

## Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay

Sonia Abente<sup>I</sup>, Letizia Carpinelli<sup>I</sup>, Rosa Guillén<sup>I</sup>, Fátima Rodríguez<sup>I</sup>, Norma Fariña<sup>I, II</sup>, Florentina Laspina<sup>I</sup>, Yolanda López<sup>I</sup>

I Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Universidad Nacional de Asunción. Paraguay

II Laboratorio de Microbiología. Sanatorio San Roque. Asunción, Paraguay

### Cómo referenciar este artículo/ How to reference this article:

Abente S<sup>I</sup>, Carpinelli L<sup>I</sup>, Guillén R<sup>I</sup>, Rodríguez F<sup>I</sup>, Fariña N<sup>I,II</sup>, Laspina F<sup>I</sup> et al. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2016;14(2):8-16

### RESUMEN

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es actualmente el agente etiológico más frecuente en infecciones de piel y tejidos blandos. El *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) aislado en infecciones de pacientes de la comunidad ha ido aumentando, constituyéndose en un problema de salud pública a nivel mundial. En Paraguay existen pocos registros sobre la meticilino resistencia y factores de virulencia a nivel comunitario, por lo que se realizó este estudio observacional descriptivo para determinar la frecuencia de SAMR y del factor de virulencia leucocidina de Pantón Valentine (PVL-Pantón Valentine leukocidin), así como el perfil de resistencia antimicrobiana acompañante a la meticilino resistencia en *S. aureus* aislados de infecciones de piel y partes blandas de pacientes ambulatorios de dos laboratorios de Asunción, Paraguay, entre octubre de 2012 a febrero de 2014. La identificación bacteriana se realizó mediante técnicas microbiológicas convencionales y la susceptibilidad antimicrobiana por la prueba de difusión en disco. El gen *mecA* y *luk-PV* fueron detectados por la técnica de PCR. De los 70 aislados de *S. aureus* estudiados, el 54,3% (38/70) fue SAMR tanto por método fenotípico como molecular. La frecuencia de PVL fue de 15,7% (11/70), siendo mayor en los SAMR (21%; 8/38) que en los SAMS (9,4%; 3/32). El 2,6% de los SAMR presentó resistencia a ciprofloxacina, no se observó multiresistencia en ningún aislado. Se encontró alta frecuencia de SAMR comparado con reportes previos en Paraguay. Se requiere fortalecer estrategias de vigilancia, prevención y control de la resistencia bacteriana en ambientes hospitalarios y de la comunidad.

**Palabras claves:** *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, leucocidina de Pantón Valentine, *mecA*, infección de piel y partes blandas.

## Frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and PVL virulence factor in ambulatory patients with skin and soft tissue infections of Asuncion, Paraguay

### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is currently the most common etiologic agent of skin and soft tissue infections. The isolation of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) from infections of patients in the community has increased, becoming a

Fecha de recepción: junio 2016. Fecha de aceptación: agosto 2016

Autor correspondiente: Sonia Abente Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

E-mail: sonia\_abente@hotmail.com

public health problem worldwide. In Paraguay, there are few records about methicillin resistance and virulence factors at community level. Therefore, this descriptive observational study was performed to determine the frequency of MRSA and factor virulence of Pantón-Valentine leukocidin (PVL) as well as the antimicrobial resistance profile accompanying methicillin resistance in *S. aureus* isolated from skin and soft tissue infections in ambulatory patients from two laboratories of Asunción, Paraguay from October, 2012 to February, 2014. The bacterial identification was performed using conventional microbiological techniques and the antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion. The *mecA* and *luk-PV* genes were detected by PCR technique. Out of the 70 *S. aureus* isolates studied, 54.3% (38/70) was SAMR by phenotypic and molecular methods. PVL frequency was 15.7% (11/70) being higher in MRSA (21%; 8/38) than in the SAMS (9.4%; 3/32), 2.6% of the MRSA was resistant to ciprofloxacin and multidrug resistance was not observed in any isolates. A high frequency of MRSA was found compared with previous reports in Paraguay. It is required to strengthen surveillance, prevention and control of bacterial resistance strategies in hospital and community environments.

**Keywords:** methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Pantón Valentine leukocidin, *mecA*, skin and soft tissue infections.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* representa uno de los principales patógenos de importancia clínica en el humano, su distribución es mundial y el impacto en la morbilidad y mortalidad es relevante no solamente en las infecciones hospitalarias sino también a nivel comunitario (1).

