo con las manos de diferentes individuos, las costumbres de almacenamiento y las condiciones higiénicas de los usuarios. Los estudios de este tipo de materiales se ha relacionado siempre con el potencial de transportar patógenos que pueden afectar la salud del usuario. Varios estudios de estos elementos se han realizado empleando metodologías dependientes de cultivo y reportan aislamientos frecuentes de bacterias grampositivas y bacilos gramnegativos dentro de las cuales fueron frecuentes *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*¹⁵.

Los resultados de esta investigación muestran por primera vez la gran diversidad de especies bacterianas presentes en el papel moneda y contribuyen exponencialmente a su conocimiento ya que, debido a la aplicación de tecnologías de secuenciamiento profundo, se incrementó en más de 200 el número de géneros detectados sobre las decenas que se han determinado empleando métodos dependientes de cultivo.

Los géneros bacterianos más abundantes encontrados en el billete de 1.000 pesos colombianos corresponden a los mismos ya reportados en las manos de humanos: *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*¹⁸. Lo que es esperado dado que el inóculo y sustrato de crecimiento (sudor) provienen en su mayoría de esta parte del cuerpo. Además los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* han sido caracterizados por presentar la capacidad de sobrevivir en superficies inertes durante meses¹⁹. Un estudio metagenómico similar en billetes de la India, pero aplicando una metodología de *whole genome shotgun*, reportó la presencia de ADN de bacterias patógenas de los géneros *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus*, coincidiendo con nuestros resultados. Sin embargo, en esta publicación se concentran solo en las especies patógenas y que degradan celulosa, y no mencionan tampoco las abundancias relativas de secuencias de cada especie encontrada²⁰.

Propionibacterium ha sido reportado como el género más abundante en la superficie de la mano¹⁸. Morfológicamente se caracterizan como bacilos grampositivos no formadores de endosporas, de los cuales se encuentran reportadas 14 especies en la base de datos del NCBI. Recientemente, Fitz-Gibbon et al. (2013)²¹ indicaron que la especie dominante de los folículos sebáceos de la piel es *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), que corresponde al 90% de la microbiota. El nombre se debe a la habilidad de este grupo en fermentar carbohidratos a ácido propiónico, sustancia química que presenta actividad antimicrobiana²¹. Este organismo es considerado comensal y un agente patogénico del desarrollo

del acné. Sin embargo, en este estudio se evidenció la presencia en la piel de cepas de la especie con características patogénicas y otras que se establecen pero no provocan la enfermedad. Recientemente los mismos autores reportaron que bacteriófagos de *P. acnes* también se encuentran en la piel y que estos, al infectar selectivamente las cepas, influyen la estructura de la población de *P. acnes* presentes en la piel²². Además de esto, *P. acnes*, mediante la producción de ácido propiónico, puede inhibir el crecimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina y puede influir la composición de la comunidad bacteriana en la piel y actuar como barrera protectora frente a estos patógenos²³. Otra especie que también ha sido reportada asociada a humanos, y específicamente a caries, es *P. acidifaciens*. Otras especies como *P. olivae* y *P. damnosum*, *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* y *P. thoenii* han sido aisladas de leche y productos lácteos, vegetales y ensilajes y, al tener contacto directo con las manos de humanos, podrían establecerse en los billetes. Sin embargo, estas especies no han sido reportadas como patógenas, sino que algunos de sus metabolitos confieren características organolépticas deseables a los productos o, en algunos casos, provocan su deterioro²⁴.

El género *Streptococcus* tiene reportadas actualmente 110 especies en la base de datos BACTERIO.NET (<http://www.bacterio.net/s/streptococcus.html>). De las cuales algunas pueden causar infecciones en humanos o animales, o ser beneficiosas y actualmente tiene usos industriales. El hallazgo en este estudio de este género coincide con otros trabajos donde se hallaron frecuentemente estos cocos grampositivos en billetes de varios países¹⁵.

Las especies de *Staphylococcus* comúnmente reportadas en piel son *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*. Estos 2 últimos también reportados como causantes de enfermedades nosocomiales²⁵. La especie *S. aureus* y otros estafilococos coagulasa positiva colonizan la piel y la membrana mucosa y pueden causar enfermedades en la piel o infecciones de tejidos blandos en animales y humanos. Dentro de los blancos de estudio actualmente más relevantes en salud pública se encuentran las cepas de esta especie que presentan resistencia a la meticilina (SAMR)²⁶. Debido a la capacidad de los billetes de Colombia de alojar *Staphylococcus*, es muy posible que pueda alojar cepas con resistencias a antibióticos, por lo tanto, es prioritario determinar en estudios posteriores la capacidad de los billetes en Colombia para alojar y transmitir estas especies patógenas.

