

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA, SUBÁREA MICROBIOLOGÍA



TESIS DE DOCTORADO

**Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
causante de infecciones invasivas en niños paraguayos**

Mag. Fátima Rodríguez Acosta

Orientadora: Dra. Teresa Camou¹

Co-orientadora: Dra. Rosa Guillén²

¹Departamento de Laboratorios de Salud Pública
Montevideo, Uruguay

²Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – Universidad Nacional de
Asunción San Lorenzo, Paraguay

DEDICATORIA

A mis hijos María Lucía y Rodolfo Ezequiel, mi inspiración para ser cada día mejor.

A mis padres, Carmen y Jorge[†], por enseñarme el valor del esfuerzo.

*A mi esposo, Rodolfo, por acompañarme en éste camino y darme alas para seguir
volando.*

AGRADECIMIENTOS

A la Prof. Dra. Rosa María Guillén Fretes, por sus enseñanzas, su paciencia y guía constante, sin lo cual no hubiera podido lograrlo. Mi gratitud eterna hacia Usted.

A la Dra. Teresa Camou, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de ingresar al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de UDELAR.

*Al Grupo de estudio de Staphylococcus aureus del Paraguay conformado por: Dra. Wilma Basualdo[†], Dr. Héctor Castro, Dra. Beatriz Quiñonez[†], Dra. Rocío Argüello, Dra. Noemí Zárate del **Hospital General Pediátrico**; Dra. Ana Campuzano de Rolón, Dr. Martin Agüero, Dra. Juana Ortellado de Canese, Dra. Gladys Velázquez, Dra. Patricia Almada, Dr. Richard Lezcano del **Hospital de Clínicas**; Dr. Héctor Castro, Dra. Mónica Rodríguez, Dra. Lorena Grau, Dra. Carmen Espínola, Dra. Gladys Velázquez del **Instituto de Previsión Social**; Dras. Gloria Gómez y Gloria Samudio del **Hospital Nacional de Itauguá**, quiénes con su colaboración hicieron posible éste trabajo.*

Al equipo de la Unidad de Bacteriología del DLSP del Uruguay, especialmente a Gabriela y Mariana por su colaboración desinteresada para la realización de mis experimentos durante mis estancias de investigación en Uruguay y por guiarme en los trámites del postgrado.

A las Dras. Marta Mollerach, Sabrina DiGregorio, Sol Haim, Silvina Fernández y todo su equipo de trabajo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por guiarme desinteresadamente y darme las herramientas necesarias para avanzar en el estudio de la epidemiología del S. aureus.

A los Dres. Carlos Flores, Rafaela González, Alejandro Mendoza, Ana Díaz y José Lorenzo del ITER, Tenerife, España, por llevar a cabo la secuenciación genómica de los aislamientos de S. aureus incluidos en éste estudio y guiarnos en el proceso del análisis de los datos obtenidos.

Al CONACYT – Paraguay, por las Becas otorgadas a través del Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos (PVCT17-61 y PVCT18-61) y del Proyecto de

Investigación CTS (PINV15-101), que permitieron la financiación parcial de los experimentos de la tesis.

A los servidores Freiburg Galaxy (financiado en parte por el Centro de Investigación Colaborativo 992 Epigenética Médica y el Ministerio Federal de Educación e Investigación de Alemania) y Center for Genomic Epidemiology (Research group for Genomic Epidemiology and National Food Institute) que permitieron los análisis genómicos de S. aureus presentados en éste estudio.

A mis compañeros del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA, por alentarme siempre y acompañarme en éste proceso hasta el final.

A mi esposo e hijos, por acompañar y apoyar cada una de las etapas de éste largo proceso y disculparme todas las veces que estuve ausente para cumplir con mi rol de estudiante.

A mis padres y hermanos, por guiarme y acompañarme siempre, sin su apoyo incondicional no hubiera sido posible éste logro.

A mis tíos, abuela y madrina, por sus incansables oraciones, uno de los principales motivos por el que sigo en pie.

A Dios, la fuerza motora que me impulsó hasta aquí.

ABREVIATURAS

ATCC: del inglés, "American Type Culture Collection"

BHI: del inglés, "Brain Heart Infusion"

CC: Complejo clonal

CDC: del inglés, "Center for Disease Control and Prevention"

CLSI: del inglés, "Clinical and Laboratory Standard Institute"

IPPB: Infecciones de Piel y Partes Blandas

MLST: del inglés, "Multi-locus Sequence Typing"

MLVA: del inglés, "Multi-locus Variable Analysis" o "Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis"

NCTC: del inglés, "National Collection of Type Cultures"

NGS: del inglés, "Next Generation Sequencing"

PBPs: del inglés, "Penicillin Binding Proteins"

PFGE: del inglés, "Pulsed Field Gel Electrophoresis"

PVL: Leucocidina Panton-Valentine

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SARM-AC: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad

SARM-AH: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado al hospital

cassette SCCmec: del inglés, "Staphylococcal Cassette Chromosome mec"

ST: secuenciotipo del inglés, "Sequence Type"

TSA: del inglés, "Tryptone Soy Agar"

TSB: del inglés, "Tryptic Soy Broth"

TSST-1: Toxina del Síndrome de Shock Tóxico 1

VNTR: del inglés, "Variable Number Tandem Repeat"

WGS: del inglés, "Whole Genome Sequencing"

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1. <i>S. aureus</i> . Características generales.	10
2.2. Resistencia a los antibióticos	11
2.3. Resistencia a metilina y <i>cassette SCCmec</i>	12
2.4. <i>S. aureus</i> resistente a metilina asociado al hospital (SARM-AH) y <i>S. aureus</i> resistente a metilina asociado a la comunidad (SARM-AC)	14
2.5. Factores de Virulencia	17
2.5.1. Leucocidina de Panton-Valentine	18
2.5.2. Enterotoxinas estafilocócicas (SE)	19
2.5.3. Toxina del Síndrome del Shock Tóxico	21
2.5.4. Hemolisinas	21
2.5.5. Toxinas exfoliativas	22
2.6. Variabilidad Genética.....	22
2.7. Distribución geográfica de clones SARM	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Específicos.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1. Diseño del estudio	31
5.2. Material Biológico	31
5.3. Caracterización fenotípica	32
5.4. Caracterización molecular	32
5.4.1. Extracción del material genético	32
5.4.2. Identificación molecular	32
5.4.3. Identificación de clones SARM	33
5.4.4. Tipificación del <i>cassette SCCmec</i>	34
5.4.5. Tipificación del <i>locus Spa</i>	35
5.4.6. Multi-Locus Sequencing Typing	35
5.4.7. Multi-Locus Variable Analysis	36
5.4.8. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado	36
5.4.9. Análisis del Genoma Completo	38
5.4.10. Ensayo de Expresión Génica de Factores de Virulencia.....	40

5.5.	Análisis y Gestión de Datos	42
5.6.	Aspectos éticos.....	42
6.	Resultados.....	44
6.1.	Características clínicas y demográficas	44
6.2.	Perfil de Susceptibilidad a Antibióticos.....	45
6.3.	Caracterización molecular	46
6.3.1.	Detección de factores de virulencia	47
6.3.2.	Niveles de expresión génica de factores de virulencia.....	49
6.3.3.	Identificación de clones SARM (N=85)	52
6.3.4.	Electroforesis en Gel de Campo Pulsado	57
6.3.5.	Análisis de genoma completo (WGS) por la técnica NGS (Next Generation Sequencing).	58
7.	DISCUSIÓN.....	70
7.1.	Clones SARM causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos	70
7.2.	Complejo Clonal 30: CC30	71
7.3.	Complejo Clonal 5: CC5	72
7.4.	Complejo Clonal 8: CC8	74
7.5.	Complejo Clonal 15: CC15	75
7.6.	Análisis de Susceptibilidad a Antimicrobianos y Genes de Resistencia	75
7.7.	Factores de Virulencia, detección genética.....	78
7.8.	Análisis de expresión de factor de virulencia: PVL.....	80
7.9.	Factores de Virulencia, detección genómica: VIRULOMA	82
8.	CONCLUSIONES	85
9.	PERSPECTIVAS	86
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
11.	ANEXOS.....	103

1. RESUMEN

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) es uno de los patógenos humanos más importantes, con la capacidad de causar una amplia variedad de infecciones, desde leves a invasivas y potencialmente mortales. SARM posee una epidemiología compleja, por la circulación de cientos de clones a nivel mundial, debido a su gran variabilidad genética y capacidad de portar numerosos genes de resistencia y factores de virulencia, cuya expresión podría contribuir a la severidad de las infecciones. En Sudamérica, los clones SARM encontrados más frecuentemente son el clon Pediátrico (CC5-ST5-IV), el Cordobés-Chileno (CC5-ST5-I), el SouthWest Pacific (CC30-ST30-IV), el Brasileiro (CC8-ST239-III), el New York/Japan (CC5-ST5-II) y una variante del Pediátrico, el clon Pediátrico-Argentino (CC5-ST100-IV). Los reportes sobre SARM circulando en Paraguay están limitados a un par de artículos de clones circulantes en adultos hospitalizados (CC5-ST5-I y CC8-ST239-III) y niños de la comunidad (CC30-ST30-IV y CC5-ST5-IV).

Este estudio observacional, descriptivo de corte transversal tuvo por objetivo principal estudiar la epidemiología molecular de SARM causante de infecciones invasivas en niños paraguayos colectados en un periodo de 10 años (2009-2019); mediante la implementación de técnicas moleculares como MLST, tipificación del *cassette SCCmec* y de la proteína *spa*, PFGE, MLVA, detección y expresión de factores de virulencia por PCR y análisis del genoma completo de aislamientos representativos por NGS.

Los resultados del presente estudio revelaron la circulación de cuatro complejos clonales diferentes (CC30, CC5, CC8 y CC15), cada uno compuesto por clones principales y variantes estrechamente relacionadas entre sí. Los principales clones SARM identificados fueron el CC30-ST30-IV (66%) y CC5-ST5-IV (21%), que cuentan con su principal reservorio en la comunidad, pero además no solo ingresan sino que son verdaderamente adquiridos dentro del hospital. Entre los años 2009-2011, el clon CC5-ST5-IV (54%) estaba instalado fuertemente en la comunidad y con el correr de los años fue desplazado ampliamente por el CC30-ST30-IV, éste último considerado como el más prevalente hasta el día de hoy (66%). El éxito del CC30-ST30-IV se debe a varios factores que conllevan a un comportamiento más agresivo del CC30-ST30-IV frente al CC5-ST5-IV, motivo por el que lo desplaza.

Se estudió la expresión de PVL, uno de los principales factores de virulencia, en ambas cepas identificadas como mayoritarias en este estudio, CC30-ST30-I PVL+ y CC5-ST5-IV PVL+. La expresión de la PVL fue significativamente mayor en la fase exponencial, considerada como la etapa de mayor tasa del crecimiento bacteriano. Esta información es relevante para comprender las fallas terapéuticas en pacientes inmunocomprometidos, ya que es en esta fase inicial del crecimiento bacteriano en que

se produce la activación del sistema inmune y fagocitosis de SARM en los huéspedes sanos, no así en individuos inmunocomprometidos.

El análisis de los genomas completos de los diez clones SARM seleccionados como más representativos permitió obtener información valiosa sobre múltiples genes de virulencia, resistencia y clonalidad, nunca antes estudiados en nuestro país, dando a conocer la complejidad de los linajes de SARM que circulan en Paraguay.

La información generada en el presente estudio es un primer paso para implementar una vigilancia genómica activa, útil no sólo para comparación con datos regionales y/o mundiales que contribuyan al conocimiento universal sobre el microorganismo, sino también para la detección oportuna y a tiempo de cambios significativos en la epidemiología local que permitan emitir alertas tempranas ante posibles brotes a nivel nosocomial o comunitario. También se podría detectar desplazamientos en nichos ecológicos, demostrar la adquisición de características adaptativas por los clones circulantes, que motiven a los comités de vigilancia a reencausar sus esfuerzos en la lucha contra las infecciones por SARM, considerando ambos contextos: el hospital y la comunidad.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, epidemiología molecular, secuenciación completa del genoma, infecciones invasivas, niños, Paraguay.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han sido la causa predominante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial a lo largo de la historia de la humanidad, lo que no sólo ha restringido el bienestar de las personas sino que, además, ha cercenado la prosperidad social de las primeras civilizaciones. Recién en el siglo XX, con el descubrimiento de la penicilina, las mejoras en las condiciones de vida y la optimización de las intervenciones preventivas, las sociedades actualmente desarrolladas emergieron de esta situación. Aun así, actualmente un tercio de las muertes que ocurren en el mundo se deben a las enfermedades transmisibles (1–3).

Las bacterias Gram-positivas, especialmente los cocos, junto con los bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son los microorganismos aislados con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas humanas en el laboratorio de microbiología. Históricamente el *Staphylococcus aureus* es sin duda el patógeno más importante entre los estafilococos, y continúa siendo una de las bacterias más comúnmente implicadas en infecciones humanas a nivel mundial. Está ampliamente distribuido en la naturaleza y puede ser recuperado del ambiente o como habitante comensal de la piel, las mucosas y otros sitios del cuerpo de seres humanos y animales. Alrededor del 30% de la población general a nivel mundial es portadora asintomática de *S. aureus* en fosas nasales, considerado ésto como un factor de riesgo para posteriores infecciones (4,5).

2.1. *S. aureus*. Características generales.

S. aureus, patógeno Gram positivo perteneciente a la familia *Staphylococcaceae* y al género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes. *S. aureus* es una bacteria esférica de aproximadamente 0,5-1,5 µm de diámetro, agrupadas como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o en forma de racimos de uvas. Sus colonias miden de 1 a 3 mm y producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides, por lo que reciben la denominación *aureus* = dorado, muchas cepas producen β-hemólisis a las 24-36 horas. En 1880, Pasteur describió y cultivó al *S. aureus*, pero fue Sir Alexander Ogston en 1881 quien introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración (6,7).

Es un coco gram-positivo, no móvil, no esporulado, no posee cápsula, es anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Resiste al calor y a la desecación y puede crecer en condiciones de salinidad (7,5% NaCl). Crece rápidamente en agar sangre, y produce dos enzimas: la catalasa y coagulasa, entre otras, siendo ésta última responsable de la actividad de coagulación del plasma citratado, principal característica

que lo diferencia de los demás estafilococos. La catalasa es la enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre; característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. Otra de sus características bioquímicas más importantes es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol para producir ácido láctico (8,9). *S. aureus* fue uno de los primeros patógenos descritos y sigue siendo una de las causas más comunes de infecciones en humanos. Tiene gran importancia clínica debido a su capacidad para ocasionar una gran variedad de infecciones, en el hospital como en la comunidad con graves consecuencias, así como su capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales. Puede causar desde infecciones leves de piel y partes blandas, intoxicaciones alimentarias, neumonías hasta incluso bacteriemias, endocarditis, osteomielitis e infecciones relacionadas a instrumental médico, que podrían comprometer la vida del paciente (10).

Su diversidad patogénica refleja su habilidad para colonizar exitosamente, adaptarse y sobrevivir en diferentes tejidos celulares durante la infección debido a que es capaz de portar genes que le confieren resistencia a los antibióticos, otros que codifican factores de virulencia, y a su plasticidad genética, ya que le permite una mejor adaptación al huésped (10,11).

2.2. Resistencia a los antibióticos

S. aureus es naturalmente susceptible a prácticamente todos los antibióticos que se han desarrollado hasta el momento; pero adquiere resistencia principalmente por transferencia horizontal genética, incluso de fuentes externas que son distantes filogenéticamente, aunque también por otros mecanismos importantes como mutación cromosómica y posterior selección antibiótica (12).

La susceptibilidad natural exquisita de *S. aureus* condujo al descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en el año 1928, un antibiótico betalactámico de acción bactericida, que actúa inhibiendo la pared celular bacteriana. Este hecho histórico marcó el inicio de la “era de los antibióticos” y permitió el tratamiento de enfermedades que hasta ese entonces eran consideradas fatales, como infecciones de heridas en la piel, neumonías bacterianas y sepsis. La resistencia a la penicilina por *S. aureus* surgió en los hospitales poco tiempo después de su industrialización, durante la Segunda Guerra Mundial. En 1958 se desarrolló la meticilina, un antibiótico semisintético, también de la familia de los betalactámicos, aunque ya en 1960 fue identificado clínicamente el primer *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Desde entonces, SARM ha sido la bacteria resistente a los antimicrobianos más prevalente y conocida durante más de 60 años, principalmente en el entorno hospitalario (4,12,13).

El gen de la resistencia a penicilina (*blaZ*) es plasmídico, a diferencia del gen de la resistencia a meticilina (*mecA*) que es cromosómico, y sólo está presente en cepas SARM, no en *S. aureus* sensible a meticilina (SASM). *mecA* no es exclusivo de *S. aureus*, pues se han identificado varios alotipos del gen *mecA* en otras especies estafilocócicas humanas y de otros orígenes. Aparte de *S. aureus*, *mecA* también se ha detectado en *S. sciuri*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. vitulinus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*, convirtiéndose en una preocupación cada vez mayor en la medicina humana y veterinaria (4).

Los brotes asociados con la resistencia a diferentes antibióticos en *S. aureus* ocurrieron posteriormente en diferentes oleadas. Al aumento de la resistencia a la penicilina siguió la aparición de brotes epidémicos por las primeras cepas identificadas de SARM en el Reino Unido que luego se expandieron por toda Europa. A partir de la década de 1980 surgieron nuevos linajes de SARM que dieron lugar a una expansión sin precedentes a nivel mundial. En el Reino Unido, la proporción de aislamientos de SARM en hemocultivos aumentó en la década de 1990 y alcanzó aproximadamente el 40% alrededor de 2000, aunque disminuyó a menos del 10% en la década de 2010. Desde entonces una alta prevalencia de resistencia a la meticilina y a otros antimicrobianos se correlaciona con el uso inapropiado de antimicrobianos en el ambiente hospitalario, por lo que la prevalencia de SARM todavía se usa como un indicador de buenas prácticas de control y prevención de infecciones y la idoneidad del uso de antimicrobianos. Clínicamente, un problema importante asociado con *S. aureus* es el notable nivel de adquisición de resistencia contra múltiples familias de antibióticos, lo que complica el tratamiento ante un proceso infeccioso, con el consecuente incremento de la morbi-mortalidad, duración de las estancias hospitalarias y costos de atención médica (4,14).

2.3. Resistencia a meticilina y cassette *SCCmec*

Las cepas de SARM, producen una proteína específica de unión a penicilina, la PBP2a, codificada por el gen *mecA*, que posee una reducida afinidad de unión a los antibióticos betalactámicos. El descubrimiento de la amplia diseminación del gen *mecA* entre las diferentes especies de estafilococos, condujo a la hipótesis de que podría estar presente en un elemento móvil con capacidad de transferencia horizontal. La aparición de linajes estafilocócicos resistentes a meticilina (SARM) obedece a la adquisición e inserción de un elemento genético móvil denominado: *cassette cromosómico estafilocócico mec* (*SCCmec*) en el cromosoma de cepas susceptibles (SASM) (**Figura 1**) (14,15).

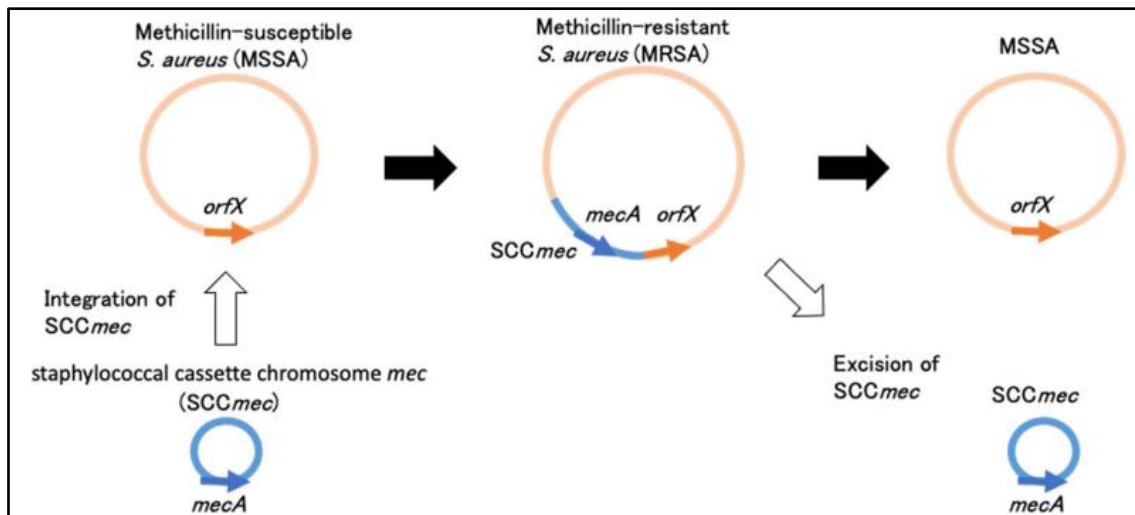


Figura 1. Representación esquemática de la escisión del SCCmec y su integración en *S. aureus*. Extraído de Uehara 2022.

Este elemento genético móvil de 21 a 60 kb es la característica definitoria de las cepas de SARM y es responsable de conferir la resistencia a los β -lactámicos de amplio espectro. Estos *cassetes* comparten tres elementos estructurales/genéticos básicos: el complejo del gen *mec*, que contiene el gen *mec* (*mecA*, *mecB*, *mecC* y/o *mecD*) y genes reguladores que controlan su expresión (*mecR1* y *mecI*); el complejo del gen *ccr*, que codifica las recombinasas específicas del sitio, (*ccr*) (*ccrAB* y/o *ccrC*); y por último la región de unión (*regiones J*). SCCmec también puede contener otras estructuras genéticas, como Tn554, pT181, y pUB110, que se encargan de conferir resistencia a otros antibióticos no β -lactámicos. La gran diversidad en su organización estructural y contenido genético han dado lugar a su clasificación en tipos y subtipos. Se han identificado al menos 13 tipos de elementos SCCmec hasta el momento, cada uno con sus características individuales. La **figura 2** ilustra las variaciones estructurales de cada uno de los 13 tipos SCCmec de cepas prototípicas de SARM. Es una práctica común definir la procedencia de los clones SARM por la combinación del tipo SCCmec y el linaje genético al que pertenecen (14,15).