En los últimos años, se han descrito en Australia, Estados Unidos, Japón y algunos países latinoamericanos cepas de SAMR de adquisición comunitaria (SAMR-AC) (2-4). Los SAMR-AC se diferencian de los SAMR de adquisición hospitalaria (SAMR-AH), en sus características epidemiológicas, microbiológicas y clínicas. Tienen un patrón de sensibilidad antibiótica diferente, no se asocian a los factores de riesgo clásicos descritos para SAMR-AH como ser internación reciente, uso previo de antibióticos, infección por VIH, homosexualidad, uso de drogas intravenosas, diálisis, entre otros; además su base genética y sus factores de virulencia son distintos (3).

La cepa de SAMR fue descrita inicialmente en 1960, poco tiempo después de la introducción de este antimicrobiano en la práctica clínica. Esta resistencia es conferida por una proteína de unión a penicilina (PBP-*penicilin binding protein*) conocida como PBP2a, la cual no está presente en las cepas sensibles a meticilina (SAMS) y es codificada por el gen *mecA*, el cual forma parte de un complejo móvil que reside dentro de una isla genómica, denominado *cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec)* (5).

Los SAMR-AH portan un *cassette* cromosómico de mayor tamaño *SCCmec* tipo I, II o III que además del gen *mecA*, contienen otros genes que codifican la resistencia a diferentes antimicrobianos no betalactámicos (macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas), de ahí el fenotipo de multirresistencia característico de las cepas nosocomiales. Por el contrario, los SAMR-AC poseen *SCCmec* de tipo IV y V, que son de menor tamaño por lo que son fácilmente transmisibles y generalmente no contienen genes de resistencia a otras familias de antibióticos, por lo que presentan el fenotipo de ser bastante sensibles (6,7).

La leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) es una citotoxina que forma poros heptaméricos en la membrana de los leucocitos causando destrucción de los mismos y necrosis tisular, facilitando la producción de abscesos (6). Desde el punto de vista clínico, las cepas PVL positivas, tienden a causar infecciones de piel y partes blandas (IP y PB) como forunculosis (93%), abscesos cutáneos (50%) e incluso neumonías rápidamente progresivas con un alto grado de fatalidad (10%). Es por esto que el rol determinante de la PVL como factor de virulencia, aún sigue siendo motivo de controversia (1,3,4,6,8). La producción de PVL está relacionada con las cepas SAMR-AC, ya que comúnmente son las que producen esta citotoxina, en comparación con los SAMS y SAMR-AH (1).

En Sudamérica, una de las primeras publicaciones de infecciones por SAMR en pacientes ambulatorios adultos con infección de piel fue en Brasil en el 2002 (9). Posteriormente,

fueron apareciendo otros reportes, así en Argentina, en un estudio multicéntrico, realizado en pacientes pediátricos ambulatorios con IP y PB, de noviembre de 2006 a noviembre de 2007, llegaron al 62% de SAMR de los aislamientos (10) y en el Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología de 2011 se presentaron datos correspondientes a varios estudios epidemiológicos de IP y PB adquiridas en la comunidad, efectuados en más de 500 pacientes adultos, en los que se observó una prevalencia de SAMR que osciló entre 70 y 87% (11). En Paraguay la mayoría de los estudios de SAMR se llevaron a cabo en medio hospitalario, son pocos los estudios de prevalencia de SAMR-AC. Entre estos estudios se pueden mencionar el realizado en el 2011 por Guillén *et al* quienes reportaron una prevalencia de 18,7% de SAMR en pacientes ambulatorios pediátricos con IP y PB y sepsis, de hospitales de referencia de Paraguay (12) y en el 2013, la prevalencia de SAMR-AC en ambulatorios en el Instituto de Medicina Tropical de Asunción en pacientes pediátricos con IP y PB fue del 61% y en pacientes adultos 31% (13).

