



INFORME BREVE

Análisis MLVA y perfil de virulencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina adquiridos en la comunidad causantes de infecciones pediátricas en Paraguay

Fátima Rodríguez Acosta^a, Wilma D. Basualdo Acuña^b, Héctor Castro^b, Ana Campuzano^c, María L. Macchi^c, Juana Ortellado de Canese^c, Patricia Almada^c, Mónica Rodríguez^d, Lorena Grau^d, Gladys Velázquez^d, Carmen Espínola^d, Gloria C. Samudio Domínguez^e, Gloria Gómez^e, Letizia Carpinelli^a y Rosa M. Guillén Fretes^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Departamento de Análisis Clínicos y Microbiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA, 2160 San Lorenzo, Paraguay

^b Departamento Epidemiología y Enfermedades Infecciosas, Laboratorio de Microbiología, Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, 2179 San Lorenzo, Paraguay

^c Cátedra de Pediatría y Laboratorio de Microbiología, Hospital de Clínicas, FCM, UNA, 2160 San Lorenzo, Paraguay

^d Servicio de Pediatría y Laboratorio de Microbiología, Hospital Central, Departamento de Epidemiología y SIS, Instituto de Previsión Social, 1749 Asunción, Paraguay

^e Servicio de Pediatría, Servicio de Microbiología, Hospital Nacional de Itauguá, 2740 Itauguá, Paraguay

Recibido el 2 de agosto de 2016; aceptado el 16 de marzo de 2017

Disponible en Internet el 18 de octubre de 2017

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus aureus resistente a meticilina;
Niños;
Factores de virulencia;
Tipificación molecular

Resumen *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC) es uno de los principales patógenos causantes de infecciones de piel y partes blandas, aunque también se lo implica en infecciones graves, como osteomielitis y neumonía. El objetivo de este estudio descriptivo fue determinar el tipo de *cassette SCCmec*, el perfil de virulencia y la variabilidad genética de 21 aislamientos de SARM-AC que infectaron a niños paraguayos en el año 2010. Se determinó por PCR el tipo de *cassette SCCmec* y los factores de virulencia, en tanto que la variabilidad genética se determinó por la técnica *multiple locus variable analysis* (MLVA). Todos los aislamientos (100%) presentaron *cassette SCCmec IV*; algunos portaron factores de virulencia como *hla*, *hly* y *sea* (el 28,6, el 9,5 y el 4,8%, respectivamente). El análisis MLVA

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rmguillen@gmail.com (R.M. Guillén Fretes).

KEYWORDS

Methicillin-resistant
Staphylococcus aureus;
Children;
Virulence factors;
Molecular typing

mostró gran variabilidad genética, con datos de antibiograma y perfil de virulencia congruentes. Este trabajo pone de manifiesto por primera vez en Paraguay la presencia de SARM-AC portador del *cassette SCCmec IV* con elevada diversidad genética.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. 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/>).

MLVA analysis and virulence profile of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing infections in Paraguayan children

Abstract Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) is one of the first causes of skin and soft tissue infections, and can also produce severe diseases such as osteomyelitis and pneumonia. The aim of this descriptive study was to determine the *SCCmec* type and virulence profile and to study the genetic diversity by MLVA analysis of 21 CA-MRSA isolates that infected Paraguayan children in 2010. The *SCCmec* type and virulence factors were performed by PCR and genetic diversity by MLVA (multiple locus variable analysis). All the isolates carried *SCCmec* cassette IV. *hla*, *hly* and *sea* genes were detected in 28,6%, 9,5% and 4,8% respectively. The MLVA analysis showed high genetic diversity with congruent antibiotic resistance and virulence profiles. This study revealed the presence of CA-MRSA harbouring *SCCmec* IV with high genetic diversity, providing information not available in our country.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. 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/>).

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC) es uno de los principales patógenos causantes de infecciones de piel y partes blandas, aunque también puede producir infecciones graves, como bacteriemia, osteomielitis y neumonía necrosante³. Los aislamientos resistentes a la meticilina se caracterizan por portar los genes *mecA*, *mecB* o *mecC*, que son transportados por un elemento genético móvil denominado *staphylococcal cassette chromosome element* (SCC). Algunos tipos de *SCCmec* son más frecuentes en aislamientos de origen comunitario, lo que los convierte en una importante herramienta para el estudio de la epidemiología de los aislamientos⁴.