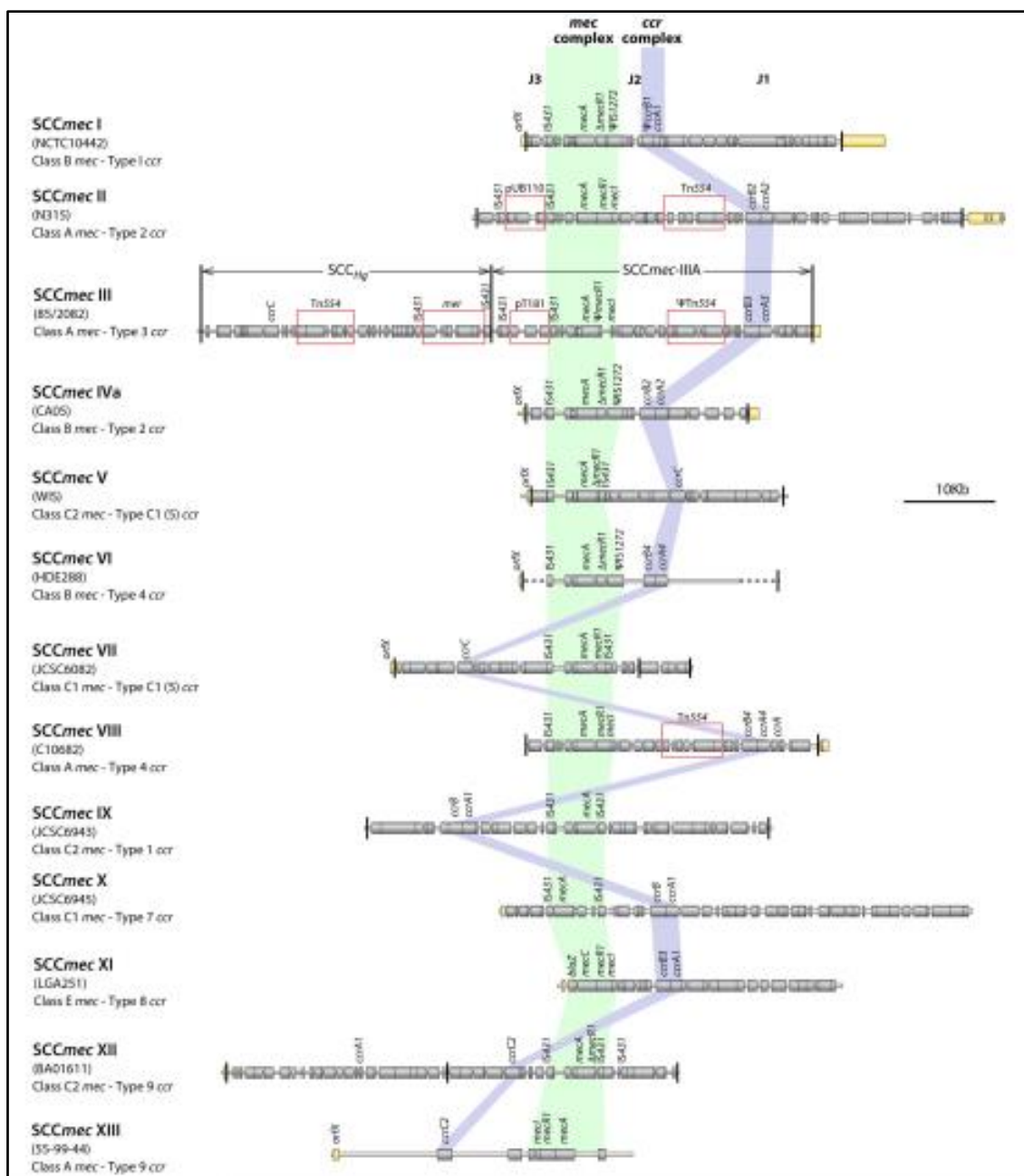


Figura 2. Diagrama ilustrativo de la composición estructural de cada uno de los 13 tipos de SCCmec reportados hasta el momento en cepas SARM. Extraído de Lakhundi y Zhang, 2018 (4).

2.4. *S. aureus* resistente a meticilina asociado al hospital (SARM-AH) y *S. aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC)

Una de las características más llamativas del SARM es la fuerte estructura clonal de la población bacteriana. Desde su primera aparición en la década de los 60's, SARM ha sido reconocido como un patógeno nosocomial (SARM-AH), con altas tasas de incidencia en todo el mundo, e incluso hoy día sigue siendo una de las causas más comunes de infección intrahospitalaria, con mayor riesgo de infección para aquellos

pacientes con sistemas inmunitarios comprometidos u otras condiciones comórbidas. Rara vez causan infecciones en individuos sanos que no están hospitalizados o asistidos a un servicio de salud en los 6 a 12 meses previos a la infección (4,16).

Las infecciones por SARM-AH suelen ser clínicamente difíciles de tratar debido a su resistencia a múltiples clases de antibióticos, lo que genera un enorme problema económico y logístico, con una morbilidad y mortalidad significativas, traducidas en estancias hospitalarias más prolongadas y una mayor utilización de los recursos (incluidos los productos farmacéuticos y el personal), lo que resulta en un aumento de 3 veces en los costos del tratamiento. Las estrategias de control de infecciones, incluidos los programas de vigilancia del lavado de manos, las políticas de administración de antibióticos, las leyes de notificación obligatoria y los programas de detección y descolonización, han contribuido a la disminución de la incidencia de infecciones por SARM. SARM-AH describe el comportamiento epidemiológico de cepas particulares que son específicamente exitosas en entornos hospitalarios y pueden ser endémicos en ciertos institutos de atención médica, causando niveles epidémicos de infecciones que generalmente están por encima del umbral de la tasa de infección por *S. aureus*. Las cepas de SARM-AH se encuentran entre las causas más comunes de infecciones asociadas con catéteres intravenosos, neumonías asociadas a ventiladores, endocarditis infecciosa e infecciones de heridas quirúrgicas, incluso en países industrializados como en los Estados Unidos. Los clones típicos de SARM-AH son CC5-ST5, CC8-ST239, CC22-ST22 y CC30-ST36. Muchos factores contribuyen al éxito de SARM-AH en el ambiente nosocomial: su capacidad para persistir como comensal, su habilidad para combatir múltiples agentes antimicrobianos y sus múltiples determinantes de virulencia, a menudo con funciones redundantes. Sin embargo, una consecuencia biológica de adquirir todas estas funciones es la reducción del *fitness* competitivo. Esto generalmente se ha asociado con la incapacidad de SARM-AH para propagarse de manera eficiente en la comunidad (4,16).

A finales de la década de los 80' se registraron los primeros aislamientos SARM causantes de infecciones adquiridas en la comunidad (SARM-AC) en Oceanía; este clon (CC1-ST1-SCC*mec*IV) se denominó WA-1, por Western Australia-1. Posteriormente, SARM-AC se estableció fuertemente en el ambiente extrahospitalario a principios del siglo XXI, con importantes brotes de infecciones de piel y partes blandas (IPPB) en personas sin atención médica previa, dejando de ser un patógeno estrictamente nosocomial, con el consecuente cambio de su epidemiología (17). SARM-AC ha sido descrito como genéticamente distinto a las cepas SARM-AH, en la configuración del *cassette* SCC*mec* que porta el gen *mecA*, en la resistencia a otras clases de antibióticos y en su tasa de crecimiento. También difieren en sus toxinas asociadas y/o factores de

virulencia y enzimas. Los *cassettes SCCmec* más grandes (los tipos *SCCmec* I a III) están presentes en las cepas de SARM-AH y probablemente se transmitieron cada uno en una única ocasión desde especies comensales de *Staphylococcus*. Sin embargo, los tipos *SCCmec* más pequeños (IV y V) son transferidos desde cepas sensibles a la meticilina con frecuencia, lo que resulta en la aparición de mayor diversidad de clones de SARM-AC. A diferencia de los *SCCmec* tipos I a III, que portan genes para la resistencia a múltiples antibióticos, los tipos IV y V de *SCCmec* solo portan el gen *mecA*. Los *cassettes SCCmec* tipos IV y V y la portación de una citotoxina, la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), fueron la base principal para diferenciar SARM-AH de SARM-AC (4,16).

Es notable cómo algunos clones de SARM-AC pueden prevalecer en regiones geográficas específicas. Por ejemplo, en Europa, CC80-ST80 es el clon predominante de SARM-AC, y posiblemente se originó a partir de un ancestro de SARM positivo para PVL del África subsahariana. En Australia, prevalecen 3 clones diferentes (CC93-ST93, CC30-ST30 y CC1-ST1). El CC30-ST30 es también el clon de SARM-AC predominante en América del Sur. En los EEUU, el clon CC8-ST8 (el llamado USA300) es el clon dominante en las infecciones comunitarias. Sin embargo, los factores involucrados en la expansión local de un clon específico de SARM-AC y los mecanismos detrás de la diversificación bacteriana en cepas hospitalarias o comunitarias continúan poco claros. En la década del 2000, se ha identificado a SARM-AC como agente causal de importantes brotes nosocomiales a nivel mundial, compitiendo con los clones de SARM-AH, lo que representó un cambio epidemiológico importante. Estos hallazgos están en línea con modelos matemáticos que predijeron el reemplazo de SARM-AH en los nichos hospitalarios por clones SARM-AC epidémicos, albergando un *cassette SCCmec* más pequeño (*SCCmec* IV) con un menor costo de fitness, aunque la coexistencia de ambos también se ha sugerido (4,16–19).

La aparición de SARM-AC como causa de infecciones intrahospitalarias y/o asociadas a la atención médica, expone a un grupo más amplio de pacientes hospitalizados, personal de salud y sus contactos en la comunidad a un potencial riesgo de infección por SARM. También las cepas de SARM-AC quedan expuestas a la presión selectiva del uso de antibióticos en los hospitales, lo que puede resultar en el aumento de la resistencia a los mismos, cambiando sus características moleculares y por tanto su definición, obstaculizando los esfuerzos de control. Es más, todos estos cambios epidemiológicos tienen implicaciones significativas para el diagnóstico y tratamiento tanto de SARM-AC (tener en cuenta SARM para establecer pautas de terapia empírica) y SARM-AH (opciones de tratamiento con antimicrobianos no betalactámicos). Es por ello que existe una necesidad urgente de estudiar su prevalencia y epidemiología, así

como desarrollar sistemas de identificación y control de clones en la comunidad, en los hospitales y todo tipo de instalaciones médicas, (17,18).

2.5. Factores de Virulencia

S. aureus tiene la capacidad de producir un amplio espectro de factores de virulencia, en su mayoría proteínas que le confieren la habilidad de contrarrestar al sistema inmune innato, con el consiguiente retraso de la respuesta inmune adaptativa, promoviendo así la propagación bacteriana a los tejidos y órganos profundos que desencadenen una enfermedad. Estos factores de virulencia incluyen moléculas adhesivas, dañinas para la célula huésped e inmunomoduladoras, que varían en su presencia o especificidad entre clones, reflejadas por la gran diversidad de infecciones que éste microorganismo puede causar. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y toxinas como hemolisinas, nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas es la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina del síndrome del shock tóxico 1 (tsst-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas y la leucocidina de Pantón Valentine (**Figura 3**) (4,6,9,20).

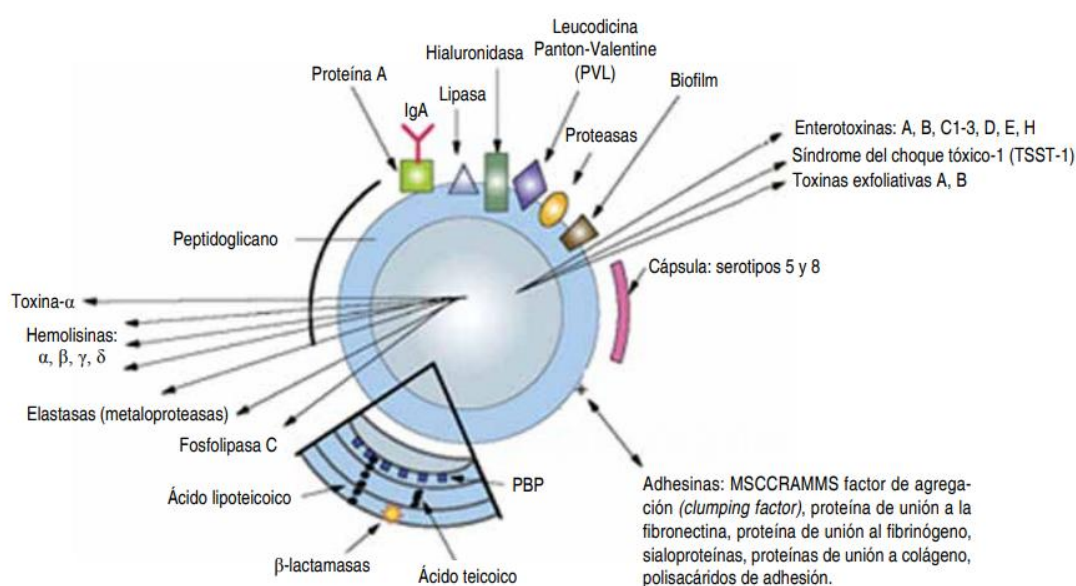


Figura 3. Principales factores de virulencia de *S. aureus*. Extraído de Cervantes-García et al, 2014 (6).

Los factores de virulencia de *S. aureus* se clasifican teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria (asociados a la pared celular) o si son liberados al medio extracelular como enzimas o toxinas. Las más comunes proteínas estafilocócicas ancladas en la pared celular son aquellas con afinidad a fibrinógeno, fibronectina, colágeno, sialoproteína, elastina y adhesinas con función desconocida. Entre ellas

podemos mencionar, una gran variedad de adhesinas de superficie, que han sido usadas como marcadores de moléculas adhesivas a la matriz: la cápsula de polisacárido externa que sirve para evitar la fagocitosis del microorganismo, la presencia de la proteína A que estimula reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato y retardado, los constituyentes de la pared celular como peptidoglicano y ácidos teicoicos que, aparte de conferir rigidez y elasticidad a la estructura del microorganismo, también contribuyen a la virulencia (1,9,21).

El segundo grupo de factores de virulencia está representado por enzimas como la catalasa, hialuronidasa, lipasas, coagulasa, nucleasas, proteasas, estafilococinasa, colagenasa, una familia de proteínas bacterianas con actividad superantigénica (activa de manera exacerbada el sistema inmunológico): las enterotoxinas (SE), toxina del síndrome del shock tóxico-1, toxinas exfoliativas A y B, otras toxinas como hemolisinas (alfa, beta, gama, delta) y la leucocidina de Pantón Valentine, las cuáles son proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano (1,9,21).

Muchos genes codificantes de factores de virulencia se encuentran sobre elementos genéticos móviles; por tanto, su combinación difiere sustancialmente entre clones e incluso entre cepas estrechamente relacionadas. Aun así es difícil asociar la portación o expresión de factores de virulencia específicos con ciertos clones o la agresividad de las infecciones causadas por *S. aureus*, probablemente porque muchos de estos factores tienen funciones redundantes y parcialmente superpuestas, o porque no pueden ser investigados en modelos animales por ser específicos de humanos (20).

2.5.1. Leucocidina de Pantón-Valentine

La leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) es una leucotoxina que pertenece a una familia de toxinas sinergohimenotrópicas, consistente en dos componentes no asociados que actúan sinérgicamente sobre las membranas celulares formando poros. Los principales objetivos celulares de la PVL son los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, uniéndose a los receptores del complemento en las membranas de estas células e induciendo la formación de canales de membrana que conducen a la destrucción celular. La toxina también induce la liberación de citocinas proinflamatorias y el factor nuclear kappa B en los neutrófilos, siendo un importante factor de virulencia en las infecciones necrotizantes. Está codificada por los genes *lukS-PV* y *lukF-PV*, transmitidos por bacteriófagos y cuya detección se utiliza en estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de la PVL en cepas de *S. aureus* (22,23).

Su portación es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de cuadros clínicos más graves. Producida por el 3%-10% de las cepas clínicas de *S. aureus* implicadas en la gravedad de las infecciones hospitalarias y adquiridas en la comunidad. También se ha identificado a la PVL en otras especies estafilocócicas como *S. haemolyticus* y *S. simulans*.

Los brotes ocasionados por *S. aureus* portador de PVL se reportaron por vez primera en cepas SARM a mediados del siglo XX, mientras que en la década de 1990 se informó por primera vez la PVL asociada a SARM-AC en un brote relacionado al clon emergente CC8-ST8/USA300. Este clon se convirtió en el predominante productor de PVL en los EEUU y otros clones se diseminaron en otras regiones: CC80-ST80 en Europa, CC59-ST59-V en Asia, CC30-ST30 en Asia-Pacífico y CC93-ST93-IV en Australia. Sin embargo, la toxina no es responsable exclusivamente del éxito de determinados clones SARM-AC, ya que existe controversia respecto al papel de PVL en la patogénesis de la infección por SARM-AC. Además, se ha comprobado que las cepas SARM PVL+ producen un cuadro clínico similar al de SARM PVL-, por lo que se cree que éste primero podría ser un reservorio potencial para la aparición de cepas SARM PVL+ (22,23).

2.5.2. Enterotoxinas estafilocócicas (SE)

Hasta el momento se han identificado aproximadamente 24 SE diferentes, en función de su potencial antigénico y nombrados de SEA a SE/Y en orden cronológico de descubrimiento. Las SE comprenden una superfamilia de proteínas que comparten muchas características comunes: son proteínas monocatenarias no glicosiladas con una estructura globular homóloga y de bajo peso molecular (19–29 kDa). Se pueden dividir en dos grupos: las SE verdaderas, que comprenden las toxinas con potencial emético demostrado en monos, y las toxinas similares a enterotoxinas (SE/-), que comprenden aquellas que carecen de actividad emética o que no han sido probadas en animales. Según sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos, las SE y SE/- se pueden subdividir en varios grupos:

- el grupo SEA (SEA, SED, SEE, SE/J, SEH, SEN, SEO, SEP, SES),
- el grupo SEB (SEB, SEC, SEG, SER, SE/U, SE/W, antes conocido como SE/U2),
- el grupo SEI (SEI, SEK, SEL, SEQ, SEM, SE/V)
- el grupo SE/X (TSST-1, SET, SE/X, SE/Y)
- toxinas similares a superantígenos (SSL) o SAg, superantígenos únicos, que incluyen al menos 26 proteínas distintas, incluyendo el síndrome de choque tóxico, el SAg TSST-1

- un operón que codifica seis enterotoxinas estafilocócicas similares a SE, el grupo EGC (24–29).

La mayoría de los genes de enterotoxinas se encuentran, en forma individual o agrupada, en una amplia variedad de elementos genéticos móviles (MGE), incluidos profagos, plásmidos, transposones, islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPI) y grupos de genes de enterotoxinas. Entre las SE clásicas, *sea* es transportada por una familia de fagos, *seb* y *sec* están ubicadas en SaPI, *sed* es transportada por un plásmido de 27,6kb denominada pIB485 y *see* es transportada por un fago defectuoso. Existe un grupo de SE, denominada *Enterotoxin Gene Cluster* (EGC), contenido en un operón de genes que codifica las SEG, SEI, SEM, SEN, SEO y dos pseudogenes, ϕ ent1 y ϕ ent2. A diferencia de muchas SE recientemente descritas, las codificadas por el operón del grupo EGC actúan como un semillero de nuevas enterotoxinas generando nuevos genes de SE a través de reordenamientos genómicos. La delección, duplicación y recombinación en éste operón del genoma a menudo conduce a la generación de nuevos tipos de enterotoxinas y sus variantes. Teniendo en cuenta el amplio espectro de diferentes bases genéticas para la producción de enterotoxinas, es fácil entender que los aislamientos de *S. aureus* varíen considerablemente: el 80 % de los aislamientos tienen un promedio de 5 a 6 genes SE (27,30–32).

Por el momento se conoce que las clásicas SE (SEA-SEE y SEH), y en menor grado también las SE recientemente descritas como las del grupo EGC, incluidas SEG y SEI, pueden provocar respuesta emética en ensayos en monos. Además para las clásicas SE se demostró también actividad emética en ensayos en humanos. Sin embargo, se demostró que las cepas que portan los genes *sei* y *seg* sólo producen niveles muy bajos de las proteínas SEG y SEI, con una consecuente actividad emética débil demostrada para SEI. Si bien varios estudios en los últimos años indican que SEG y SEI podrían ser responsables de casos de enfermedad estafilocócica transmitida por alimentos (SFP, por sus siglas en inglés *Staphylococcal Food Poisoning*) en humanos, la evidencia más fuerte los relaciona con colonización de mucosa a largo plazo: estudios experimentales en conejos han demostrado que los SE del grupo EGC pueden ser cruciales para el desarrollo de cierto tipo de infecciones como endocarditis o respiratorias (31,33–37).

S. aureus portador de SE es probablemente el principal patógeno transmitido por los alimentos que causa problemas tanto en la salud animal y humana. Además, representa una de las principales causas de mastitis en animales lecheros (vacas, cabras y ovejas), con una reducción sustancial tanto en la producción como en la calidad de la leche, generando pérdidas económicas considerables en la industria láctea. Por esas razones, su búsqueda y detección es importante en todo tipo de muestras clínicas y debido al potencial riesgo de brotes, a la contaminación de alimentos. La transmisión hacia

productos de manufactura que sean manipulados por un portador de SARM, representa también un riesgo para la salud pública (38–40).

2.5.3. Toxina del Síndrome del Shock Tóxico

En *S. aureus* se ha detectado una variedad de genes de toxinas superantigénicas, entre ellos el *tst-1*, que codifica la TSST-1, una exotoxina que se une tanto al receptor de células T (TCR) como a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, en las células presentadoras de antígenos. La intoxicación grave por un aislamiento portador del SAg TSST-1, codificado por el gen *tst-1*, puede resultar en la activación sistémica e incontrolada en las células T, lo que conlleva a una liberación masiva de citocinas conocida como el Síndrome del Shock Tóxico (TSS, por sus siglas en inglés), asociado con la sobreexpresión del SAg TSST-1. Los síntomas de TSS incluyen fiebre alta, sarpullido, hipotensión, síndrome de disfunción orgánica múltiple, resultando en la mayoría de los casos en la muerte del paciente (28,29,40).