La detección de la meticilino resistencia se realiza comúnmente en los laboratorios de rutina por el método de difusión en disco, sin embargo la prueba de referencia es la detección del gen *mecA* por PCR (14). Carpinelli *et al* estandarizaron una PCR múltiple para la detección simultánea del gen *mecA* y *luk-PV* que fue utilizada para la identificación de estos genes en aislados de estafilococos como portación en el personal de salud de un hospital pediátrico encontrando una prevalencia de 31,7% de *mecA*. (15)

Con el aumento en la prevalencia de SAMR en pacientes ambulatorios con IP y PB hubo un cambio epidemiológico en los últimos años respecto a las infecciones producidas por *S. aureus*, lo que lo convierte en un hecho de importancia clínica y terapéutica, de gran trascendencia en la salud pública (16). Consecuentemente hubo una modificación en el patrón de resistencia de *S. aureus*, dificultando el uso de beta-lactámicos como opción preferencial de tratamiento para las IP y PB (17). Razón por la cual es fundamental el conocimiento actualizado de los patrones de resistencia locales, a fin de facilitar la elección empírica del tratamiento antibiótico. Por todo lo expuesto, se realizó este estudio donde el objetivo fue determinar la frecuencia de SAMR, el factor de virulencia PVL y el perfil de resistencia antimicrobiana acompañante en los aislados de *S. aureus* de pacientes ambulatorios con IP y PB, que acudieron a un laboratorio público y otro privado de microbiología de Asunción, Paraguay de octubre de 2012 a febrero de 2014.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, con muestreo de casos consecutivos, en el cual se estudiaron los aislados de *S. aureus* obtenidos de pacientes ambulatorios con IP y PB que acudieron a los laboratorios de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) y del Sanatorio San Roque, de Asunción, Paraguay de octubre de 2012 a febrero de 2014.

Las muestra de los abscesos y forúnculos fueron recolectadas por punción-aspiración y las lesiones supurativas por hisopado. Los procedimientos fueron realizados en los consultorios de urgencia del Sanatorio San Roque y en la Cátedra de dermatología del Hospital de Clínicas y las muestras fueron inmediatamente remitidas para su procesamiento a los laboratorios del San Roque y del IICS.

Las muestras fueron cultivadas utilizando técnicas microbiológicas convencionales, en agar sangre de oveja al 5% e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Para la identificación de *S. aureus* se realizaron coloración de Gram, prueba de catalasa, coagulasa, manitol y DNAsa (18).

La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos fue realizada en agar Mueller-Hinton, según el método de difusión de discos de Kirby-Bauer, siguiendo las recomendaciones y puntos de cortes del CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*). La resistencia fenotípica a meticilina se detectó utilizando discos de cefoxitina de 30µg (BioRad, FR), informando sensible o resistente a oxacilina y basados en los puntos de corte para cefoxitina que se detalla a continuación, halos mayor o igual a 22 mm de diámetro se reporta sensible a oxacilina y halos menor o igual a 21 mm de diámetro se reporta resistente a oxacilina (19). Además se ensayaron discos de gentamicina de 10µg (BioRad, FR), eritromicina de 15 µg (BioRad, FR), clindamicina de 2 µg (BioRad, FR), trimetoprim/sulfametoxazol de 1,25/23,7 µg (BioRad, FR) y ciprofloxacina de 5 µg (BioRad, FR).

Los aislados de *S. aureus* fueron conservados en caldo cerebro corazón - glicerol al 15% a -20 °C hasta la realización de los estudios moleculares. La caracterización genotípica fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular del IICS. La extracción de ADN se realizó

por el método de ebullición, descrito previamente por Zhang *et al* . (20), con las modificaciones descritas por Carpinelli *et al* . (15).

El método fue ajustado en el laboratorio de Biología Molecular del IICS, empleando unas 5 UFC (Unidad Formadoras de Colonias) del cultivo agar sangre con 24 a 48 hs de crecimiento, se suspendieron en 100 uL de agua bidestilada y se procedió a realizar dos ciclos de temperatura de 100° durante 15 min, luego la muestra fue sometida durante 5 min a baño frío. El sobrenadante conteniendo el ADN extraído se preservó a - 20°C hasta su uso.