La capacidad de *S. aureus* de portar genes de resistencia a antibióticos y una amplia gama de factores de virulencia, así como su gran variabilidad genética, le confieren una epidemiología compleja, por lo que es necesario contar con metodologías que permitan la monitorización y la vigilancia de estos aislamientos en tiempo real.

La técnica conocida como *multiple locus variable analysis* (MLVA) es una metodología que permite discriminar entre diferentes aislamientos clínicos de *S. aureus* empleando una reacción de PCR múltiple, que amplifica 7 regiones intragénicas con número variable de repeticiones en tándem. Este método, de bajo costo, rápida ejecución y fácil interpretación, ha sido validado a nivel internacional y tiene un poder discriminatorio comparable con la *pulse field gel electrophoresis* (PFGE), considerada como el *gold standard* para la tipificación molecular de *S. aureus*^{11,13}.

En Paraguay, los datos publicados sobre *S. aureus* se limitan a un reporte de circulación del clon cordobés/chileno y del clon brasileño en aislamientos que provenían de adultos⁶, y al estudio de un brote epidémico asociado al

consumo de leche contaminada con *S. aureus* portador de enterotoxinas¹⁵.

En referencia a la población pediátrica, un estudio de 113 aislamientos de *S. aureus* asociado a la comunidad mostró un 18% de resistencia a la meticilina y generó los primeros datos de perfil de virulencia, entre los que se destacó la portación de la leucocidina de Panton-Valentine (PVL) como principal factor de virulencia en el 58% del total de las muestras analizadas¹².

El objetivo de este trabajo consistió en determinar el tipo de *cassette SCCmec* y el perfil de virulencia de 21 aislamientos de SARM-AC que infectaron a niños paraguayos menores de 15 años y en estudiar por MLVA su variabilidad genética.

Los aislamientos fueron colectados de 4 hospitales de referencia, que dan cobertura de servicios de salud a más del 50% de la población de Asunción y del Departamento Central durante el año 2010. Estos aislamientos se encontraban preservados en el biobanco del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) como resultado de proyectos iniciales limitados a caracterizaciones clínicas y microbiológicas. El protocolo de estudio contó con la aprobación del Comité Científico y el Comité de Ética del IICS, UNA (P44/2012).

Se definió como infección por SARM-AC cualquier infección por SARM diagnosticada a un paciente ambulatorio o a uno internado si el diagnóstico fue dentro de las 48 h de hospitalización, teniendo en cuenta que el paciente no presentara otra enfermedad de base o crónica que hubiera requerido su exposición previa al ambiente hospitalario⁷. Se excluyeron los aislamientos provenientes de puntas de catéter y secreción traqueal, para evitar fenómenos de portación.