Como exotoxina potente, no sorprende que *S. aureus* haya desarrollado múltiples sistemas para controlar la expresión de TSST-1. El sistema regulador de genes accesorios (Agr) mejora la expresión de TSST-1, a través de la actividad de la molécula efectora RNAIII, que reprime la traducción del regulador represor de toxinas (Rot), aumentando la expresión de TSST-1 en ausencia del gen *rot* durante la fase exponencial de crecimiento, así como la sobreexpresión de Rot reprime drásticamente la expresión de la proteína TSST-1. De esta forma Agr es considerado como un inductor de TSST-1 y ha evolucionado en combinación con Rot, para restringir la expresión de este potente SAg(29).

2.5.4. Hemolisinas

Las hemolisinas de *S. aureus*, como las toxinas β , α y δ , atacan las membranas celulares y causan daño plaquetario, destrucción de lisosomas, isquemia y necrosis. Hla (α -hemolisina) es una toxina formadora de poros que altera la membrana celular provocando cambios osmóticos irreversibles, lo que resulta en la muerte celular por apoptosis. Hla puede dañar la membrana de una variedad de células, como linfocitos, glóbulos rojos, plaquetas y células endoteliales. Hla se une a la célula diana a través de su receptor celular, la proteína transmembrana ADAM10, creando un heptámetro de barriles- β que extruye la bicapa lipídica y forma un canal transmembrana. Esto conduce a la permeabilidad celular, lo que resulta en la muerte celular y crea un estímulo proinflamatorio. La β -hemolisina (Hlb) está codificada por un bacteriófago lisogénico; en sí mismo, no puede destruir la mayoría de los tipos de células, pero expone las células vulnerables a otras proteínas líticas, como Hla y leucocidinas. Esta toxina, también

conocida como esfingomielinasa, muestra una alta actividad hemolítica contra los glóbulos rojos de carnero; pudiendo también dañar los queratinocitos, ayudando a la bacteria a colonizar la piel de los mamíferos. La diferente susceptibilidad de los eritrocitos de diferentes especies a Hlb puede deberse a la cantidad de esfingomielina presente en las células (40).

2.5.5. Toxinas exfoliativas

Las toxinas exfoliativas (ET) pertenecen a una familia de serina proteasas que muestran una exquisita especificidad de sustrato y reconocen e hidrolizan un único enlace peptídico en el segmento extracelular de la desmogleína 1 (Dsg1), una molécula de adhesión célula-célula de tipo cadherina desmosomal. Esta hidrólisis provoca una disociación de los queratinocitos en la piel humana y animal. Hasta la fecha, se han identificado tres serotipos diferentes de ET (ETA, ETB y ETD) en *S. aureus*, cuyas secuencias de aminoácidos deducidas son similares a las serina proteasas similares a la tripsina y se han asociado con infecciones cutáneas estafilocócicas como el Síndrome Stafilocócico de la Piel Escaldada (SSSS, por sus siglas en inglés) o impétigo ampolloso en humanos. La exfoliación causada por ETs está descrita en muchos hospederos filogenéticamente distantes, aunque con diferentes grados de susceptibilidad, lo que indica especificidad del hospedero (41).

2.6. Variabilidad Genética

Los clones SARM han surgido como un grave problema de salud pública a nivel mundial, varios se han identificado como importantes clones endémicos, y otros han causado brotes muy graves en la comunidad. Los clones presentes en los hospitales poseen características especiales, como la resistencia a múltiples antibióticos que les permiten subsistir en ese medio, de gran presión selectiva, aunque no generalmente no son capaces de infectar a individuos en la comunidad.

La capacidad de intercambio horizontal de material genético de *S. aureus* aporta un dinámico proceso evolutivo, dando origen a una gran variabilidad genética (42–44).

Los orígenes evolutivos de SARM eran poco conocidos en la década del 2000 y no existía una nomenclatura racional y consensuada sobre los principales clones descritos en los diferentes países y su relación entre sí, por lo que se nombraba a los nuevos clones según el nombre de la ciudad o el país donde fueron detectados por vez primera: NewYork/Japan, Brasileiro, Cordobés/Chileno, entre otros (45).

Con la circulación de numerosos clones SARM a nivel mundial, estudiar su epidemiología se volvió muy compleja. La habilidad del microorganismo requirió el empleo de numerosos métodos moleculares combinados para la identificación de los

clones y sus variantes, entre ellos, los más históricos: *phage-typing*, MLEE (Multi-locus enzyme electrophoresis), sistemas de tipificación basados en PCR (AFLP, RAPD, Rep-PCR) y tipificación del *locus agr*; algunos de ellos desplazados por la aparición de otros métodos más robustos y con resultados más objetivos que permiten la comparación entre laboratorios (**Tabla 1**), como aquellos enfocados al análisis de variabilidad genética a corto plazo, útiles para análisis en caso de brotes: PFGE (Pulse Field Gel Electroforesis, *gold standard* para tipificación de *S. aureus*) y MLVA (Multi-locus variable analysis), una técnica de alto poder resolutivo, con resultados comparables a PFGE; así como las metodologías enfocadas a la identificación de clones y complejos, capaces de detectar variabilidad a largo plazo: MLST (Multi-locus sequencing typing), tipificación del *locus spa* o spatipo (*spa typing*) y el tipo de *cassette SCCmec*, éste último explicado en detalle en el apartado de resistencia a meticilina. MLST y *spa typing* implican procesos de secuenciación de genes que aumentan el poder resolutivo del método, lo que permite diferenciar aislamientos de hasta una base de diferencia. Éstos últimos dos métodos permiten agrupar a los aislamientos en base a sus similitudes o diferencias, así como el estudio epidemiológico mediante la identificación de asociaciones clonales y el establecimiento de relaciones evolutivas a nivel mundial (46–48).

Tabla 1. Métodos moleculares para estudio de variabilidad genética de *S. aureus*.

Características	PFGE ^a	MLVA ^b	MLST ^c	Spa Typing ^d
Región estudiada	Genoma completo	7 genes constitutivos	7 genes constitutivos	1 gen constitutivo
Método molecular	Restricción enzimática	PCR	Secuenciación	Secuenciación
Usos	Epidemiología/ Análisis brotes	Epidemiología/ Análisis brotes	Epidemiología y evolución	Epidemiología y evolución
Ventajas	Gold standard	Específico, rápido, fácil ejecución, bajo costo	Resultados registrables, buena comparación interlaboratorial y generación de base de datos mundial	Fácil de desarrollar, buena comparación interlaboratorial y generación de base de datos mundial
Desventajas	Difícil comparación interlaboratorial, laborioso y costoso	Confirmación posterior con otros métodos de tipificación como PFGE	Aplicación de rutina inviable Costoso	Agrupación de aislados compleja Costoso

^a *Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de campo pulsado)*. Extraído de Chung 2000 (49) y Rivero-Pérez 2010 (50).

^b *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (Análisis polimórfico de locus múltiples con número variable de repeticiones en tándem)*. Extraído de Schouls 2009 (47).

^c *Multilocus sequence typing (Tipificación de secuencias multilocus)*. Extraído de Rivero-Pérez 2010, Schouls 2009 y Enright 2000 (45,47,50).

^d *Spa-sequence Typing (Tipificación de secuencias de la Proteína A)*. Extraído de Schouls 2009 (47).

La introducción de MLST como técnica de tipificación de *S. aureus* estableció un antes y un después en la historia evolutiva de la bacteria, porque permitió desarrollar un sistema de nomenclatura sistemática objetiva, y sumar esfuerzos entre laboratorios para la comparación en una base de datos a nivel mundial que permitió estimar la estructura poblacional de las diferentes especies bacterianas. MLST es una metodología molecular que implica la identificación de polimorfismos tras la amplificación y secuenciación de fragmentos de 7 genes conservados (loci), fácilmente reproducible entre diferentes laboratorios. Estos genes forman parte del genoma core y codifican para enzimas esenciales del metabolismo bacteriano, por lo cual son buenos marcadores de la evolución en el largo plazo. Los alelos identificados en cada uno de los siete loci definen el perfil de alelos de cada aislamiento. Un perfil alélico define el secuenciotipo (ST) de la cepa, que proporciona un descriptor conveniente e inequívoco para cada clon de *S. aureus* (45). MLST permite agrupar a los aislamientos entre grandes conjuntos de datos de su base (www.pubmlst.org) que tienen algún nivel definido de similitud en el perfil de alelos. Los aislamientos que comparten exactamente el mismo perfil alélico pertenecen al mismo ST y, por tanto, al mismo linaje genético o clon. Sin embargo, los aislamientos que difieren en uno o dos loci (variantes de locus único [SLV] o variantes de locus doble [DLV]) se consideran relacionados genéticamente y pertenecen a un grupo de linajes relacionados, denominado complejo clonal (CC). En el CC de cada perfil alélico ancestral putativo se visualizan patrones parsimoniosos de descendencia evolutiva de todos los aislamientos. Un CC incluye todos los aislamientos que descenden del mismo genotipo ancestral, aunque podría incluir otros aislamientos, por ejemplo, descendientes de aislamientos relacionados con el genotipo ancestral original. Dado que los CC se observan en una muestra muy pequeña de la población total de *S. aureus*, es probable que la cepa ancestral o progenitora del CC haya obtenido alguna ventaja adaptativa (aptitud) de modo que aumentó su frecuencia dentro de la población, por tanto es el ST más prevalente en la población, con una diseminación geográfica más amplia en comparación con sus descendientes. Durante su expansión clonal, se produjo una ligera diversificación genética, de modo que se acumularon descendientes de la cepa ancestral que difieren en uno de los siete loci MLST (SLV), y el genotipo ancestral putativo dentro de cada CC se define, por tanto, como el perfil alélico que tiene el mayor número de SLV y debe estar presente entre los aislamientos más tempranos o primitivos en el tiempo evolutivo (4,51).

Tras el desarrollo y la validación del esquema MLST para *S. aureus*, los clones de SARM se han definido en términos de ST y, se estableció por primera vez un lenguaje

inequívoco, generalizado, común y universal para SARM. Además, la aplicación de MLST al estudio de poblaciones de SARM ha brindado información importante sobre la estructura de su población. Validó datos de PFGE que proponen que las cepas de SARM, a diferencia de las SASM, tienen una población clonal muy fuerte. También se comprobó que los clones pandémicos pertenecen principalmente a unos pocos linajes genéticos, éstos últimos definidos además del CC-ST, por su *spatipo* y *cassette SCCmec* (4).

En la última década, la incorporación de técnicas de secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing), ha permitido la secuenciación de genomas bacterianos completos (WGS por sus siglas en inglés: *whole genome sequencing*) para estudios de epidemiología molecular. Las mismas son capaces de proporcionar en un solo proceso analítico información sobre: identificación bacteriana, susceptibilidad a antibióticos, portación de genes de virulencia, tipificación bacteriana y ubicar al genotipo dentro del árbol filogenético de la especie (52).

La alta tasa de transferencia horizontal genética entre algunas especies de bacterias, ha dado lugar a una inconmensurable diversidad y abundancia en el repertorio génico de los genomas, inclusive al considerar bacterias dentro de una misma especie. Esta diversidad se pudo evidenciar y analizar mejor desde la introducción de las técnicas de secuenciación masiva de tercera generación. En este contexto se ha desarrollado el concepto del pangenoma, que comprende todos los elementos genéticos del genoma de una especie, consta de dos partes: el genoma core, constituido por los genes presentes en todos los individuos de la especie, asentando las bases taxonómicas y el genoma flexible o accesorio, el cual puede estar presente en un sólo organismo de la especie y es el que otorga a las bacterias características adaptativas excepcionales. El estudio del pangenoma puede ayudar a redefinir especies patógenas (53).

El genoma bacteriano de *S. aureus* presenta una alta tasa de variabilidad genética, por lo que su estudio epidemiológico, además de requerir el empleo de técnicas moleculares combinadas para la identificación de los clones, también se completa con el uso de técnicas de secuenciación masiva para una mayor comprensión de la evolución de los clones presentes, por ejemplo, en una región geográfica específica (52).

Actualmente, la técnica NGS no está disponible en el Paraguay para estudios de bacterias, pero a nivel mundial aumenta cada día su disponibilidad y disminuyen sus costos y tiempo de respuesta (menor al de cualquier otra metodología de similar magnitud). Su utilidad ya fue demostrada para la predicción de resistencia a los antibióticos en *M. tuberculosis*, mediante el cual se obtuvo un resultado con varias semanas de anticipación respecto al ensayo tradicional de susceptibilidad fenotípica. En el caso de *S. aureus*, algunos fenotipos de resistencia (por ejemplo la resistencia

intermedia a la vancomicina) de difícil detección por los métodos fenotípicos convencionales, podrían detectarse fácilmente por métodos genotípicos (52).

2.7. Distribución geográfica de clones SARM

Los primeros clones de SARM tenían características genéticas y fenotípicas similares a los clones SASM, que produjeron importantes epidemias a principios de la década de 1960 en Europa. Una de las teorías más aceptadas indica que la aparición de SARM fue el resultado de la adquisición del gen *mecA* por parte de clones SASM de una fuente heteróloga desconocida (42).

A nivel mundial han sido descritos diferentes clones de SARM; sin embargo los informados con mayor frecuencia pertenecen a cinco CC principales: CC5, CC8 (incluido el subgrupo CC8-ST239), CC22, CC30 y CC45. De estos cinco principales CC, CC5 y CC8 son los más frecuentes en todo el mundo. Ambos CC contienen varios ST, que se diferencian por diferencias en la secuencia (SLV o DLV) de los genes utilizados para asignar su ST, y se distribuyen a lo largo de diferentes países/regiones del mundo (4).

Entre los clones predominantes a nivel mundial se encuentran el Brasilero-Húngaro (CC8-ST239-III), Ibérico (CC8-ST247-I), Pediátrico (CC5-ST5-IV, New York/Japón (CC5-ST5-II) y el USA300 (CC8-ST8-IV), éstos cinco clones principales tienen una capacidad única para hacer frente a entornos clínicos cambiantes(42). Mientras que CC30-ST36 es común en los Estados Unidos y el Reino Unido y CC45 es común en los Estados Unidos (CC45-ST45-II) y Europa (CC45-ST45-IV/V), CC22 es un CC generalizado a nivel mundial. El subgrupo CC8-ST239, CC5-ST5 y CC22-ST22 son los CC informados con mayor frecuencia en los países asiáticos. La evidencia sugiere que el linaje del subgrupo CC8-ST239 (CC8-ST239-III) de Corea del Sur, Hong Kong, Taiwán y Vietnam y CC5-ST5-II de Corea del Sur y Sri Lanka se han diseminado desde los hospitales a la comunidad. CC8-ST239-III y CC5-ST5-II son los principales clones de SARM-AH. La presencia de estos aislamientos en la comunidad refuerza la teoría del desplazamiento en nichos ecológicos de clones SARM-AH y SARM-AC. Los clones predominantes en América Latina incluyen CC5-ST5, CC8-ST239 y CC30-ST30, mientras que en África predominan el CC8-ST239, CC5-ST5 y CC30-ST36. CC8-ST612 se ha descrito con poca frecuencia en Sudáfrica y Australia. Los clones CC8-ST8-IV y CC30-ST30-IV, conocidos respectivamente como USA 300 y SouthWest Pacific (SWP), se han expandido globalmente y son considerados pandémicos (4,42,54,55).

En Sudamérica, los clones SARM encontrados más frecuentemente (incluyendo cepas comunitarias y hospitalarias) son el clon Pediátrico (CC5-ST5-IV), el Cordobés-Chileno (CC5-ST5-I), el SouthWest Pacific (CC30-ST30-IV), el Brasilero (CC8-ST239-III), el New York/Japan (CC5-ST5-II) y una variante del Pediátrico, el clon Pediátrico-Argentino

(CC5-ST100-IV) (42). En Argentina el principal clon SARM-AC, relacionado en la última década a infecciones invasivas es el CC30-ST30-IV-t019-PVL+, que pasó a ser predominante reemplazando al anteriormente descrito CC5-ST5-IV-t311-PVL+ (18,56,57).

En Uruguay, entre los años 1996 y 1998, Aires de Sousa y colaboradores, reportaron la presencia del clon Brasileiro (CC8-ST239-III) en el 100% de los aislamientos SARM colectados de cinco hospitales estudiados (58), éste mismo clon también fue identificado en cuatro de cinco hospitales de Montevideo por Senna y colaboradores en el año 2003, aunque sólo mostró predominio en uno de ellos (59). Entre los años 2002 y 2003, se registró en Montevideo un gran brote de infecciones causadas por SARM-AC, que afectó a personas privadas de su libertad y sus familiares, el 74,5% de los aislamientos identificados pertenecían al clon CC30-ST30-IV, altamente virulento y portador de los genes *PVL* y *cna*(60).

Los reportes sobre SARM circulando en Paraguay son limitados. Mayor y colaboradores en el 2007 reportaron dos linajes SARM-AH el CC5-ST5-t149-I y el CC8-ST239-t037-IIIA como circulantes en un hospital universitario del Paraguay en el año 2005. En el año 2020 en un estudio preliminar de nuestro equipo de investigación, Rodríguez y colaboradores reportaron dos linajes estafilocóccicos dominantes como responsables de infecciones estafilocóccicas en niños de la comunidad: CC30-ST30-IV-t019 (77%) y CC5-ST5-IV-t311 (10%), entre los años 2009 y 2013(61,62).

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, desde el año 2006 SARM es considerado una amenaza global y desde el año 2013, el reporte del CDC (*Center for Diseases Control and Prevention*) lo clasifica como un microorganismo de Nivel de Amenaza Seria (63). Numerosos estudios identifican ciertos linajes SARM asociados a resultados clínicos específicos (52). Por ejemplo el CC30 (complejo clonal 30) de *S. aureus* ha sido asociado a un alto índice de mortalidad en una cohorte europea (48). También, en Australia el CC8 (ST239) fue asociado significativamente con casos de bacteriemia persistente o recurrente, mientras que el CC22 fue menos comúnmente asociado a estos cuadros (64).

En Paraguay existen pocos datos publicados sobre caracterización molecular de *S. aureus* realizados en el país. Mayor y colaboradores en el 2007 publicaron la identificación de dos clones aislados de adultos hospitalizados en Asunción, cuyo análisis molecular fue realizado en Francia: el mayoritario fue el CC5-ST5-I, similar al clon Cordobés/chileno que se expandió a través de Sudamérica, y el minoritario CC8-ST239-IIIA, relacionado al clon Brasileiro (61).

Un brote grave de origen alimentario por *S. aureus*, en el año 2009 en Paraguay requirió la colaboración de centros de investigación argentinos para el estudio molecular. Esta situación puso de manifiesto la necesidad a nivel nacional de la implementación de metodología molecular que permita la vigilancia epidemiológica de aislamientos de *S. aureus* ante sospechas de brotes. En éste contexto un grupo de investigación de la UNA inició proyectos multidisciplinarios y multicéntricos orientados al estudio de la epidemiología molecular de SARM en infecciones pediátricas, logrando la creación del mayor biobanco de cepas de *S. aureus* de nuestro país, que cuenta actualmente con más de 900 muestras (62,65,66).

La potencia de los métodos moleculares, incluyendo la secuenciación de nueva generación permite evaluar a profundidad características propias de la bacteria como clonalidad, resistoma, viruloma y su evolución en el tiempo. La propuesta con éste proyecto de tesis fue realizar el análisis de la epidemiología molecular de aislamientos de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) que condujeron a las infecciones más graves en niños y que desencadenaron en cuadros invasivos, entre los años 2009 y 2019.

Así mismo, para evaluar el posible rol de cambios en la expresión de factores de virulencia, postulamos explorar la expresión de la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), una de las toxinas más características de SARM, en las diferentes etapas del ciclo celular.

El conocimiento de los principales clones de SARM circulantes en nuestro país, generará conocimiento epidemiológico importante conducente a la vigilancia genómica

activa, útil para comparación con datos regionales y/o mundiales y como contribución al conocimiento universal sobre el microorganismo. Además, permitirá la detección oportuna y a tiempo de cambios significativos en la epidemiología local que podrían indicarnos desplazamientos del nicho ecológico bacteriano o entre clones, indicativos de presencia y circulación de un nuevo linaje bacteriano exitoso que podría conducir a aumentos repentinos en los números de casos presentados normalmente en los centros asistenciales de nuestro país.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar la epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina causante de infecciones invasivas en niños paraguayos

4.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar fenotípica y molecularmente aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos.
2. Determinar la prevalencia de factores de virulencia de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos por métodos moleculares.
3. Establecer la correlación existente entre portación de factores de virulencia y su expresión.
4. Identificar clones de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos empleando métodos moleculares.
5. Establecer el patrón de evolución temporal de clones de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Para el cumplimiento de los objetivos postulados se recurrió a la realización de un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal, con muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

5.2. Material Biológico

Los aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) analizados en el presente estudio provenían de diferentes tipos de muestras biológicas colectadas de niños paraguayos con infecciones invasivas, de edades comprendidas entre 0 (cero) y 16 (dieciséis) años. Estas muestras fueron procesadas en cuatro hospitales de referencia de Asunción y el Dpto. Central del Paraguay participantes del presente proyecto de investigación: Hospital de Clínicas (HCL, FCM-UNA), Instituto de Previsión Social (IPS), Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú (HGP), Hospital Nacional de Itauguá (HNI), estos dos últimos dependientes del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social del Paraguay (MSPyBS). En la **tabla 2** se muestra el número total de aislamientos SARM colectados en cada periodo y los centros participantes, así como el correspondiente número de aislamientos SARM causante de infecciones invasivas incluidos en este estudio.

Tabla 2. Procedencia de aislamientos SARM causante de infecciones invasivas, según periodo de colecta

Periodo de Colecta	2009-2010	2012-2013	2017-2018	2019
S. aureus total (N)	192	430	300	30
SARM total (n)	31	117	85	15
SARM invasivas (n)	11	29	38	7
Centro asistencial	IPS	IPS	IPS	IPS
	HGP	HGP	HGP	HGP
	HNI	HNI	HCL	HNI
	HCL	HCL		

Los aislamientos colectados se almacenaron en el Biobanco del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS-UNA), en medio BHI-glicerol al 15% a -80°C para su posterior análisis.

