

**Características moleculares de aislamientos de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a meticilina causantes de infecciones pediátricas atendidas en el hospital infantil Napoleón Franco Pareja de la ciudad de Cartagena de Indias, 2012.**

**Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Microbiología**

**Grupo de Investigación: Genética y Biología Molecular**

**Carlos Arturo Leal Acosta**

---

**Niradiz Reyes Ramos, PhD**  
**Directora**



**Facultad de Medicina**  
**Universidad de Cartagena**  
**2014**

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

Firma del Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

---

Jurado

## *Dedicatoria*

*Dedico este peldaño de mi vida a mi familia que pese a toda adversidad permanece férrea con amor, comprensión y alegría, sorteando cada nuevo obstáculo y celebrando cada nuevo triunfo.*

## *Agradecimientos*

Gracias a Dios por permitirme continuar con la obtención de mis metas.

A Marlene, Milton, Ricardo, Sandy, Reyna, Milton Jr y Ana, por su gran apoyo como familia y amigos.

A mi tutora Niradiz Reyes por su paciencia, constancia y sobre todo, por brindarme la oportunidad de ser uno de los multiplicadores de su conocimiento.

A mis amigos Sandra González, Rina Montoya, Indira Llanos Y Juan Rebollo, por compartir un fragmento de sus vidas con la mía.

Al grupo del Laboratorio de Microbiología por su apoyo: Gregori, Martha, Ketty y obviamente a Mayito por su valiosa ayuda y su agradable compañía.

A Colciencias por su financiación a través del proyecto titulado "Caracterización epidemiológica, microbiológica y molecular de *Staphylococcus aureus* causante de infecciones pediátricas adquiridas en la comunidad en la ciudad de Cartagena de Indias", Código: 1107-519-28910, ejecutado por el grupo Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina. Contrato # 255-2010

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	13
2.1. Generalidades y determinantes de resistencia: Casete Cromosomal Estafilocócico mec .....	13
2.2. Determinantes de virulencia .....	15
2.2.1. MSCRAMM.....	15
2.2.2. Superantígenos .....	15
2.2.3. Enterotoxinas.....	16
2.2.4. Citotoxinas .....	17
2.3. Regulador de genes accesorios ( <i>agr</i> ) .....	20
2.4. Modulinas Solubles en Fenol (PSMs) .....	21
2.5. Manifestaciones Clínicas.....	22
2.5.1. Infecciones de piel y tejidos blandos .....	22
2.5.2. Infecciones invasivas.....	25
2.6. Tratamiento de las infecciones por <i>S. aureus</i> .....	27
3. Planteamiento del problema.....	33
4. Justificación.....	35
5. Objetivos .....	36
5.2. Objetivo general .....	36
5.3. Objetivos específicos .....	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
6.1. Tipo de estudio, población, y recolección de la muestra .....	37
6.2. Aspectos Éticos.....	37
6.3. Fases del estudio .....	38
6.3.1. Métodos Microbiológicos .....	39

6.3.2. Métodos Moleculares.....	41
6.4. Análisis estadístico.....	46
7. RESULTADOS.....	47
7.1. Características Sociodemográficas.....	47
7.2. Resistencia antibiótica.....	48
7.2.1. Kirby Bauer.....	48
7.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria.....	49
7.3. Resultados moleculares.....	50
7.3.1. <i>Nuc</i> , SCCmec y PVL.....	50
7.3.2. Enterotoxinas, BSA, TST y Exo $\alpha$ .....	53
7.3.3. Agr.....	54
7.3.4. Complejo clonal.....	54
7.3.5. Tipificación molecular mediante PFGE.....	55
7.4. Tratamiento y manejo de infecciones.....	58
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	65
10. BIBLIOGRAFÍA.....	66

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Recomendaciones para el Tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
Tabla 2. Recomendaciones para el Tratamiento de infecciones invasivas por <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	30
Tabla 3. Comparación demográfica de los casos por SASM/SARM .....	48
Tabla 4. Perfil de resistencia antibiótica en aislados infectantes de <i>S. aureus</i> .....	50
Tabla 5. Perfil de los factores de virulencia entre SASM y SARM.....	52
Tabla 6. Distribución de los aislados de <i>S. aureus</i> según el tipo de Agr que portan. ....	54
Tabla 7. Descripción molecular y fenotípica de los principales pulsotipos obtenidos por PFGE al comparar las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de pacientes infectados según portación del gen <i>mecA</i> .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución por sexo de los participantes .....	47
Figura 2. Distribución de las condiciones clínicas halladas en los pacientes pediátricos infectados por <i>S. aureus</i> .....	48
Figura 3. Proporción de los aislamientos de <i>S. aureus</i> infectantes resistentes a antibióticos (n=94).....	49
Figura 4. PCR múltiple para la detección de los genes <i>nuc</i> , <i>mecA</i> y <i>lukF-PV</i> .....	51
Figura 5. PCR múltiple para la tipificación del SCCmec en los aislados SARM..	53
Figura 6. PCR múltiple para la subtipificación del SCCmec tipo IV en los aislados SARM .....	53
Figura 7. PCR múltiple para determinar los procesos de dispersión de las líneas clonales ST5 y ST8. ....	55
Figura 8. Distribución de los complejos clonales en <i>S. aureus</i> infectantes .....	55
Figura 9. Dendograma derivado del análisis de PFGE: comparación de cepas de <i>S. aureus</i> causantes de infección según portación del gen <i>mecA</i> . ....	57
Figura 10 Terapia antibiótica empírica para las infecciones por <i>S.aureus</i> . n=62 ..	59
Figura 11. Manejo antibiótico final en infecciones por <i>S. aureus</i> . n=58.....	59

## RESUMEN

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria con gran potencial patogénico capaz de establecerse en los seres humanos y causar múltiples alteraciones que van desde la afectación de la piel y tejidos blandos hasta aquellas en donde se pone en peligro la vida. El surgimiento a nivel mundial de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos propone la búsqueda de explicaciones epidemiológicas que puedan llegar a aportar un mejoramiento en la comprensión de este microorganismo, así como también la potencialización del tratamiento a suministrar. En Cartagena no se conocen con claridad las características moleculares que diferencian las infecciones de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina de las sensibles.

**Objetivo:** El propósito de este estudio fue describir el perfil genético y de resistencia antibiótica de las cepas de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) y *Staphylococcus aureus* Sensible a Meticilina (SASM) causantes de infecciones en niños. **Métodos:** Estudio de corte transversal de tipo analítico, en el que a un grupo de aislados de *S. aureus* obtenidos de 94 pacientes pediátricos con infecciones por esta bacteria se les determinó mediante ensayo por PCR, los perfiles de enterotoxinas, gen *mecA*, tipificación y subtipificación del SCCmec, complejo clonal, AGR y los perfiles de resistencia que portan. Con ello se clasificaron como SARM y SASM basados en la identificación del gen *mecA*. Además, se compararon las características moleculares y de resistencia antibiótica entre los aislamientos SARM y SASM. Adicionalmente se correlacionaron los datos moleculares con los tipos de la cepa y algunos datos sociodemográficos y clínicos. Además se realizó la tipificación del perfil genético de los aislados de *Staphylococcus aureus* del estudio mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Los resultados fueron analizados mediante el test exacto de Fisher, la prueba  $\chi^2$  y la prueba T Student en donde fueron requeridas. Se asumió una significancia estadística de  $P \leq 0,05$ . **Resultados:** La proporción de SARM y SASM fue de 48,9% y 51,1%, respectivamente. La portación de los genes para PVL se presentó con mayor frecuencia en las cepas SARM. Los complejos clonales más prevalentes fueron el ST8 (41,5%) y ST5 (37,2%). La PFGE reveló

poca diversidad genética en los aislados estudiados. **Conclusiones:** SASM y SARM mostraron una proporción equivalente y el patrón genético relacionado con el Clon USA300 fue el más prevalente en las cepas del estudio. El análisis de PFGE reveló poca diversidad genética entre los aislados SASM y SARM, por lo tanto las diferencias moleculares entre estos dos grupos no son significantes.

**Palabras claves:** *Staphylococcus aureus*, resistencia a la meticilina, tipificación molecular, Epidemiología Molecular, electroforesis en gel de campo pulsado.

## 1. INTRODUCCIÓN

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se establece como uno de los principales patógenos en infecciones humanas tanto a nivel comunitario como en el ambiente nosocomial. Debido a su capacidad patogénica esta bacteria puede producir un amplio espectro de manifestaciones que van desde una leve infección de piel hasta estados tan avanzados que pueden fácilmente ser mortales. En niños, se presenta frecuentemente debido probablemente a los continuos traumas a los que se está expuesto en este grupo etario.

Dentro de las infecciones más frecuentes relacionadas con *S. aureus* se encuentran las de piel y tejidos blandos, tales como los abscesos, celulitis y otras lesiones que pueden permanecer confinadas al estrato dérmico. Sin embargo, este microorganismo también tiene la capacidad para producir sepsis, considerada como una de las principales complicaciones, seguida de otras condiciones como osteomielitis, meningitis, neumonía necrotizante, entre otras infecciones que por lo general son precedidas por infecciones de piel y tejidos blandos, las cuales alcanzan estratos más profundos, pudiéndose diseminar hacia diferentes órganos simultáneamente a través de la vía hematógena.

Por lo tanto, una de las preocupaciones en las infecciones por *S. aureus* es su tasa de mortalidad que puede variar de un 25% para el caso de SASM a un 34,2%, para el de SARM (1). La diferencia entre las proporciones, puede deberse a la capacidad de este microorganismo para adquirir diversos elementos genéticos móviles que potencializan su capacidad de virulencia.

En este sentido, *S. aureus* ha podido apropiarse de un casete cromosómico que le confiere resistencia a casi todos los antibióticos betalactámicos, dificultando así su tratamiento. A estas cepas se les conoce como *S. aureus* resistentes a meticilina y actualmente su proporción se ha incrementado drásticamente. Adicionalmente, posee otros factores de virulencia como la Leucocidina de Pantón Valentine,

citotoxina relacionada con alteraciones pulmonares y con la que puede atacar directamente a los leucocitos y producir su lisis. Además, porta una multiplicidad de superantígenos con capacidad enterotóxicas.

Teniendo en cuenta la facilidad con la que se modifica su contenido génico, se han realizado diversos estudios que buscan establecer los perfiles genéticos asociados a diversos estados infecciosos. Sin embargo, los estudios revelan que existe una gran variedad genética, tal vez relacionada con las discrepancias geográficas en las que se ejecutan. Por lo tanto se requieren estudios de vigilancia epidemiológica en sectores geográficos específicos que ayuden a comprender mejor la evolución de *S. aureus* localmente. Por esto, en la ciudad de Cartagena se requieren más investigaciones que contribuyan al conocimiento de las características moleculares de este patógeno y la relación que guardan con el pronóstico clínico, para establecer diseños de estrategias y el mejoramiento de protocolos vigentes de prevención, diagnóstico, control y tratamiento.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1. Generalidades y determinantes de resistencia: Casete Cromosomal Estafilocócico mec

El *S. aureus* es un coco grampositivo, encontrado como uno de los factores etiológicos principales de infecciones localizadas en piel y tejidos blandos, neumonía, meningitis, poliposis nasal; así como también de eventos sistémicos como bacteremias, endocarditis y sepsis (2-4). La capacidad de adaptación de esta bacteria, le confiere la habilidad de poblar diversos lugares en el cuerpo humano, volviéndose parte de su flora normal. *S. aureus* puede colonizar a las personas a nivel de las narinas, axilas, periné y vagina (5-8). Actualmente, las personas portadoras de *S. aureus* pueden ser clasificadas de acuerdo a su patrón de portación en: Portadores persistentes, representados hasta en un 30% de la población, los portadores intermitentes con un 30% (12-70%) y los no portadores (con hasta un 69%). De estos últimos se piensa que nunca son colonizados por la bacteria (9-12).

La literatura reporta que *S. aureus* evidencia múltiples cambios en su perfil genético direccionados a la resistencia al antibiótico meticilina, conociéndose como *S. aureus* Resistente a la Meticilina (SARM). Estas cepas inicialmente se relacionaban con individuos en contacto hospitalario previo, sin embargo, actualmente existen pacientes infectados en la comunidad sin este precedente, denominando a la cepa *S. aureus* Resistente a la Meticilina Asociado a la Comunidad (SARM-AC)(13).

La adquisición de resistencia a la meticilina es de principal interés tanto para la comunidad científica como para el sistema de salud, debido a que esta propiedad le confiere resistencia a todos los antibióticos beta-lactámicos a esta bacteria. Este mecanismo de resistencia se debe a la adquisición horizontal del gen *mecA*, el cual codifica una proteína fijadora de penicilina 2ao PBP2a por sus siglas en inglés (Peniciline Binding Protein 2a), transpeptidasa que funciona en la síntesis del

peptidoglicano y que presenta baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos. El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil grande, conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* (“Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*”, SCC*mec*) transferido horizontalmente a cepas precursoras de *S. aureus* sensibles a metilina, en múltiples eventos independientes entre sí, a partir de especies relacionadas del género *Staphylococcus* (14-16) .

Actualmente se reconocen siete tipos principales de casetes SCC*mec* (I-VII), los cuales difieren entre sí en su contenido genético y organización. De estos, los tipos IV, V, VI y VII, causan resistencia solo a antibióticos beta lactámicos, mientras que los tipos I, II y III producen resistencia a múltiples clases de antibióticos, debido principalmente a genes adicionales de resistencia codificados en plásmidos y transposones que se integran en el elemento SCC*mec*. Los casetes cromosomales SCC*mec* tipos IV y V, poseen un tamaño pequeño y contienen elementos genéticos móviles, lo que ocasiona que se muevan rápidamente entre los diversos ambientes genéticos de las cepas de *S. aureus* sensibles a la metilina que circulan en la comunidad (SASM-AC), aumentando la probabilidad de generación de nuevas cepas SARM-AC (16-19).

Las cepas SARM aisladas de infecciones son objeto de estudios de genética poblacional identificándose seis grupos principales de clones (complejos clonales) con base en la tipificación de secuencias multilocus (MLST), en el polimorfismo de la proteína A del gen *spa* y los diferentes tipos del elemento SCC*mec*. Estos complejos clonales (CC) se designan como CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45, cada uno de los cuales adquirió en forma independiente elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia (20). Cada CC está compuesto por aislamientos de SARM relacionados entre sí en el análisis MLST, siendo los de mayor prevalencia los clones arcaico (CC8), ibérico (CC8), brasileño (CC8), pediátrico (CC5) y el clon de New York/Japón (CC5)(19, 21, 22).

En los últimos años, la comunidad médica y científica alrededor del mundo observa con preocupación la emergencia de clones pandémicos de SARM-AC, los cuales tienen gran capacidad para causar brotes y epidemias, aunque los clones específicos que emergen varían con el área geográfica (23). Actualmente se acepta que las cepas SARM-AC representan un problema potencialmente grave cuya prevalencia está en aumento en diversas áreas del mundo, incluyendo Estados Unidos (24-26), Australia(27, 28), Asia (29-31), Brasil(32, 33) y Colombia (34, 35) entre otras (36, 37).

## **2.2. Determinantes de virulencia**

### **2.2.1. MSCRAMM**

Los factores de virulencia de *S. aureus* que determinan la patogénesis de la infección pueden ser estructurales o secretados. En el establecimiento de una infección, *S. aureus* tiene numerosas proteínas de superficie, denominados “componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de matriz” (MSCRAMM) y median la adhesión a los tejidos del hospedero (38). Las MSCRAMMs se unen al colágeno, a la fibronectina y al fibrinógeno (39). Estas moléculas parecen ser clave en la iniciación de las infecciones endovasculares, óseas, articulares e infecciones de dispositivos protésicos. En las diferentes cepas de *S. aureus* se encuentran múltiples combinaciones de MSCRAMMs y por ello se pueden llegar a causar diversos tipos de infecciones (40, 41).

### **2.2.2. Superantígenos**

Otros factores de virulencia en estas bacterias son los superantígenos (SAg), caracterizados por su capacidad para inducir fiebre, amplificar los efectos letales de otras moléculas tóxicas y en el caso de las enterotoxinas estafilocócicas, para causar la emesis observada en la intoxicación estafilocócica por alimentos. Estos superantígenos estimulan la proliferación de células T mediante la formación de un puente cruzado entre ciertas partes variables de las cadenas  $\beta$  de los receptores de las células T (TCR  $V\beta$ -), y en los dominios invariables de las cadenas  $\alpha$ -y  $\beta$  de la molécula MHC II en las células presentadoras de antígeno y macrófagos (42). Estas interacciones moleculares finalmente son los responsables

de los signos del Síndrome de Shock Tóxico (SST) (43, 44). Este síndrome está caracterizado por cuadros febriles rápidos, hipotensión arterial, prurito difuso, fallas circulatorias, vómitos, diarrea, mialgias, descamaciones cutáneas, hipoalbuminemia y falla multiorgánica (45, 46).

Cada SAg tiene un conjunto único de TCR V $\beta$  con los que interactúa. Sin embargo, la consecuencia de la interacción de los surcos con las células T y los macrófagos es el mismo: la producción masiva de citoquinas que incluye IL-2, TNF- $\alpha$  y  $\gamma$ -interferón a partir de células T CD4. En conjunto, estas citoquinas causan la mayoría de las características clínicas de SST. Además, estimulan a las células epiteliales y endoteliales para producir IL-8 y MIP-3 $\alpha$ . Estas dos quimiocinas reclutan PMN y células dendríticas y probablemente participan en las fases iniciales de la infección por *S. aureus* a través de la inducción de la inflamación, particularmente en la piel y de las mucosas (47).