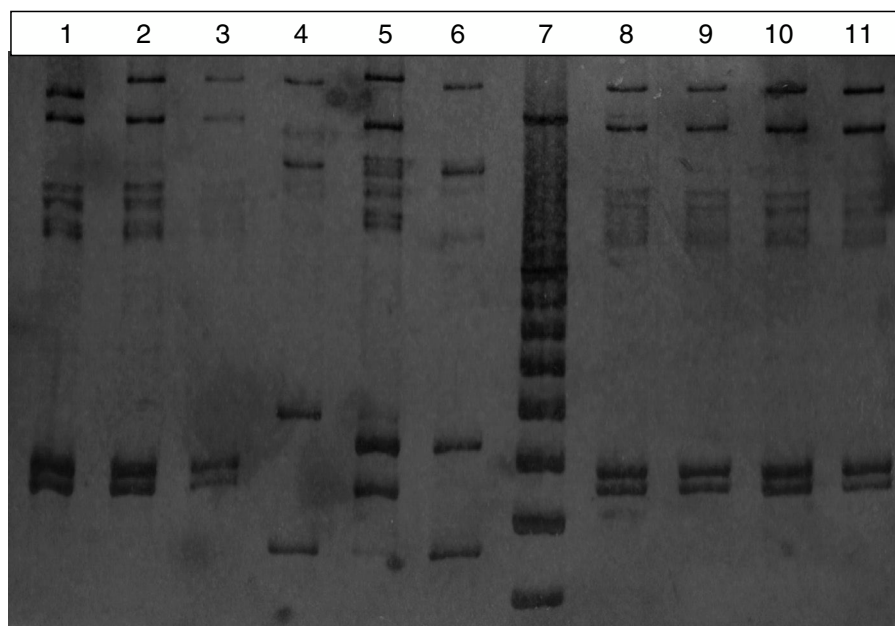


Figura 1 Perfil MLVA de aislamientos SARM-AC estudiados (n=21). Electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata de algunos (n=10) de los productos obtenidos por la técnica MLVA. Carril: 1) SGP14; 2) SGP17; 3) SGP11, el cual no pudo ser tipificado (se observa amplificación parcial de los locus estudiados); 4) SGP21; 5) SGP22; 6) SGP29; 7) marcador de PM de 50 pb Fermentas (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas [ThermoFisher], Waltham, Massachusetts, EE. UU.); 8) SGP32; 9) SGP34; 10) SGP57 y 11) SGP58.

Se contaba con datos clínicos y demográficos de los niños infectados. La sensibilidad a antibióticos se evaluó por el método de Kirby Bauer, según el criterio del CLSI². Los aislamientos criopreservados fueron cultivados en agar sangre de carnero al 5% e incubados a 35 °C durante 24-48 h en atmósfera del 5% de CO₂. La extracción de ADN se realizó empleando el kit Wizard Genomics (Wizard Genomic DNA, Purification Kit, Promega, Madison, EE. UU.) y se cuantificó con espectrofotómetro Biowave DNA (Biochrom WPA Biowave DNA, Life Science Spectrophotometer, Biochrom, Cambridge, Reino Unido).

La PCR para la detección de *mecA* y *lukS/F-PV* se realizó según Carpinelli et al.¹. Los genes codificantes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh*) y el control interno 16S ARNr de hemolisinas (*hla* y *hnb*) y toxinas exfoliativas (*eta* y *etb*) se amplificaron según lo describen Rodríguez et al.¹². La identificación del tipo de *cassette SCCmec* se realizó con las condiciones de Kondo et al.⁴.

El análisis MLVA se realizó con las condiciones descritas por Sabat et al.¹³, con algunas modificaciones¹¹. El tamaño de los productos se obtuvo por digitalización con el *software* UN SCAN IT GEL 6.1; estos datos se emplearon para realizar un dendrograma mediante el uso del *software* Treeview versión x 0.5.1.

Del total de muestras del biobanco (n=113), 21 aislamientos SARM-AC cumplieron los criterios de inclusión antes descritos. Esos aislamientos infectaron a 8 niñas y 13 niños, cuyas edades se encontraban comprendidas entre 1 mes y 15 años (mediana: 4 años; rango intercuartílico: 1 a 11 años).

La distribución de los aislamientos correspondió al Hospital General Pediátrico (HGP) (n=10), el Hospital de Clínicas (n=6), el Instituto de Previsión Social (IPS) (n=3) y el Hospital Nacional de Itauguá (n=2). La mayor frecuen-

cia de aislamiento se vio en el verano (57,1%). El 86% (n=18) de los aislamientos causó infecciones de piel y partes blandas, mientras que el 14% (n=3) restante causó cuadros invasivos. El 100% de los aislamientos fue sensible a vancomicina, tetraciclina, rifampicina, ciprofloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol, teicoplanina y novobiocina. Los niveles de resistencia a cloranfenicol, eritromicina, gentamicina y clindamicina fueron, respectivamente, del 3,3, el 19,0, el 14,3 y el 9,5%.

El gen *mecA* dentro del *cassette SCCmec* de tipo IV fue detectado en el 100% de los aislamientos y el gen codificante de la PVL en el 33,3%.