Para la detección de los genes *mecA* y *luk-PV* se utilizó una reacción de PCR múltiple, que emplea los oligonucleótidos descritos por Murakami *et al* . (21) para *mecA*; y Lina *et al* . (22) para *luk-PV*. Los reactivos utilizados y sus concentraciones óptimas para la reacción de PCR fueron los siguientes: *buffer* 1X (Fermentas, EU), dNTPs 0,4 mM (Bioline, UK), cebadores *mecA-R*, *mecA-F*, *luk-PV-1* y *luk-PV-2* 0,5 µM (Genbiotech, AR), MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM (Fermentas, EU), Taq polimerasa 1 U (Fermentas, EU) y agua tridestilada. Para la reacción de PCR se utilizó 2,5 µL ADN molde obtenido, en un volumen total de reacción entre 25 µL. La amplificación de ADN se llevó a cabo durante 40 ciclos como sigue: desnaturalización de 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s, y extensión a 72°C durante 1 min con una extensión final a 72°C durante 5 min. Se utilizó el termociclador PTC100 (MJ Research, USA).

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% (FlukaAnalytical, Sigma, USA) en buffer TAE 1X (0,04M tris-acetato - 0,001M EDTA), realizadas en cuba electroforética (Thermo SCIENTIFIC, USA) a 100V. Los tamaños de las bandas se verificaron corriendo en paralelo un marcador de peso molecular de 100 pb (Bioline, UK) y visualizados con luz UV utilizando un transiluminador previa tinción con bromuro de etidio (5 µg/mL). Los geles de agarosa fueron fotografiados utilizando una cámara digital.

Se utilizaron las siguientes cepas control: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para las pruebas de identificación, pruebas de sensibilidad para los discos ensayados y control negativo para el gen *mecA* y *luk-PV*; *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 como control positivo para el gen *mecA*; para *luk-PV* se utilizó un aislado de portador del gen *mec-A* y *luk-PV*, previamente caracterizado.

Los datos obtenidos fueron introducidos y almacenados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel, utilizándose estadística descriptiva (frecuencia absoluta y relativa porcentual) para resumir los datos.

## RESULTADOS

Se estudiaron un total de 70 aislados de *S. aureus* obtenidos de pacientes ambulatorios con el diagnóstico IP y PB, entre 5 a 83 años de edad, con media: 35,814 y DE: 16,791, de los cuales el 51% (36/70) fueron del sexo femenino.

De los 70 aislados, el 54% (38/70) resultó ser resistente a oxacilina (SAMR). (Tabla 1).

**Tabla 1.** Perfil de resistencia antimicrobiana de los SAMR y SAMS

Antibióticos	Perfil de resistencia de <i>S. aureus</i>					
	SAMR (n=38)		SAMS (n= 32)		Total (n=70)	
	n	%	n	%	n	%
Cefoxitina	38	100	0	0,0	38	54,3
Eritromicina	1	2,6	2	6,2	3	4,3
Clindamicina	1	2,6	2	6,2	3	4,3
Ciprofloxacina	1	2,6	0	0,0	1	1,4
Trimetoprin-Sulfametoxazol	0	0,0	1	3,1	1	1,4
Gentamicina	5	13,1	1	3,1	6	8,6

SAMR: *S. aureus*meticilino resistente, SAMS: *S. aureus*meticilino sensible

La franja etaria con mayor frecuencia de SAMR fue la de 20-35 años con 58% (21/36), (Tabla 2).

El 55,3% (21/38) de los SAMR fueron aislados de pacientes de sexo femenino.

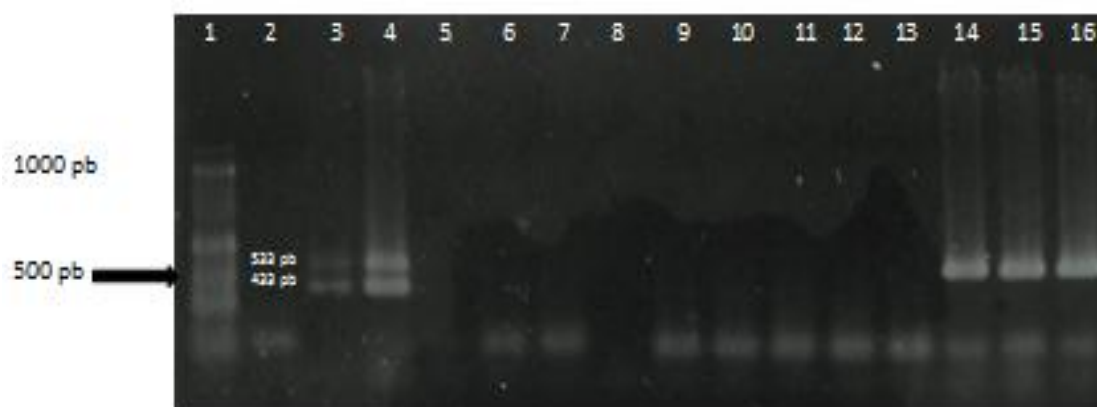
**Tabla 2.** Frecuencia de SAMR y SAMS según franja etaria.