### **2.2.3. Enterotoxinas**

*S. aureus* ostenta múltiples enterotoxinas (SE), denominadas así por sus capacidades para producir emesis y diarrea al ser ingeridas e inducir intoxicación alimentaria por estafilococo (48-50). Estas exotoxinas son polipéptidos antigénicos termorestables, resistentes a la hidrólisis por enzimas gástricas y pancreáticas, sintetizadas por *S. aureus* a lo largo de la fase logarítmica de crecimiento o durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria y las cuales poseen una estructura química muy similar entre ellas (51-53).

Las SEs básicamente son superantígenos que en su mayoría están relacionadas con el síndrome de shock tóxico (SST) y las intoxicaciones alimentarias, que por lo general se producen después de la ingestión de alimentos contaminados con *S. aureus* (54-56).

La respuesta sistémica con respecto a la sintomatología es consecuente con las características de un superantígeno y por ello los signos y síntomas se observarán dentro de las primeras 8 horas incluyendo náuseas y vómitos violentos, con o sin diarrea y calambres abdominales (57, 58). Este estado es autolimitado y frecuentemente desaparece a las primeras 48 horas. Sin embargo, la presentación

sintomática dependerá de la cantidad y concentración de la toxina consumida, del estado inmune del paciente y de otros estados como la edad. En casos severos se puede presentar shock (59).

Aunque en principio se pensaba que todas las SEs poseían los mismos efectos a nivel gastrointestinal, actualmente se pueden diferenciar dos grupos de enterotoxinas: el primero, que posee actividad emética demostrada, perteneciendo a este grupo SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEI, SER y SET. El segundo grupo que aún no se conocen con certeza sus capacidades emetizantes, se denomina SE-L y a éste pertenecen SEIL, SEIQ, SEIO, SEIK, SEIM, SEIP, SEIU, SEIU2 y SEIV (60, 61).

SEIQ, SEIK están codificadas por los genes *selq* y *selk* respectivamente, se encuentran en las islas de patogenicidad SaPI1, SaPI3, SaPI5 (USA 300) y en los profagos  $\Phi$ Sa3ms,  $\Phi$ Sa3mw, SEIO es codificada por el gen *selo* que se encuentra en los grupos de genes de enterotoxinas EGC3, EGC4 y en los elementos genéticos móviles MGE<sub>mw2/mssa476</sub> seh/seo, SEIM está codificada por el gen *selm* que se encuentra en las islas genómicas vSa $\beta$ I y vSa $\beta$ III (60, 61). Estas enterotoxinas actúan como superantígenos y por lo tanto tienen la capacidad para estimular grandes poblaciones de células T, con la subsecuente liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que pueden desencadenar el síndrome de shock tóxico que es potencialmente letal(49, 62).

En general, las infecciones por esta bacteria afectan principalmente la piel y el tejido subcutáneo, siendo la presentación clínica más común una foliculitis o un absceso, reportándose como factores predisponentes para su adquisición el trauma, picaduras de insectos, uso de drogas intravenosas y bajo nivel de higiene (63, 64).

#### **2.2.4. Citotoxinas**

La capacidad de estas cepas SARM-AC para causar infecciones de piel y tejidos blandos se atribuye a la presencia de diversos factores de virulencia codificados en el genoma y a su regulación coordinada por sistemas sensores de dos

componentes(65). Entre los factores de virulencia de estas cepas, se destacan las exotoxinas superantigénicas, la toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1) y la leucocidina de Panton-Valentine (PVL)(50, 62, 66).

#### **a. Leucocidina de Panton-Valentine**

En particular, se reporta que la acción tóxica de la PVL sobre los leucocitos es responsable de la alta tasa de mortalidad asociada con la neumonía necrotizante causada por cepas SARM-AC. Aunque hoy día la importancia de PVL en la patogénesis de *S. aureus* es controversial, sí existe una asociación epidemiológica entre las infecciones por SARM-AC y la presencia de PVL, la cual es infrecuente en los aislamientos de SARM hospitalarios (SARM-AH) (67).

En la década pasada el interés creciente en el estudio de aislamientos clínicos de *S. aureus* PVL positivos se debió a los brotes emergentes de infecciones severas por esta cepa en niños y adultos jóvenes previamente sanos en Estados Unidos (68) y Europa(69).

Los estudios de laboratorio muestran que los efectos tóxicos de PVL son consecuencia de la acción sinérgica de dos exo-proteínas separadas, LukS-PV y LukF-PV, las cuales están codificadas por dos genes contiguos que se transcriben simultáneamente (*lukS-PV* y *lukF-PV*) y que están contenidos en la secuencia de un bacteriófago temperado. Esta leucocidina de dos componentes, formadora de poros, tiene actividad citolítica específica contra granulocitos, monocitos y macrófagos (51)(67, 70-72)

Las cepas PVL positivas suelen asociarse con forúnculos, úlceras, infecciones cutáneas necrotizantes severas, leucopenia y hemoptisis. Así mismo, se describe una asociación entre las infecciones respiratorias, necrosis del epitelio respiratorio y neumonía necrotizante con la portación de esta leucotoxina (70, 73).

#### **b. Bacteriocinas**

Por otro lado, se encuentran las Bacteriocinas (BSA) conocidas también como Lantibióticos, son péptidos antimicrobianos de amplio espectro(74), producidos por lo general en las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina que causan

infecciones asociadas a la comunidad, los cuales aumentan el potencial de virulencia de las cepas productoras y le proporciona una ventaja competitiva con la flora normal de los individuos sanos en los diferentes nichos ecológicos. Estos péptidos están codificados por los genes *bsa*, son sintetizados en el ribosoma y modificados post-traduccionalmente. Contienen aminoácidos inusuales, tales como los residuos deshidratados y lantionina, que son generalmente activos contra especies de bacterias que están estrechamente relacionados con el organismo productor(75). La teoría de la bacteriocina, sugirió por primera vez cuando se realizó la secuenciación de la cepa FPR3757 (parte del grupo clonal de USA300) que reveló la presencia de los genes *bsa* en la isla genómica *vSAβ*, similares a los asociados con la producción de lantibióticos de *Staphylococcus epidermidis* (76).

### **c. Toxinas exfoliativas**

*S. aureus* posee toxinas exfoliativas (ETs): proteasas de serina que catalizan la destrucción de la proteína desmogleína-1, una proteína que mantiene adheridos a los queratinocitos del estrato granuloso en la epidermis. Están presentes en menos del 10% de las cepas de *S. aureus* (50). Estas toxinas están relacionadas con el síndrome de piel escaldada causada por esta bacteria y es una enfermedad secundaria a la dermatitis exfoliativa mediada por estas toxinas, que se caracteriza por la descamación diseminada del epitelio de recién nacidos y lactantes; no se encuentran microorganismos o leucocitos en las ampollas que se forman (77).

Existen dos formas distintas de toxinas exfoliativas en *S. aureus*: ETA (*toxina exfoliativa A*) que es codificada por un gen cromosómico termoestable (profago), ETB (*toxina exfoliativa B*) que es codificada por un plásmido, es termolábil y ETD (*toxina exfoliativa D*). La expresión de las ETs es regulado por el regulador de genes accesorios (*agr*)(49, 78).

#### **d. Toxina-1 del síndrome de shock tóxico**

La Toxina-1 del síndrome de shock tóxico (tsst-1) es una toxina de 22 kDa termoestable y resistente a proteólisis que produce el síndrome de shock tóxico al actuar como un superantígeno. Esta patología está asociada con la infección de una herida por *S. aureus*, causando síntomas multisistémicos como fiebre, hipotensión, exantema maculo-eritematoso, vómito en muchas modalidades, diarrea, falla renal; La mortalidad es elevada en ausencia de tratamiento. El gen que la codifica está presente en el 20% de las cepas de *S. aureus*, es un gen cromosómico que se encuentra en la isla de patogenicidad SaPI1 (*S. aureus* isla de patogenicidad 1)(49, 78).

### **2.3. Regulador de genes accesorios (*agr*)**

La virulencia de las cepas de *S. aureus* es regulada genéticamente por el *agr*, el cual controla la expresión de factores de virulencia (exotoxinas, enterotoxinas y enzimas como hemolisinas, PVL.) Este gen comprende una serie de genes cuyos productos establecen un mecanismo regulatorio de detección de la densidad de la población bacteriana; la activación del sistema depende de la producción y detección de una señal de péptido cíclico llamado el péptido autoinductor (AIP). El *agr* regula la activación de genes que favorecen la expresión de factores de virulencia y reprimen los factores de superficie, tales como adhesinas y proteína A (79).

El locus *agr* se encuentra en el cromosoma del *S. aureus*, se considera parte del genoma central y no una isla de patogenicidad. El locus contiene dos transcritos divergentes: RNAII (codifica cuatro proteínas: AgrA, AgrB, AgrC y AgrD) y RNAIII (regula la expresión de genes que codifican factores de virulencia enterotoxinas, superantígenos como TSST-1, SEB, SEC, SED, enzimas). La expresión de RNA II y RNA III está controlada por los promotores P2 y P3 respectivamente(80).

Se conocen cuatro tipos de *agr* los cuales muestran una correlación con las enfermedades producidas por *S. aureus*. El *agr* clase I es el más común y está relacionado con la enfermedad invasiva, el *agr* III está relacionado con el síndrome de choque tóxico, el *agr* IV está relacionado con la toxina exfoliativa y el

*agr* tipo II no es muy común y está relacionado con enfermedades en el ganado (79, 80).

De igual forma, en los aislamientos SARM-AC es característica la presencia del elemento SCCmec tipo IV o V. El aumento inusitado de infecciones por este tipo de cepas en la última década, especialmente en la población pediátrica, amenaza con convertirse en un problema serio de salud pública en diversas áreas del mundo, incluyendo Colombia (81-83).

#### **2.4. Modulinas Solubles en Fenol (PSMs)**

Las PSMs son péptidos hidrofóbicos con actividad citolítica y alta similitud en sus secuencias de aminoácidos. En general, las PSMs son péptidos anfipáticos, con estructura de hélices  $\alpha$ , que son secretados como productos primarios de traducción y presentan una metionina N-formilada en su extremo N-terminal (84). Se reportan en múltiples modelos *in vitro* e *in vivo* el rol de las PSMs en la patogénesis de las infecciones por cepas SARM (85). Se ha determinado que los niveles de expresión de PSMs están fuertemente asociados con la capacidad invasiva de la cepa de *S. aureus* (86).

Se ha encontrado que estos péptidos pueden reclutar, activar y posteriormente causar la lisis de los neutrófilos. Por otro lado, otros reportes muestran que PSM tiene un papel secundario en la lisis de neutrófilos humanos, actuando como potenciador de la lisis mediada por PVL(87). La estimulación de neutrófilos y monocitos mediada por las PSMs de *S. epidermidis* potencia el estallido respiratorio y la degranulación de neutrófilos, además de inhibir la apoptosis en ambos tipos celulares(88).

Otro de los aspectos patogénicos en los que han sido involucradas las PSMs es en el desarrollo de biopelículas, las cuales son causa importante de problemas tanto a nivel ambiental como en el tratamiento de infecciones. Los estudios demuestran que todos los péptidos PSMs producidos por *S. aureus* intervienen en la estructuración, separación y diseminación *in vivo* de estas biopelículas, lo cual se atribuye a las propiedades surfactantes que tienen estos péptidos anfipáticos (89).

## **2.5. Manifestaciones Clínicas**

### **2.5.1. Infecciones de piel y tejidos blandos**

#### **a. Abscesos cutáneos**

Los abscesos cutáneos son acumulaciones de pus localizadas en cavidades formadas por necrosis o desintegración del tejido dentro de la dermis y la grasa subcutánea. Son nódulos sensibles y dolorosos que progresan a pústulas fluctuantes, a menudo rodeadas por un borde eritematoso(90).

#### **b. Foliculitis, furúnculos y los carbuncos.**

**Foliculitis.** Resulta de la inflamación de los folículos pilosos, que se presenta como racimos de pequeñas pápulas o pústulas eritematosas. 39, 40 y 48 La inflamación es superficial y el pus está presente sólo en la epidermis. Los sitios más comúnmente afectados incluyen el cuero cabelludo, extremidades y las regiones paranasales y perioral, así como las áreas de la piel propensas a la humedad y a la fricción como las axilas o los muslos mediales(91).

**Forúnculos.** Son producto de una foliculitis que se extiende a través de la dermis al tejido subcutáneo. La forunculosis es poco común en la primera infancia, pero la incidencia aumenta en los adolescentes, en particular los que viven en condiciones de hacinamiento con pobres hábitos de higiene. Estas lesiones dolorosas pueden ocurrir en cualquier parte de la piel con vellos y se encuentran más a menudo en el cuero cabelludo, los glúteos o las extremidades(92).

**Carbuncos.** Los carbunclos son grupos de furúnculos caracterizados por múltiples puntos de drenaje y cambios inflamatorios en el tejido conectivo circundante. Se encuentran comúnmente en áreas de piel gruesa tales como cuello, espalda o muslos. A menudo se presenta fiebre y síntomas sistémicos y las lesiones por lo general sanan con cicatrices(93).

#### **c. Impétigo**

El impétigo es una infección bacteriana común y muy contagiosa de las capas superficiales de la epidermis. La incidencia máxima se en niños de 2 a 5 años, aunque los niños mayores también pueden verse afectadas. Generalmente ocurre en zonas expuestas del cuerpo, tales como la cara y las extremidades. Aunque

puede ocurrir linfadenitis regional, no es común la presencia de síntomas sistémicos(94).

**Impétigo no buloso.** Representa casi el 70% de los casos, con mayor frecuencia en la cara y las extremidades. Las lesiones comienzan como pápulas que evolucionan rápidamente en vesículas rodeadas de una zona de eritema pasando a la característica costra con exudado miel. Las lesiones son generalmente sin dolor, crecen gradualmente y se descomponen en un período de 4 a 6 días para formar costras gruesas. Si no se tratan las lesiones se curan lentamente, resolviendo en aproximadamente 2 semanas(94).

**Impétigo buloso.** Puede aparecer como racimos de ampollas o como una lesión solitaria, exudativa. Al principio, las vesículas superficiales crecen rápidamente para formar ampollas flácidas llenas de líquido amarillo claro, que se puede oscurecer para convertirse turbia ya veces purulenta. Las lesiones a menudo se unen para formar grandes placas, de color rojizo, sobre todo alrededor de los orificios oronasaes. Las ampollas pueden romperse, dejando a menudo una costra marrón. Pueden existir síntomas sistémicos(94).

#### **d. Celulitis**

La celulitis es una infección aguda que afecta principalmente a la dermis y el tejido subcutáneo. Las lesiones se caracterizan por edema, dolor, sensibilidad, calor, eritema y difusión con márgenes irregulares. La celulitis puede estar acompañada de linfangitis y linfadenopatías. Se produce comúnmente en las extremidades inferiores, precedidos por traumas clínicamente inaparentes en el área local. En los niños, aproximadamente el 25% de los casos de celulitis se asocian con absceso y aproximadamente el 1% con osteomielitis. Sobre la piel afectada se pueden desarrollar otras lesiones como vesículas, ampollas, petequias o equimosis. Adicionalmente esta puede diseminarse y llegar a producir una infección profunda, como la fascitis necrotizante(95).

#### **e. Síndrome de piel escaldada estafilococcica**

Síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SSSS - Staphylococcal scalded skin syndrome) es una enfermedad severa mediada por la toxina epidermolítica que

forma ampollas y su exfoliación provocada por la circulación de la toxina exfoliativa estafilocócica. Esta condición ocurre principalmente en niños menores de 6 años, con mayor frecuencia en los niños pequeños (que han disminuido la excreción renal de toxinas debido a una función renal inmadura). La infección inicia generalmente en el ojo o nasofaringe. SSSS puede limitarse a unas pocas ampollas localizadas que se revientan y dejan una base eritematosa (manifestando impétigo ampollar localizado), pero la exfoliación puede involucrar a toda la superficie del cuerpo (enfermedad de Ritter en los recién nacidos). El sello distintivo de la SSSS es la presencia de separación epidérmica en la zona granulosa (signo de Nikolsky); con la fricción, la epidermis se despega con facilidad, a menudo en grandes hojas(96).

#### **f. Paroniquia aguda**

Es una infección del tejido blando que rodea las uñas de las manos o de los pies como consecuencia de un trauma menor que facilita la entrada de bacterias a la cutícula de uñas. Los factores de riesgo para esta condición incluyen dermatitis, onicofagia y la succión digital. Se presenta con eritema, edema y sensibilidad de los extremos proximal y lateral de los pliegues de las uñas o puede extenderse por debajo y supurar(97).

#### **g. Dactilitis Ampollar**

Se observa típicamente en los niños de 2 a 16 años y se manifiesta como una ampolla no dolorosa tensa con una base eritematosa que compromete la almohadilla de grasa palmar distal de las falanges. Se pueden afectar uno o más dígitos y comúnmente no se presentan síntomas sistémicos(98).

#### **h. Fascitis necrotizante**

La fascitis necrotizante es una grave y rara infección caracterizada por una rápida necrosis de los tejidos blandos y un dolor desproporcional. Esta infección involucra la capa más profunda de la fascia superficial, pero conservando la piel adyacente. Entre aproximadamente el 30% y el 55% de los casos de fascitis necrotizante son fascitis necrotizante polymicrobianas. Algunas veces se presenta posterior a un

traumatismo menor o quirúrgico, pero en aproximadamente la mitad de los casos no se asocian a lesiones o traumas de la piel en la que está presente. Al principio de la infección, es difícil diferenciar entre una celulitis simple y una fascitis necrotizante, por lo tanto, una alta sospecha clínica es de suma importancia(99).