El análisis MLVA de 20 aislamientos mostró 15 perfiles distintos (fig. 1). Un aislamiento no pudo ser tipificado debido a la falta de amplificación en un locus. En el perfil 2 se observaron 4 aislamientos con el mismo patrón de bandas, los aislamientos presentes en este grupo fueron obtenidos en el HGP en los meses de febrero, julio y octubre del 2010; estos no portaban factores de virulencia y eran resistentes a la meticilina.

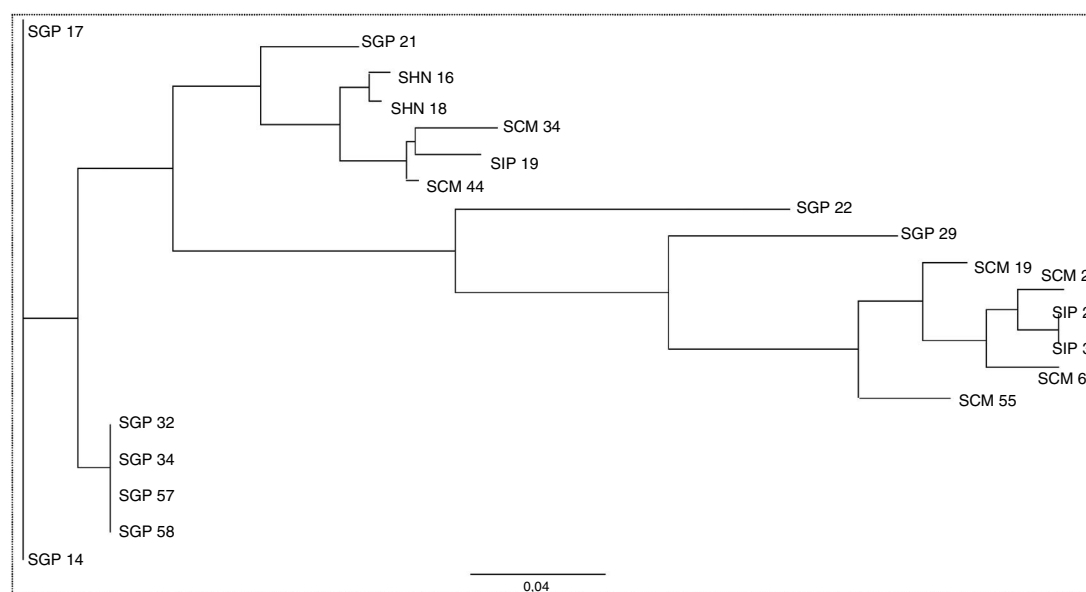
Los perfiles 1 y 15 agruparon 2 aislamientos cada uno. Los aislamientos componentes del perfil 1 provenían del HGP y se obtuvieron entre enero y octubre del 2010; eran resistentes a meticilina, uno de ellos presentaba PVL y ambos originaron infecciones de piel y partes blandas. Los del perfil 15 fueron aislados en el IPS en enero y marzo, y se caracterizaron por ser resistentes a la meticilina, y el cloranfenicol; a su vez, presentaron PVL y hemolisina A y B. Los perfiles restantes incluían un único aislamiento cada uno; las características de los mismos se describen en la tabla 1.

En la figura 2 se muestra el dendrograma obtenido; se observan las 3 agrupaciones descritas (perfiles 1, 2 y 15),

Tabla 1 Características de los aislamientos SARM-AC en estudio (n=21)

Aislamiento	Tipo de muestra	Cuadro clínico	ATB	Factor de virulencia	Perfil MLVA
SHN 16	S. purulenta	IPPB	ERI, MET, CLO, PEN	<i>hIA</i>	5
SHN 18	Sangre	Invasiva	GEN, MET, PEN	<i>hIA</i>	4
SIP 19	S. purulenta	IPPB	ERI, CLI, MET, CLO, PEN	<i>lukF/S-PV</i>	7
SIP 29	S. purulenta	IPPB	MET, CLO, PEN	<i>lukF/S-PV, hIA, hIB</i>	15
SIP 30	S. purulenta	IPPB	MET, CLO, PEN	<i>lukF/S-PV, hIA, hIB</i>	15
SCM 19	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	12
SCM 21	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	14
SCM 34	S. purulenta	IPPB	MET, CLO, PEN	<i>lukF/S-PV, hIA, sea</i>	8
SCM 44	S. purulenta	IPPB	GEN, MET, CLO, PEN	<i>hIA</i>	6
SCM 55	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	11
SCM 61	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	14
SGP 11	Sangre	Invasiva	FOX, ERI, MET, PEN	—	13
SGP 14	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	1
SGP 17	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	<i>lukF/S-PV</i>	1
SGP 21	S. purulenta	IPPB	GEN, MET, PEN	—	3
SGP 22	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	<i>lukF/S-PV</i>	9
SGP 29	Sangre	Invasiva	ERI, CLI, MET, CLO, PEN	<i>lukF/S-PV</i>	10
SGP 32	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	2
SGP 34	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	2
SGP 57	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	2
SGP 58	S. purulenta	IPPB	MET, PEN	—	2