Todos los aislamientos contaban con datos clínicos y epidemiológicos como identificación bioquímica, susceptibilidad a antibióticos, tipo de material, fecha de colección, cuadro clínico, edad y sexo del paciente del cual fueron aislados, proveídos por el laboratorio de microbiología de cada uno de los centros asistenciales donde se

colectaron las muestras. Se empleó como criterio para ser considerado **SARM causante de infecciones invasivas** a aquellos aislamientos de *S. aureus* provenientes de un sitio del cuerpo normalmente estéril (sangre, líq. cefalorraquídeo, peritoneal, pleural o aspirados de tejido profundo obtenidos asépticamente o muestras de tejido quirúrgico) y resistentes a meticilina por antibiograma, según criterio del CLSI(67).

5.3. Caracterización fenotípica

La identificación bioquímica y análisis de susceptibilidad a antibióticos se llevó a cabo en cada laboratorio de microbiología en el cual fueron colectados los aislamientos. Se realizaron según criterios estándar establecidos en las guías del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) de 2009 a 2018, de acuerdo a la fecha de colecta de cada aislamiento(68–74).

5.4. Caracterización molecular

5.4.1. Extracción del material genético

Los aislamientos identificados como SARM por métodos fenotípicos fueron repicados en agar TSA (Agar Triptona Soja, Difco, Le Pont de Claix, Francia) e incubados a 35°C por 24-48 horas en presencia de 5% de CO₂ para la posterior extracción de ADN genómico, empleando kit comercial (Wizard Genomic, Promega, Madison, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.4.2. Identificación molecular

La identificación molecular fue llevada a cabo por detección del gen ADNr 16S utilizando oligonucleótidos y condiciones descritos por Manfredi y colaboradores (39) para el reconocimiento del género *Staphylococcus*.

La confirmación genotípica de la resistencia a meticilina se llevó a cabo mediante la amplificación del gen *mecA*, empleando oligonucleótidos y condiciones de ciclado descritos por Murakami y colaboradores(75), obteniéndose un producto de 533pb.

Detección Genes Codificantes de Factores de Virulencia

La caracterización molecular de los aislamientos en estudio incluyó la detección de genes codificantes de factores de virulencia como la Leucocidina de Panton-Valentine (*lukS/F-PV*)(76), enterotoxinas A, B, C, D, G, H, I, M, N, O, U (*sea, seb, sec, sed, seg, seh, sei, sem, sen, seo, seu*)(39,77), hemolisinas alfa y beta (*hIA y hIB*)(78), toxinas exfoliativas A y B (*etA y etB*)(79) y la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*)(79), siguiendo las condiciones de reacción indicadas en la **Tabla 3**.

En la **Tabla 3** se resumen las condiciones de amplificación de los factores de virulencia incluidos en este trabajo. Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por la

empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea) y la amplificación fue realizada en termocicladores Veriti (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Todos los ensayos mencionados fueron realizados a una concentración final 1X de Tampón (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU), 0,03U/μL de Taq polimerasa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU) y 0,4mM desoxirribonucleótidos trifosfato (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EEUU).

Tabla 3. Condiciones de reacción para detección de genes codificantes de factores de virulencia incluidos en el estudio

Gen	Producto (pb)	PCR	Concentración de Reactivos		Condiciones de Ciclado					
			Oligonucleótidos (concentración μM)	MgCl ₂ (Invitrogen)	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Ciclos D-A-E	Extensión Final
<i>lukS/F-PV</i>	433	Simple	0,5	2mM	94°C 10 min	94°C 30 s	55°C 30 s	72°C 1 min	40	72°C 10 min
<i>seA</i>	521	Múltiple	1	3mM	95°C 5 min		*			72°C 2 min
<i>seB</i>	667		1		95°C 5 min					72°C 2 min
<i>seC</i>	284		1		95°C 5 min					72°C 2 min
<i>seD</i>	385	Simple	1	3mM	95°C 5 min		*			72°C 2 min
<i>seH</i>	358	Simple	1	3mM	95°C 5 min					72°C 2 min
<i>seM</i>	379	Simple	1	3mM	95°C 5 min	95°C 30 s	54°C 30 s	72°C 30s	35	72°C 10 min
<i>seN</i>	680	Simple	1	3mM	95°C 5 min	95°C 30 s	58°C 30 s	72°C 30s	35	72°C 5 min
<i>seG</i>	642	Simple	1	3mM	95°C 5 min	95°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30s	35	72°C 5 min
<i>sel</i>	576	Simple	1	3mM	95°C 5 min	95°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30s	35	72°C 5 min
<i>seO</i>	180	Simple	1	3mM	95°C 5 min	95°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30s	35	72°C 5 min
<i>seU</i>	215	Simple	1	3mM	95°C 5 min	95°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30s	35	72°C 5 min
<i>hIA</i>	704	Múltiple	1	3mM	94°C 3 min	94°C 1 min	51°C 45 s	72°C 1 min	30	72°C 5 min
<i>hIB</i>	496		1		94°C 3 min	94°C 1 min	51°C 45 s	72°C 1 min	30	72°C 5 min
<i>etA</i>	119	Múltiple	1	2mM	94°C 5 min	94°C 2 min	55°C 2 min	72°C 1 min	30	72°C 5 min
<i>etB</i>	200		1		94°C 5 min	94°C 2 min	55°C 2 min	72°C 1 min	30	72°C 5 min
<i>tsst-1</i>	350	Simple	1	2mM	94°C 5 min	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	30	72°C 5 min

*Incluyeron dos ciclos diferentes de D-A-E (Desnaturalización-Anillamiento-Extensión), primeramente 15 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (68°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos), seguidos de 20 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (60°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos).

5.4.3. Identificación de clones SARM

Para la identificación de los clones SARM se emplearon de forma combinada los siguientes métodos: tipificación del *cassette SCCmec*, *spa typing*, MLST, MLVA y PFGE.

Todos los aislados SARM del estudio (N=85) fueron sometidos a la tipificación del *cassette SCCmec*, de la proteína A, MLST y MLVA. Sólo aislados de perfiles representativos fueron escogidos para ser analizados por PFGE (N=32) y WGS (N=10).

5.4.4. Tipificación del *cassette SCCmec*

La tipificación del *cassette SCCmec* fue llevada a cabo mediante una versión simplificada del método diseñado por Kondo y colaboradores(80). Los tipos de *cassette SCCmec*, indicados con números romanos, están definidos por la combinación de alotipos *ccr* y *mec* (**Tabla 4**). Primeramente se realizó la determinación del complejo *ccrAB* a través de una PCR múltiple descrita por Ito y cols 2001(81), en la cual la combinación de cuatro oligonucleótidos permitió la identificación de tres complejos *ccr* (**AB1, AB2, AB3 y C**), mediante las siguientes condiciones de reacción: tampón 1X (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU), 0,3 mM dNTPS (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EEUU), 1 μ M oligonucleótidos *ccr* β 2, *ccr* α 2, *ccr* α 3, *ccr* α 4 (Macrogen, Seúl, Corea), MgCl₂ 2,5 mM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU) y 0,03U/uL Taq Polimerasa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU). Para la reacción de PCR se utilizó 1 μ L de ADN molde en un volumen total de reacción de 25 μ L. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 2 minutos), anillamiento (57°C por 1 minuto), extensión (72°C por 2 minutos) y una extensión final a 72°C por 2 minutos.

Tabla 4. Complejos *mec* y *ccr* asociados a los distintos tipos de *Cassette SCCmec*.

<i>Cassette SCCmec</i>	Complejo <i>mec</i>	Complejo <i>ccr</i>
<i>SCCmec</i> I (1B)	Clase B (565 pb)	<i>ccrA1/ccrB1</i> (700 pb)
<i>SCCmec</i> II (2A)	Clase A (480 pb)	<i>ccrB2/ccrA2</i> (1000 pb)
<i>SCCmec</i> III (3A)	Clase A (480 pb)	<i>ccrB3/ccrA3</i> (1600 pb)
<i>SCCmec</i> IV (2B)	Clase B (565 pb)	<i>ccrA2/ccrB2</i> (1000 pb)
<i>SCCmec</i> IV (2B R5)	Clase B2/Th4001 (449 pb/709 pb)	<i>ccrA2/ccrB2</i> (1000 pb)
<i>SCCmec</i> V (5C2)	Clase C ₂ (804 pb)	<i>ccrC</i> (804 pb)

En base a los resultados obtenidos en la identificación del complejo ccr se procedió a la identificación del complejo *mec* clase B, mediante una PCR simple utilizando las siguientes condiciones de reacción: tampón 1X (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU), 0,4 mM dNTPS (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EEUU), oligonucleótidos específicos para el complejo *mec* clase B *IS1272* y *mec RI*, descritos por Katayama cols 2000 (82)(Macrogen, Seúl, Corea), $MgCl_2$ 1,5 mM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU) y Taq Polimerasa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU). Para la reacción de PCR se utilizó 1 μ L de ADN molde en un volumen total de reacción de 25 μ L. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (95°C por 1 minuto), anillamiento (55°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto), y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

5.4.5. Tipificación del *locus Spa*

La región polimórfica del gen *spa* fue amplificada por PCR con oligonucleótidos y condiciones descritos por Shopsis y cols(83) y el fragmento de ADN obtenido para cada aislamiento fue secuenciado por el método Sanger (Macrogen Inc., Seúl, Corea). La edición de las secuencias obtenidas (*forward* y *reverse*) y la obtención de una secuencia consenso fue llevada a cabo utilizando el software Bioedit versión 7.0.5.3(84), para su posterior análisis con ayuda de los servidores Ridom Spa: <https://spa.ridom.de> (85) y Center for Genomic Epidemiology <https://genomicepidemiology.org> (86).

5.4.6. Multi-Locus Sequencing Typing

La determinación del secuenciotipo de cada aislamiento se llevó a cabo utilizando el esquema propuesto por Enright y cols., que consiste en la amplificación por reacciones de PCR individuales de siete genes *housekeeping*, utilizando siete pares de oligonucleótidos y condiciones descritos por el autor(45). Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar secuencias de regiones altamente conservadas que flanquean regiones más variables. Cada par de oligonucleótidos amplificó un fragmento interno del gen *housekeeping* (aproximadamente 500 pb) y permitió la secuenciación precisa por el método Sanger (Macrogen Inc., Seúl, Corea) de fragmentos de ~ 450 pb de cada gen en ambas cadenas. Los genes que se amplificaron fueron: carbamato quinasa (*arcC*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol quinasa (*glp*), guanilato quinasa (*gmk*), fosfato acetiltransferasa (*pta*), triosafosfato isomerasa (*tpi*) y acetil coenzima A acetiltransferasa (*yqiL*). La edición de las secuencias obtenidas (*forward* y *reverse*) y la obtención de una secuencia consenso fue llevada a cabo utilizando el software Bioedit versión 7.0.5.3(84), para su posterior análisis con ayuda de los

servidores Public databases for molecular typing and microbial genome diversity <https://pubmlst.org/> (87) y Center for Genomic Epidemiology <http://genomicepidemiology.org/> (86).

En todos los casos mencionados, la visualización de los productos de PCR de punto final se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (VWR, AMRESCO, Life Science, Canadá). Para tal fin, se sembraron 5 µL de producto con loading buffer a una concentración final 1X y se realizó la corrida en cubas electroforéticas con buffer TAE (Tris, acetato, EDTA) al 1X a 120V por 40 min aproximadamente. La tinción se realizó empleando SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EEUU). Un marcador molecular de 50 pb (Jena Bioscience, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) fue utilizado para estimar el tamaño de los productos separados. Los resultados fueron registrados en formato de fotos digitales y analizados.

5.4.7. Multi-Locus Variable Analysis

El análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA) fue desarrollado empleando cinco pares de oligonucleótidos que amplificaron siete diferentes loci VNTR (*clfA*, *clfB*, *sdrC*, *sdrE*, *spa* y *sspA*) seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida (gel separador 7,5% y concentrador 5%) con tinción de nitrato de plata, siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez y cols(88). Los geles fueron digitalizados utilizando el software Un SCAN IT GEL para el análisis del patrón de bandas característico de cada aislamiento. Todos los aislamientos con bandas de igual tamaño y posición o de hasta una banda de diferencia ($\geq 85\%$ similitud) fueron incluidos en la misma agrupación, siguiendo los criterios utilizados por Malachowa y cols(89). Las agrupaciones fueron enumeradas para su identificación siguiendo los criterios estipulados por Sabat y cols(90).

5.4.8. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

Fue llevada a cabo por restricción con la enzima *SmaI* y resuelta mediante electroforesis en campos pulsados, como fue descrito previamente por Chung y colaboradores con algunas modificaciones(49,85). En este estudio se emplearon moldes comerciales para la formación de bloques de agarosa y se sustituyó el uso del tampón PIV por TE (Tris-EDTA), al comprobarse que facilitaba la manipulación de la agarosa en la preparación de los bloques.

En el proceso fueron incluidos como controles los clones ST5-IV-t311-PVL+, ST30-IV-t019-PVL+, ST8-IV-t008-PVL+ (USA 300) y la cepa NCTC 8325.

Los aislamientos fueron inoculados en medio de cultivo bacteriano TSB e incubados durante toda la noche en baño María a 37°C. Por cada inóculo se incluyeron controles

de pureza en agar TSA y un control de esterilidad para el medio TSB. Se prepararon suspensiones celulares con tampón TE (Tris-EDTA) y se calculó la densidad óptica (DO) de cada una para determinar si se encontraban dentro del rango de concentración aceptable (0,05-0,15) para la preparación de los bloques de agarosa.

Se mezclaron las suspensiones bacterianas con agarosa al 1,5% apta para PFGE (SeaKem, Amresco, Merck, Darmstadt, Alemania) y se colocaron en moldes comerciales para bloques (2 bloques por aislamiento).

Una vez gelificados, los bloques de agarosa fueron incubados en solución de lisis (RNasa 10mg/mL, Lysozima 20mg/mL y Lysostafina 10mg/mL) en baño María durante 5 horas a 37°C y luego en solución ESP conteniendo proteinasa K, durante toda la noche (17 horas) a 50°C. Posteriormente se realizaron cinco lavados a cada muestra con el tampón TE para eliminar la proteinasa K.

Se transfirió 1/3 del bloque de agarosa por aislamiento (cortado en sentido del eje mayor), a una solución conteniendo el tampón de restricción (Pre *Sma*I + mercaptoetanol), se incubó durante una hora a 25°C. Luego se incubó en tampón de restricción con la enzima *Sma*I a 25°C durante toda la noche. La reacción se detuvo al día siguiente agregando 200µL de tampón de carga (TBE 0,5X).

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% (SeaKem, Amresco, Merck, Darmstadt, Alemania), en el cual fueron incluidos los bloques. El equipo utilizado para la corrida electroforética fue el CHEF –DR III (Biorad, California, EEUU), en tampón TBE 0,5X a 11,3°C y 6 volts/cm durante 23 horas, alternando pulsos de 5 y 35 segundos a un ángulo de 120°C.

Una vez finalizada la corrida se procedió a la tinción del gel con GelRed (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) y visualización con luz ultravioleta, se tomó una fotografía que fue almacenada en formato TIFF (del inglés, "tagged image file format") para su posterior análisis.

Los patrones de bandas obtenidos se designaron siguiendo el criterio de Tenover y cols.(91) (**Tabla 5**).

El análisis de los geles obtenidos por PFGE fue realizado utilizando el programa GelCompar II 5.1. (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) para verificar las relaciones entre los pulsotipos y sus subtipos. Se utilizó el índice de DICE para generar matrices de similitud y se construyó el dendrograma aplicando los algoritmos de análisis de agrupaciones UPGMA (del inglés, "unweighted pair-group method with arithmetic mean).

Tabla 5. Criterios para identificación de Pulsotipos según Tenover y cols(91).

Criterio	Consideración	Nomenclatura
100% bandas iguales	Idénticos	Pulsotipo más frecuente, identificado con una letra mayúscula. Ejemplo: A.
1-3 bandas diferentes	Estrechamente relacionados	Subtipos del pulsotipo más frecuente, identificados con la letra mayúscula seleccionada para el pulsotipo más frecuente y un número. Ejemplo: A1, A2, A3, etc.
4-6 bandas diferentes	Posiblemente relacionados	
≥ 7 bandas diferentes	No relacionados	Identificados con letras mayúsculas, diferentes al pulsotipo más frecuente. Ejemplo: B, C, D, etc.

5.4.9. Análisis del Genoma Completo

Un aislamiento representativo de cada perfil identificado por las técnicas moleculares mencionadas anteriormente, *cassette SCCmec*, *spa typing*, MLST y MLVA fue sometido a análisis del genoma completo (WGS, n=10), siguiendo el esquema de la **figura 4**.

El ADN genómico extraído se cuantificó utilizando el equipo Qubit Fluorometric Quantification (ThermoFisher Scientific Inc., Patheon, EEUU) y posteriormente se procedió a la preparación de la librería genómica utilizando el kit exclusivo para el equipo MiSeq Sequencing System (Illumina, San Diego, California, EEUU) con el cual se realizó la secuenciación.

Los archivos BCL generados se convirtieron a formato FASTQ usando la herramienta BCLtoFASTQ v2.19 instalada en TeideHPC (ITER, Tenerife, España). Simultáneamente, se llevó a cabo la demultiplexación con la misma herramienta, obteniendo los archivos correspondientes a las lecturas de secuenciación R1 y R2 (fast.qz).

El análisis de las secuencias genómicas se llevó a cabo en la plataforma Galaxy Europe <https://usegalaxy.eu/> (92). El primer paso del análisis consistió en el control de calidad de las lecturas con el software FastQC v0.73 (93) y análisis taxonómico con Kraken v2.1.1 (94), para obtener parámetros de calidad y clasificación taxonómica respectivamente. Las reads fueron sometidas a un proceso de treamming para mejoramiento de la calidad de las mismas utilizando el software Trimmomatic

v0.38.1(95). Posteriormente se llevó a cabo el ensamble de novo con Unicycler v0.4.8.0 (96) y análisis de calidad del mismo con Quast Genome assembly Quality v5.0.2(97–99) para certificar la calidad de las lecturas (R1 y R2), con los que se obtuvo un informe resumido con métricas de ensamblaje y parámetros de calidad como el tamaño total del genoma, Nro. de contigs totales, tamaño del contig más grande, Nro. de contigs de tamaño $\geq$ a 1Kb, N50 y %GC.

Una vez superado el control de calidad, las lecturas R1 y R2 (fastq.gz) fueron procesadas con la herramienta Prokka v1.14.6 (Prokaryotic Genome Annotation) versión 1.14.6+galaxy0, para anotación bacteriana(100,101).

La caracterización de los aislamientos se llevó a cabo utilizando los softwares MLST (base de datos PubMLST) versión 2.19.0 para detección del secuenciotipo y ABRicate versión 1.0.1 para detección de genes de resistencia a antibióticos, así como susceptibilidad a cada antibiótico y su posible inducción a resistencia (base de datos Resfinder), los factores de virulencia (base de datos VFDB) y replicones plasmídicos (base de datos PlasmidFinder) (102).

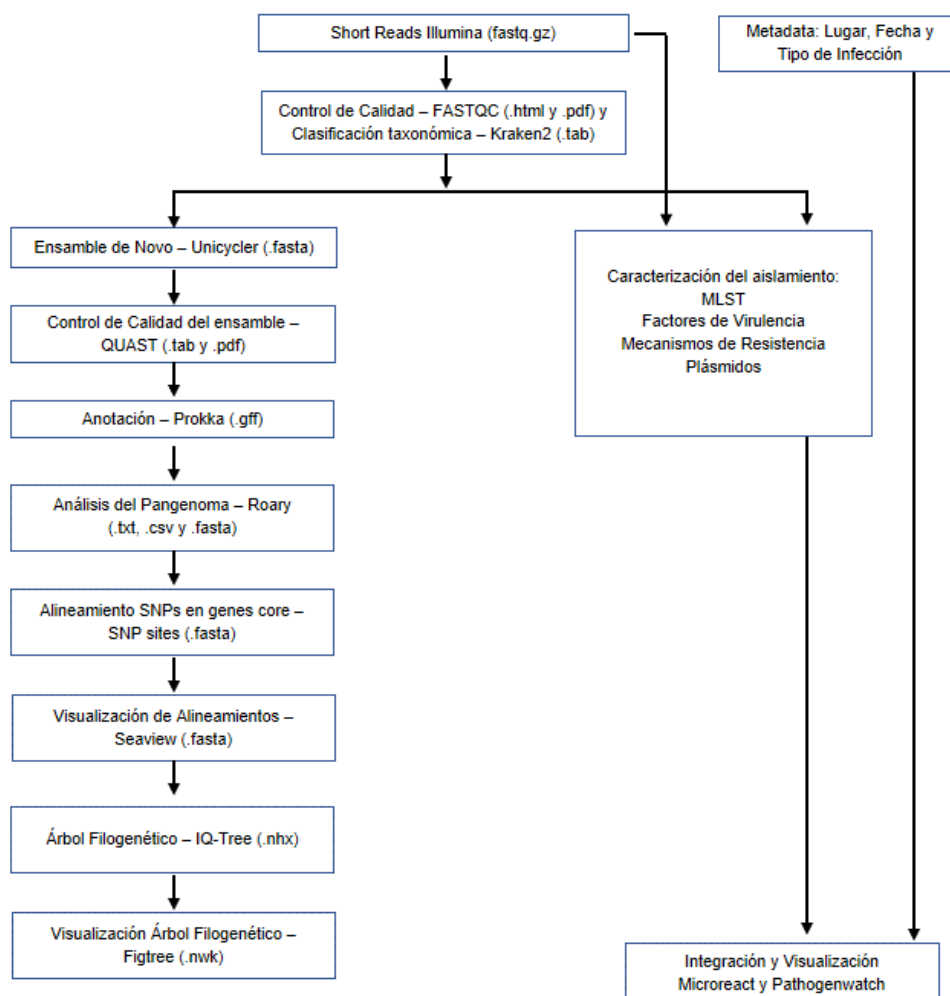


Figura 4. Esquema del Análisis Genómico.