## **2.5.2. Infecciones invasivas**

### **a. Síndrome de Shock Tóxico (SST)**

SST es una la infección sistémica grave, potencialmente mortal, asociada con infecciones cutáneas menores u ocultas. Es causado por un superantígeno (generalmente TSST-1) que estimula la producción excesiva de mediadores inflamatorios que conducen a fuga capilar, hipotensión y fallo multiorgánico. El diagnóstico de SST es fundamentalmente clínico (100).

### **b. Piomiositis**

Se refiere a un absceso desarrollado dentro de los músculos esqueléticos. Puede ser secundaria a traumatismos, infección por varicela, o ejercicio vigoroso. Los grupos musculares más afectados suelen ser los de los muslos y las nalgas, seguidos por los grupos de la columna vertebral o los músculos del hombro. Si no se trata, la infección evoluciona produciendo calambres inespecíficos con fiebre, dolor muscular localizado con síntomas sistémicos pronunciados. La piel suprayacente presenta signos de inflamación con gran eritema y sensibilidad (101).

### **c. Endocarditis infecciosa (EI)**

La EI se define como una enfermedad en la que el endotelio cardíaco es invadido por organismos infecciosos. A partir de esta llegada por vía hematógena, se inicia un proceso inflamatorio con formación de vegetaciones que son la lesión típica de la EI. Éstas se forman por la acumulación de detritus celulares, material trombótico y microorganismos sobre los tejidos mencionados, con escasa vascularización, lo cual tiene importantes implicancias terapéuticas, pues obliga al empleo de altas dosis de antibióticos por vía parenteral para el que el tratamiento sea efectivo(102).

**Endocarditis de válvula nativa.** Se distinguen 2 formas de presentación: la aguda, caracterizada por síndrome febril de corta evolución con gran compromiso del estado general. Registros elevados de temperatura, presentándose como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o sepsis. En general su diagnóstico se efectúa dentro de los 7 días y presenta mayor mortalidad. Y la forma subaguda, que presenta un inicio insidioso, caracterizado por un síndrome febril de varias semanas a meses de evolución, con síntomas inespecíficos, con mayor frecuencia de manifestaciones autoinmunes(102).

**Endocarditis protésica.** Se define como endocarditis protésica a aquella que se produce sobre cualquier sustituto mecánico o biológico, autólogo o heterólogo de las válvulas nativas. Inicialmente se clasificó a la endocarditis protésica como precoz si se producía dentro de los 60 días del reemplazo valvular, y tardía si se producía a más de 60 días. Sin embargo, se ha propuesto extender esta definición de endocarditis protésica hasta el año denominándola endocarditis protésica temprana(102).

**d. Neumonía necrotizante.**

La neumonía necrotizante es una complicación poco frecuente de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) que se caracteriza por la aparición de focos de necrosis en las zonas de consolidación del parénquima. Absceso pulmonar, neumonía necrosante y gangrena pulmonar representan la progresión de infecciones pulmonares supurativas y son manifestaciones del mismo proceso (103). Neumonía necrosante se caracteriza por un inicio repentino y rápido empeoramiento de los síntomas, leucopenia, hemorragias de las vías respiratorias, insuficiencia respiratoria severa y una alta tasa de mortalidad (104).

**e. Osteomielitis**

La osteomielitis en general se subdivide en hematógena o no hematógena. La primera se produce normalmente cuando circulan organismos patógenos y se intercalan en las metafisis de los huesos largos debido a la lenta circulación en estas regiones. Por el contrario, la osteomielitis no hematógena es el resultado de la inoculación directa de organismos en el hueso debido a un traumatismo profundo y penetrante y fracturas abiertas. La mayoría de los casos comienzan

con una infección focal en la metáfisis ósea que progresa a la descalcificación local y destrucción ósea. La primera etapa de la osteomielitis ocurre con la congestión vascular, trombosis intravascular y aumento de la presión intraósea. La siguiente es la etapa supurativa donde el pus atraviesa los canales de Havers y forma un absceso subperióstico. Posteriormente se puede formar un secuestro cuando el suministro de sangre del periostio y endostio se ve comprometido debido al aumento de la presión y obstrucción vascular. Esto puede conducir a la formación de un involucro: nuevo hueso en crecimiento a partir del periostio. Dependiendo de tratamiento médico o quirúrgico en este punto la infección puede resolverse o progresar con complicaciones (105).

#### **f. Artritis séptica.**

También llamada artritis infecciosa, es una enfermedad inflamatoria de las articulaciones que se inicia por un agente infeccioso. Típicamente, implica una articulación grande como la rodilla o la cadera, pero también puede afectar a cualquier otra articulación. Se considera generalmente una infección secundaria, es decir, la bacteria escapa desde el torrente sanguíneo y entra en los tejidos circundantes. El enfoque inicial de la destrucción articular suele ser la unión cartilago sinovial, con la subsiguiente destrucción ósea y de cartilago. Es un proceso inflamatorio que se caracteriza por un rápido reclutamiento de granulocitos polimorfonucleares, macrófagos activados y células T. Este proceso conduce a la pérdida irreversible de la función articular (106).

### **2.6. Tratamiento de las infecciones por *S. aureus***

Con base en los lineamientos emitidos por el panel de expertos pertenecientes a la Sociedad Americana de enfermedades infecciosas (IDSA- Infectious Diseases Society of America), los pacientes pediátricos con infecciones por *S. aureus* deben ser tratados según su condición clínica. Por lo tanto, procedieron esquematizar las recomendaciones para el tratamiento de las infecciones de piel y tejidos blandos producidas por *S. aureus aureus* (107); así como también las recomendaciones para el tratamiento de las infecciones invasivas por esta bacteria más relevantes (108).

**Tabla 1. Recomendaciones para el Tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos por *Staphylococcus aureus*.**

Entidad	Antibiótico	Dosis, niños	Comentario
<b>Impétigo (<i>Staphylococcus</i> y <i>Streptococcus</i>)</b>	Dicloxacilina	N / A	N / A
	Cefalexina	25-50 mg / kg / día en 3-4 dosis divididas VO	N / A
	Eritromicina	40 mg / kg / d en 3-4 dosis divididas VO	Algunas cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i> pueden ser resistentes.
	Clindamicina	20 mg / kg / d divididos en 3 dosis po	N / A
	Amoxicilina-clavulánico	25 mg / kg / d del componente de amoxicilina en dosis divididas 2 VO	N / A
	Ungüento Retapamulina	Aplicar a lesiones	Para los pacientes con número limitado de lesiones
	Ungüento de mupirocina	Aplicar a lesiones	Para los pacientes con número limitado de lesiones
	<b>MSSA SSTI</b>	Nafcilina u oxacilina	100-150 mg / kg / día divididos en 4 tomas
Cefazolin		50 mg / kg / día divididos en 3 tomas	Para los pacientes alérgicos a la penicilina, excepto aquellos con reacciones de hipersensibilidad inmediata. Más conveniente que la nafcilina con menor supresión de la médula ósea
Clindamicina		25-40 mg / kg / d en 3 dosis	Bacteriostática; potencial de resistencia cruzada y la

		divididas o IV 25-30 mg / kg / d divididos en 3 dosis po	aparición de resistencia en cepas resistentes a la eritromicina; resistencia inducible en MRSA
	Dicloxacilina	25-50 mg / kg / d en 4 dosis divididas VO	Agente oral de elección para las cepas susceptibles a la meticilina en los adultos. No se utiliza mucho en pediatría
	Cefalexina	25-50 mg / kg / d 4 dosis divididas VO	Para los pacientes alérgicos a la penicilina, excepto aquellos con reacciones de hipersensibilidad inmediata. La disponibilidad de una suspensión y el requisito para una dosificación menos frecuente
	Doxiciclina, minociclina	No se recomienda para la edad <8 años	Bacteriostática; limitada experiencia clínica reciente
	Trimetoprim-sulfametoxazol	8-12 mg / kg (basado en el componente trimetoprim), ya sea en 4 dosis divididas IV o 2 dosis divididas VO	Bactericida; eficacia mal documentada
<b>MRSA SSTI</b>	Vancomicina	40 mg / kg / día divididos en 4 tomas IV	Para los pacientes alérgicos a la penicilina; drogas por vía parenteral de elección para el tratamiento de infecciones causadas por MRSA
	Linezolid	10 mg / kg cada 12 h IV o VO para los niños <12 años	Bacteriostática; experiencia clínica limitada; hay resistencia cruzada con

			otras clases de antibióticos; costoso
	Clindamicina	25-40 mg / kg / día divididos en 3 tomas IV o 30-40 mg / kg / día divididos en 3 tomas VO	Bacteriostática; potencial de resistencia cruzada y la aparición de resistencia en cepas resistentes a la eritromicina; resistencia inducible en MRSA. Opción importante para los niños
	La daptomicina	N / A	Bactericida; posible miopatía
	Ceftaroline	N / A	Bactericida
	Doxiciclina, minociclina	No se recomienda para la edad <8 años	Bacteriostática; limitada experiencia clínica reciente
	Trimetoprim-sulfametoxazol	8-12 mg / kg / d (basado en el componente trimetoprim), ya sea en 4 dosis divididas IV o 2 dosis divididas VO	Bactericida; limitado

**Tabla 2. Recomendaciones para el Tratamiento de infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus*.**

Manifestación	Tratamiento	Dosis pediátrica	Comentario
<b>Bacteremia</b>	Vancomicina	15 mg/kg/dosis IV cada 6 h	No se recomienda habitualmente la adición de gentamicina o rifampicina a la vancomicina.
	Daptomicina	6–10 mg/kg/dosis IV QD	
<b>Endocarditis infecciosa, válvula nativa</b>	Lo mismo para bacteremias		
<b>Endocarditis infecciosa, válvula protética</b>	Vancomicina	15 mg/kg/dosis IV cada 6 h	
	Gentamicina	1 mg/kg/dosis IV cada 8 h	
	Rifampina	5 mg/kg/dosis VO/IV cada 8 h	

<b>Bacteremia Persistente</b>			
<b>Pneumonia</b>			
	Vancomicina	15 mg/kg/dosis IV cada 6 h	
	Linezolid	10 mg/kg/dosis VO/IV cada 8 h, no exceder 600 mg/dosis	Para niños de ≥12 años, 600 mg VO / BID IV
	Clindamicina	10–13 mg/kg/dosis VO/IV cada 6–8 h, no exceder 40 mg/kg/día	
<b>Infecciones óseas y articulares</b>			
<b>Osteomielitis</b>	Vancomicina	15 mg/kg/dosis IV cada 6 h	La asociación del desbridamiento quirúrgico y drenaje de abscesos de tejidos blandos es el pilar de la terapia. Algunos expertos recomiendan la adición de rifampicina 600 mg una vez al día o 300 a 450 mg dos veces al antibiótico elegido. Para los niños ≥12 años de edad, se debe utilizar linezolid 600 mg VO BID / IV. Una sola fuerza y tableta DS de TMP-SMX contiene 80 mg y 160 mg de TMP, respectivamente..
	Daptomicina	6–10 mg/kg/día IV QD	
	Linezolid	10 mg/kg/dosis VO/IV cada 8 h, no exceder 600 mg/dosis	
	Clindamicina	10–13 mg/kg/dosis VO/IV cada 6–8 h, no exceder 40 mg/kg/día	
	TMP-SMX y rifampin	ND	
<b>Artritis Séptica</b>	Vancomicina	15 mg/kg/dose IV every 6 h	Drainage or debridement of the joint space should always be performed (All).
	Daptomycin	6–10 mg/kg/dosis IV QD	
	Linezolid	10 mg/kg/dosis VO/IV cada 8 h, no exceder 600 mg/dosis	
	Clindamicina	10–13 mg/kg/dosis VO/IV cada 6–8 h, no exceder	

		40 mg/kg/día	
	TMP-SMX	ND	
<b>Articulación protésica, Infecciones de implantes espinales</b>			
<b>Infecciones del Sistema Nervioso Central</b>			
<b>Meningitis</b>	Vancomicina	15 mg/kg/dosis IV cada 6 h	Algunos expertos recomiendan en niños de ≥12 años de edad, linezolid 600 mg BID.
	Linezolid	10 mg/kg/dosis VO/IV cada 8 h, no exceder 600 mg/dosis	
	TMP-SMX	ND	
<b>El absceso cerebral, empiema subdural, absceso epidural espinal</b>	Vancomicina	15 mg/kg/dosis IV cada 6 h	Algunos expertos recomiendan en niños de ≥12 años de edad, linezolid 600 mg BID.
	Linezolid	10 mg/kg/dosis VO/IV cada 8 h, no exceder 600 mg/dosis	
	TMP-SMX	ND	
<b>Trombosis séptica del seno venoso cavernoso o de la duramadre</b>	Vancomicina	15 mg/kg/dosis IV cada 6 h	Algunos expertos recomiendan en niños de ≥12 años de edad, linezolid 600 mg BID.
	Linezolid	10 mg/kg/dosis VO/IV cada 8 h, no exceder 600 mg/dosis	
	TMP-SMX	ND	

### 3. Planteamiento del problema

El *Staphylococcus aureus* es una especie versátil y con un gran potencial patogénico, es encontrada como factor etiológico de infecciones localizadas en piel y tejidos blandos, neumonía, meningitis, poliposis nasal; así como también de eventos sistémicos como bacteremias, endocarditis y sepsis (2-4). *S. aureus* puede ser un miembro natural de la microbiota humana y se localiza principalmente a nivel de las narinas y en menor proporción en axilas, periné, tracto gastrointestinal y vagina (5-8). En las personas se pueden diferenciar tres tipos de portadores con base en su patrón de colonización nasal: Los portadores persistentes, representados hasta en un 30% de la población, los portadores intermitentes con un 30% (12-70%) y los no portadores (con hasta un 69%). De estos últimos se piensa que nunca son colonizados por la bacteria (9-12).

Por otro lado, la tasa de mortalidad para los pacientes pediátricos oscila entre 25% y 34,2% para aquellos infectados por SARM y SARM, respectivamente(1). Según Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC - Centers for Disease Control and Prevention), en el año 2012, las infecciones por SARM mostraron una tasa de incidencia de 18,74 por cada 100.000 habitantes, disminuyendo un 8,7% al comparar estos datos con el año 2008 (27,08 por cada 100.000 habitantes) (109).

Por su parte, *S. aureus* presenta una característica frecuente, su capacidad de resistencia frente a la meticilina y a casi todos los  $\beta$ -lactámicos. Esta propiedad clasifica en dos grandes grupos a la especie, denominando a las variedades resistentes *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) y a las que permanecen sensibles *Staphylococcus aureus* Sensible a Meticilina (SASM). Esta particularidad genética de resistencia es conferida por el Casete Cromosómico Estafilocócico mec (SCCmec) el cual lleva inmerso los genes Mec, que codifican para esta cualidad. Por lo tanto, las líneas emergentes de SARM son producto de la inserción del elemento SCCmec al genoma de cepas sensibles(18, 110-112).

Aunque tanto las cepas SARM como SASM muestran características clínicas muy similares, algunos autores describen que las infecciones por SARM suelen ser

más severas y tienden a diseminarse más al compararlas con las infecciones producidas por SARM(113). Sin embargo, otros autores aseguran que las cepas de SARM poseen una mayor variedad genética y por lo general son las principales causas de las infecciones de piel y tejidos blandos (114).

Las cepas SARM se encuentran bien establecidas a nivel mundial, tanto en los ambientes hospitalarios (*S. aureus* resistente a meticilina asociado a los hospitales, HA-SARM) como en la comunidad (*S. aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad, CA-SARM). Las SARM se encuentran dentro de las principales causas de infecciones de piel y tejidos blandos, así como también de infecciones nosocomiales a nivel mundial (115, 116).

En Latinoamérica, se considera que la tasa de SARM permaneció relativamente estable entre los años 2004 (44.6%) y 2010 (40.1%) y en Colombia particularmente, se estima que estas cepas pueden llegar a representar una media del 37.1% de las infecciones por *S. aureus* (117). En Cartagena, existen múltiples estudios en diferentes grupos poblacionales que describen las frecuencias de colonización nasal, las características moleculares y de resistencia antibiótica que estas cepas poseen (118-121). Sin embargo, no existen suficientes estudios que describan las infecciones producidas por *S. aureus* a nivel local. Adicionalmente, no se cuentan con datos en epidemiología molecular suficientes que puedan dilucidar el comportamiento de este microorganismo ni la proporción de cepas SARM causantes de infecciones. Por lo tanto, no se conocen con certeza las diferencias genéticas que podrían estar relacionadas con un patrón molecular específico al relacionarlos con manifestaciones clínicas y aún más con su progresión y desenlace.

Por lo anterior, el presente proyecto planteó el siguiente interrogante: ¿Cuáles son las características genéticas y de resistencia de las cepas SARM y SARM causantes de infecciones de los pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja de Cartagena entre enero y junio de 2012?

#### 4. Justificación

En el marco del grupo de investigación en Genética y Biología Molecular (GEBIMOL) de la Universidad de Cartagena, se ejecutan proyectos aprobados y financiados internamente por la misma Universidad y externamente por Colciencias. Estos proyectos son aprobados por el comité de ética institucional. Con base en el objetivo principal de GEBIMOL, el grupo lleva a cabo investigaciones referentes a las características que pueden ayudar a establecer las diferencias epidemiológicas del *S. aureus* y con ello un posible sistema de vigilancia que ayude a describir el comportamiento sobre este microorganismo.

Debido a la ubicuidad del *S. aureus* y a su gran capacidad patogénica, esta bacteria se reconoce como un microorganismo con gran capacidad para diseminarse ya que por la naturaleza de sus reservorios podría aumentar tanto la colonización como las infecciones de los individuos susceptibles (12, 122). Por lo tanto, determinar el comportamiento epidemiológico de *S. aureus* y su variabilidad genética y de resistencia corresponden a un objetivo en un contexto específico ya que la variación de estos elementos se distribuye heterogéneamente en condiciones geográficas diferentes.