Franja etaria (años)	SAMR		SAMS	
	n	%	n	%
5-19	3/6	50	3/6	50
20-35	21/36	58	15/36	42
36-60	9/19	47	10/19	53
> 60	5/9	56	4/9	44

El perfil global de resistencia antimicrobiano observado en todos los aislados de *S. aureus* y el perfil de resistencia antimicrobiana de los SAMR y SAMS se detalla en la Tabla 1. La prueba de D-test fue positiva en 3 de los 70 aislados (4,3%), uno de ellos resistente a meticilina.

En este trabajo fue estudiada la sensibilidad frente a 6 antibióticos, cada uno perteneciente a una familia distinta y considerando multirresistentes a aquellos que presentan resistencia a 5 o más familias de antibióticos, no se obtuvo multirresistencia en ninguno de los aislados de *S. aureus*.

El gen *mecA* se detectó en 38 aislados, dando un producto de amplificación de 533 pb (Figura 1), obteniendo así una frecuencia del *mecA* de 54,3 %, todos estos aislados fueron meticilino resistentes por el método fenotípico, no se detectó el gen *mecA* en los aislados caracterizados fenotípicamente como meticilino sensibles.



**Figura 1. Productos de amplificación de PCR múltiple para detección de los genes *mecA* y *pvl*.** Gel Agarosa al 2%, Carril1: Marcador de peso molecular de 100pb, Carril 2: Control negativo de reacción de PCR ( $H_2O$  destilada), Carril 3: Control positivo para gen *mecA* (533 pb) y gen *pvl* (433 pb), Carril 4: Muestra 26 *mecA* positiva y *pvl* positiva, Carriles 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13: Muestras 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 18,19 *mecA* negativa y *pvl* negativa, Carriles 14, 15 y 16: Muestras 21, 22, 23 *mecA* positiva.

Se detectó la presencia del gen *pvl* en 11 aislados de *S. aureus*, dando un producto de amplificación de 433 pb, obteniendo así la frecuencia de *S. aureus* portadores del gen de 15,7% (11/70) (Figura 1), de estos, 8 fueron SAMR y 3 SAMS (Tabla 3).

Los 3 aislados de SAMS portadores de PVL fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados y de los 8 aislados de SAMR portadores de PVL, 2 presentaron resistencia a otro antibiótico además de la meticilino resistencia, uno a ciprofloxacina y el otro a gentamicina.

**Tabla 3.** Factores de virulencia PVL y gen *mecA* encontrados en los aislados de *S. aureus* (n= 70)

Presencia del gen <i>mecA</i> y del factor de virulencia LPV	Total	
	n	%
<i>mecA</i> + , <i>pvl</i> +	8	11,4
<i>mecA</i> - , <i>pvl</i> +	3	4,3
<i>mecA</i> + , <i>pvl</i> -	30	42,8
<i>mecA</i> - , <i>pvl</i> -	29	41,4

## DISCUSIÓN

Este trabajo se realizó con el propósito de determinar la frecuencia de SAMR y el factor de virulencia PVL en los aislados obtenidos de pacientes ambulatorios con IP y PB provenientes de dos instituciones de la ciudad de Asunción.

La frecuencia de SAMR en este trabajo fue de 54,3%, un valor relativamente alto si lo comparamos con otros estudios de Paraguay, así Sanabria *et al.* reportaron valores del 9% de SAMR-AC en pacientes con IP y PB en un periodo que abarca de 2002 a 2006 para luego incrementarse al 22,6% en el periodo de 2007 a 2008, en un estudio hecho en el Instituto de Medicina Tropical de la ciudad de Asunción (23). Luego en el 2012, en la misma institución describen cifras del 61% (11/18) en pacientes pediátricos y 31% (5/16) en adultos (13). Era de esperar que la frecuencia de aislamientos SAMR en IP y PB vaya aumentando según pasan los años, así como lo muestran los registros.