Posteriormente se realizó el análisis filogenético del genoma bacteriano ensamblado con los softwares Roary versión 3.13.0 (103), IQ-Tree versión 1.5.5 (104,105) y Figtree versión 1.4.4 disponible en <https://tree.bio.ed.ac.uk/> para la visualización. Los archivos de salida .gff del Prokka v1.14.6 fueron empleados por el software Roary v3.13.0 (103) para construir el árbol de Newick a fin de establecer el genoma central de los aislados clínicos analizados. Finalmente, los archivos de salida generados por Roary v3.13.0 se visualizaron con la herramienta online Phandango v1.3.0 (106), generando el gráfico del árbol de Newick y la representación del genoma central.

5.4.10. Ensayo de Expresión Génica de Factores de Virulencia

Para el análisis del nivel de expresión de factores de virulencia por la metodología qPCR (PCR Real Time), se seleccionó la toxina más representativa entre los aislamientos SARM causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos analizados, resultando ser esta la leucocidina de Panton-Valentine (PVL) no sólo por su alta frecuencia de portación (60%, 51/85) sino también por ser el factor de virulencia que se ha ganado una atención pública significativa según la teoría propuesta por Vandenesch y cols (107) quienes refieren que prácticamente la mayoría de las cepas SARM-AC de nueva evolución, independientemente de su origen genético y antibiograma, acarrean el gen de la PVL y un pequeño *cassette SCCmec* (tipo IV), existiendo una fuerte asociación entre SARM-AC y PVL, pudiendo éste último ser un marcador de las mismas(107). Teniendo en cuenta esto a raíz que la mayoría de los aislamientos de éste estudio son provenientes de ambientes comunitarios (88%, 75/85), la importancia clínica de la PVL, así como su alta frecuencia de portación entre los aislamientos estudiados.

Se seleccionaron dos linajes de SARM representativos: GIP64 (CC30-ST30-t019-IV-PVL+) y SCM77 (CC5-ST5-t311-IV-PVL+), portadores del gen codificante del factor de virulencia PVL (*lukS/F-PV*) cultivados en un medio de cultivo bacteriano in vitro (BHI) y en suero de carnero estéril, que por sus componentes bioquímicos como proteínas séricas, carbohidratos e iones, diferentes a los del BHI, se asemeja más a un experimento in vivo(108).

Para lograr el objetivo de medir la expresión de PVL en dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano a 630nm en ambos medios y con ambos aislados por triplicado, como se muestra en la **figura 6**.

El análisis de expresión de factores de virulencia incluyó los siguientes pasos:

1. Curva de crecimiento bacteriano para determinación de las fases exponencial y estacionaria
2. Crecimiento bacteriano y colección en varias etapas
3. Extracción de ARN

4. Síntesis de ADNc

5. Medición del nivel de expresión por qPCR

Se procedió a realizar la curva de crecimiento bacteriano para detectar el tiempo en que los aislamientos seleccionados alcanzan las fases estacionarias y exponencial, mediante el siguiente esquema (**Figura 5**).

Las fases de crecimiento bacteriano fueron determinadas por medidas de densidad óptica (DO), valores entre 0,5-0,7 corresponden a la fase exponencial y valores $\geq 1,2$ a la fase estacionaria.

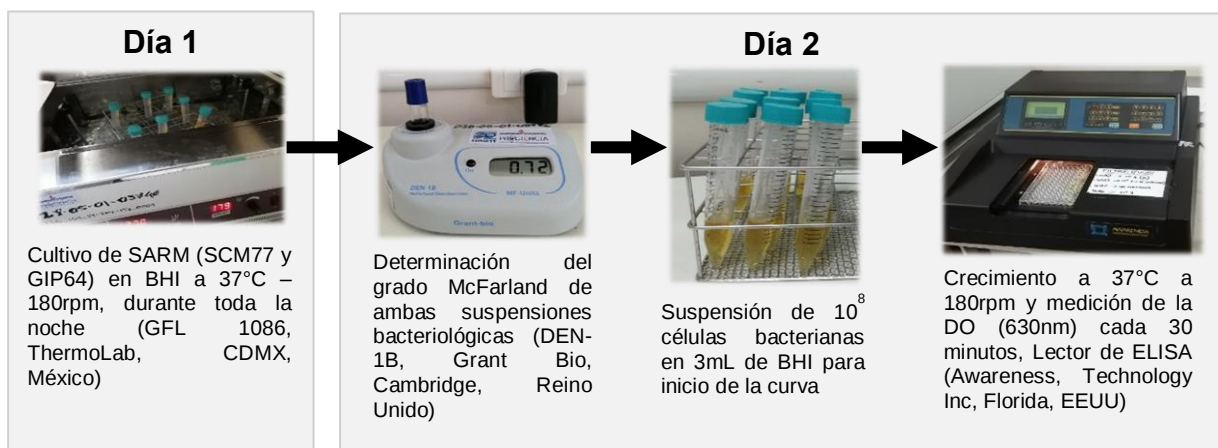


Figura 5. Esquema de la Curva de Crecimiento Bacteriano

Una vez determinados los tiempos necesarios para que los aislamientos alcancen las fases estacionaria y exponencial del crecimiento, se procedió a realizar el experimento de inducción con ambos aislamientos cultivados en suero de carnero estéril y en BHI, colectados en fase exponencial y estacionaria, por triplicado, con lo cual se cultivaron 24 tubos en total (2 aislamientos x 2 tiempos de colecta x 2 medios diferentes x triplicado). Se incubaron a 37°C – 180 rpm hasta el tiempo necesario para la colecta en fase exponencial y estacionaria. Los tubos colectados fueron centrifugados, se descartó el sobrenadante y se congeló el pellet a -80°C.

Se procedió a la extracción del ARN del pellet siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del kit de extracción Zymo-Spin Column (Zymo Research, Irvine, California, EEUU), teniendo en cuenta todos los cuidados para el manejo de dicho material genético. El ARN final obtenido se eluyó con 40 uL de agua estéril libre de RNAsa y DNAsa y fue almacenado a -80°C para posteriores usos.

Para la síntesis de ADNc se mezclaron 2ug del ARN extraído con 1 ug de random primer (Macrogen, Seúl, Corea), esta mezcla se calentó a 70°C por 5 minutos y luego se enfrió inmediatamente en hielo. A cada uno de los tubos que contenían la mezcla anterior se añadió 5uL de M-MLV 5x Buffer, 1uL M-MLV-RT, 1,25uL de cada uno de los

didexoxinucleótidos y 0,6uL de Recombinant RNAsin Inhibitor (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EEUU) y se incubó por 1 hora a 37°C.

Posteriormente se llevó a cabo la qPCR utilizando: 12,5uL de Mastermix Syber Green (Qiagen, Hilden, Alemania), 2uL del ADNc obtenido en el paso previo y 1mM de oligonucleótidos (Macrogen, Seúl, Corea) a un volumen final de reacción de 25uL. Las condiciones de reacción fueron: Desnaturalización inicial a 95°C por 30 segundos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 segundos, anillamiento a 57°C por 30 segundos y desnaturalización a 72°C por 30 segundos. El termociclador utilizado fue el CFX96 (Biorad, California, EEUU). El gen de referencia utilizado para normalizar el experimento fue el *gyrA*. Todos los ensayos de análisis de expresión de la PVL fueron realizados por triplicado.

Para calcular la expresión relativa normalizada del gen de la PVL (*lukS/F-PV*), fue empleado el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para su cálculo se obtuvieron las diferencias promedios de Ct del gen de interés y del gen de referencia en presencia de los diferentes medios a evaluar: BHI y suero de carnero estéril, para cada aislamiento y en experimentos por triplicado.

5.5. Análisis y Gestión de Datos

Los datos de los aislamientos, obtenidos de las fichas epidemiológicas, microbiológicas y moleculares fueron introducidos y almacenados en una planilla electrónica y los cálculos estadísticos fueron realizados empleando los softwares Microsoft Excel versión 2013 y Epiinfo Versión 3.5.1. Se empleó estadística descriptiva para referir las características de la población, frecuencia de los genes y perfiles detectados. Las variables dicotómicas fueron expresadas en porcentajes. Los resultados se presentaron en tablas y gráficos.

5.6. Aspectos éticos

Este proyecto empleó como muestras de estudio aquellas colectadas en el marco de protocolos anteriores (**ANEXO 1:** P20/2011-CCE-IICS, **ANEXO 2:** P29/2011-CCE-IICS, **ANEXO 3:** P15/2016-CCE-IICS), que contaban con la aprobación del Comité Científico y de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, así como también la inclusión de nuevas muestras colectadas en el marco del proyecto de doctorado (**ANEXO 4:** P34/2018-CCE-IICS). En los mismos se estudió ADN bacteriano de aislados de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras biológicas procesadas en los laboratorios de microbiología de los hospitales participantes del estudio, en respuesta a un pedido médico, por tanto el presente estudio no conllevó a la extracción de muestras adicionales al paciente, ni riesgo alguno para su salud. El resultado de antibiograma

proporcionado por los laboratorios de microbiología a cada paciente fue suficiente para orientar el tratamiento de la infección que lo movió a la consulta. Los resultados del estudio original y del presente trabajo no influyen en el tipo de tratamiento que recibió el paciente en su momento, ya que los mismos fueron determinados empleando el criterio médico basado en el antibiograma.

Se mantuvo la confidencialidad en el manejo de los datos de los aislados, dado que los mismos fueron manejados de manera estricta con códigos para su identificación. La información obtenida se manejó exclusivamente con fines científicos de carácter epidemiológico.

El protocolo del estudio actual cuenta con la aprobación de todos los investigadores de los protocolos anteriores, se han mantenido las autorías, así como también se ha sometido a consideración del Comité de Admisión y Seguimiento designado a la estudiante de doctorado, el cual lo aprobó en **ACTA SIS 03/10/2017 (ANEXO 5)**, así también cuenta con la aprobación de los Comités Científico y de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud **(ANEXO 6: P34/2018)**.

6. Resultados

6.1. Características clínicas y demográficas

Este estudio transversal, multidisciplinario y multicéntrico representa el primer trabajo en Paraguay donde se aborda la epidemiología molecular de aislamientos SARM causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos, colectados a lo largo de 10 años de estudio (2009-2019).

En éste periodo de tiempo se colectaron en total 952 aislamientos de *S. aureus* provenientes de infecciones de niños de 0-16 años, en los que se observó un total de 248/952 (26%) de resistencia a meticilina (SARM), de los cuáles **85/952 (9%) cursaron con infecciones invasivas**, éstos últimos fueron los incluidos en el presente proyecto de tesis doctoral (N=100%).

Los 85 (100%) aislamientos SARM causantes de infecciones invasivas fueron colectados de la siguiente forma en un total de cuatro periodos de tiempo: n=11 (2009-2010), n=29 (2012-2013), n=38 (2017-2018) y n=7 (2019).

El 61% (n=52) de los aislamientos fueron colectados entre primavera y verano. El 61% (n=52) de los aislamientos del estudio provenían de niños y el 39% (n=33) de niñas. El 59% (n=50) de los mismos no superaba los 5 años de edad (**Figura 6**).

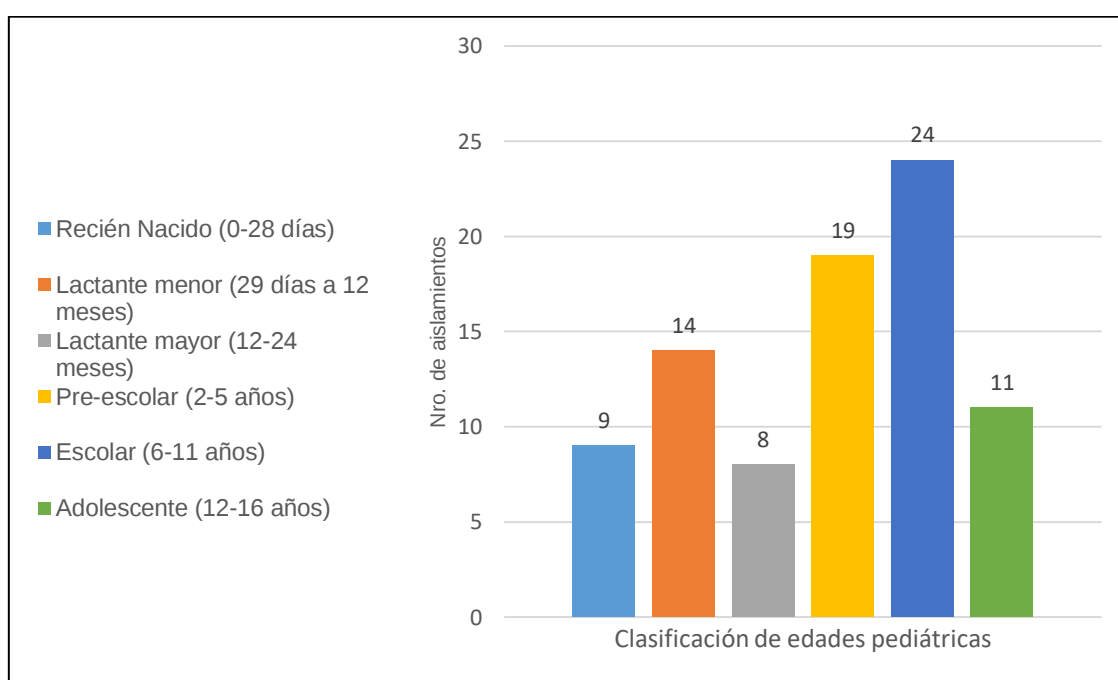


Figura 6. Distribución de aislamientos según edad del paciente (N=85)

Las manifestaciones invasivas que afectaron a los pacientes incluyeron: shock séptico 53% (n=45), infecciones musculoesqueléticas 20% (n=17), bacteriemias sin foco aparente 17% (n=14), neumonía 8% (n=7), absceso cerebral 1% (n=1) e infección del tracto urinario 1% (n=1). Se registró la muerte de uno de los pacientes que inicialmente

presentó neumonía y culminó en un cuadro de shock séptico. El tipo de material biológico del cual se aislaron los SARM causante de infecciones invasivas se muestra en la **Figura 7**.

El 51% (n=43) de los aislamientos SARM analizados fue proveído por el Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú (MSPyBS), el 26% (n=22) por el Hospital Central del Instituto de Previsión Social y los restantes 23% (n=20) por el Hospital de Clínicas y el Nacional de Itauguá en proporciones exactamente iguales.

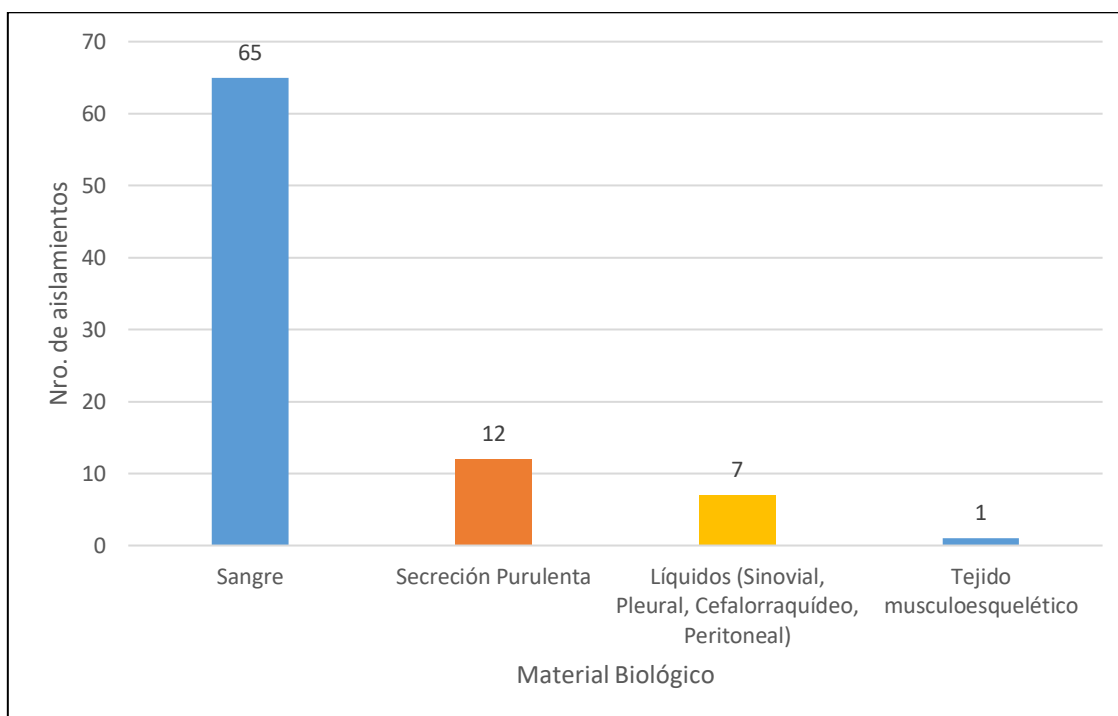


Figura 7. Distribución de aislamientos SARM invasivos según material biológico (N=85)

6.2. Perfil de Susceptibilidad a Antibióticos

Los porcentajes de resistencias globales que acompañaron a los betalactámicos incluyen a: Eritromicina (27%, n=23) y Clindamicina (25%, n=21), de los cuáles el 43% (n=9) presentó resistencia inducible, confirmada por D-test positivo. Se detectaron además resistencias menores para Gentamicina (8%, n=7), Rifampicina (7%, n=6), Ciprofloxacina (5%, n=4), Tetraciclina (4%, n=3) y Trimetoprim-sulfametoxazol (2%, n=2). El 100% de los aislados SARM analizados resultó ser sensible a Vancomicina. En los siguientes gráficos se muestra el desglose del porcentaje de aislamientos SARM resistentes a los distintos antibióticos testados por centro asistencial (**figura 8**) y por periodo de colecta (**figura 9**).

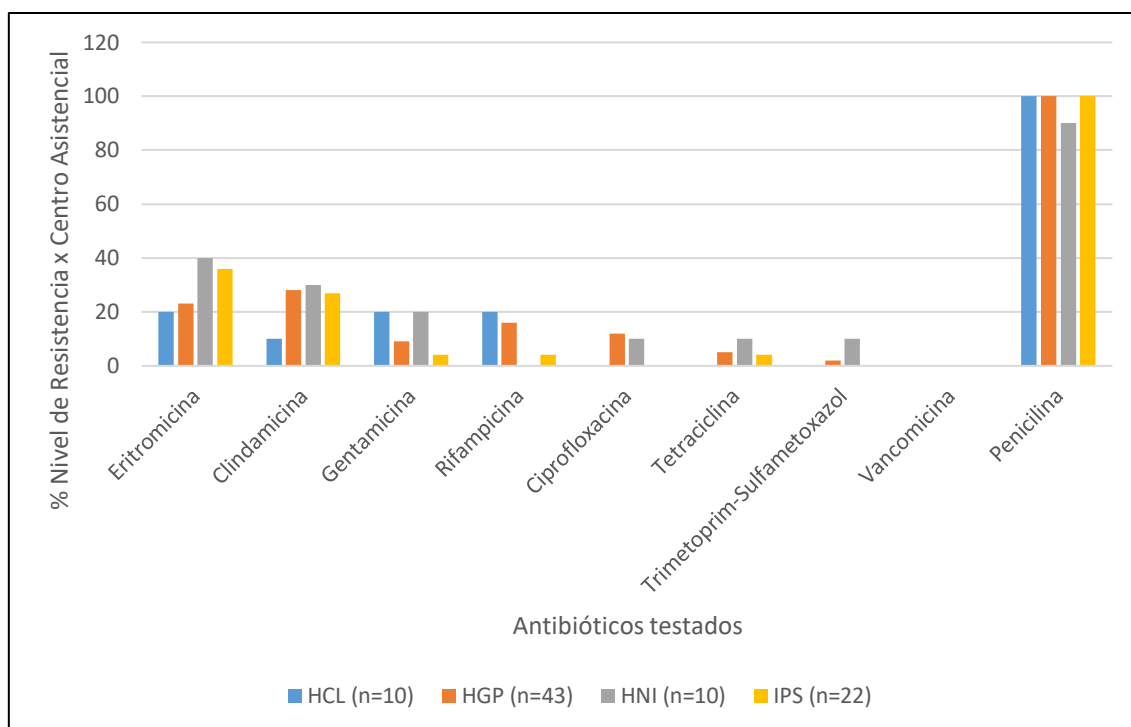


Figura 8. SARM resistente a antibióticos (%) según Centro Asistencial de Procedencia (N=85)

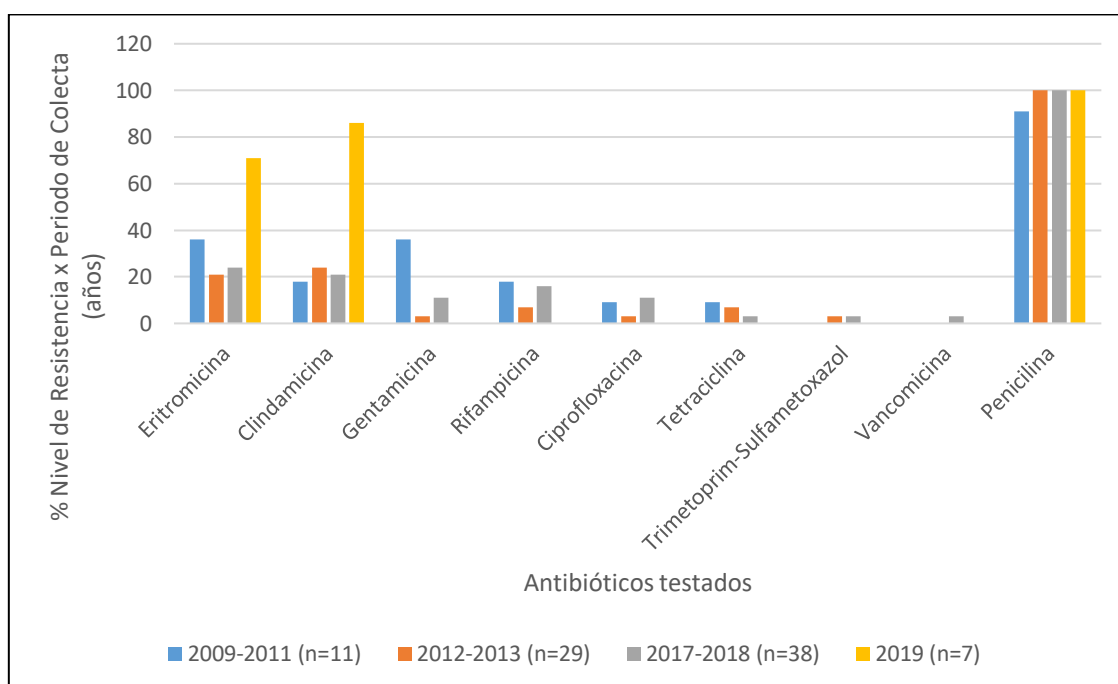


Figura 9. SARM resistente a antibióticos (%) según Periodo de Colecta (N=85)

6.3. Caracterización molecular

La identificación molecular por detección del gen ADNr 16S y la resistencia a meticilina por detección del gen *mecA*, confirmó la identidad de los mismos como SARM, establecida originalmente por métodos fenotípicos en los aislamientos en estudio (100%),.