Para lograr lo anterior, se hace necesario obtener un conocimiento profundo que domine con claridad y analice las características moleculares, clínicas y de resistencia para establecer la relación existente entre los factores de riesgo, la progresión clínica y la evolución genómica. Con esto se puede contribuir al diseño de estrategias o el fortalecimiento de las conductas existentes en cuanto a la prevención, diagnóstico, control y tratamiento de un microorganismo con una gran diversidad de factores de virulencia y que cada vez se posiciona mejor como un patógeno emergente a nivel mundial.

## 5. Objetivos

### 5.2. Objetivo general

Describir los perfiles genéticos y de resistencia antibiótica de las cepas SARM y SASM causantes de infecciones en niños en la ciudad de Cartagena de Indias de enero a julio de 2012.

### 5.3. Objetivos específicos

1. Determinar el perfil de resistencia antibiótica de las cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de infecciones en pacientes pediátricos atendidos en el hospital infantil Napoleón Franco Pareja de Cartagena.
2. Determinar los tipos y subtipos de elementos genéticos SCCmec de las cepas meticilino-resistentes.
3. Caracterizar los perfiles de genes de toxinas y el regulador de genes accesorios (agr) de las cepas SASM y SARM.
4. Determinar la prevalencia de los complejos clonales CC5 y CC8 de las cepas del estudio.
5. Tipificar el perfil genético en las cepas de *Staphylococcus aureus* mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE).
6. Comparar las características genéticas de SARM y SASM obtenidas en el estudio.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Tipo de estudio, población, y recolección de la muestra

El presente fue un estudio observacional de corte transversal, en el que a un grupo de aislados de *S. aureus* obtenidos de pacientes con infecciones por esta bacteria se les determinó mediante ensayo por PCR, los perfiles de enterotoxinas, presencia del gen *mecA*, pertenencia a complejos clonales CC5 y CC8, tipificación y subtipificación del SCCmec, tipificación del AGR, y tipificación molecular de todos los aislados del estudio mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Además, se les determinó los patrones de resistencia a antibióticos según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Los aislamientos se clasificaron respectivamente como SARM y SASM basados en la presencia o ausencia del gen *mecA*. Las características moleculares y factores de resistencia antibiótica se compararon entre los aislamientos SARM y SASM. Adicionalmente se correlacionaron los datos moleculares con los tipos de cepa, los datos sociodemográficos y clínicos.

La población estuvo constituida por pacientes pediátricos diagnosticados con infección por *S. aureus* atendidos en el hospital infantil Napoleón Franco Pareja en Cartagena de Indias entre enero y julio de 2012. El diagnóstico clínico fue confirmado mediante cultivo y pruebas microbiológicas y moleculares específicas para la especie *Staphylococcus aureus*. Para el estudio se contó con el consentimiento informado de los padres o cuidadores de los respectivos pacientes. El muestreo para este estudio fue de tipo no probabilístico, accediéndose a la totalidad de la población disponible durante el periodo de estudio, fijado entre enero y julio de 2012.

### 6.2. Aspectos Éticos

Esta investigación está clasificada como de riesgo mínimo con base en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, ya que estuvo basada en el análisis de la

información de las historias clínicas y de los aislamientos clínicos obtenidos durante el diagnóstico microbiológico rutinario realizado en la institución hospitalaria. Sin embargo, se solicitó previamente la aceptación del ingreso al estudio a los cuidadores del menor a través de la firma del consentimiento informado (ver anexo No. 1), explicándoseles los objetivos del estudio, junto a los beneficios que los resultados derivados del mismo traería a la investigación en el área epidemiológica, los cuales además ayudarían a un mejor manejo clínico de estas infecciones en nuestra área. A los participantes se les garantizó la confidencialidad y anonimato de su participación, la cual fue opcional y no obligatoria. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Cartagena y el del Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja.

Para el desarrollo del presente trabajo se tomaron los aislamientos correspondientes a los casos clínicos en los que se contó con la información respectiva referente a demografía, factores asociados a la infección, características clínicas y moleculares. Estos aislamientos fueron caracterizados microbiológica y molecularmente en cuanto a la presencia del tipo de Agr, los perfiles de toxinas que ostentan, el complejo clonal al que pertenecen, resistencia a antibióticos, resistencia a meticilina (MecA). A los aislamientos meticilino resistentes (SARM) se les realizó además la tipificación y subtipificación del casete cromosomal estafilocócico mec (SCCmec), y la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos oxacilina y vancomicina. A todos los aislamientos se les realizó la tipificación del perfil genético mediante PFGE.

### **6.3. Fases del estudio**

- Identificación de los pacientes con infecciones por *S. aureus* a través del análisis microbiológico realizado en la institución participante
- Revisión de las historias clínicas y tabulación de la información
- Transporte de la muestra de *S. aureus* positivas al laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cartagena

- Procesamiento, análisis microbiológico y confirmación de las muestras (cultivo en manitol, repique de las colonias en agar nutritivo por 24 horas, realización de Gram, prueba de coagulasa, aglutinación en látex y catalasa)
- Realización de los ensayos moleculares
- Análisis de los resultados

### **6.3.1. Métodos Microbiológicos**

#### **a. Tinción de Gram**

La tinción de Gram se realizó mediante la preparación de extendidos de *S. aureus* a partir de cultivos en agar nutritivo de 24 horas de crecimiento a 37°C. El extendido se fijó con calor, se le adicionó cristal violeta por un minuto y se enjuagó con agua. Seguidamente, se le adicionó lugol con las mismas características en tiempo y lavado que el colorante anterior. Luego de ello, se decoloró con alcohol acetona, se enjuagó y se adicionó safranina. Luego de un minuto se enjuagó y se dejó secar a temperatura ambiente para ser observado al microscopio con los objetivos de 10X, 40X y 100X.

#### **b. Prueba de la catalasa**

Para esta prueba se utilizó una colonia con 24 horas de crecimiento en agar nutritivo y se colocó sobre un portaobjetos, posteriormente se le adicionó una gota de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Luego, se determinó la producción de catalasa teniendo en cuenta la formación de burbujas.

#### **c. Prueba de coagulasa**

Esta prueba se realizó, mezclando un cultivo de caldo o de colonias extraídas de una placa de agar a un tubo con plasma de conejo BBL rehidratado. Esta mezcla se incubó a 37°C hasta por 24 horas. La formación de un coágulo en el plasma indicaba la producción de coagulasa.

#### **d. Prueba de aglutinación en látex**

En este ensayo se usaron colonias de *S. aureus* obtenidas de cultivos en agar nutritivo de 24 horas de crecimiento a 37°C. Se tomaba una cantidad equivalente a seis colonias con un asa y se colocaban en una gota del reactivo Staphaurex® previamente extendida en una superficie lisa, limpia e impermeable. Para obtener la aglutinación fue necesario frotar circularmente las colonias sobre el reactivo durante 20 segundos. Si la reacción era positiva se observaba la aglutinación a simple vista.

#### **e. Determinación de los Perfiles de Resistencia a Antibióticos.**

La susceptibilidad antibiótica se realizó a través de la prueba de difusión en disco con base en las especificaciones del CLSI(123). Asimismo se evaluó la inhibición por difusión en doble disco (D-Test) siguiendo los parámetros del CLSI. A las cepas SARM se les evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a vancomicina (concentraciones de 0,5 a 32 µg/ml) y oxacilina (concentraciones de 0,5 a 64 µg/ml) mediante el método de microdilución en agar, bajo las condiciones recomendadas por el CLSI (123).

#### **6.3.1.5.1. Método de Difusión en Disco (Método de Kirby Bauer).**

Este procedimiento se desarrolló teniendo en cuenta las recomendaciones propuestas por el CLSI. Para esto se realizó para cada aislamiento confirmado de *S. aureus* una siembra masiva en medio de Müller Hinton, a partir de un inóculo preparado en solución salina con una absorbancia equivalente a la de un estándar 0.5 McFarland ( $ABS_{620nm}$ : 0.1 – 0.08) que resultaba en una suspensión con aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Posteriormente, se colocaron los discos correspondientes a los antibióticos oxacilina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, cefoxitina, trimetoprim/sulfametoxazol y rifampicina. Para la evaluación y determinación de la sensibilidad o grado de resistencia de los aislados se consideraron los parámetros determinados por el CLSI.

#### **6.3.1.5.2. Método de Microdilución en agar.**

Para este ensayo se prepararon soluciones antibióticas para vancomicina y oxacilina. Éstas se realizaron a partir de diluciones seriadas dobles en un rango de dilución de 0.5 – 32 ug/mL. Se preparó una solución de antibiótico a 640ug/mL y a partir de ésta se realizaron las siguientes diluciones hasta alcanzar la concentración de 10ug/mL. Posteriormente, esta solución antibiótica se mezcló con el agar Müller Hinton a su concentración correspondiente. A continuación, el medio se inoculó siguiendo un patrón de siembra específico a concentraciones bacterianas estandarizadas. Estas concentraciones se realizaban mediante la resuspensión de colonias de un cultivo bacteriano de 18-24 horas de crecimiento en solución salina, para obtener una turbidez que alcanzara una absorbancia equivalente a un estándar 0.5 McFarland ( $ABS_{620nm}$ : 0.1 – 0.08). Esto resultaba en una suspensión con aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Para determinar algún deterioro en la actividad antibiótica o descartar cualquier tipo de contaminación se utilizaron cepas de control de calidad que acompañaron cada determinación.

#### **6.3.2. Métodos Moleculares**

##### **a. Extracción de ADN bacteriano**

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de los cultivos de 24 horas en medio nutritivo siguiendo la metodología descrita por Bettín *et al*(118). Las colonias obtenidas fueron resuspendidas en 1ml de Tris-HCl (0.5 M; pH: 8.0) para luego centrifugarse a 13.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, tras descartar el sobrenadante, el precipitado era resuspendido en 0.5 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH: 8.0 + EDTA 1mM), calentada a 100°C por 30 minutos y enfriada a -35 °C durante 20 minutos. Luego de este choque térmico, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm por 15 minutos, y el sobrenadante conteniendo el ADN fue recolectado en nuevos tubos. Al ADN resultante se le determinó su grado de pureza mediante lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a longitud de onda de 260 y 280 nm. Las muestras con una relación de  $A_{260} / A_{280}$  de 1,6 a

1,8 indicativo de un ADN de buena calidad fueron almacenadas a -80°C hasta su uso en ensayos moleculares.

#### **b. Determinación de la presencia de los genes *MecA*, *nuc*, y *PVL***

La determinación de la presencia de los genes *mecA*(124), *nuc*(125) y *PVL*(126) de todos los aislamientos incluidos en el estudio se realizó utilizando los parámetros descritos en el protocolo(119).

La PCR múltiple de todos los aislados de *Staphylococcus aureus* se llevó a cabo utilizando tres juegos de oligonucleótidos: *MecA*1F – *MecA*2R (124) que amplificaba un fragmento de 147 pb del gen *MecA*; *Nuc*1F – *Nuc*2R (125) que amplificaba un fragmento de ~300 pb del gen *nuc* específico de *Staphylococcus aureus*, *LukPV*1F – *LukPV*2R (126) que amplificaba un fragmento de 437 pb del gen que codifica para *PVL*.

El ADN se sometió a amplificación en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.2 uM de cada primer y 5 uL de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Como controles se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (*MecA* +; *Nuc* +; *PVL* -) y ATCC 25923 (*MecA* -; *Nuc* +; *PVL* +) y como control negativo de la reacción se utilizó agua ultrapura. Todos los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio 0.5 ug/ml, mediante un transiluminador de luz UV.

#### **c. Tipificación del locus *Agr* por PCR múltiple**

La tipificación del *agr* de todos los aislamientos incluidos en el estudio se realizó mediante PCR, utilizando primers localizados en la región variable de los genes *agrC* y *agrD*, reportado por Shopsis y colaboradores(127), los cuales son específicos para cada uno de los tipos de *agr* (I, II, III y IV). Se utilizó un cebador directo pan-AGR en todas las reacciones, las secuencias de los cebadores se obtuvieron a partir de las bases de datos GenBank. Los grupos de *agr* se

identificaron por los tamaños de los productos esperados. Para la tipificación se realizaron dos PCR múltiples. En la primera PCR se evaluaron los agr tipo I (440pb) y IV (588pb) y en la segunda los tipos II (572pb) y III (406pb).

El ADN fue amplificado en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.5 uM de cada primer y 5 uL de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 25 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, y 72°C por 1 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Como controles se utilizaron cepas de referencias específicas para cada tipo de agr. Todos los productos fueron visualizados mediante un transiluminador de luz UV en gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio 0.5 ug/ml.

#### **d. Determinación de los perfiles de toxinas**

A todos los aislamientos se les evaluó la presencia de los genes que codifican para las enterotoxinas estafilocócicas SEM, SEK, SEQ, SEO, EXO $\alpha$ , BSA y TST, mediante PCR múltiple con base en protocolos estandarizados previamente. Se utilizaron cebadores específicos para cada una de las toxinas. Las secuencias de los cebadores se obtuvieron a partir de las bases de datos GenBank. Los juegos de cebadores se combinaron en tres reacciones simultáneas según el peso de su producto en dos PCR múltiples para asegurar la confiabilidad y reproducibilidad del ensayo. Para la primera PCR se utilizaron los cebadores para *Sek*, *Seq*, *Seo*, y *Tst* que amplificaban un fragmento de 596pb, 326pb, 180pb y 130pb, respectivamente. Para la segunda PCR se utilizaron los cebadores para *Sem*, *Bsa* y *Exoalfa*, que amplificaban un fragmento de 376pb, 296pb y de 167pb, respectivamente. Se incluyeron cepas controles positivos para cada uno de los genes a amplificar: Mu50 (*tst*, *sem* y *seo*), USA 300-0114 (*sek*, *seq*, *eta*, *bsa*) y un control negativo.

El ADN fue amplificado en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.2 uM de cada primer y 5 uL

de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 25 ciclos de 95°C por 45 seg , 54°C por 45 seg, y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Todos los productos fueron teñidos con bromuro de etidio 0.5 ug/ml y visualizados a través de luz UV en gel de agarosa al 1.5%.

#### **e. Tipificación y sub-tipificación del casete cromosómico estafilocócico SCCmec**

A todos los aislados confirmados como SARM se les realizó la tipificación del casete SCCmec, por medio de la amplificación de fragmentos específicos de la región J1, mediante PCR múltiple(128). Se utilizaron cebadores específicos para cada uno de los tipos de SCCmec (I, II, III, IV). Las secuencias de los cebadores se obtuvieron de las bases de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El ADN fue amplificado en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.25 uM de cada primer y 5 uL de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 seg , 53°C por 30 seg, y 72°C por 1 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 4 min. Todos los productos fueron teñidos con bromuro de etidio 0.5 ug/ml y visualizados en gel de agarosa al 2.0%, usando un transiluminador de luz UV. Como controles se utilizaron las cepas de referencia para cada tipo de SCCmec.

A las cepas con SCCmec tipo IV, se les realizó la subtipificación de este casete mediante PCR múltiple. Se utilizaron cebadores específicos para cada uno de los subtipos de SCCmec IV reportados previamente: IVa (278 pb), IVb (336 pb), IVc (483 pb), IVd (575 pb), IVg (792 pb) y IVh (663 pb,)(129). El ADN fue amplificado en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.25 uM de cada primer y 5 uL de ADN molde. La

reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 seg , 48°C por 30 seg, y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 4 min. Todos los productos fueron teñidos con bromuro de etidio 0.5 ug/ml y visualizados en gel de agarosa al 2.0%, usando un transiluminador de luz UV. Se utilizó un control interno de 203 pb que codifica para una recombinasa *ccrB2* específica del gen que codifica para SCC mec de tipo IV y se utilizaron controles positivos específicos para cada subtipo de SCCmec IV.

#### **f. Asignación de los complejos clonales CC8 y CC5**

Para clasificar en su respectivo complejo clonal a cada uno de los aislamientos del estudio, se realizó una PCR en donde se utilizaron primers específicos para cada uno de los genes carbamato quinasa (*arcC*-332 pb) y guanilato quinasa (*gmk* -557 pb). Estos amplifican las secuencias ST5 y ST8 respectivamente y cuyas secuencias fueron obtenidas de las bases de datos MLST ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)). El ADN fue amplificado en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.5 uM de cada primer y 5 uL de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 seg , 50°C por 30 seg, y 72°C por 1 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Todos los productos fueron teñidos con bromuro de etidio 0.5 ug/ml y visualizados en gel de agarosa al 2.0%, usando un transiluminador de luz UV. Luego de la amplificación de los genes, se realizó la restricción con la endonucleasa *Sma*I, para permitir su diferenciación por el tamaño de los fragmentos obtenidos. Posteriormente, se realizó nuevamente una electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos. Como controles se utilizaron las cepas de referencia USA300-0114 (ST8) y CHL93 (ST5)(130).

#### **g. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)**

A todos los aislamientos incluidos en el estudio se les realizó la PFGE siguiendo el protocolo de Mulvey *et al*(131) y Tenover *et al*(132). Para cada aislamiento cultivado en agar nutritivo por 24 horas, se tomó una colonia y se inoculó en caldo TSB (Tryptone Soya Broth) y se incubó en agitación a 200 rpm a 37°C por 18hr. Posteriormente, se centrifugó a 4.000 rpm por 10 min a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante el sedimento se resuspendió en buffer de suspensión celular y se centrifugó a 11.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sedimento se suspendió nuevamente en este mismo buffer para ser tratado subsiguientemente con lisostafina en moldes de agarosa al 2% (Pulsed Field Certified Agarose, BIO-RAD) y tratados con Proteinasa K. Luego de ser lavados, los bloques se sometieron a digestión con la enzima de restricción Sma I. Para la electroforesis se utilizó el equipo CHEF (BioRad) utilizando los siguientes parámetros: ángulo 120°, gradiente de voltaje 6.0 v/cm, temperatura de 14°C. Se programaron 2 bloques de la siguiente manera: Bloque 1: tiempo inicial “switch” 5 segundos, tiempo final “switch” 15 segundos, tiempo de corrido 10 horas. Bloque 2: tiempo inicial “switch” 15 segundos, tiempo final “switch” 60 segundos, tiempo de corrido 13 horas. Finalmente el ADN fragmentado se sometió a tinción con bromuro de etidio durante una hora, y se visualizó en un transiluminador de luz UV(131).