S. purulenta: secreción purulenta; IPPB: infección de piel y partes blandas; ATB: antibiograma; FOX: cefoxitina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; CLI: clindamicina; MET: meticilina; CLO: cloranfenicol; PEN: penicilina; hIA: hemolisina alfa; hIB: hemolisina beta; lukF/S-PV: leucocidina de Pantón-Valentine; sea: enterotoxina A.

**Figura 2** Dendrograma de aislamientos SARM-AC estudiados (n=21).

Dendrograma obtenido utilizando software Treeview versión x 0.5.1. Aislamientos con mismos perfiles MLVA: 1) SGP 14 y SGP 17; 2) SGP 32, SGP 34, SGP 57 y SGP 58; 15) SIP 29 y SIP 30. Se observa el dendrograma con el total de aislamientos tipificables por MLVA (95%, n=20).

que engloban 2 (SGP 14 y GP 17), 4 (SGP 32, SGP 34, SGP 57 y SGP 58) y 2 (SIP 29 y SIP 30) aislamientos, respectivamente.

Este es el primer reporte de SARM-AC con *cassette SCCmec* de tipo iv en Paraguay. Los datos publicados hasta el momento hacían referencia al clon cordobés/chileno (*cassette SCCmec* tipo i) y al clon brasileño (*cassette SCCmec*

tipo iii)⁶. Si bien no contamos con datos de spa-tipo y secuenciación MLST para poder definir a qué clones pertenecen estos aislamientos (lo que constituye una limitante de este trabajo), los aislamientos estudiados muestran diferencias genotípicas con respecto a los anteriormente descritos en Paraguay, por la portación del *cassette SCCmec* tipo iv. Países

como Argentina y Uruguay ya han reportado la circulación de los clones SARM-AC emergentes ST30/t019 y ST5/t311, portadores del *cassette SCCmec* tipo IV^{3,10,14}.

La tasa de resistencia a los antimicrobianos de los aislamientos SARM-AC estudiados en este trabajo fue en general baja y similar a la informada en otros estudios realizados en la región^{8,9}.

La frecuencia de portación de genes codificantes de factores de virulencia, como la PVL y las hemolisinas, fue comparable con la de otros estudios similares. Varios autores señalan la importancia de identificar aislamientos portadores de estos genes, por la capacidad que tienen de generar cuadros graves^{5,15}. Los datos obtenidos amplían la escasa información sobre los factores de virulencia que caracterizan a los SARM-AC que circulan en Paraguay.

Los resultados de la MLVA mostraron una variabilidad genética alta, con 15 perfiles diferentes, de los cuales solo 3 contenían 2 o más aislamientos. La concordancia del antibiograma y del perfil de virulencia de los aislamientos agrupados fue buena.

Varios trabajos señalan como ventajas del MLVA su capacidad para manejar un alto flujo de muestras y la similitud de las agrupaciones que se obtienen con respecto a las generadas por el MLST, lo que, sumado a la fácil interpretación de los resultados, la convierten en una técnica de alto valor en estudios epidemiológicos^{11,13}. Es importante señalar que en Paraguay, el acceso a métodos de análisis como PGFE es muy restringido, con lo cual el uso del MLVA puede ser una alternativa para estimar la diversidad genética de los aislamientos SARM-AC.