6.3.1. Detección de factores de virulencia

El análisis parcial de la secuenciación de genoma completo de los primeros 10 aislamientos permitió detectar por primera vez en aislamientos SARM de Paraguay genes codificantes de factores de virulencia de otras enterotoxinas no incluidas inicialmente en el estudio con alta frecuencia: G, I, M, N, O y U, pertenecientes al grupo EGC, así como uno portador de la toxina del síndrome del shock tóxico, por lo que éstos genes fueron agregados a los métodos de detección de factores de virulencia. Se analizó en total la portación de 17 genes codificantes de factores de virulencia en los 85 aislamientos en estudio por medio de reacciones de PCR simples y múltiples (figuras de electroforesis en **ANEXO 6**). En cuanto al perfil de virulencia, la enterotoxina O (85%, n=72) resultó ser la más frecuente, seguida de G (73%, n=62), M (69%, n=59), I (66%, n=56), la leucocidina de Pantón-Valentine (60%, n=51) y las enterotoxinas N y U con frecuencias iguales a 59% (n=50) cada una. En porcentajes menores al 50% se detectaron las hemolisinas alfa (39%, n=33) y beta (25%, n=21), seguidas de la toxina del síndrome del shock tóxico (18%, n=15), las enterotoxinas A (9%, n=8) y C (2%, n=2) y la toxina exfoliativa B (1%, n=1). No se detectaron genes codificantes de las enterotoxinas B, D, H y la toxina exfoliativa A.

Se realizó una figura Heat map con la plataforma NG-CHM Builder de la Universidad de Texas <https://build.ngchm.net/NGCHM-web-builder/>, para mostrar las agrupaciones según el perfil de genes codificantes de factores de virulencia por aislamientos SARM (**Figura 10**). Se puede apreciar a los genes codificantes de las SE pertenecientes al *cluster* EGC agrupadas por su elevada frecuencia y cercanas a la PVL.

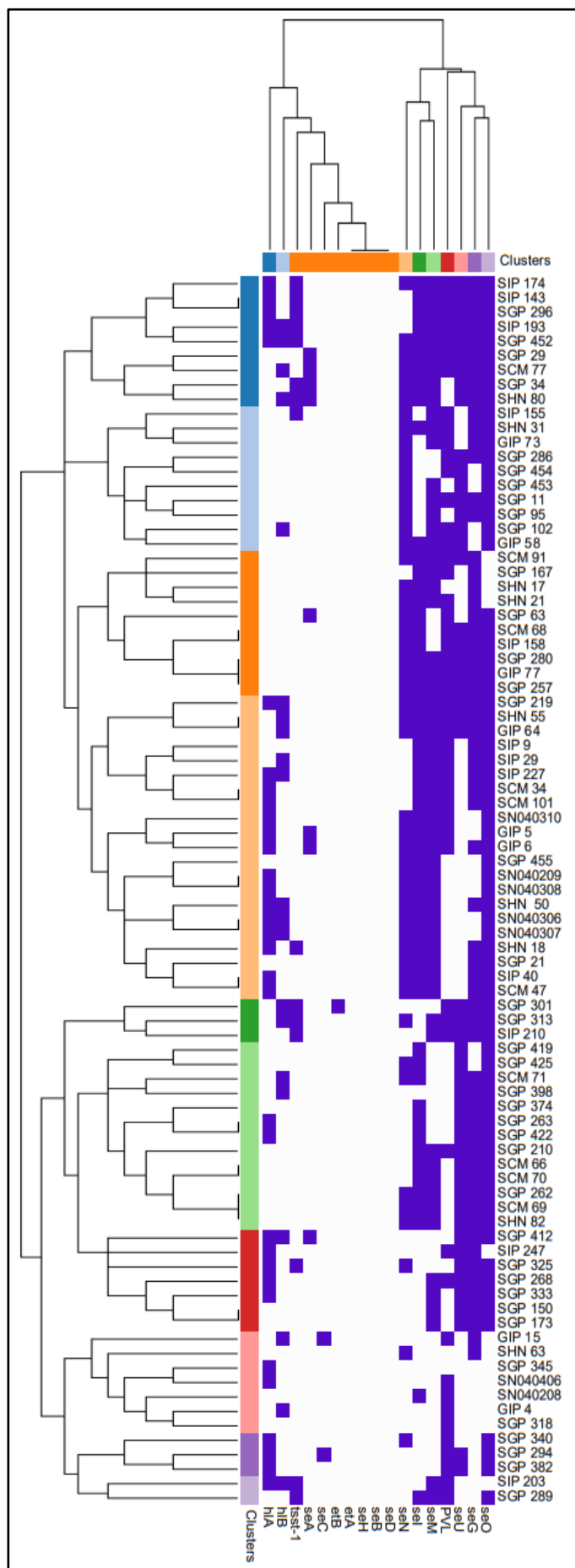


Figura 10. Heat map y dendrograma de factores de virulencia de SARM invasivos (N=85). Los cuadros azules indican presencia y los blancos ausencia de cada uno de los 17 genes codificantes de factores de virulencia en las 85 muestras analizadas. La aplicación permitió agrupar jerárquicamente a los aislamientos en base a su perfil de factores de virulencia empleando distancia métrica euclidiana con aglomeración de enlace completo tanto en filas como en columnas, proporcionando así dos dendrogramas. El dendrograma vertical (izquierda) presenta numerosas agrupaciones de los aislamientos (n=85, filas) en base a sus perfiles de virulencia. El dendrograma horizontal (superior) agrupa a los factores de virulencia según su frecuencia de aparición en los aislamientos, los más frecuentes: **PVL** y las seis SE del cluster EGC (**seO**, **seG**, **seU**, **seM**, **sel** y **seN**), los poco frecuentes: **hIA**, **hIB**, **tsst-1**, **seA**, **seC** y **etB**. Y por último, en el medio del heat map (color blanco) aparecen agrupados los no detectados (**etA**, **seB**, **seD** y **seH**).

6.3.2. Niveles de expresión génica de factores de virulencia

El análisis de expresión de factores de virulencia incluyó la determinación de las fases exponencial y estacionaria de la bacteria por curva de crecimiento bacteriano (**Figura 11**), mediante la cual se pudo determinar que los tiempos necesarios para alcanzar dichas fases bacterianas son 3 (180 minutos) y 6 (360 minutos) horas respectivamente, en experimentos realizados por triplicado.

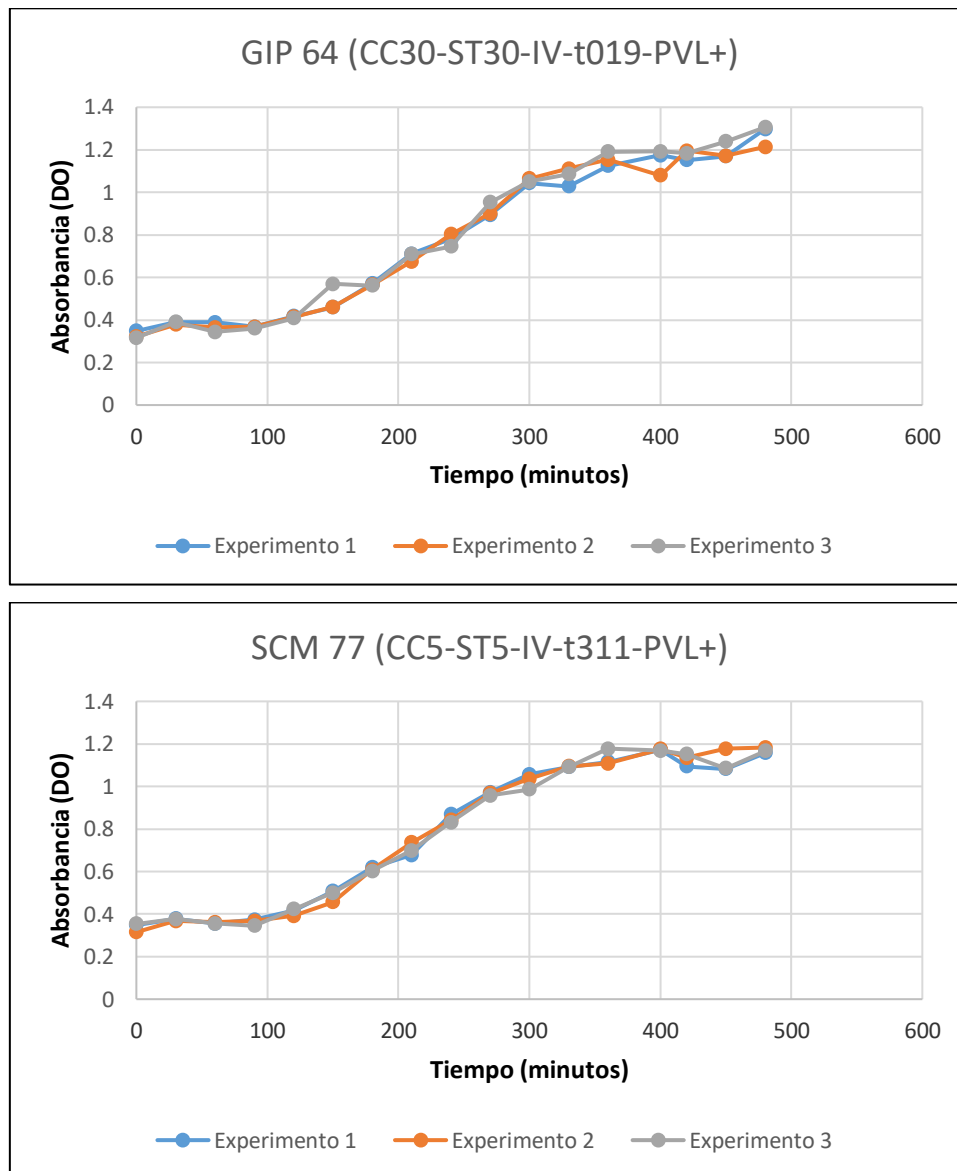


Figura 11. Curvas de Crecimiento Bacteriano de Clones Representativos

La densidad óptica (DO) del control negativo fue constante (0,321-0,395) durante todo el experimento (480 minutos).

Una vez establecidos los tiempos necesarios para que los aislamientos alcancen las fases exponencial y estacionaria, se procedió a realizar el experimento de inducción para la medición del nivel de expresión de la PVL por qPCR.

En el experimento de inducción se incluyeron curvas de melting de los genes de la PVL (*lukF/S-PV*) y el gen control interno (*gyrA*), lo que nos permitió evaluar la formación de un producto único, sin la presencia de dímeros de oligonucleótidos y/o bandas secundarias para ambos genes en estudio (**figuras 12 y 13, respectivamente**).

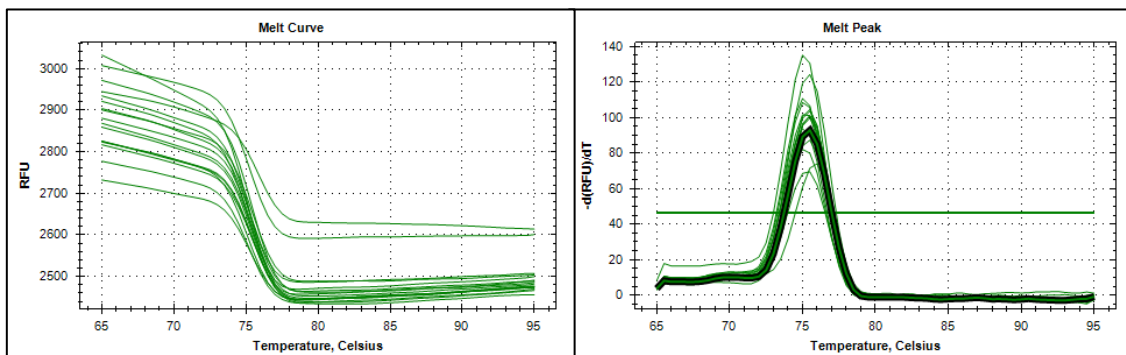


Figura 12. Curva y pico de melting del gen *lukS/F-PV* por qPCR Syber Green

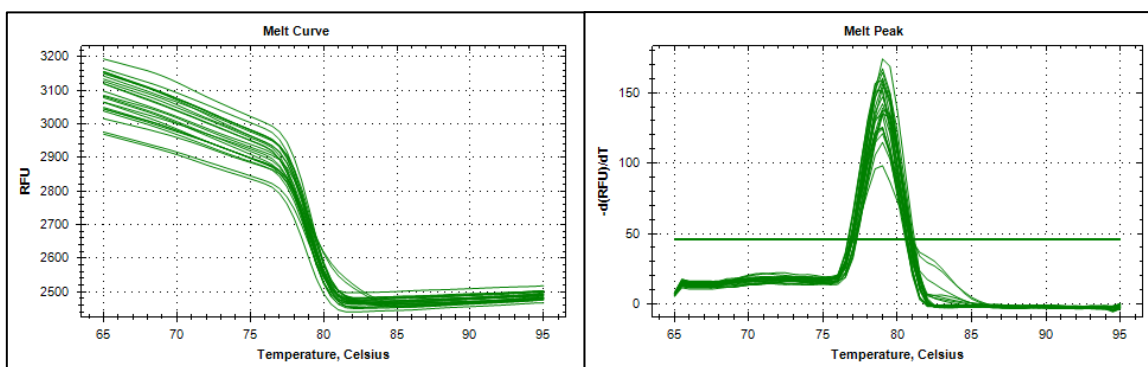


Figura 13. Curva y pico de melting del gen *gyrA* por qPCR Syber Green

Los valores promedios de Ct (ciclo umbral de la qPCR o cycle threshold en inglés) y desvío estándar (DS), calculados en base a experimentos de amplificación del gen de interés (*lukF/S-PV*), por triplicado se observan en la **tabla 6**.

Tabla 6. Valores promedios de Ct y Desviación Estándar de la amplificación del gen *lukF/S-PV*

Aislamiento	Medio	Tiempo	Ct*	DS**
GIP 64	BHI	3 h	17,5	0,8
GIP 64	Suero Carnero	3 h	26,3	2,5
GIP 64	BHI	6 h	17,2	0,8
GIP 64	Suero Carnero	6 h	20,9	0,4
SCM 77	BHI	3 h	19,1	0,2
SCM 77	Suero Carnero	3 h	25,5	0,7
SCM 77	BHI	6 h	17,8	0,2
SCM 77	Suero Carnero	6 h	27,7	2,8

Los valores promedios de Ct y desvío estándar (DS), calculados en base a experimentos de amplificación del gen control interno (*gyrA*), por triplicado se observan en la **tabla 7**. Los diferentes valores de Ct obtenidos a partir de la amplificación del gen control interno *gyrA* bajo diferentes condiciones de trabajo, indican que éste no se comporta como un gen de referencia adecuado.

Tabla 7. Valores promedios de Ct y Desviación Estándar de la amplificación del gen *gyrA*

Aislamiento	Medio	Tiempo	Ct*	DS**
GIP 64	BHI	3 h	17,8	0,6
GIP 64	Suero Carnero	3 h	26,4	2,0
GIP 64	BHI	6 h	18,4	0,8
GIP 64	Suero Carnero	6 h	23,4	1,1
SCM 77	BHI	3 h	18,3	0,3
SCM 77	Suero Carnero	3 h	26,1	0,1
SCM 77	BHI	6 h	17,3	0,5
SCM 77	Suero Carnero	6 h	27,0	3,2

En la **figura 14** se observa el nivel de expresión del gen *lukF/S-PV* (PVL) en los diferentes aislamientos (GIP 64 y SCM77), medios (BHI y sangre de carnero estéril) y tiempos estudiados (t1=3h y t2=6h)

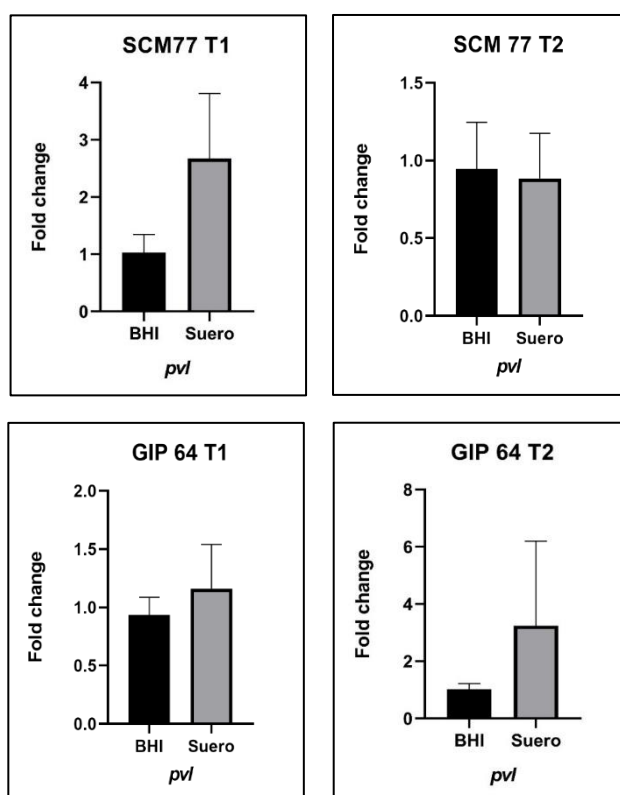


Figura 14. Expresión del gen *lukF/S-PV* en los diferentes aislamientos (GIP 64 y SCM77) y tiempos estudiados (t1=3h y t2=6h).

6.3.3. Identificación de clones SARM (N=85)

El 99% (84/85) de los aislamientos analizados resultó ser portador del cassette IV, uno de ellos portó el cassette de tipo I.

Los diferentes spatipos identificados (n=17) responden a diferentes patrones de repetición, que se muestran en la **tabla 8** para cada uno de ellos. El conocimiento del patrón de repeticiones permite determinar aquellos aislamientos estrechamente relacionados entre sí, ya sea por inserción o delección de repeticiones. Como por ejemplo, el spatipo t975 (n=1) que perdió la última repetición (24), respecto a su estrechamente relacionado y más frecuente t019 (n=53). Así, como el t311 y el t002 que sólo se diferencian por la inserción de una repetición (r17) en la quinta posición en éste último.

El análisis de la secuenciación de los genes *arcc*, *aroe*, *glpf*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yquil*, arrojó diferentes perfiles alélicos que se corresponden con diferentes secuenciotipos (n=9) y complejos clonales (n=4) identificados en la **tabla 9** según su frecuencia.

Así también se realizó una figura empleando el software Phyloviz, para demostrar la cercanía existente entre los diferentes linajes SARM identificados, según secuenciotipo y spatipo (**Figura 15**).

Tabla 8. Frecuencia de Spatipos y sus repeticiones (N=85)

Spatipo	Frecuencia	Repeticiones
t019	53	08-16-02-16-02-25-17-24
t311	8	26-23-17-34-20-17-12-17-16
t002	7	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
t084	2	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23
t7078	2	26-17-34-17-20-17-12-17-23
t008	2	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
t975	1	08-16-02-16-02-25-17
t012	1	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24
t021	1	15-12-16-02-16-02-25-17-24
t024	1	11-12-21-17-34-24-34-22-25
t148	1	07-23-12-21-12-17-20-17-12-12-17
t149	1	26-30-17-13-17-20-17-12-17-12-17-16
t400	1	11-19-12-21-17-34-34-22-25
t1062	1	26-23-17-34-17-02-17-12-17-16
t1791	1	26-23-17-34-17-20-17-20-17-12-17-16
t11770	1	11-581-12-21-17-34-24-34-22-25
t5300	1	26-23-17-34-17-20-17-12-17-23

Empleando la técnica MLVA se identificaron 10 perfiles MLVA diferentes, siendo el perfil M1 el más frecuente (62%, 53/85).