#### **6.4. Análisis estadístico.**

Los resultados moleculares y perfiles de resistencia obtenidos fueron sometidos a análisis comparativo para identificar diferencias entre los grupos meticilino-resistentes (SARM) y meticilino-sensibles (SASM). Se realizó un análisis descriptivo de las variables tanto cualitativas como cuantitativas para conocer su distribución. Para determinar la asociación entre los tipos de infección y las características clínicas se realizó un análisis univariado y bivariado utilizando la prueba  $\chi^2$ , el test exacto de Fisher y la prueba T Student. Para efectos de corrección, se tuvieron en cuenta las variables de confusión relacionadas con las características clínicas, microbiológicas y moleculares de cada caso. El análisis se llevó a cabo con el programa SPSS para Windows versión 19.0, asumiendo un límite de significancia inferior a 0,05.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Características Sociodemográficas

Durante el periodo comprendido entre enero y julio de 2012, en el Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja se reportaron 94 casos de infección por *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad. Solo se contó con la Historia Clínica de un subgrupo de 73 pacientes, siendo imposible la recuperación del resto de las historias clínicas. De acuerdo a esto, se encontró que la edad promedio de este subgrupo de pacientes con historial clínico disponible fue de 7,1 años (DE=4,9) y la frecuencia de hombres y mujeres fue 50 (68,5%) y 23 (31,5%), respectivamente (Figura 1). Con respecto a la procedencia de los pacientes, 46 (63%) provinieron del área urbana y 27 (37%) de áreas rurales. Asimismo, 39 (53,4%) pacientes reportaron un trauma como el principal evento asociado a la infección. La manifestación clínica más prevalente fue la infección de piel y tejidos blandos con 48 (65,8%) casos, mientras que las infecciones invasivas se presentaron en 25 (34,2%) casos (Figura 2). La media de la estancia hospitalaria fue de 16,2 (DE=28,6) días. En la tabla 1 se resumen los datos demográficos de los casos discriminados por el tipo de cepa causante de la infección (SASM o SARM), en la que no se observa asociación estadística alguna entre las variables analizadas.

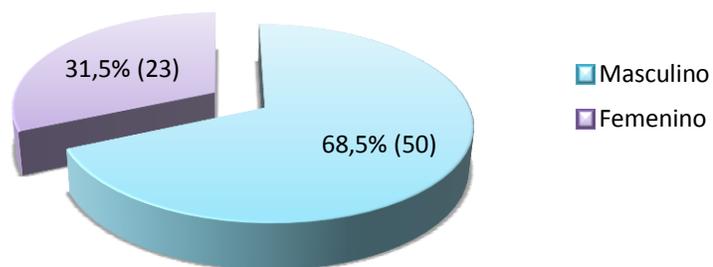
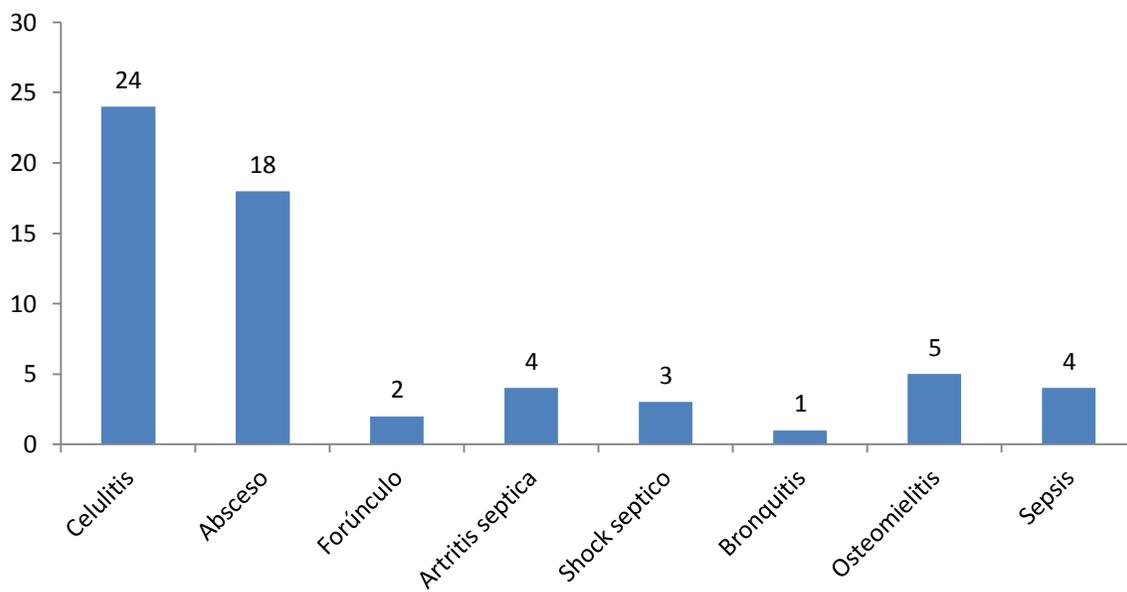


Figura 1. Distribución por sexo de los participantes



**Figura 2.** Distribución de las condiciones clínicas halladas en los pacientes pediátricos infectados por *S. aureus*

**Tabla 3.** Comparación demográfica de los casos por SASM/SARM

Variable	N=62		Valor p
	SASM	SARM	
Sexo (Masculino/Femenino)*	26/11	24/12	0,74
Edad – Años ((Media (DE))**	6,8 (4,9)	7,4 (5)	0,60
Procedencia (Urbana/Rural)*	20/17	17/10	0,1
Área de ingreso (Urgencias/Otro)	35/2	25/11	0,005
Estancia Hospitalaria (Media (DE))**	17,4 (21,9)	14,9(34,5)	0,71
Tipo de infección (Piel y tejidos blandos/Invasiva)*	22/14	26/10	0,31

Para el análisis estadístico se usó Chi cuadrado\* y La prueba T de Student\*\*.

## 7.2. Resistencia antibiótica

### 7.2.1. Kirby Bauer

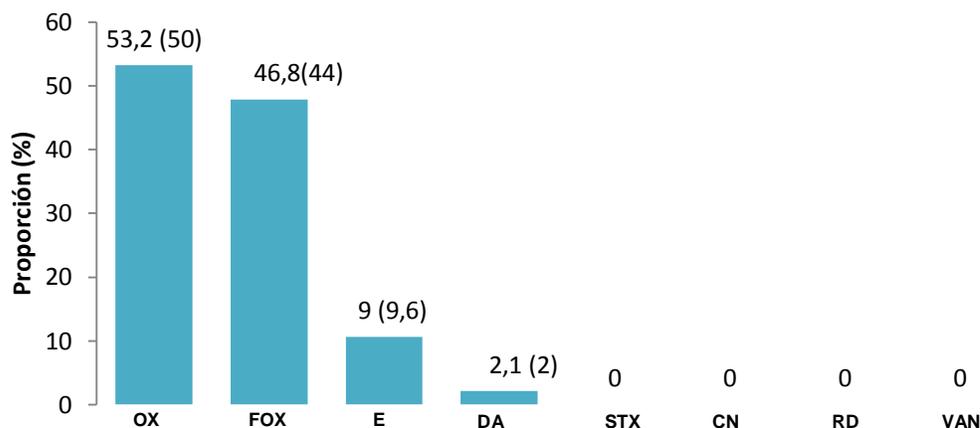
Adicionalmente, los perfiles de resistencia antibiótica de los aislados fueron evaluados mediante la prueba Kirby Bauer. En el grupo de 94 aislados no se encontró resistencia a los fármacos gentamicina, trimetoprin/sulfamotiazol, rifampicina y vancomicina. No obstante, 50 mostraron resistencia a la oxacilina (53,2%), 44 fueron resistentes a la cefoxitina (46,8%), 9 a la eritromicina (9,6%) y 2 a clindamicina (2,1%). No se halló prueba D positiva en las cepas del estudio (Figura 2). En la tabla 2 se observa la heterogeneidad de los perfiles de resistencia

antibiótica al contrastar los aislados SASM y SARM; en ésta se observa una diferencia significativa entre los dos grupos con respecto a la eritromicina ya que en los aislados SASM se presentó sólo una cepa resistente, mientras que ocho cepas SARM lo fueron.

### 7.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria

A todos los aislamientos SARM del estudio se les fue realizado la prueba MICs para los antibióticos oxacilina y vancomicina a concentraciones de 0,5 µg/mL a 64 µg/mL y de 0,5 µg/mL a 32 µg/mL respectivamente. La media de MICs para oxacilina fue de 45,1 (DS 18,46). Para el antibiótico vancomicina todos los aislamientos fueron sensibles. Al correlacionar las medias de los aislados SASM con los SARM no se encontraron diferencias significantes entre ellos.

**Figura 3.** Proporción de los aislamientos de *S. aureus* infectantes resistentes a antibióticos (n=94).



La oxacilina (OX) y la cefoxitina (FOX) son los antibióticos a los que los aislados evaluados presentan mayor resistencia. La resistencia a la eritromicina (E) y a la clindamicina (DA) es menos frecuente. Sin embargo, para los antibióticos trimetoprim/sulfametoxazol (STX), gentamicina (CN), rifampicina (RD) y vancomicina (VAN) ningún aislado fue resistente.

**Tabla 4.** Perfil de resistencia antibiótica en aislados infectantes de *S. aureus*

Antibiótico	SASM			SARM			Valor <i>p</i>
	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	
Cefoxitina	48	0	0	2 (4)	0	44 (96)	0,00
Oxacilina	28 (58,3)	13 (27,1)	7 (14)	2 (4,3)	1 (2,2)	43 (93,5)	0,00
Eritromicina	47 (97,9)	0	1 (2,1)	36 (78,3)	2 (4,3)	8 (17,4)	0,01
Clindamicina	46 (95,8)	0	2 (4,2)	46 (100)	0	0	0,49
Gentamicina	48 (100)	0	0	46 (100)	0	0	-
Rifampicina	48 (100)	0	0	46 (100)	0	0	-
Trimetoprim-sulfametoxazol	48 (100)	0	0	46 (100)	0	0	-
Test D	48 (100)	0	0	46 (100)	0	0	-

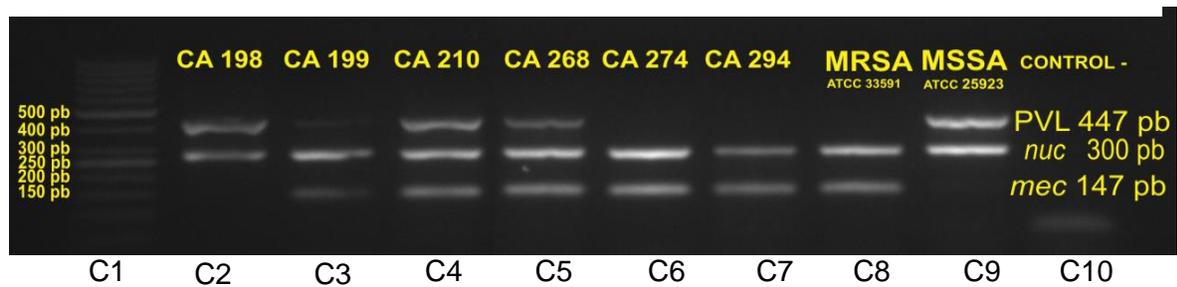
Como era de esperarse, los aislados SARM presentan diferencias significativas entre la resistencia a la oxacilina y cefoxitina con relación a las cepas SASM. Además, la resistencia a eritromicina parece ser más frecuente en este mismo grupo. Sensible(S), Resistencia Intermedia (I), Resistente (R).

### 7.3. Resultados moleculares

#### 7.3.1. *Nuc*, *SCCmec* y *PVL*

Los resultados moleculares estuvieron disponibles para el total de aislamientos incluidos en el estudio. Mediante ensayo de PCR múltiple se confirmaron los aislamientos obtenidos como *S. aureus* determinado por la presencia del gen *nuc*. En este mismo ensayo, se verificó la presencia de los genes que codifican la citotoxina PVL y la portación o no del gen *mecA*, clasificando los aislados como SARM o SASM, respectivamente con base en el último (Figura 3).

**Figura 4.** PCR múltiple para la detección de los genes *nuc*, *mecA* y *lukF-PV*



La PCR confirma los aislados como: *S. aureus* (gen *nuc*), Resistente a metilicina (gen *mecA*) y portadores de PVL. En el carril 1: Marcador de peso molecular de ADN, en los carriles 8 y 9: cepas de referencia ATCC 33591 (*nuc*+, *mecA*+, PVL-) y ATCC 25923 (*nuc*+, *mecA*-, PVL+) respectivamente. Los carriles del 2 al 7 corresponden a aislados representativos del estudio. Carril 10: control negativo de la PCR.

En este sentido, se halló que el número de aislados resistentes a metilicina fue de 46 (48,9%), mientras que el número de aislados que carecieron de esta particularidad fue de 48 (51,1%). Al correlacionar estos datos con los hallazgos obtenidos en la prueba Kirby Bauer para los antibióticos oxacilina y cefoxitina; se determinó que la cefoxitina tuvo una mayor concordancia (44 casos) que la oxacilina (50 casos) con respecto a la identificación de cepas SARM.

Además, esta PCR reveló que 81 (86,2%) de los 94 aislamientos analizados fueron portadores de PVL y tan sólo 13 (13,8%) no presentaron los genes que la codifican. Al correlacionar estas características se determinó que 43 (93,5%) de los aislados SARM fueron PVL positivos y 38 (79,2%) aislados SASM fueron PVL positivos (Tabla 3).

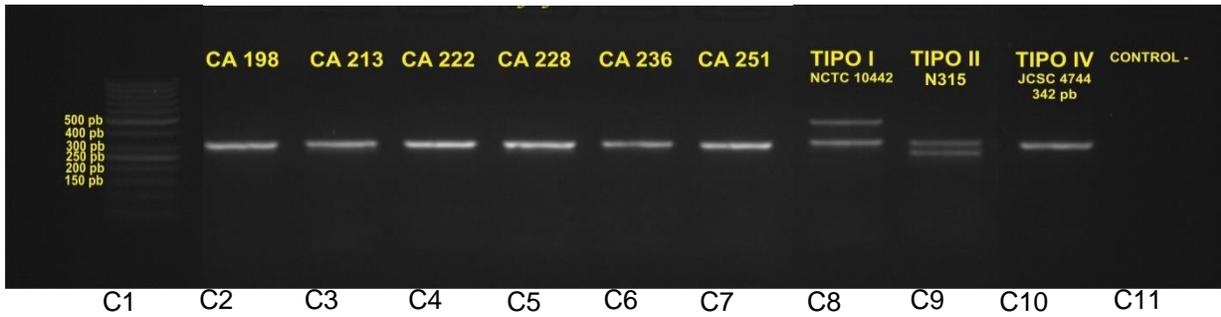
**Tabla 5.** Perfil de los factores de virulencia entre SASM y SARM

Presencia del gen	SASM		SARM		Valor de p
	f	%	f	%	
<b>lukF-PV (PVL)</b>					
NO	10	20,80%	3	6,50%	<b>0,045*</b>
SI	38	79,20%	43	93,50%	
<b>seq</b>					
NO	45	93,80%	29	63,00%	<b>0,00*</b>
SI	3	6,30%	17	37,00%	
<b>seo</b>					
NO	37	77,10%	41	89,10%	<b>0,12</b>
SI	11	22,90%	5	10,90%	
<b>tst</b>					
NO	46	95,80%	44	95,70%	<b>0,965</b>
SI	2	4,20%	2	4,30%	
<b>sem</b>					
NO	34	70,80%	45	97,80%	<b>0,00*</b>
SI	14	29,20%	1	2,20%	
<b>bsa</b>					
NO	29	60,40%	13	28,30%	<b>0,002*</b>
SI	19	39,60%	33	71,70%	
<b>Exo α</b>					
NO	46	95,80%	13	28,30%	<b>0,00*</b>
SI	2	4,20%	33	71,70%	
<b>sek</b>					
NO	45	93,80%	32	69,60%	<b>0,002*</b>
SI	<b>3</b>	<b>6,30%</b>	<b>14</b>	<b>30,40%</b>	

\*Significancia estadística.

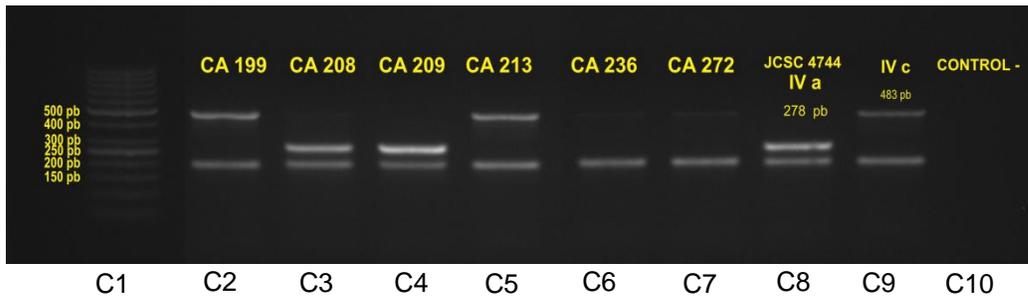
Adicionalmente, a cada aislado *mecA* positivo (SARM), se le realizó la tipificación y subtipificación del elemento genético móvil SCCmec, evidenciando que el tipo de SCCmec para todos los aislados fue el IV (Figura 4) y tras su subtipificación se halló que el subtipo predominante fue el IVc con 30 (65,2%) casos, seguido del subtipo IVa con 13(28,8%) casos del total. (Figura 5).