Es sabido que las frecuencias varían de una región a otra, en Argentina en el trabajo realizado por Bermejo *et al.* en pacientes ambulatorios con IP y PB que consultaron en un hospital de Buenos Aires entre los años 2009 y 2011, se encontró una prevalencia de SAMR de 74,7% (62/83), (17). Mientras que Verón *et al.* describen un 55,5% de SAMR (15/27) en pacientes adultos ambulatorios con IP y PB atendidos en una institución privada de Gran Buenos Aires 2006 a de 2011 (2), este último con valores muy similares al encontrado en este estudio.

En España, encontraron frecuencias menores, así en el trabajo realizado por Casado *et al.* en pacientes adultos con infección cutánea supurativa adquirida en la comunidad, que acudieron a un hospital de Madrid, en el año 2010, reportaron una prevalencia SAMR de 33,3% (13/39) (24), valor bastante similar fue reportado por García Agudo *et al.* en aislamientos de *S. aureus* de muestras de IP y PB de pacientes ambulatorios en el periodo de 2007 a 2009, con una cifra del 33,5% de SAMR. En este mismo estudio se describe una resistencia a gentamicina de 16% (4), cuyo valor es semejante al de este trabajo (13,1%), que fue el más elevado entre los antibióticos acompañantes ensayados, por lo que no se recomienda su uso ya que supera el 10 % de resistencia. Además la gentamicina es un antibiótico poco utilizado para el tratamiento de infecciones purulentas, ya que en estas se dan ciertas condiciones que reducen el potencial eléctrico de la membrana bacteriana como la anaerobiosis o el bajo pH del medio, disminuyendo el ingreso de este antibiótico al citoplasma bacteriano, las concentraciones alcanzadas son muy bajas, lo que hacen que este antibiótico tenga baja actividad en ese medio (25).

En este trabajo se encontró resistencia de 2,6% para eritromicina, clindamicina y ciprofloxacina en los aislados de SAMR, valores de resistencia inferiores a los encontrados por Bermejo *et al.* que fueron de 20,4%, 17,7% y 4,8% respectivamente (17). La prueba de D-test utilizada para detectar el mecanismo de resistencia a los macrólidos y lincosamidas mostró que el mecanismo enzimático por producción de metilasa fue en solo un caso 2,6% (1/38) de los SAMR en este trabajo, valor inferior al reportado por Anodal *et al.* que encontraron 20% (6 /30) casos de D-test positivo entre sus aislados de SAMR estudiados (26) y al de otro estudio en India en 2014, que fue de 16,9% (10/59) (27). Esto probablemente se debe a que en nuestro sistema sanitario estos antibióticos no suelen

emplearse en el tratamiento empírico inicial de las IP y PB, pero en otros países con el aumento de las prevalencias de SAMR en IP y PB se suelen excluir a los betalactámicos como monoterapia en el tratamiento empírico inicial, por lo que cada vez aparecen más resistencias a otros grupos de antibióticos.

En los aislados de SAMR del presente trabajo no se obtuvo resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol, al igual que en los valores descritos por Anodal *et al.* en pacientes ambulatorios con IP y PB que acudieron al servicio de dermatología en un hospital de Argentina durante los años 2009 y 2010 (26), por lo que podría ser una opción válida para el tratamiento de estas infecciones.

El término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados betalactámicos tanto en *S. aureus* de origen hospitalario como comunitario, los SAMR-H presentan frecuentemente resistencia a varios grupos de antibióticos. En este estudio realizado en aislados de la comunidad la resistencia acompañante fue baja, los SAMS no presentaron un valor de resistencia superior al 10% entre los antibióticos ensayados y en los SAMR solo gentamicina superó el 10% de resistencia, tampoco se obtuvo ningún aislado multiresistente, coincidente con lo que describe la teoría para los SAMR-AC (7).

La técnica de PCR múltiple permitió detectar de manera simultánea la presencia de los genes *mecA* y *luk-PV* en *S. aureus* aislados de pacientes ambulatorios. De los 70 aislados de *S. aureus*, en 38 de ellos se detectó el gen *mecA*, todos resistentes a meticilina por el método fenotípico de difusión con discos, obteniendo una concordancia del 100% con ambos métodos, lo que indica que el mecanismo determinante de la resistencia a meticilina es la producción de PBP2a.