Tabla 9. Secuenciotipos identificados y sus perfiles alélicos (N=85)

Complejo Clonal (CC)	Secuenciotipo (ST)	Frecuencia	Perfil Alélico						
			<i>arcc</i>	<i>aroe</i>	<i>glpf</i>	<i>Gm_k</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>Yqil</i>
30	30	56	2	2	2	2	6	3	2
5	5	18	1	4	1	4	12	1	10
5	100	2	1	65	1	4	12	1	10
5	4331	1	510	4	1	4	12	1	10
8	8	4	3	3	1	1	4	4	3
8	72	1	1	4	1	8	4	4	3
8	4335	1	3	3	1	1	4	497	3
15	1160	1	13	13	1	1	12	11	127
15	5585	1	13	13	1	444	12	11	13

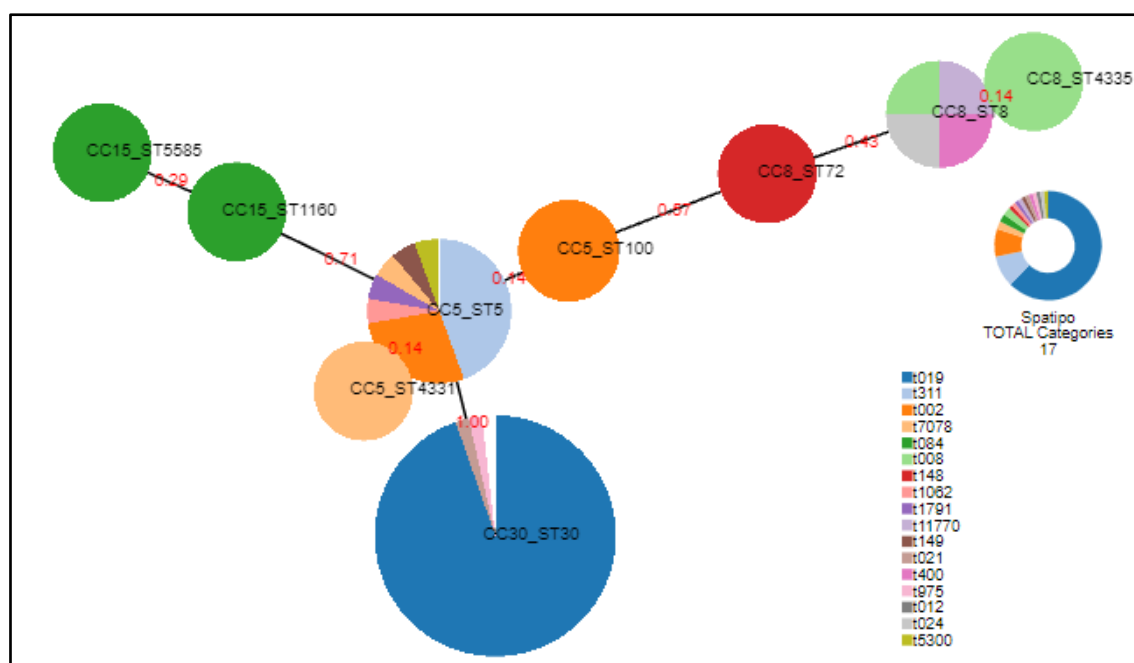


Figura 15. Clones SARM identificados (N=85). Los nueve círculos (nodos) que componen la figura están representando cada uno de los diferentes secuenciotipos y complejos clonales identificados en los aislamientos, dentro de cada círculo (secuenciotipo) se pueden observar diferentes spatipos (barras de diferentes colores) en tamaños correspondientes (en escala logarítmica 3:1) a su frecuencia de aparición. Los círculos están unidos por líneas que representan la distancia relativa (en nros. rojos) que existe entre cada secuenciotipo según su perfil alélico. El gráfico de barras en la esquina inferior derecha está indicando los 17 spatipos diferentes identificados, por color, según su frecuencia de aparición. <https://online.phyloviz.net/index>

La distribución de los principales clones SARM causantes de infecciones invasivas según periodo de colecta se puede visualizar en la **figura 16**.

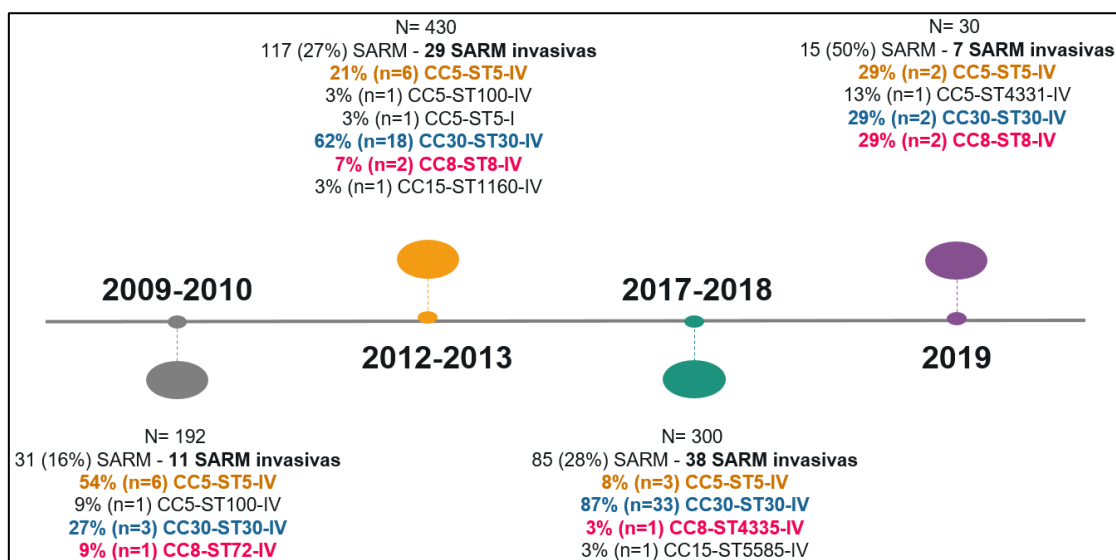


Figura 16: Distribución de los principales clones SARM causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos, según periodo de colecta.

Los resultados obtenidos del estudio de la variabilidad genética de los aislamientos SARM causantes de infecciones invasivas, empleando métodos moleculares combinados como *cassette SCC-mec*, Spa typing, MLST, determinación de complejo clonal (CC) según el secuenciotipo obtenido y MLVA, se muestran en la **tabla 10**.

A nivel general, los clones SARM detectados como mayoritarios son el CC30-ST30-IV 66% (56/85) y el CC5-ST5-IV 20% (17/85). El 62% (53/85) de los aislamientos analizados corresponden al linaje CC30-ST30-t019-IV, identificados además por la técnica MLVA como perteneciente a un único perfil nombrado como M1, por ser el perfil mayoritario. Se identificaron además otras variantes minoritarias (4%, 3/85) y estrechamente relacionadas al linaje principal, que difieren del mismo por sus spatipos ($\leq 12\%$ discrepancia), así como por su perfil MLVA, distintos pero similares al M1.

El linaje estafilocócico CC5-ST5-t311-IV, perteneciente al perfil MLVA M5, fue identificado en el 9% (8/85) de los aislamientos, seguido por sus variantes CC5-ST5-t002-IV-M6 (6%, 5/85) y CC5-ST100-t002-IV-M7 (2%, 2/85), todas estrechamente relacionadas al linaje principal, con mínimas diferencias en los spatipos t311 y t002, que se diferencian en 1 (1/9) sola repetición y entre los secuenciotipos ST5 y ST100 en 1 (1/7) sólo alelo. Así también se identificaron 6 (7%, 6/85) aislamientos estrechamente relacionados a éstos últimos que presentan mínimas diferencias por sus spatipos y secuenciotipos.

Se identificaron además 2 (2%, 2/85) linajes CC15-t084-IV-M8, cuyos secuenciotipos discrepan entre sí en el 29% (2/7) de los alelos analizados por la técnica MLST (ST1160 y ST5585).

Tabla 10. Identificación de clones SARM empleando métodos moleculares combinados (N=85)

Nro. de aislados (%)	Perfil MLVA	Tipo cassette SCC-mec	Spatipo	Secuenciotipo (ST)	Complejo Clonal (CC)
53 (62)	M1	IV	t019	30	30
1 (1)	M2		t975		
1 (1)	M3		t021		
1 (1)	M4		t012		
8 (9)	M5		t311		
5 (6)	M6		t002	5	5
1 (1)			t7078		
1 (1)			t1791		
1 (1)			I		
1 (1)	M7	t1062	100	15	
1 (1)		t5300			
2 (2)		t002			
1 (1)		t7078			
1 (1)		t084			
1 (1)	M8	IV	t008	1160	8
1 (1)	M9		5585		
1 (1)			t008	4335	
1 (1)			t11770		
1 (1)			t008		
1 (1)	M10	t024	8	8	
1 (1)		t400			
1 (1)		t148	72		

Por último, pero no menos importante, se identificaron 4 (5%, 4/85) aislamientos pertenecientes al linaje CC8-ST8-IV y otros 2 (2%) aislamientos estrechamente relacionados al mismo, pertenecientes al mismo CC, pero que varían en secuenciotipo. El dendrograma obtenido utilizando todas las variables del estudio genético como: tipo de cassette, repeticiones que conforman el spatipo, complejo clonal, perfiles alélicos del MLST y MLVA, se muestra en la **Figura 17**.

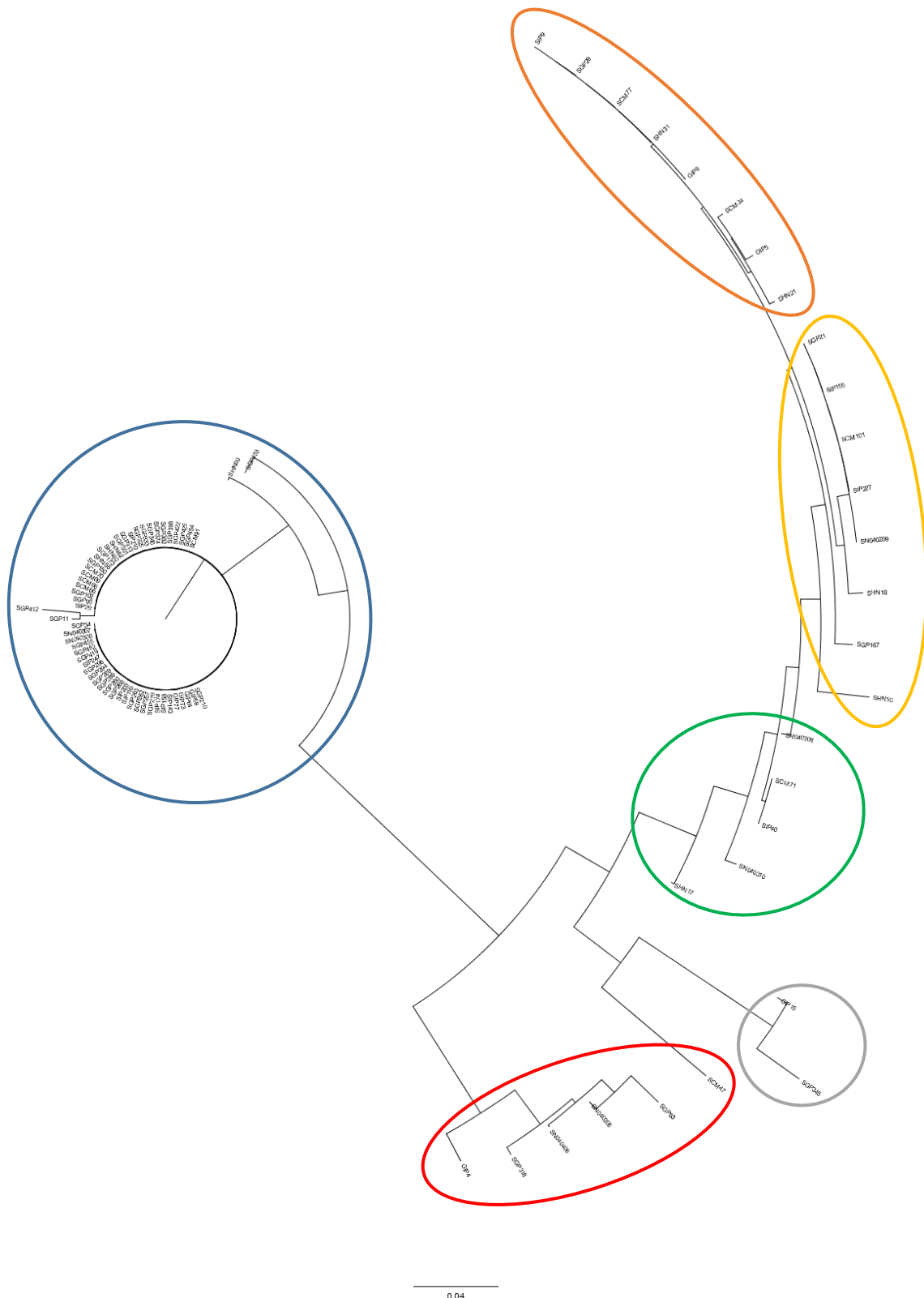


Figura 17. Dendrograma obtenido mediante los resultados de *cassette SCCmec*, Spatipo, complejo clonal, secuenciotipo y perfiles MLVA (N=85). En círculo azul, los

aislamientos pertenecientes al linaje CC30-ST30-IV (n=56), que engloba a los perfiles M1-M4: en naranja todos los aislamientos pertenecientes al clon CC5-ST5-t311-IV-M5 (n=8). En amarillo los aislamientos pertenecientes al linaje clonal CC5-ST5 (n=8), perfil M6; en verde los aislamientos pertenecientes al CC5-M7 (n=5), con diferentes secuenciotipos y spatipos. En gris los aislamientos pertenecientes al CC15-IV-M8 (n=2) y en rojo los pertenecientes al CC8-IV, perfiles M9-M10 (n=6).

6.3.4. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

Treinta y tres aislamientos fueron seleccionados para ser analizados por PFGE, representativos de los principales linajes identificados en el estudio (CC-ST-spatipo-IV-MLVA), se identificaron siete pulsotipos distintos y los resultados obtenidos en detalle se muestran en la **tabla 11**, ordenados por pulsotipo.

Los aislamientos identificados como CC30-ST30-t019-M1 62% (53/85), mayoritarios en éste estudio, fueron identificados como PA (CC30-ST30, 27%, 9/33) y sus subtipos. En segundo lugar, el PB (CC5-ST5, 18%, 6/33) y subtipos, que presentaron mayor variabilidad que el PA.

En el **Anexo 6** se muestra uno de los geles de agarosa obtenido del análisis de los aislamientos SARM en estudio por la técnica PFGE.

Tabla 11. Resultados PFGE (n=33)

Nro. Aislados (%)	CC	ST	Spatipo	Cassette	MLVA	Pulsotipo
9 (27)	30	30	t019	IV	1	A
1 (3)	30	30	t019	IV	1	A1
1 (3)	30	30	t019	IV	1	A2
1 (3)	30	30	t019	IV	1	A3
1 (3)	30	30	t021	IV	1	A4
6 (18)	5	5	t311	IV	2	B
1 (3)	5	5	t311	IV	2	B1
1 (3)	5	5	t002	IV	3	B1
1 (3)	5	5	t002	IV	3	B2
1 (3)	5	5	t002	IV	3	B3
1 (3)	5	5	t1791	IV	2	B3
1 (3)	5	5	t7078	IV	2	B4
1 (3)	5	5	t149	I	2	B5
1 (3)	5	100	t002	IV	3	B6
1 (3)	8	8	t008	IV	4	C
1 (3)	8	8	t11770	IV	4	C1
1 (3)	8	8	t024	IV	5	D
1 (3)	8	8	t400	IV	5	E
1 (3)	8	72	t148	IV	6	F
1 (3)	15	1160	t084	IV	8	G

6.3.5. Análisis de genoma completo (WGS) por la técnica NGS (Next Generation Sequencing).

Se realizó la secuenciación del genoma completo de 10 aislamientos SARM representativos de los principales de perfiles fenotípicos y genotípicos, seleccionados en base a resultados preliminares de *cassette SCCmec*, *Spa typing*, MLVA, MLST y PFGE, colectados en los primeros años del estudio (2009-2013) (**Tabla 12**).

Tabla 12. Características clínicas, fenotípicas y moleculares de SARM seleccionados para análisis de genoma completo (n=10)

ID	Fecha Colecta	Muestra biológica	Enfermedad Paciente	Edad paciente	Sexo biológico paciente	CC	ST	Spatipo	MLVA	PVL
SGP_11	2009, Dic	Sangre	Neumonía	14 años	F	30	30	t019	1	+
SIP_29	2010, Ene	Sangre	Osteomielitis	2 meses	F	30	30	t019	1	+
SGP_29	2010, Feb	Sangre	Sepsis	1 año	M	5	5	t311	2	+
SGP_63	2011, Nov	Sangre	Sepsis	10 años	M	8	8	t11770	4	+
SGP_102	2012, Ene	Sangre	Sepsis	11 años	M	30	30	t019	1	+
SCM_71	2012, Feb	Secreción Purulenta	Sepsis	12 días	F	5	100	t002	3	-
SCM_77	2012, Abr	Secreción Purulenta	Sepsis	9 años	F	5	5	t311	2	+
SHN_80	2012, Nov	Sangre	Sepsis	9 días	M	30	30	t021	1	-
GIP_4	2013, Ago	Sangre	Osteomielitis	15 años	M	8	8	t400	5	+
GIP_64	2013, Dic	Sangre	Neumonía	5 años	M	30	30	t019	1	+

Abreviaturas: ID: Identificación, ST: Secuenciotipo, CC: Complejo clonal, ST: Secuenciotipo, MLVA: Perfil MLVA, PVL: leucocidina de Pantone-Valentine, Ene: Enero, Feb: Febrero, Abr: Abril, Ago: Agosto, Nov: Noviembre, Dic: Diciembre, F: Femenino, M: Masculino.

Los parámetros de calidad de las lecturas (R1 y R2) obtenidos, se detallan en la **tabla 13**. Para el cálculo de la cobertura aproximada de las lecturas se tuvo en cuenta el tamaño del genoma de **SARM= 2.827.644 pb** y la siguiente fórmula:

$$\% \text{Cobertura aproximada} = \frac{\text{Longitud máx. de las reads} \times \text{Promedio del nro. de reads}}{\text{Tamaño del Genoma de } S. aureus}$$

En ninguna de las lecturas obtenidas se detectaron adaptadores de secuenciación, considerado éste resultado como un buen parámetro de calidad.

Evaluando los parámetros obtenidos y teniendo en cuenta el valor de **%GC de SARM= 32,8%**, analizamos el grado de calidad de las lecturas para ser utilizadas en análisis subsiguientes, por lo que clasificamos a las mismas por colores: verde (excelente calidad), amarillo (buena calidad) y rojo (calidad no aceptable) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Parámetros de calidad y clasificación taxonómica (n=10)

Aislamiento	Nro. de reads ^a	Longitud reads ^b	%GC ^c	Cobertura aproximada ^d	% Reads <i>S. aureus</i> ^e	% Reads No clasificada ^f
SGP_11	1.439.061	2 – 301	35,0	306	88,80	0,04
SGP_29	966.485	2 – 301	35,5	206	97,08	0,14
SGP_63	1.416.626	2 – 301	41,0	302	88,09	2,42
SGP_102	1.160.358	2 – 301	41,5	247	73,63	4,85
SIP_29	1.570.614	2 – 301	36,0	329	88,84	0,04
GIP_4	1.234.194	2 – 301	38,5	263	90,26	4,92
GIP_64	1.520.864	2 – 301	33,0	324	88,12	0,03
SCM_71	1.167.072	2 – 301	48,0	248	50,35	20,41
SCM_77	1.518.022	2 – 301	35,0	323	98,59	0,01
SHN_80	1.559.248	2 – 301	36,0	332	90,53	0,02

^aValor obtenido del análisis con el programa FastQC: promedio del nro. de reads obtenidos para cada lectura de una misma muestra.

^bValores obtenidos del análisis con el programa FastQC.

^cValor obtenido del análisis con el programa FastQC: promedio del porcentaje de GC calculado para cada lectura de una misma muestra.

^dValor calculado empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Cobertura aproximada} = \frac{\text{Longitud máximo de las reads} \times \text{Promedio del nro. de reads}}{\text{Tamaño del Genoma de } S. aureus}$$

^eValor obtenido del análisis con el programa Kraken, indica el % de las lecturas cuya clasificación corresponde a la especie en estudio.

^fValor obtenido del análisis con el programa Kraken, indica el % de las lecturas que no fue clasificada bajo ninguna especie.

Posteriormente se llevó a cabo el ensamble de novo, útil para detectar nuevas variantes estructurales en el genoma bacteriano y análisis de calidad de los ensambles, cuyos

resultados se resumen en la **tabla 14**, incluyendo métricas de ensamblaje y parámetros de calidad como el tamaño total del genoma, Nro. de contigs totales, tamaño del contig más grande, L50, N50 y %GC, los detalles se muestran en el **ANEXO 7**.

Todos los ensamblajes están disponibles en: NCBI Sequence Read Archive (**BioProject accession number PRJNA830493**).

Tabla 14. Parámetros de calidad del ensamble^a (n=10)

Aislamiento	Nro. de Contigs ^b	Tamaño del contig más largo ^c	N50 ^d	L50 ^e	Tamaño del genoma ^f	%GC ^f
SGP_11	72	354.810	81.371	10	2.719.656	32,83
SGP_29	40	984.945	306.045	3	2.801.912	32,67
SGP_63	2208	107.481	11.886	410	17.822.726	55,65
SGP_102	48	362.040	224.570	5	2.858.763	33,32
SIP_29	65	284.909	79.441	11	2.666.158	32,84
GIP_4	59	226.512	93.386	11	2.897.788	33,35
GIP_64	52	390.906	137.306	6	2.767.805	32,68
SCM_71	671	712.921	88.914	42	14.881.909	50,16
SCM_77	51	325.044	263.702	5	2.771.113	32,74
SHN_80	79	165.559	70.837	13	2.752.704	32,78

^aValores obtenidos del análisis del ensamblaje del genoma con Unicycler y posterior control de calidad del ensamblaje con Quast Genome Assembly Quality. El total de valores de control de calidad y gráficos obtenidos con la herramienta Quast Genome Assembly Quality a partir de los ensamblajes fueron incluidos en el **Anexo 7**.

^bNúmero total de contigs en el ensamblaje.

^cLongitud en pares de bases del contig más largo.

^dLongitud del contig más corto con el que se alcanza a cubrir el 50% del genoma.

^eNúmero de contigs con los que se llega al N50.

^fValores acordes a la especie secuenciada.

Posterior al control de calidad del ensamblaje, se procedió a realizar la anotación con Prokka v1.14.6, a partir del cual se tuvieron 12 archivos por cada genoma, cuyos resultados se resumen en la **tabla 15**.

Todos los aislamientos fueron identificados como *Staphylococcus aureus*, además los secuenciotipos y spatipos detectados por análisis del genoma completo fueron 100% concordantes con los resultados obtenidos por PCR detallados anteriormente en la **tabla 12**.

Todos los SARM (100%, 10/10) sometidos al estudio del genoma completo fueron fenotípicamente resistentes a penicilina y sensibles a vancomicina, gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol, y portadores del gen *mecA* en el cassette *SSCmec* de tipo IV. El perfil de susceptibilidad y resistencia a todos los antibióticos

detectados se muestra en la **tabla 16**. Para todos los genes de resistencia, los porcentajes de identidad se encontraban entre el 97,1-100,0% y la cobertura entre 87,2-100,0%. La búsqueda de genes de resistencia a glucopéptidos incluyó la detección del gen *vanA*, por lo que la detección del genotipo VRSA estaba incluido en el estudio, no así la posibilidad de un probable genotipo VISA.