**Figura 5.** PCR múltiple para la tipificación del SCCmec en los aislados SARM



La PCR determina los tipos de SCCmec. En el carril1: Marcador de peso molecular de ADN, en los carriles 8, 9 y 10: cepas de referencia NCTC10442 (SCCmec Tipo I), N315 (SCCmec Tipo II) y JCSC4744 (SCCmec tipo IV) respectivamente. Los carriles del 2 al 7 corresponden a aislados SCCmec tipo IV del estudio. Carril 11: control negativo de la PCR.

**Figura 6.** PCR múltiple para la subtipificación del SCCmec tipo IV en los aislados SARM



La PCR determina los subtipos del SCCmec tipo IV. En el carril1: Marcador de peso molecular de ADN, en los carriles 8 y 9: cepas de referencia JCSC4744 (Tipo IVa) y JCSC (Tipo IVc) respectivamente. Los carriles 2 y 5 corresponden a aislados tipo IVc del estudio. Los carriles 2 y 4 corresponden a aislados del estudio tipo IVa. El Carril 11: control negativo de la PCR.

### 7.3.2. Enterotoxinas, BSA, TST y Exo $\alpha$

Por otro lado, se determinó el perfil de algunos factores de virulencia como las enterotoxinas estafilocócicas a cada aislamiento mediante una PCR múltiple, detectando los genes *sek*, *seq*, *seo*, *sem*, *tst*; así como también la presencia de los genes *bsa* y *exo- $\alpha$* . Tras esto, se evidenció la predominancia del gen *bsa* en los aislados del estudio con 52 (55,3%) de los casos, seguido por los genes *exo- $\alpha$*  con 35 (37,2%) casos, *seq* con 20 (21,3%), *sek* con 17(18,1%), *seo* con 16(17%) y el

gen *sem* con 15(16%) casos positivos. En la tabla 3 se especifican las diferencias obtenidas al correlacionar los aislados SASM y SARM con este perfil genético.

### 7.3.3. Agr

Con respecto al análisis de los tipos de Agr hallados en el estudio, el tipo I fue el más prevalente con 69 (73,4%) casos, seguido por el Agr tipo III con 10 (10,6%) casos y se halló una equivalencia para los tipos de Agr II y IV con 2 (2,1%) casos cada uno. Al contrastar estos hallazgos de acuerdo a los grupos SASM y SARM no se encontraron diferencias significativas entre la portación de un determinado tipo de Agr con relación a la presencia o no del gen de resistencia a meticilina en las cepas evaluadas en el estudio (Tabla 4).

**Tabla 6.** Distribución de los aislados de *S. aureus* según el tipo de Agr que portan.

Agr	N=94		Valor p
	SASM	SARM	
Tipo I	31	38	0,27
Tipo II	1	1	
Tipo III	7	3	
Tipo IV	2	0	
No tipificable	7	4	

### 7.3.4. Complejo clonal

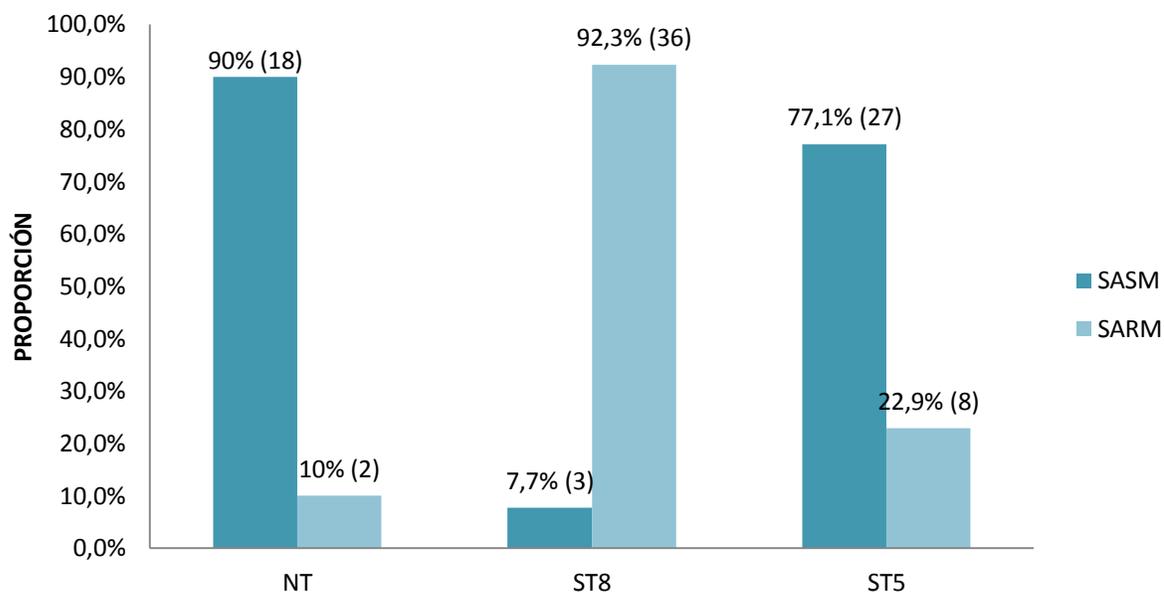
Al evaluar los procesos de distribución de los linajes clonales de los aislamientos de *S. aureus* del estudio a través de una PCR múltiple, se observó que el complejo clonal más prevalente fue el ST8 con 39 casos (41,5%), seguido muy de cerca por el ST5 con 35 (37,2%) casos (Figura 6). Al analizar estas distribuciones teniendo en cuenta los grupos SASM y SARM, se determinó una diferencia significativa ( $p=0,00$ ) al observarse que el complejo clonal ST5 se encuentra más relacionado con las cepas SASM (77,1%) que con las SARM (22,9%), mientras que estas últimas muestran mayor proporción en el complejo clonal ST8 (93,2%) (Figura 7).

**Figura 7.** PCR múltiple para determinar los procesos de dispersión de las líneas clonales ST5 y ST8.



La PCR determina los procesos de dispersión de las líneas clonales ST5 y ST8. En el carril 11: Marcador de peso molecular de ADN, en los carriles 11 y 12: cepas de referencia Clon USA300 (ST8) y Clon Chileno (ST5) respectivamente. Los carriles 1, 4, 6, 9 y 10 corresponden a aislados del estudio pertenecientes al complejo clonal ST8. Los carriles 3, 5, 7 y 8 corresponden al complejo clonal ST5.

**Figura 8.** Distribución de los complejos clonales en *S. aureus* infectantes



El complejo clonal ST5 prevalece en los aislados SARM, mientras que en los SASM es predominante el complejo clonal ST8. Los complejos clonales no tipificables (NT), se asocian mayoritariamente a los aislados SASM del estudio.

### 7.3.5. Tipificación molecular mediante PFGE

Al realizar la comparación según la portación del gen *mecA* de los productos de restricción obtenidos de los aislados, se pudieron identificar 5 grupos genómicos (G1 - G5) y un grupo de 12 cepas con pulsotipos indistinguibles. El grado de

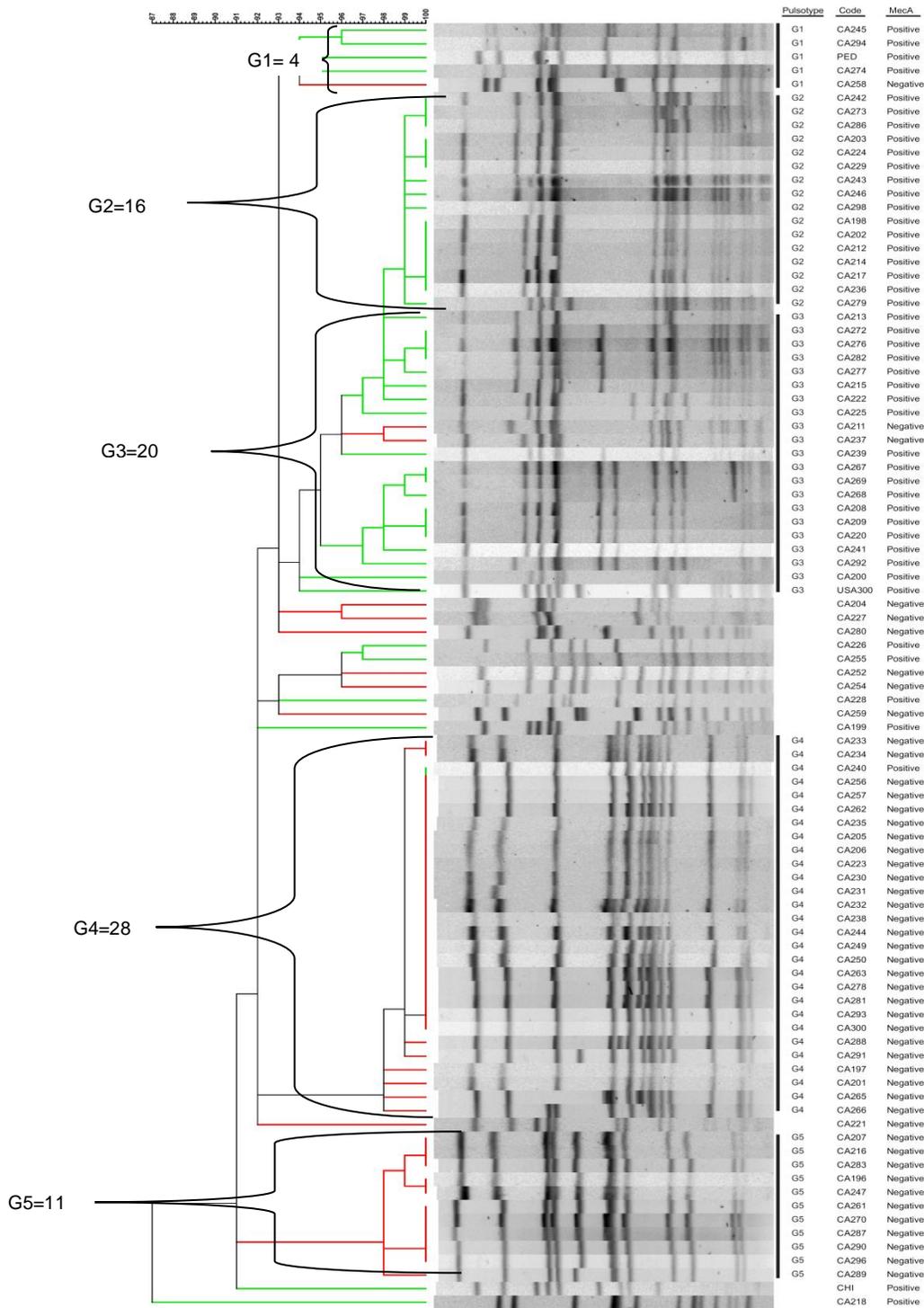
semejanza entre las cepas de SASM y SARM se representó gráficamente en un dendograma de homología (Figura 8).

En el grupo G1(n=4) los aislados se agruparon con una relación genética del 94%, mostrando un patrón genéticamente relacionado con el clon pediátrico, portando el gen *mecA* (n=3), *seo* (n=4), *sem* (n=2), *agr nt* (n=2), complejo clonal ST5 (n=4), SCCmec tipo IVc (n=1), IVa (n=2).

El grupo G3 (n=20) los aislados se agruparon con una relación genética del 93%, de las cuales 18 cepas fueron SARM y 2 cepas fueron SASM, este grupo mostró un patrón genéticamente relacionado con el clon USA 300, portando el gen *bsa-B* (n=17), *Exo* (n=18), *lukS/F-PV* (PVL n=20), *agr* tipo I (n=16), complejo clonal ST8 (n=16), SCCmec tipo IVc (n=10), IVa (n=8). Las características fenotípicas y genotípicas más frecuentes de los diferentes grupos obtenidos se muestran en la Tabla 5.

El grupo con mayor número de cepas fue el G4 (n=28) las cuales se agruparon con una relación genética del 92%, fue conformado por 27 cepas SASM y 1 cepa SARM. Este se caracterizó por portar con mayor frecuencia el siguiente patrón genético: *BsaB* (n=16), *lukF-PV/ lukS-PV* (n=26), *agr* tipo I (n=23), complejo clonal ST5 (n=21) y fenotípicamente fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados.

En G5 las cepas se agruparon con una relación genética del 91%, conformado únicamente por cepas SASM (n=12), se caracterizó por portar con mayor frecuencia los genes *seo* (n=8), *sem* (n=11), *lukS/F-PV* (n=12), *agr I*(n=4) y *agr nt* (n=4), complejo clonal no tipificable (n=11), fenotípicamente fueron sensible a todos los antimicrobianos ensayados.



**Figura 9.** Dendrograma derivado del análisis de PFGE: comparación de cepas de *S. aureus* causantes de infección según portación del gen *mecA*.

**Tabla 7.** Descripción molecular y fenotípica de los principales pulsotipos obtenidos por PFGE al comparar las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes infectados según portación del gen *mecA*.

<b>SARM - SASM</b>		<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
<b>Nº DE CEPAS</b>		4	16	20	28	11
<b>Características frecuentes</b>	<i>mecA</i>	+	+	+	-	-
	SCCmec	IV	IV	IV	NA	NA
	Subtipo SCCmec	IVa	IVc	IVc	NA	NA
	<i>sek</i>	-	-	-	-	-
	<i>seq</i>	-	-	+/-	-	-
	<i>seo</i>	+	-	-	-	+
	<i>sem</i>	+/-	-	-	-	+
	<i>tst</i>	-	-	-	-	-
	<i>bsa-B</i>	-	+	+	+	-
	<i>exo α</i>	-	+	+	-	-
	<i>lukS/F-PV</i>	-	+	+	+	+
	<i>agr</i>	NT	I	I	I	I/NT
	cc	ST5	ST8	ST8	ST5	NT
	OX	R	R	R	S	S
	FOX	R	R	R	S	S
	E	R/S	S	S	S	S
	DA	S	S	S	S	S
	GN	S	S	S	S	S
	SXT	S	S	S	S	S
	RN	S	S	S	S	S
TD	-	-	-	-	-	

Gen *mecA*, SCCmec (casete cromosómico estafilocócico mec) genes que codifican para las enterotoxinas: *Sek*, *Seq*, *Seo*, *Sem*, toxinas: TSST-1 (Toxina de Síndrome de shock tóxico), *Exo α* (Toxina exfoliativa), PVL (Citotoxina Pantón Valentine) Bacteriocina: *BsaB*, *agr* (gen regulador accesorio) Antibióticos: OX (Oxacilina), FOX (cefotaxima), E (Eritromicina), DA. (Clindamicina), GN (gentamicina), SXT (Trimetoprim-sulfametoxazol), RD (Rifampicina), TD (Test D), NT: no tipificable, NA: no aplica.

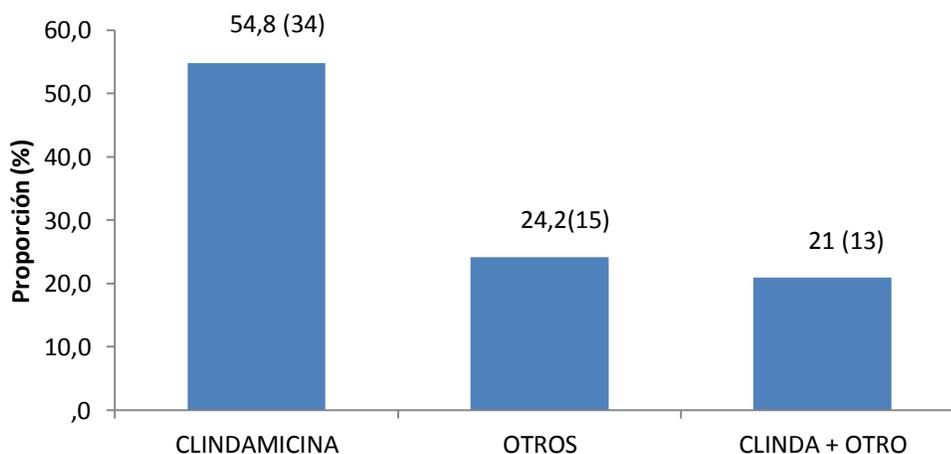
#### 7.4. Tratamiento y manejo de infecciones

Por otro lado, se empleó la terapia antibiótica empírica para el manejo clínico de las infecciones. Se observó que el fármaco más usado en las infecciones estafilocócicas fue la clindamicina ya sea individualmente (con una frecuencia de 40 (54,8%)) o en combinación con uno o más antibióticos (con 15 (20,5%) casos) (Figura 9). Sin embargo, no siempre se mantuvo el mismo fármaco durante el tiempo de hospitalización, de hecho la mayoría de éstos fueron reemplazados por el trimetoprim/sulfametoxazol en 21 (30,8%) casos, seguido por la Cefalexina en

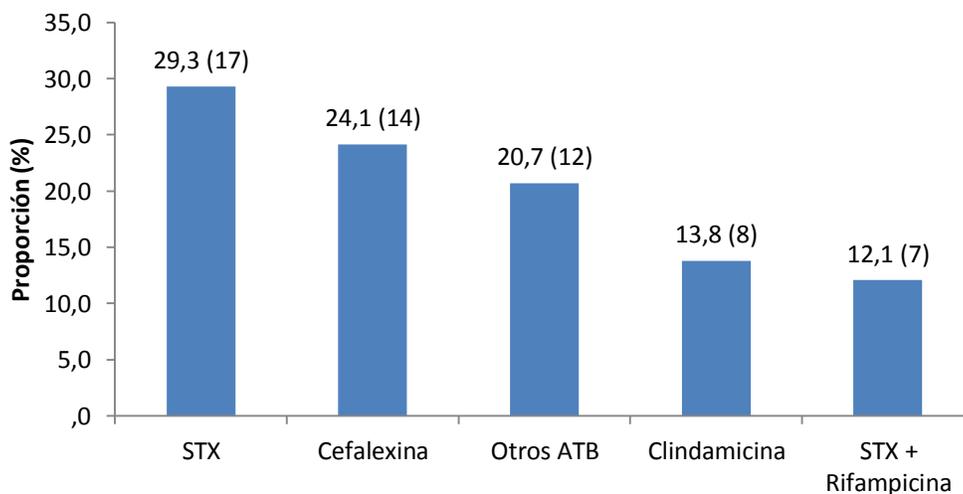
17(25%), la combinación de trimetoprin/sulfametoxazol y cefalexina en 15 (22,1%) casos y el empleo de otros antibióticos o combinaciones entre éstos en 8 (11,7%) pacientes (Figura 10).