En el presente trabajo se detectó el gen *luk-PV* en 11 (15,7%) aislados de *S. aureus*, 8 fueron meticilino resistente y 3 meticilino sensible, valor similar al encontrado por Cobos Trigueros *et al.*, quienes describieron una prevalencia del 11,2% (37/329) de PVL en SAMR de aislados de IP y PB de pacientes de un hospital de Barcelona de octubre de 2007 a julio de 2009 (28). En cambio Casado Verrier *et al.* encontraron una cifra de 84,6% (11/13) para el gen *luk-PV* en los aislados de SAMR de pacientes ambulatorios con infecciones cutáneas supurativas que acudieron a Urgencias de un Hospital de Madrid (24). La mayor cantidad del factor PVL fue detectado en los SAMR como era de esperar debido a que el factor de virulencia PVL se asocia con mayor frecuencia a los SAMR-AC.

En trabajos anteriores realizados en Paraguay se pueden mencionar el del 2011 por Guillén *et al.*, quienes reportaron valores de 43% (10/23) de portación de PVL en los SAMR en pacientes ambulatorios pediátricos con IP y PB y sepsis, de hospitales de referencia de Paraguay (12) y el de Rodríguez *et al.*, en el que se analizaron 50 aislados de *S. aureus* adquiridos de la comunidad obtenidos a partir de muestras clínicas de secreciones de piel, partes blandas o líquidos corporales de pacientes menores de 17 años que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú durante el año 2010, donde la portación del gen codificante de la PVL se observó en más de la mitad de los aislados estudiados (58%; 29/50) y la mayoría de ellos (90%; 26/29) produjo IP y PB (29); también en el trabajo de Cataldo *et al.* donde se estudio la portación de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a antimicrobianos en cavidad bucal de niños que concurren para un tratamiento en una clínica odontológica, y ninguno de ellos portaba el factor de virulencia PVL, comparado con los valores más bajos obtenidos en este trabajo se puede ver que las cepas de *S. aureus* portadoras de la PVL se encuentran muy asociadas a las IP y PB . y no se puede descartar el riesgo de que los mismos bajo ciertas condiciones del huésped puedan ocasionar patologías más graves.

Con este estudio se ha logrado actualizar la frecuencia de SARM por métodos fenotípicos y genotípicos y se ha confirmado un aumento de la frecuencia de estos aislados en la comunidad. Además se ha determinado que un porcentaje importante de los aislados de pacientes de la comunidad portan PVL, y por lo tanto vinculadas a infecciones más severas. Por otra parte se puede aseverar que las cefalosporinas de primera generación utilizada hace unos años en el tratamiento empírico de estas infecciones ya no pueden ser utilizadas, y que antibióticos como trimetoprima-sulfametoxazol, macrólidos y clindamicina podrían ser indicados como terapia inicial para infecciones por *S. aureus* de la comunidad.