Este trabajo pone de manifiesto la presencia de SARM-AC portadores de *cassette SCCmec* de tipo IV, con perfiles de virulencia variables y una elevada diversidad genética, como agentes causales de infecciones en niños que viven en Asunción y en el Departamento Central del Paraguay. De esta manera, provee información no disponible hasta el momento en esta región. La identificación de los clones a los que pertenecen estos aislamientos es nuestra prioridad. Esperamos poder profundizar los análisis moleculares de estos aislamientos en un futuro próximo.

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 han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

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

Financiación

El presente estudio fue llevado a cabo con fondos propios de los investigadores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Carpinelli ML, Guillén RM, Fariña NJ, Basualdo W, Aquino R. PCR múltiple para la detección simultánea de los genes *mecA* y *pvl* en *Staphylococcus* spp. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2012;10:5-13.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth informational supplement M100-S19. Wayne, PA: CLSI; 2009.
3. Fernández S, Vedia de L, López Furst MJ, Gardella N, di Gregorio S, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotrying F, Stryjewski ME, Mollerach M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. Inf Gen Evol. 2013;14:401-5.
4. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth B, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: Rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in Junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:264-74.
5. Manfredi EA, Leotta GA, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*: caracterización de aislamientos de origen alimentario. Rev Argent Microbiol. 2010;42:212-5.
6. Mayor L, Ortellado J, Menacho C, Lird G, Courtier C, Gardon C, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, Etienne J. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asunción, Paraguay. J Clin Microbiol. 2007;45:2298-300.
7. Morrison MJ, Hageman JC, Klevens RM. Case definition for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 2006;62:241. Disponible en: <https://www.google.com.py/#q=morrison+hageman+klevens+case+definition+for+community-associated+methicillin-resistant+staphylococcus+aureus>.
8. Paganini H, della Latta MP, Muller Opet B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, Ensinck G, Kamiya de Macarrein M, Miranda MR, Ciriaci C, Hernández C, Casimir L, Rial MJ, Schenonne M, Ronchi E, Rodríguez M, Aprile F, de Ricco C, García V, Vrátnica C, Pons L, Ernst A, Morínigo S, Toffoli M, Bosque C, Monzani V, Mónaco A, Pinheiro JL, López M, Maninno L, Sarkis C. Estudio multicéntrico sobre las infecciones pediátricas por *Staphylococcus aureus* metilino-resistente provenientes de la comunidad en la Argentina. Arch Argent Pediatr. 2008;106:397-403.
9. Paganini H, della Latta MP, Muller Opet B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, Ensinck G, Kamiya de Macarrein M, Miranda MR, Ciriaci C, Hernández C, Casimir L, Rial MJ, Schenonne M, Ronchi E, Rodríguez M, Aprile F, de Ricco C, Saito V, Vrátnica C, Pons L, Ernst A, Morínigo S, Toffoli M, Bosque C, Monzani V, Mónaco A, Pinheiro JL, López M, Maninno L, Sarkis C. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. Rev Chil Infectol. 2009;26:406-12.
10. Pardo L, Vola M, Macedo-Viñas M, Machado V, Cuello D, Mollerach M, Castro M, Pérez C, Varela G, Algorta G. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay. J Infect Dev Ctries. 2013;7:6-10.
11. Rivero-Pérez B, Pérez-Roth E, Méndez-Álvarez S. Evaluation of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for typing a polyclonal hospital-acquired methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* population in an area where such infections are endemic. J Clin Microbiol. 2010;48:2991–4.
12. Rodríguez F, Carpinelli L, Basualdo W, Castro H, Quiñónez B, Argüello R, Guillén RM. Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurrieron al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Nú, durante el año 2010. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2015;13:1–9.
 13. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, Travis J, Potempa J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol. 2003;41: 1801–4.
 14. Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnero A, Kevric I, Culasso C, Vindel A, Lopardo H, Bocco JL, Study Group of CA-MRSA in Children, Argentina 2007. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinian children. PLoS One. 2012;7:1–12.
 15. Weiler N, Leotta GA, Zarate MN, Manfredi E, Alvarez ME, Rivas M. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. Rev Arg Microbiol. 2011;43:33–6.