Finalmente, al realizar el seguimiento a los pacientes del estudio, se encontró una mejoría en 69 (94,5%) de los 73, mientras que 4 (5,5%) fallecieron debido a complicaciones (3 por Shock séptico y 1 por sepsis).

**Figura 10** Terapia antibiótica empírica para las infecciones por *S.aureus*. n=62



**Figura 11.** Manejo antibiótico final en infecciones por *S. aureus*. n=58



## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio constituye una investigación de corte transversal en donde se describen los perfiles genéticos de aislados de *S. aureus* meticilino-resistentes y meticilino-sensibles obtenidos de pacientes pediátricos infectados por esta bacteria y algunas de sus características clínicas. Esta investigación se llevó a cabo considerando que *S. aureus* es una bacteria patogénica que cuenta con diversos factores de virulencia, haciendo a este microorganismo capaz de producir infecciones potencialmente mortales en humanos hasta en un 34,2% (1). Se fundamentó además en la variabilidad epidemiológica y de resistencia antibiótica que presenta *S. aureus* en diferentes escenarios geográficos.

En este estudio, el perfil de resistencia antibiótica de las cepas SASM y SARM fue equivalente, revelando que en ambos grupos no existieron cepas resistentes a los fármacos Trimetoprim/Sulfametoxazol, Gentamicina, Rifampicina y Vancomicina. Así mismo, Machuca *Et al.*, (133) no encontraron cepas resistentes a Rifampicina y Vancomicina, sin embargo, se reportaron resistencias a el Trimetoprim/Sulfametoxazol y a la Gentamicina. Estos hallazgos son similares a los reportados por Egyir *Et al.* (134), en donde muestran que tanto las cepas SASM y SARM revelaron resistencia a los antibióticos antes mencionados.

SARM emergió a nivel mundial como uno de los principales patógenos causantes de infecciones de piel y tejidos blandos, así como también de infecciones invasivas que pueden poner en peligro la vida (135, 136). En esta investigación la proporción entre cepas de *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina no mostraron diferencias significativas, con relación a la portación del SCCmec; revelando la alta tasa de portación de este casete cromosómico en las cepas que circulan en este entorno geográfico colombiano. Estos hallazgos coinciden con los encontrados en un estudio realizado por Weiss *et al* (137) en donde se observó una proporción de SARM y SASM de 41,6% y 58,4%, respectivamente. Estos datos concuerdan con los hallados por Lall y Sanhi (138) los cuales reportaron una prevalencia de aislados SARM del 45.9% y para los aislados SASM de 54%.

Así mismo, Hu *et al* (139) demostraron una proporción de 48.7% para aislados SARM y 51.3% para aislados SASM. No obstante, en países como Nueva Zelanda la proporción de infecciones por *S. aureus* no supera el 15% de las infecciones asociadas a piel y tejidos blandos. Esta discrepancia, se debe probablemente a la heterogeneidad ecológica y geográfica en la que se ejecutaron dichas investigaciones.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, la presencia de PVL en las cepas MRSA es superior a la encontrada en las SASM, coincidiendo con los hallazgos de Al Fouzan *et al* (140). Sin embargo, al tener en cuenta las proporciones observadas de los genes que codifican para PVL con respecto a las cepas SASM y SARM en el presente estudio; PVL no puede ser considerada como un marcador específico para las cepas SARM-AC (140). Se reporta que la portación de estos genes puede desencadenar condiciones clínicas más severas o complicadas cuando están relacionadas a las cepas SARM (141). No obstante, la evidencia encontrada en esta investigación revela que en cuanto a la presentación clínica de las infecciones y al desenlace de estas, las cepas SARM PVL positivas no guardan una relación de severidad al compararlas con otras cepas de *S. aureus*. Estos resultados son semejantes con los encontrados por Chiu *et al* (142) en donde al relacionar diversos datos clínicos con la presencia o ausencia de los genes que codifican esta leucotoxina no hallaron diferencias significativas entre los dos grupos.

Con respecto al perfil de enterotoxinas evaluadas, se pudo determinar una presencia similar de *sem* y *seo*, debido probablemente a que se encuentran en el mismo clúster estafilocócico (*egc*) contenido en la isla de patogenicidad SaPI3 (143). Este estudio mostró una baja prevalencia de estas SE, coincidiendo con lo reportado previamente en la literatura (144, 145) y en donde se muestran como superantígenos con un bajo potencial patogénico, causado posiblemente por la irrupción de algún gen de virulencia durante su inserción en el genoma bacteriano (146). En este estudio se encontró la presencia de los genes *bsa*, *sek* y *seq* con

mayor frecuencia en las cepas SARM, relacionando este grupo de aislados con el clon SARM USA300 ya que estos factores de virulencia son considerados marcadores específicos para este clon. USA300 reviste gran importancia mundial debido a su gran relación como agente etiológico en infecciones comunitarias y según se especula, parte de su virulencia es debida al sinergismo de los productos codificados por este grupo de genes (35, 147-149).

Por otra parte, la portación de Agr tipo I predominó tanto en los aislados SASM como en los SARM. Estos resultados son comparables con los encontrados por Khan *et al* (150) en donde mostraron a este tipo de Agr como el más prevalente en los aislamientos evaluados, así como también la presencia del Agr tipo III en segundo lugar. No obstante, Azimian *et al* (151) hallaron que aunque en los aislados SARM se mantuvo la misma condición de prevalencia, para los aislados SASM los tipos de Agr más comunes fueron el II y el IV, difiriendo ampliamente con este estudio ya que estos últimos mostraron el porcentaje de prevalencia más bajo con respecto a los Agr tipo I y III. Adicionalmente, a un número de cepas en este estudio no se les pudo determinar el grupo de Agr al que pertenecían, denominándolo como Agr no tipificable. Este hecho se considera como un inconveniente clínico ya que las cepas que portan este defecto se asocian con un mayor nivel de mortalidad en infecciones invasivas y una posible resistencia a glicopéptidos al compararlas con las cepas que portan un Agr intacto; esto es debido probablemente a la ventaja metabólica de las cepas defectuosas sobre las convencionales en un ambiente antibiótico (152).

Por otro lado, la comparación entre las cepas SASM y SARM teniendo en cuenta los perfiles arrojados por la PFGE mostraron poca diversidad genética; en donde el clon USA300 fue el mayormente relacionado con los aislados del estudio, coincidiendo con investigaciones previas realizadas en Colombia (153). Sin embargo, este clon difiere del clon USA300 relacionado en Estados Unidos con respecto al subtipo del SCCmec ya que este clon presenta un SCCmec IVa; mientras que el SCCmec encontrado en las cepas con perfiles relacionados

genéticamente con este clon en el presente estudio evidenciaron mayoritariamente un SCCmec IVc. Estudios previos muestran también una variedad en algunas de las características genéticas en las cepas relacionadas con el clon USA300 (154, 155) y cuyo origen aún permanece sin determinar. Adicionalmente, en este estudio, se evidenciaron cepas SASM relacionadas genéticamente con este mismo clon, coincidiendo con un estudio realizado por Escobar-Pérez *Et al.*, en el cual postula que estas cepas pueden llegar a ser el origen de las cepas variantes SARM-USA300 que predominan en este país (156).

En este estudio la presentación clínica más frecuente fue la infección de piel y tejidos blandos, en donde la celulitis fue la condición mayormente relacionada. Con relación a esto Leifso *et al* (157) encontraron que este tipo de infecciones representaron el 69% en una población infantil de 155 sujetos. Así mismo, Talan *et al* (158) y Conceição *et al* (159) revelaron al *S. aureus* como el patógeno mayormente relacionado con esta presentación clínica, encontrándolo alrededor del 75% de las infecciones pediátricas en un departamento de emergencias. Sin embargo, en esta investigación la diferencia en la distribución entre las infecciones causadas por SASM y SARM no fue significativa.

Por otro lado, las infecciones invasivas por *S. aureus* pueden superar el 50% del total de infecciones a este nivel en niños (160) y en donde los aislados SARM pueden llegar a duplicar la mortalidad comparada con las producidas por cepas SASM (161). Estos últimos datos difieren con la presente investigación ya que no se encontraron diferencias significantes entre el desenlace clínico de las condiciones producidas por las cepas SASM y SARM.

Al evaluar la terapia antibiótica de los pacientes del estudio, se mostró que en general a todos los niños se les prescribió una terapia empírica. No obstante, según los lineamientos establecidos por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América, sugieren que para el tratamiento de abscesos cutáneos, se puede hacer uso del drenaje y evitar la utilización de antibióticos(157). Así mismo, según

los nuevos lineamientos para el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos de IDSA, recomiendan que la antibioticoterapia empírica sea realizada con uno tipo Vancomicina ya que con la clindamicina se puede llegar a inducir resistencia. Según esta guía, la vancomicina es el antibiótico de elección para la terapia empírica de infecciones por SARM y que si la prevalencia de SARM es mayor al 15%, se recomienda su utilización (107).

## 9. CONCLUSIONES

La presente investigación mostró que los aislados de *Staphylococcus aureus* en infecciones pediátricas del Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja presentan una equivalencia en cuanto a la proporción de cepas SASM y SARM. Además, reveló que el perfil genético más prevalente entre las cepas fue el relacionado con el Clon USA300 con la variante en la subclasificación del SCCmec. En este estudio se mostró también, que las características moleculares de los aislados SASM y SARM no difieren significativamente al ser comparados con los datos obtenidos mediante la PFGE.

Por otro lado, los hallazgos sugieren que en las cepas del estudio no existe un patrón molecular relacionado con el tipo de infección y el desenlace clínico. Así mismo, los diferentes perfiles de resistencias obtenidos de los aislados muestran un gran uso de la clindamicina como terapia empírica para las infecciones producidas por cepas SASM y SARM. Hecho que en el Hospital infantil Napoleón Franco Pareja, aparenta seguir dando buenos resultados. Sin embargo, se deben tener en cuenta las características de la infección y la severidad de las mismas para evitar el uso indiscriminado de antibióticos, debido a la capacidad selectiva de cepas resistentes a los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de infecciones.

Finalmente, se recomiendan estudios moleculares adicionales como el análisis de secuencias multilocus (MLST) con el fin de complementar los datos obtenidos y reforzar la vigilancia epidemiológica de las cepas de *S. aureus* infectantes y con ello conocer la evolución genética de estas en la ciudad de Cartagena.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Vardakas KZ, Apiranthiti KN, Falagas ME. Antistaphylococcal penicillins versus cephalosporins for definitive treatment of meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: A systematic review and meta-analysis. *International journal of antimicrobial agents*. 2014.
2. Das DK, Baker MG, Venugopal K. Risk factors, microbiological findings and outcomes of necrotizing fasciitis in New Zealand: a retrospective chart review. *BMC infectious diseases*. 2012;12:348.
3. Kang CI, Song JH, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Yeom JS, et al. Clinical impact of methicillin resistance on outcome of patients with *Staphylococcus aureus* infection: a stratified analysis according to underlying diseases and sites of infection in a large prospective cohort. *The Journal of infection*. 2010;61(4):299-306.
4. Tantilipikorn P BC, Nan Z, Bachert C. *Staphylococcus aureus* superantigens and their role in eosinophilic nasal polyp disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012(3):171-6.
5. Fueyo JM, Mendoza MC, Martin MC. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2005;7(2):187-94.
6. Acton DS, Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2009;28(2):115-27.

7. van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(12):1820-6.
8. Mernelius S, Lofgren S, Lindgren PE, Matussek A. The role of broth enrichment in *Staphylococcus aureus* cultivation and transmission from the throat to newborn infants: results from the Swedish hygiene intervention and transmission of *S. aureus* study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2013.
9. Nurjadi D HE, Hinderberger I, Zanger P. Impaired  $\beta$ -defensin expression in human skin links DEFB1 promoter polymorphisms with persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J Infect Dis*. 2013;207(4):666-74.
10. Lawrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyga B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *International journal of food microbiology*. 2007;117(3):319-23.
11. Lepelletier D, Lucet JC. Controlling methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: not simply methicillin-resistant *S. aureus* revisited. *The Journal of hospital infection*. 2013;84(1):13-21.
12. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(12):751-62.
13. Chatterjee SS, Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clinical epidemiology*. 2013;5:205-17.

14. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(4):227-39.
15. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(4):273-82.
16. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007;13(3):222-35.
17. Lindsay JA. Evolution of *Staphylococcus aureus* and MRSA during outbreaks. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013.
18. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists*. 2011;60(2):95-103.
19. Mehndiratta PL, Bhalla P. Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review. *Indian journal of medical microbiology*. 2012;30(1):16-23.
20. Uhlemann AC, Otto M, Lowy FD, Deleo FR. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013.

21. Lancashire JF, Jones A, Bergh H, Huygens F, Nimmo GR. Typing early Australian healthcare-associated MRSA: confirmation of major clones and emergence of ST1-MRSA-IV and novel ST2249-MRSA-III. *Pathology*. 2013;45(5):492-4.
22. Feng Y, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS microbiology reviews*. 2008;32(1):23-37.
23. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(9):629-41.
24. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;40(12):1785-91.
25. Prosperi M, Veras N, Azarian T, Rathore M, Nolan D, Rand K, et al. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomic era: a cross-sectional study. *Scientific reports*. 2013;3:1902.
26. Chadwick SG, Prasad A, Smith WL, Mordechai E, Adelson ME, Gygax SE. Detection of Epidemic USA300 Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains by Use of a Single Allele-Specific PCR Assay Targeting a Novel Polymorphism of *Staphylococcus aureus* *pbp3*. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(8):2541-50.
27. Nimmo GR, Bergh H, Nakos J, Whiley D, Marquess J, Huygens F, et al. Replacement of healthcare-associated MRSA by community-associated MRSA in Queensland: Confirmation by genotyping. *The Journal of infection*. 2013.

28. Aung AK, Skinner MJ, Lee FJ, Cheng AC. Changing epidemiology of bloodstream infection pathogens over time in adult non-specialty patients at an Australian tertiary hospital. *Communicable diseases intelligence quarterly report*. 2012;36(4):E333-41.
29. Chuang YY, Huang YC. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(8):698-708.
30. Rashid ZZ, Bahari N, Othman A, Jaafar R, Mohamed NA, Jabbari I, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Malaysian tertiary centre. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2013;44(1):104-8.
31. Yamaguchi T, Nakamura I, Chiba K, Matsumoto T. Epidemiological and microbiological analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a Japanese hospital. *Japanese journal of infectious diseases*. 2012;65(2):175-8.
32. Gelatti LC, Bonamigo RR, Inoue FM, do Carmo MS, Becker AP, Castrucci FM, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46(1):34-8.
33. Rodrigues MV, Fortaleza CM, Riboli DF, Rocha RS, Rocha C, Cunha MD. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit from Brazil. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2013.
34. Cortes JA, Gomez CA, Cuervo SI, Leal AL. [Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogota, Colombia: Public Health implications]. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2007;9(3):448-54. Implicaciones en Salud Publica de

*Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente Adquirido en la Comunidad en Bogota, Colombia.

35. Escobar JA, Marquez-Ortiz RA, Alvarez-Olmos MI, Leal AL, Castro BE, Vanegas N. Detection of a new community genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone that is unrelated to the USA300 clone and that causes pediatric infections in Colombia. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(2):661-4.
36. Menegotto F, Gonzalez-Cabrero S, Lorenzo B, Cubero A, Cuervo W, Gutierrez MP, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital over a 4-year period: clonal replacement, decreased antimicrobial resistance, and identification of community-acquired and livestock-associated clones. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;74(4):332-7.
37. Nielsen MV, Sarpong N, Krumkamp R, Dekker D, Loag W, Amemasor S, et al. Incidence and characteristics of bacteremia among children in rural Ghana. *PloS one*. 2012;7(9):e44063.
38. Barbu EM, Ganesh VK, Gurusiddappa S, Mackenzie RC, Foster TJ, Sudhof TC, et al. beta-Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. *PLoS pathogens*. 2010;6(1):e1000726.
39. Vazquez V, Liang X, Horndahl JK, Ganesh VK, Smeds E, Foster TJ, et al. Fibrinogen is a ligand for the *Staphylococcus aureus* microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (Bbp). *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(34):29797-805.
40. Geoghegan JA, Ganesh VK, Smeds E, Liang X, Hook M, Foster TJ. Molecular characterization of the interaction of staphylococcal microbial surface components

recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with fibrinogen. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(9):6208-16.