Corynebacterium es un género perteneciente al *phylum Actinobacteria* con aproximadamente 112 especies según información del NCBI. Algunas especies, como *C. glutamicum*, son utilizadas en procesos industriales para la producción de aminoácidos o en la producción de proteínas recombinantes²⁷. Algunas especies son comensales y otras patógenas. En humanos han sido aisladas del tracto respiratorio, de la placa dental o de lesiones ulcerativas en la piel. *Corynebacterium diphtheriae* es el agente causal de la difteria debido a la producción de una toxina. Como comensales se reportó que la presencia de *Corynebacterium spp.* en el tracto respiratorio superior de niños reduce en un 49% la probabilidad de que presenten otitis media²⁸. De tal manera que es necesario alertar a las poblaciones expuestas de los riesgos de no lavarse las manos al manipular estos objetos, ya que es posible que se favorezca la aparición de enfermedades por malos hábitos higiénicos.

Los géneros potencialmente patógenos de mayor relevancia detectados en los billetes pueden ser *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, ya que estos no solo presentan potencial virulento, sino que pueden presentar resistencia a muchos de los antibióticos de uso rutinario en humanos. Además, estos 3 grupos representaron, en promedio, una tercera parte de las lecturas procesadas de ambos amplicones, indicando una preponderante abundancia en el billete. Sin embargo, estudios posteriores con mayor cantidad de muestras y mayor resolución taxonómica son necesarios para determinar las especies alojadas en los billetes, así como la posible carga de genes de resistencia a antibióticos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Esta investigación fue financiada por el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) (Estrategia de Sostenibilidad 2014-2015), Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia y Colciencias.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Ritz K. The plate debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60. 2007;35:8–62.
- Nielsen UN, Ayres E, Wall DH, Bardgett RD. Soil biodiversity and carbon cycling: A review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *Eur. J. Soil Sci.* 62. 2011;10:5–116.
- Pham VHT, Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol.* 2012;30:475–84.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:244–53.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007;5:e177.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:11971–5.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:14691–6.
- Betancur CA, Estrada S, Ceballos MT, Sánchez E, Abad AM, Vane-gas C, et al. Paper currency as fomite for bacteria with human pathogenic potential. *Infectio* 14, 120–126.
- Ngwai YB, Ezenwa FC, Ngadda N. Contamination of Nigerian currency notes by *Escherichia coli* in Nasarawa State University, Keffi, Nigeria | Yakubu Ngwai - Academia.edu. *Asian J Pharm Heal Sci.* 2011;1:163–6.
- Rocha-Gómez J, Tejeda-Villarreal PN, Macías-Cárdenas P, Canizales-Oviedo J, Garza-González E, Ramírez-Villarreal EG. Microbial contamination in 20-peso banknotes in Monterrey, Mexico. *J Environ Health.* 2012;75:20–3.
- Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:38.
- Daniel R. The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:470–8.
- Gilbert JA, Dupont CL. Microbial metagenomics: Beyond the genome. *Ann Rev Mar Sci.* 2011;3:347–71.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:12115–20.
- Alemu A. Microbial contamination of currency notes and coins in circulation: A potential public health hazard. *Biomed Biotechnol.* 2014;2:46–53.
- Kumar PS, Brooker MR, Dowd SE, Camerlengo T. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS One.* 2011;6:e20956.
- Vilo C, Dong Q. Evaluation of the RDP classifier accuracy using 16S rRNA gene variable regions. *Metagenomics.* 2012;1:1–5.
- Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:17994–9.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006;6:130.
- Jalali S, Kohli S, Latka C, Bhatia S, Vellarikal SK, Sivasubbu S, et al. Screening currency notes for microbial pathogens and antibiotic resistance genes using a shotgun metagenomic approach. *PLoS One.* 2015;10:e0128711.
- Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH, Nguyen L, Du C, Liu M, et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J Invest Dermatol.* 2013;133:2152–60.
- Liu J, Yan R, Zhong Q, Ngo S, Bangayan NJ, Nguyen L, et al. The diversity and host interactions of Propionibacterium acnes bacteriophages on human skin. *ISME J.* 2015, <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.47>
- Wang Y, Dai A, Huang S, Kuo S, Shu M, Tapia CP, et al. Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Benef Microbes.* 2014;5:161–8.
- Meile L, Le Blay G, Thierry A. Safety assessment of dairy microorganisms: Propionibacterium and Bifidobacterium. *Int J Food Microbiol.* 2008;126:316–20.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:870–926.
- Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:273–82.
- Käb F, Junne S, Neubauer P, Wiechert W, Oldiges M. Process inhomogeneity leads to rapid side product turnover in cultivation of *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 2014;13:6.
- Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *MBio.* 2011;2, e00245-10.