Con el trascurso del tiempo hay un claro aumento en la prevalencia de aislados de SAMR-AC en infecciones en Paraguay. La vigilancia de las infecciones por SARM en la comunidad es fundamental para determinar el tratamiento antibiótico empírico adecuado, ya sea para las infecciones locales o invasivas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Colsa A. *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica. Microbiología molecular para el clínico. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 2011; 24(95):91-4.
- Verón MT, Ojeda MG, Avino F, Spelzzini A, Barboza A, Pedrozzino Y. Incidencia y distribución estacional de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en pacientes adultos ambulatorios en una clínica de la provincia de Buenos Aires: período 2006 – 2011. Rev Argent Microbiol. 2012;44(4):306-11.
- Noriega LM, González P, Hormazábal JC, Pinto C, Canals M, Munita JM et al. *Staphylococcus aureus* comunitario resistente a cloxacilina: Comunicación de los primeros cinco casos descritos en Chile. Rev Med Chile. 2008;136(7):885-91.
- García-Agudo L, Huertas M, Asencio MA, Carranza R, García-Martos P. Sensibilidad a antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina procedentes de pacientes ambulatorios. Rev Esp Quimioter. 2011;24(2):91-5.
- Castellano M, Pedrozo A, Vivas R, Ginestre M, Rincón G. Tipificación molecular y fenotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR) en un hospital universitario. Rev Chilena Infectol. 2009;26(1):39-48.
- Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in outpatients, United States, 1999-2006. Emerg Infect Dis. 2009;15 (12):1925-30.
- Cercenado E, Ruiz de Gopegui E. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(Supl13):19-24.
- De Vedia L, Lista N, Piovano G, Amaya Akkay V, Rodríguez A, Eusebio MJ et al. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad: una nueva amenaza. Rev Am Med Resp. 2012;12(4):131-9.
- Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 2005;43(4):1985-8.
- Paganini H, Della Latta MP, Muller Opet B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children: multicenter trial. Arch Argent Pediatr. 2008;106(5):397-403.
- López Furst MJ. Grupo de Estudio de Infecciones por *Staphylococcus aureus* de la Comunidad, Sociedad Argentina de Infectología. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en la comunidad: la emergencia de un patógeno. Medicina (B Aires). 2011;71:585-6.
- Guillén RM, Basualdo W, Castro H, Campuzano de Rolón A, Macchi M, Ortellado J, et al. *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: Caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños que concurren a hospitales de referencia de Asunción y Dpto. Central. Rev Inst Med Trop. 2011;6 Supl:45-5.
- Irala J. Progresión de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a Oxacilina en el Instituto de Medicina Tropical de Asunción – Paraguay. Rev Inst Med Trop. 2013;8(1): 18-25.
- Ulloa MT, Porte L, Carmi A, Varela C, Fica A. Comparación de reacción de polimerasa en cadena, látex y antibiograma para detección de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. Rev Chilena Infectol. 2001;18(4):255-60.
- Carpinelli ML, Guillen R, Fariña N, Basualdo W, Aquino R. PCR múltiple para la detección simultánea de los genes *mecA* y *pvl* en *Staphylococcus* spp. Mem Inst Investg Cienc Salud. 2012;10(1):5-13.
- Tobeña M, Coll F, García C, Bartolomé R, Moraga F. Fascitis necrosante por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad productor de leucocidina de Pantón-Valentine. An Pediatr (Barc). 2009;70(4):374-8.
- Bermejo V, Spadaccini L, Elbert G, Duarte A, Erbin M, Cahn P. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. Medicina (B Aires). 2012; 72 (4): 283-6.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, et al. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6º ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. 2014; 34(1):M100-S21.
- Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2004; 42(11): 4947-55.
- Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29(10): 2240-4.
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29(5):1128-32.



23. Sanabria G, Araya S, Arbo A. Situación actual de la susceptibilidad a antibióticos de cepas de Staphylococcus aureus aislados en infecciones invasoras en niños. Rev Inst Med Trop. 2008; 2(1):29-34.
24. Casado-Verrier B, Gómez-Fernández C, Paño-Pardo JR, Gómez-Gil R, Mingorance-Cruz J, Moreno-Alonso de Celada R, et al. Community-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus skin and soft tissue infections in Madrid: prevalence study. Enferm Infec Microbiol Clin. 2012; 30(6):300-6.
25. Noblia L. Aminoglucósidos. Recuperado en: <http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/amino/AMINOGLUC%D3SIDOS.htm>
26. Anodal M, Villani ME, Rodríguez L, Schijman M, Terzano M, Gardella N. Infecciones de piel y partes blandas por Staphylococcus aureus metilino resistente de la comunidad. Análisis molecular y genético. Dermatol Argent. 2012; 18(3): 213-20
27. Emilda JK, Shenoy SM, Chakrapani M, Kumar P, Bhat KG. Clinical spectrum and antimicrobial resistance pattern of skin and soft tissue infections caused by community acquired-methicillin resistant Staphylococcus aureus. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2014; 80(6): 539-40.
28. Cobos-Trigueros N, Pitart C, Marco F, Martínez JA, Almela M, et al. Epidemiology and clinical presentation of Pantone-Valentine leukocidin positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Rev Esp Quimioter. 2010; 23(2): 93-9.
29. Rodríguez Acosta F, Carpinelli L, Basualdo W, Castro H, Quiñonez B, Argüello R, et al. Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en Staphylococcus aureus aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, durante el año 2010. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2015; 13(1): 58-66.
30. Cataldo K, Jacquett N, Fariña N, Pereira A, Rodríguez F, Guillén RM, et al. Portación de Staphylococcus aureus multiresistentes a antimicrobianos en cavidad bucal de niños que concurren para un tratamiento en una clínica odontológica, Paraguay. Pediatr (Asunción). 2014; 41(3): 201-7.