41. Tung H, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Ryden C. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *The Biochemical journal*. 2000;345 Pt 3:611-9.
42. Feng MH, Cui JC, Nakane A, Hu DL. Vaccination with Plasmid DNA Encoding a Mutant Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Ameliorates Toxin-induced Lethal Shock in Mice. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2013;231(1):1-8.
43. Elston JW, Meigh J, Kearns AM, Jordan-Owers N, Newton A, Meigh RE, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology, microbiology and clinical impact in East Yorkshire, UK. *The Journal of hospital infection*. 2009;72(4):307-13.
44. Luft FC. *Staphylococcus aureus*, Toll-like receptors, superantigens, and their derivatives. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(10):1091-3.
45. Javid KV, Foster H. Dye labelled monoclonal antibody assay for detection of Toxic Shock Syndrome Toxin -1 from *Staphylococcus aureus*. *Iranian journal of microbiology*. 2011;3(4):170-6.
46. Schaeffers MM, Breshears LM, Anderson MJ, Lin YC, Grill AE, Panyam J, et al. Epithelial proinflammatory response and curcumin-mediated protection from staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. *PloS one*. 2012;7(3):e32813.
47. Spaan AN, Surewaard BG, Nijland R, van Strijp JA. Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus*: A Biological Tug of War. *Annual review of microbiology*. 2013.

48. Lina G BG, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R; International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. The Journal of infectious diseases. 2004;189(12):2334-6.
49. Grumann D, Nubel U, Broker BM. Staphylococcus aureus toxins - Their functions and genetics. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2013.
50. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010;2(8):2177-97.
51. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins. 2010;2(7):1751-73.
52. Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. Food microbiology. 2009;26(8):896-904.
53. Otero A, Garcia ML, Garcia MC, Moreno B, Bergdoll MS. Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. Applied and environmental microbiology. 1990;56(2):555-9.
54. Kluytmans JA, Wertheim HF. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. Infection. 2005;33(1):3-8.
55. Tamarapu S, McKillip JL, Drake M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Staphylococcus aureus in dairy products. J Food Prot. 2001;64(5):664-8.

56. Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol Infect.* 1993;110(3):519-31.
57. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology.* 2000;61(1):1-10.
58. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J.* 2005;35 Suppl 2:S106-19.
59. Kim HJ, Griffiths MW, Fazil AM, Lammerding AM. Probabilistic risk model for staphylococcal intoxication from pork-based food dishes prepared in food service establishments in Korea. *J Food Prot.* 2009;72(9):1897-908.
60. Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International journal of food microbiology.* 2008;121(1):66-73.
61. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of infectious diseases.* 2004;189(12):2334-6.
62. Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Galvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins.* 2010;2(8):2117-31.
63. Elston DM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2007;56(1):1-16; quiz 7-20.
64. Cooke FJ, Brown NM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *British medical bulletin.* 2010;94:215-27.

65. Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(15):8821-6.
66. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chemical immunology and allergy*. 2007;93:24-41.
67. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(1):43-54.
68. From the Centers for Disease Control and Prevention. Public health dispatch: outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections--Los Angeles County, California, 2002-2003. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003;289(11):1377.
69. Boubaker K, Diebold P, Blanc DS, Vandenesch F, Praz G, Dupuis G, et al. Panton-valentine leukocidin and staphylococcal skin infections in schoolchildren. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(1):121-4.
70. Gillet Y, Dumitrescu O, Tristan A, Dauwalder O, Javouhey E, Floret D, et al. Pragmatic management of Panton-Valentine leukocidin-associated staphylococcal diseases. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(6):457-64.
71. Ritz N, Curtis N. The role of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012;31(5):514-8.

72. Lo WT, Wang CC. Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatrics and neonatology*. 2011;52(2):59-65.
73. Karampela I, Poulakou G, Dimopoulos G. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia: an update for the emergency and intensive care physician. *Minerva anesthesiologica*. 2012;78(8):930-40.
74. Daly KM, Upton M, Sandiford SK, Draper LA, Wescombe PA, Jack RW, et al. Production of the Bsa lantibiotic by community-acquired *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol*. 2010;192(4):1131-42.
75. McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS microbiology reviews*. 2001;25(3):285-308.
76. Augustin J, Rosenstein R, Wieland B, Schneider U, Schnell N, Engelke G, et al. Genetic analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin-negative mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Biochem*. 1992;204(3):1149-54.
77. Hu Y, Meng J, Shi C, Hervin K, Fratamico PM, Shi X. Characterization and comparative analysis of a second thermonuclease from *Staphylococcus aureus*. *Microbiological research*. 2013;168(3):174-82.
78. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2001;3(7):585-94.
79. Reynolds J, Wigneshweraraj S. Molecular insights into the control of transcription initiation at the *Staphylococcus aureus* agr operon. *Journal of molecular biology*. 2011;412(5):862-81.

80. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR. Peptide signaling in the staphylococci. *Chemical reviews*. 2011;111(1):117-51.
81. Mejia C, Zurita J, Guzman-Blanco M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant staphylococcus aureus in Latin America. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2010;14 Suppl 2:S79-86.
82. Rodriguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2010;14 Suppl 2:S87-96.
83. Rodriguez-Noriega E, Seas C, Guzman-Blanco M, Mejia C, Alvarez C, Bavestrello L, et al. Evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Latin America. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2010;14(7):e560-6.
84. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature medicine*. 2007;13(12):1510-4.
85. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(6):937-41.
86. Chatterjee SS, Chen L, Joo HS, Cheung GY, Kreiswirth BN, Otto M. Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulins PSM-mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *PLoS one*. 2011;6(12):e28781.

87. Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto Y, Ito T, Hiramatsu K. Phenol-soluble modulin alpha 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Panton-Valentine leukocidin. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(5):715-23.
88. Liles WC, Thomsen AR, O'Mahony DS, Klebanoff SJ. Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulin. *Journal of leukocyte biology*. 2001;70(1):96-102.
89. Tsompanidou E, Denham EL, Becher D, de Jong A, Buist G, van Oosten M, et al. Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Applied and environmental microbiology*. 2013;79(3):886-95.
90. Singer AJ, Thode HC, Jr., Chale S, Taira BR, Lee C. Primary closure of cutaneous abscesses: a systematic review. *The American journal of emergency medicine*. 2011;29(4):361-6.
91. Hsu AR, Hsu JW. Topical review: skin infections in the foot and ankle patient. *Foot & ankle international*. 2012;33(7):612-9.
92. Demos M, McLeod MP, Nouri K. Recurrent furunculosis: a review of the literature. *The British journal of dermatology*. 2012;167(4):725-32.
93. Lee N, Chang LC, Chiu CP. A case of carbuncle caused by a catalase-negative strain of *staphylococcus aureus*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1996;24(4):221-3.
94. Pereira LB. Impetigo - review. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2014;89(2):293-9.
95. Lio PA. The many faces of cellulitis. *Archives of disease in childhood Education and practice edition*. 2009;94(2):50-4.

96. Kapoor V, Travadi J, Braye S. Staphylococcal scalded skin syndrome in an extremely premature neonate: a case report with a brief review of literature. *Journal of paediatrics and child health*. 2008;44(6):374-6.
97. Shafritz AB, Coppage JM. Acute and chronic paronychia of the hand. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2014;22(3):165-74.
98. Fretzayas A, Moustaki M, Tsagris V, Brozou T, Nicolaidou P. MRSA blistering distal dactylitis and review of reported cases. *Pediatric dermatology*. 2011;28(4):433-5.
99. Sadasivan J, Maroju NK, Balasubramaniam A. Necrotizing fasciitis. *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2013;46(3):472-8.
100. Krakauer T, Stiles BG. The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings. *Virulence*. 2013;4(8):759-73.
101. Koudela K, Jr., Koudelova J, Skalicky T. [Primary Pyomyositis of the muscles around the hip. case reports and literature review]. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2012;79(2):156-61. Epub 2012/04/28. Primarni pyomyozitida svalu v oblasti kyčelního kloubu: kazuistika a přehled literatury.
102. Comisión de Diagnóstico y Evaluación - Argentina. Sergio Varini DF, Sebastián Ameriso, José Luis Barisani, Tomás Cianciulli, Marco Del Pont, Antonio F. De Rosa, Claudio A. Dizeo, Hernán Doval. Consenso endocarditis infecciosa. *Revista argentina de cardiología*. 2002;70(5 ):9 - 19.

103. Norte A, Santos C, Gamboa F, Ferreira AJ, Marques A, Leite C, et al. [Necrotizing pneumonia - a rare complication]. *Acta medica portuguesa*. 2012;25(1):51-5. Epub 2012/08/14. Pneumonia Necrotizante - Uma Complicacao Rara.
104. Loffler B, Niemann S, Ehrhardt C, Horn D, Lanckohr C, Lina G, et al. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection. *Expert review of anti-infective therapy*. 2013;11(10):1041-51.
105. Pugmire BS, Shailam R, Gee MS. Role of MRI in the diagnosis and treatment of osteomyelitis in pediatric patients. *World journal of radiology*. 2014;6(8):530-7.
106. Colavite PM, Sartori A. Septic arthritis: immunopathogenesis, experimental models and therapy. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2014;20:19.
107. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Dellinger EP, Goldstein EJ, Gorbach SL, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;59(2):e10-52.
108. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(3):e18-55.
109. Johnson NB, Hayes LD, Brown K, Hoo EC, Ethier KA. CDC National Health Report: Leading Causes of Morbidity and Mortality and Associated Behavioral Risk and Protective Factors-United States, 2005-2013. *MMWR Surveill Summ*. 2014;63:3-27.

110. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2013.
111. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(18):3057-71.
112. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(12):4961-7.
113. Creel AM, Durham SH, Benner KW, Alten JA, Winkler MK. Severe invasive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in previously healthy children. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2009;10(3):323-7.
114. McDonald RR GG, Irvine J, Graham MR, Tyler S, Mulvey MR, et al. . Genome Announc Draft Genome Sequence of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strain 06BA18369, a Pathogen Associated with Skin and Soft Tissue Infections in Northern Saskatchewan, Canada. *Genome Announc*. 2013; 1(3):e00389-13.
115. Stryjewski ME, Chambers HF. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46 Suppl 5:S368-77.
116. Rosenthal VD, Richtmann R, Singh S, Apisarnthanarak A, Kubler A, Viet-Hung N, et al. Surgical site infections, *International Nosocomial Infection Control*

Consortium (INICC) report, data summary of 30 countries, 2005-2010. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2013;34(6):597-604.

117. Garza-Gonzalez E, Dowzicky MJ. Changes in *Staphylococcus aureus* susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2013;17(1):13-9.
118. Bettin A, Causil C, Reyes N. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2012;16(4):329-34.
119. Rebollo-Perez J, Ordonez-Tapia C, Herazo-Herazo C, Reyes-Ramos N. Nasal carriage of Panton Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2011;13(5):824-32.
120. Bettin A, Suarez P, Bedoya A, Reyes N. [*Staphylococcus aureus* in residents from a nursing-home in Cartagena]. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2008;10(4):650-7. Epub 2009/04/11. *Staphylococcus aureus* en residentes de un hogar de ancianos de Cartagena.
121. Castro-Orozco R, Villafane-Ferrer LM, Alvarez-Rivera E, De Arco MM, Rambaut-Donado CL, Vitola-Heins GV. [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children attending school in Cartagena, Colombia]. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2010;12(3):454-63. Epub 2011/02/12. *Staphylococcus aureus* metilino resistente en niños escolares de Cartagena.

122. Kassem, II. Chinks in the armor: the role of the nonclinical environment in the transmission of Staphylococcus bacteria. American journal of infection control. 2011;39(7):539-41.
123. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. M100-S20. 2010. 2010.
124. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of clinical microbiology. 2005;43(10):5026-33.
125. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. Journal of clinical microbiology. 1992;30(7):1654-60.
126. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1999;29(5):1128-32.
127. Ayed S, Boutiba-Ben Boubaker I, Samir E, Ben Redjeb S. Prevalence of agr specificity groups among methicillin resistant Staphylococcus aureus circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. Pathologie-biologie. 2006;54(8-9):435-8.
128. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(7):2155-61.

129. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(1):42-8.
130. Escobar JA, Gomez IT, Murillo MJ, Castro BE, Chavarro B, Marquez RA, et al. Design of two molecular methodologies for the rapid identification of Colombian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2012;32(2):214-23.
131. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, et al. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(10):3481-5.
132. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(9):2233-9.
133. Machuca MA, Sosa LM, Gonzalez CI. Molecular typing and virulence characteristic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients in Bucaramanga, Colombia. *PloS one*. 2013;8(8):e73434.
134. Egyir B, Guardabassi L, Sorum M, Nielsen SS, Kolekang A, Frimpong E, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of clinical *Staphylococcus aureus* from healthcare institutions in Ghana. *PloS one*. 2014;9(2):e89716.
135. Wong H, Watt C, Elsayed S, John M, Johnson G, Katz K, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with persistent or recurrent bacteremia. *The Canadian journal of infectious diseases & medical*

microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale / AMMI Canada. 2014;25(2):83-6.

136. Jiang W, Zhou Z, Zhang K, Yu Y. Epidemiological investigation of community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Genetics and molecular research : GMR*. 2013;12(4):6923-30.
137. Weiss C, Kaminsky P, Boggs J, Ley C. Skin and soft-tissue infections in suburban primary care: epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and observations on abscess management. *BMC research notes*. 2011;4:33.
138. Lall M, Sahni AK. Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Medical journal, Armed Forces India*. 2014;70(1):43-7.
139. Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. *PloS one*. 2013;8(9):e73300.
140. AlFouzan W, Al-Haddad A, Udo E, Mathew B, Dhar R. Frequency and clinical association of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* isolates: a study from Kuwait. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2013;22(3):245-9.
141. Lo WT, Tang CS, Chen SJ, Huang CF, Tseng MH, Wang CC. Panton-Valentine leukocidin is associated with exacerbated skin manifestations and inflammatory response in children with community-associated staphylococcal scarlet fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(7):e69-75.

142. Chiu YK, Lo WT, Wang CC. Risk factors and molecular analysis of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* colonization and infection in children. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2012;45(3):208-13.
143. Holtfreter S, Bauer K, Thomas D, Feig C, Lorenz V, Roschack K, et al. egc-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infection and immunity*. 2004;72(7):4061-71.
144. Bhatta M, Ray P, Singh R, Jain S, Sharma M. Presence of virulence determinants amongst *Staphylococcus aureus* isolates from nasal colonization, superficial & invasive infections. *The Indian journal of medical research*. 2013;138:143-6.
145. Wu D, Li X, Yang Y, Zheng Y, Wang C, Deng L, et al. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. *Journal of medical microbiology*. 2011;60(Pt 1):35-45.
146. Nashev D, Toshkova K, Bizeva L, Akineden O, Lammler C, Zschock M. Distribution of enterotoxin genes among carriage- and infection-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Letters in applied microbiology*. 2007;45(6):681-5.
147. Planet PJ, LaRussa SJ, Dana A, Smith H, Xu A, Ryan C, et al. Emergence of the epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on skin. *mBio*. 2013;4(6):e00889-13.
148. Bocchini CE, Mason EO, Hulten KG, Hammerman WA, Kaplan SL. Recurrent community-associated *Staphylococcus aureus* infections in children presenting to

Texas Children's Hospital in Houston, Texas. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(11):1189-93.

149. Portillo BC, Moreno JE, Yomayusa N, Alvarez CA, Cardozo BE, Perez JA, et al. Molecular epidemiology and characterization of virulence genes of community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Colombia. *Int J Infect Dis*. 2013;17(9):e744-9.
150. Khan S, Rasheed F, Zahra R. Genetic Polymorphism of agr Locus and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* at two hospitals in Pakistan. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014;30(1):172-6.
151. Azimian A, Najar-Pirayeh S, Mirab-Samiee S, Naderi M. Occurrence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among clinical samples in tehran-iran and its correlation with polymorphism of specific accessory gene regulator (AGR) groups. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2012;43(2):779-85.
152. Paulander W, Nissen Varming A, Baek KT, Haaber J, Frees D, Ingmer H. Antibiotic-mediated selection of quorum-sensing-negative *Staphylococcus aureus*. *mBio*. 2013;3(6):e00459-12.
153. Marquez-Ortiz RA, Alvarez-Olmos MI, Escobar Perez JA, Leal AL, Castro BE, Marino AC, et al. USA300-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone is the predominant cause of community and hospital MRSA infections in Colombian children. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014;25:88-93.
154. Larsen A, Stegger M, Goering R, Sorum M, Skov R. Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark

(2000-2005). Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2007;12(2).

155. Bartels MD, Hansen LH, Boye K, Sorensen SJ, Westh H. An unexpected location of the arginine catabolic mobile element (ACME) in a USA300-related MRSA strain. *PloS one*. 2011;6(1):e16193.
156. Escobar-Perez JA, Castro BE, Marquez-Ortiz RA, Gaines S, Chavarro B, Moreno J, et al. [Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates related to USA300 clone: Origin of community-genotype MRSA in Colombia?]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2014;34 Suppl 1:124-36. Epub 2014/06/27. Aislamientos de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina relacionados genéticamente con el clon USA300, inverted question mark origen de los aislamientos SARM de genotipo comunitario en Colombia?
157. Leifso KR, Gravel D, Mouchili A, Kaldas S, Le Saux N. Clinical characteristics of pediatric patients hospitalized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals from 2008 to 2010. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale / AMMI Canada*. 2013;24(3):e53-6.
158. Talan DA, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, Limbago B, Albrecht V, et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(2):144-9.
159. Conceicao T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R, et al. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. *European journal of clinical microbiology & infectious*

diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology.  
2011;30(2):293-7

160. Prabhu K, Bhat S, Rao S. Bacteriologic profile and antibiogram of blood culture isolates in a pediatric care unit. *Journal of laboratory physicians*. 2010;2(2):85-8.
161. Park DA, Lee SM, Peck KR, Joo EJ, Oh EG. Impact of Methicillin-Resistance on Mortality in Children and Neonates with *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Infection & chemotherapy*. 2013;45(2):202-10.