Tabla 15. Resumen anotación genómica con software Prokka (n=10)

Aislamiento	Contigs	Bases	CDS	Genes	rRNA	tRNA	tmRNA	Region repetida
SGP_11	79	2.722.060	2508	2.568	4	55	1	-
SGP_29	43	2.802.959	2612	2.664	4	47	1	-
SGP_63	2218	17.826.805	16.967	17.200	20	209	4	3
SGP_102	53	2.860.791	2.632	2.709	11	65	1	-
SIP_29	69	2.667.627	2.454	2.514	4	55	1	-
GIP_4	60	2.898.251	2.680	2.747	7	59	1	2
GIP_64	61	2.770.881	2.578	2.637	4	54	1	-
SCM_71	691	14.889.551	13.940	14.212	20	249	3	2
SCM_77	52	2.771.573	2.584	2.638	5	48	1	-
SHN_80	85	2.754.645	2.580	2.639	4	54	1	-

Para la detección de los genes codificantes de factores de virulencia se recurrió al análisis de los ensamblajes genómicos, utilizando la plataforma Center for Genomic Epidemiology con el software Virulence finder v2.0.3 con diferentes bases de datos (**ANEXOS 8 y 9**) en complementación con un segundo análisis de portación de genes codificantes de factores de virulencia con ABRicate v1.0.1 y la base de datos Virulence Factors Database (**ANEXO 10**).

Tabla 16. Genotipo y fenotipo de susceptibilidad a antimicrobianos identificados en el análisis genómico de SARM (n=10)

Resistoma y Perfil de Susceptibilidad a Antimicrobianos (Representación de los datos Genotípicos/Fenotípicos)*										
ID CC-ST-Spatipo	FOX/ β - Lactámicos ¹	PEN	VAN ²	GEN	Macrólidos genes/ERY, CLY	Fenotipo Resistencia Macrólidos	TET	CLO	FOS	RIF
SGP_11 CC30-ST30- t019	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	<i>ermC/R</i> , R	iMLS	<i>tet (38)/S</i>	<i>cat(pC221)/ND</i>	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
SIP_29 CC30-ST30- t019	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	-/S, S	-	<i>tet (38)/S</i>	<i>cat(pC221)/ND</i>	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
SGP_29 CC5-ST5-t311	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	<i>ermC/R</i> , R	iMLS	<i>tet (38)/S</i>	<i>cat(pC221)/ND</i>	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
SGP_63 CC8-ST8- t11770	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	-/S, S	-	<i>tet (38)/R</i>	-/ND	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
SGP_102 CC30-ST30- t019	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	-/S, S	-	<i>tet (38)/S</i>	-/ND	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
SCM_71 CC5-ST100- t002	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	-/S, S	-	<i>tet (38)/S</i>	-/ND	<i>fos-B-Saur/ND</i>	<i>rphC/R</i>
SCM_77 CC5-ST5-t311	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	-/S, S	-	<i>tet (38)/S</i>	-/ND	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
SHN_80 CC30-ST30- t021	<i>mecA/R*</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	<i>ant(9)-la/S</i>	<i>ermA/R</i> , R	iMLS	<i>tet (38)/R</i>	-/ND	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
GIP_4 CC8-ST8-t400	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	-/S, S	-	<i>tet (38)/S</i>	<i>cat(pC221)/ND</i>	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S
GIP_64 CC30-ST30- t019	<i>mecA/R</i>	<i>blaZ/R</i>	-/S	-/S	-/S, S	-	<i>tet (38)/S</i>	-/ND	<i>fos-B-Saur/ND</i>	-/S

*Base de Datos: Resfinder + National Center for Biotechnology Information (NCBI). **Abreviaturas:** (-): gen ausente, S: susceptible fenotípicamente, R: resistente fenotípicamente, ND: No Detectado, ID: Identificación, ST: Sequenciotipo, FOX: Cefoxitina, PEN: Penicilina, VAN: Vancomicina, GEN: Gentamicina, ERY: Eritromicina, CLY: Clindamicina, TET: Tetraciclina, CLO: Cloranfenicol, FOS: Fosfomicina, RIF: Rifampicina. ¹ β -Lactámicos testados fenotípicamente: cefoxitina y oxacilina. ²Susceptible a Vancomicina determinado por E-test.

El resumen de la portación de genes codificantes de los 87 factores de virulencia analizados para cada uno de los 10 genomas de SARM en estudio se resume en la **figura 18**, obtenido mediante el empleo de la plataforma NG-CHM Builder: Cluster Matrix, de la Universidad de Texas <https://build.ngchm.net/NGCHM-web-builder/>.

La portación de los genes codificantes de factores de virulencia fue diversa y se correlacionó con las características de cada linaje (**Tabla 17**). Todos los aislamientos (100%, 10/10) resultaron ser portadores de aureolisina (*aur*), componentes A, B y C de la hemolisina gamma (*hlg*), componentes A, B, C, D, E, F y G de la proteína determinante de superficie regulada por hierro (*isd*), hemolisina alfa (*hly/hla*), precursor de estafiloquinasa (*sak*), elastina de la superficie celular (*ebp*) y el factor de aglomeración A de la proteína fijadora de fibrinógeno (*clfA*). Además, también portaron los genes codificantes de la proteína de unión IgA e IgG (*spa*), inhibidor del complemento SCIN (*scn*), ester de glicerol hidrolasa (*geh*), el sistema de secreción de proteínas y sus componentes (*es*) EsxA, EsaA/B y EssA/B, el polisacárido capsular tipo 8 (*cap8*) y sus componentes L/M/N/O/P, con funciones antifagocíticas. La proteasa de serina (*sspA*), estafopaina, proteinasa de cisteína (*sspB*), estafopaina B (*sspC*) y la sortasa B específica de NPQTN (*srtB*), también se detectaron en todos los aislamientos. La portación diferencial de los demás genes de virulencia detectados por el análisis del genoma completo se muestra en la **tabla 17** para una mejor comprensión y clasificación de los mismos según su funcionalidad.

Ninguno de los aislados estudiados portaba enterotoxinas (*se*) B, C, D, H, L y toxinas exfoliativas (*et*) A/B.

La detección de replicones plasmídicos se realizó con ABRicate v1.0.1 empleando la base de datos **PlasmidFinder (Tabla 18)**, con cobertura de entre 89,16-100,00% e identidad de entre 90,91-100,00%.

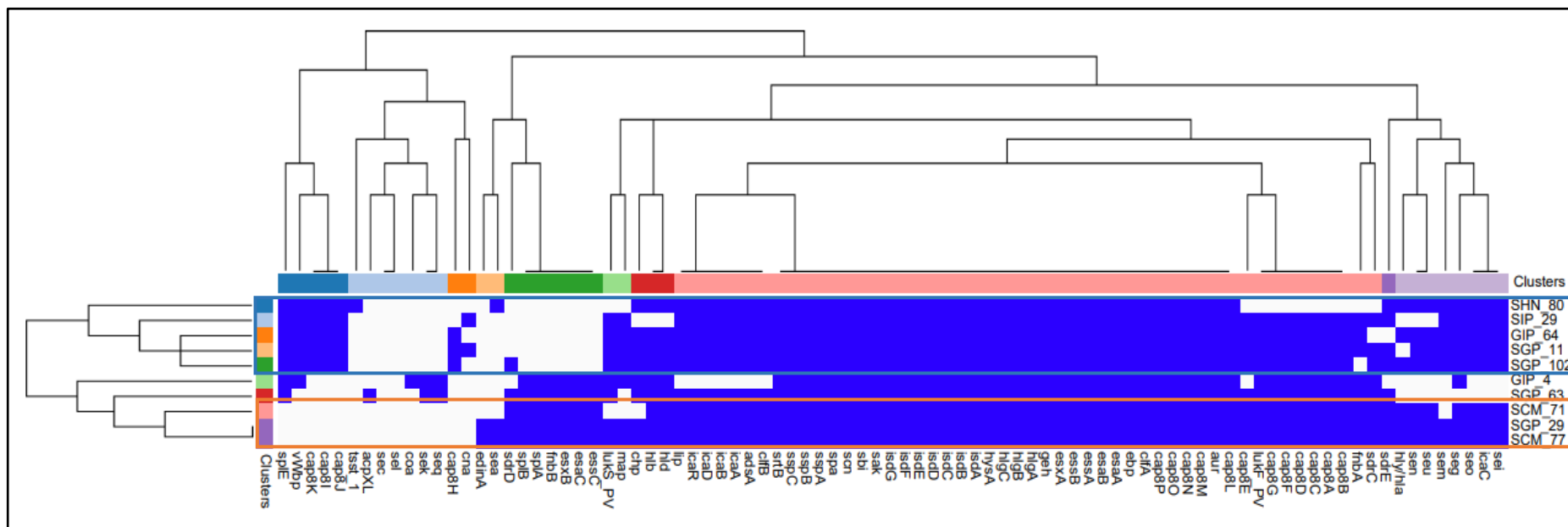


Figura 18. Heat map y dendrograma de factores de virulencia a partir del ensamble de novo del genoma completo de SARM invasivas (n=10). Los cuadros azules indican presencia y los blancos ausencia de cada uno de los 87 genes codificantes de factores de virulencia analizados. La aplicación permitió agrupar jerárquicamente a los aislamientos en base a su perfil de factores de virulencia empleando distancia métrica euclidiana con aglomeración de enlace completo tanto en filas como en columnas, proporcionando así dos dendrogramas.

El dendrograma vertical (izquierda) presenta numerosas agrupaciones de los factores de virulencia según su frecuencia de aparición en los aislamientos, los más frecuentes: en el centro y los poco frecuentes en los extremos inferior y superior. El dendrograma horizontal (inferior) agrupa a los aislamientos en base a su perfil de virulencia, dentro del mismo cluster se encuentran en un recuadro azul **SIP_29, GIP_64, SGP_11 y SGP_102**, todos CC30-ST30-t019-IV y un poco más alejado al **SHN_80** CC30-ST30-t021-IV. En otra agrupación se puede divisar en un

recuadro naranja como idénticos a **SCM_77**, **SGP_29** (ambos CC5-ST5-t311-IV) y **SCM_71** (CC5-ST100-t002-IV), luego **SGP_63** (CC8-ST8-t11770-IV) y **GIP_4** (CC8-ST8-t400-IV).

Tabla 17. Viruloma de los aislados SARM secuenciados (n=10)

Tipo Proteína/Fun ción	Antifagocítica					Exotoxinas formadoras de poros		Adherencia		Exoenzimas		Toxinas	Evasinas
ID CC-ST- Spatipo	Polisacárido capsular	Sistema de secreción de proteínas	Sintasas de mediadores antifagocítico s	Inhibidores de quimiotaxis	Inhibidor de diferenciació n de células epidérmicas	Leucodina	Hemolisinas	Formadores de Biopelículas	Proteínas de superficie	Factores de coagulación	Degradación TAGs	Superantígen os	Proteasas de Serina
SGP_11 CC30-ST30- t019	cap8A/B/C/D/ E/F/G/H/I/J/K	-	adsA	Chp	-	lukf-pv, luks- pv	hlyb, hld	icaA, icaB, icaC, icaD, icaR	sdrC, sdrE, cna, fnbA, map	clfB, vWbp	Lip	seg, sem, sen, seo, seu	splE
SIP_29 CC30-ST30- t019	cap8A/B/C/D/ E/F/G/H/I/J/K	-	adsA	-	-	lukf-pv, luks- pv	-	icaA, icaB, icaC, icaD, icaR	sdrC, sdrE, cna, fnbA, map	clfB, vWbp	Lip	seg, sem, seo	splE
SGP_29 CC5-ST5-t311	cap8A/B/C/D/ E/F/G	esaC, essC, esxB	adsA	Chp	edinA	lukf-pv, luks- pv	hlyb, hld, hly/hlyA	icaA, icaB, sdrE, fnbA, icaD, icaR	sdrC, sdrD, sdrE, fnbA, fnbB, map	clfB	Lip	sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu	splA, splB
SGP_63 CC8-ST8- t11770	cap8A/B/C/D/ E/F/G	esaC, essC, esxB	adsA	Chp	-	lukf-pv, luks- pv	hlyb, hld	icaA, icaB, icaD, icaR	sdrC, sdrD, sdrE, fnbA, fnbB	clfB	Lip	sek, seq	splA, splB, splE
SGP_102 CC30-ST30- t019	cap8A/B/C/D/ E/F/G/H/I/J/K	-	adsA	Chp	-	lukf-pv, luks- pv	hlyb, hld, hly/hlyA	icaA, icaB, icaC, icaD, icaR	sdrC, sdrD, sdrE, map	clfB, vWbp	Lip	seg, sei, sem, sen, seo, seu	splE
SCM_71 CC5-ST100- t002	cap8A/B/C/D/ E/F/G	esaC, essC, esxB	adsA	-	-	lukf-pv	hlyb, hld, hly/hlyA	icaA, icaB, icaC, icaD, icaR	sdrC, sdrD, sdrE, fnbA, fnbB	clfB	Lip	seg, sei, sen, seo, seu	splA, splB
SCM_77 CC5-ST5-t311	cap8A/B/C/D/ E/F/G	esaC, essC, esxB	adsA	Chp	edinA	lukf-pv, luks- pv	hlyb, hld, hly/hlyA	icaA, icaB, icaC, icaD, icaR	sdrC, sdrD, sdrE, fnbA, fnbB, map	clfB	Lip	sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu	splA, splB
SHN_80 CC30-ST30- t021	cap8I/J/K	-	adsA	Chp	-	-	hlyb, hld, hly/hlyA	icaA, icaB, icaC, icaD, icaR	sdrE	clfB, vWbp	lip,	sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu, tsst-1	splE
GIP_4 CC8-ST8-t400	cap8A/B/C/D/ F/G	esaC, essC, esxB	-	Chp	-	lukf-pv, luks- pv	hlyb, hld	-	sdrC, fnbA, fnbB, map	coa, vWbp	-	seg, sek, seq	splA, splB, splE
GIP_64 CC30-ST30- t019	cap8A/B/C/D/ E/F/G/H/I/J/K	-	adsA	Chp	-	lukf-pv, luks- pv	hlyb, hld, hly/hlyA	icaA, icaB, icaC, icaD, icaR	fnbA	vWbp	Lip	seg, sei, sem, sen, seo, seu	splE

Abreviaturas: (-): ausencia del gen, ID: Identificación, CC: Complejo clonal, ST: Secuenciotipo

Tabla 18. Detección de Replicones Plasmídicos: Abricate + PlasmidFinder (n=10)

Aislamiento/s	Gen	Producto*
SGP_11, SGP_102, SIP_29, GIP_64	rep19_15_repA(TCH60plasmid)	rep19_15_repA(TCH60plasmid)_CP002111
SGP_11, SGP_102, SIP_29, GIP_64	rep16_6_SAP071A015(SAP071A)	rep16_6_SAP071A015(SAP071A)_GQ900485
SGP_11, SGP_63, GIP_4	rep21_9_rep(pKH12)	rep21_9_rep(pKH12)_EU168704
SGP_11, SGP_102, SIP_29, GIP_4	rep7a_5_repD(pTZ4)	rep7a_5_repD(pTZ4)_NC010111
SGP_11	rep10_3_pNE131p1(pNE131)	rep10_3_pNE131p1(pNE131)_NC001390
SGP_29, SCM_77	rep20_1_ORF1(EDINA)	rep20_1_ORF1(EDINA)_AP003089
SGP_29, SCM_77	rep16_2_CDS6(pSJH101)	rep16_2_CDS6(pSJH101)_CP000737
SGP_29	rep19_16_rep(pSK156)	rep19_16_rep(pSK156)_GQ900448
SGP_29	rep7a_7_rep(pKH7)	rep7a_7_rep(pKH7)_NC002096
SGP_63	rep7a_16_repC(Cassette)	rep7a_16_repC(Cassette)_AB037671
SGP_63, GIP_4	rep7c_1_rep(MSSA476)	rep7c_1_rep(MSSA476)_BX571857
SCM_71, GIP_4	rep20_3_rep(pTW20)	rep20_3_rep(pTW20)_FN433597
SCM_71	repUS21_1_rep(pWBG764)	repUS21_1_rep(pWBG764)_GQ900468
SCM_77	rep5c_1_rep(pRJ9)	rep5c_1_rep(pRJ9)_AF447813
SCM_77	rep19_5_rep(pWBG747)	rep19_5_rep(pWBG747)_GQ900399
SCM_77	rep13_14_rep(pPI2)	rep13_14_rep(pPI2)_AB125342
SHN_80	No detectado	No detectado

El análisis filogenético se realizó a partir del genoma bacteriano ensamblado a fin de establecer el genoma central de los aislados clínicos analizados, utilizando como controles MRSA 252 (NC_002952.2), TCH60 (NC_017342.1), NCTC8325 (NC_007795.1), N315 (NC_002745.2) y USA300 (NZ_CP092052.1). El resumen estadístico de los análisis se muestra en la **Tabla 19**, obtenidos con un mínimo del 95% de identidad.

Tabla 19. Resumen estadístico análisis Roary v3.13.0 (n=10)

Genes Núcleo	(99% <= strains <= 100%)	1879 (08.85%)
Genes Núcleo blando	(95% <= strains < 99%)	0 (00.00%)
Genes Accesorios	(15% <= strains < 95%)	9622 (45.35%)
Genes Nube	(0% <= strains < 15%)	9718 (45.80%)
Total genes	(0% <= strains <= 100%)	21219 (100.00%)

A partir del alineamiento de los genes core producido por Roary v3.13.0 se realizó un alineamiento sólo de los sitios que contenían variaciones (SNPs) con el programa SNP sites v2.5.1 , para luego construir un árbol filogenético de Newick que muestre las relaciones entre cada cepa (**Figura 19**).

El árbol filogenético construido a partir de las variantes de un solo nucleótido (SNV) del genoma completo (**Figura 19**) agrupó a los aislados en tres clados distintos: CC30-ST30 (SGP_11, SIP_29, SGP_102, GIP_64 y SHN_80, en azul), CC5-ST5/ST100 (SGP_29, SCM_71 y SCM_77, en naranja) y CC8-ST8 (SGP_63 y GIP_4, en rojo).

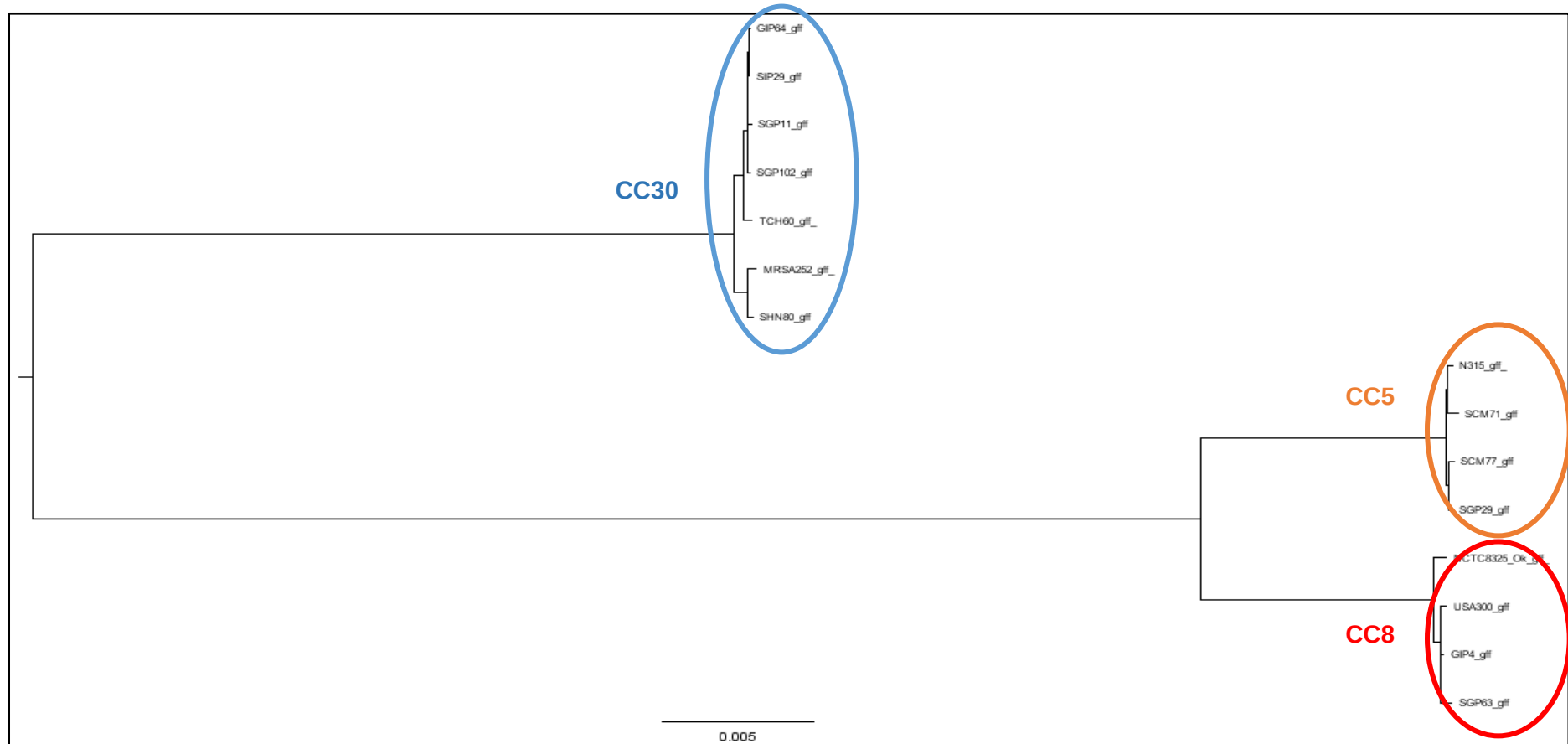


Figura 19. Árbol filogenético tipo Newick. Enraizado en punto medio, realizado a partir de los alineamientos de los SNPs de los genes core de los aislamientos en estudio (n=10). Se pueden visualizar las agrupaciones obtenidas a partir del análisis del genoma completo.

Así también se puede visualizar la integración de todos los metadatos y el árbol filogenético realizado con la plataforma Microreact (**Figura 20**).

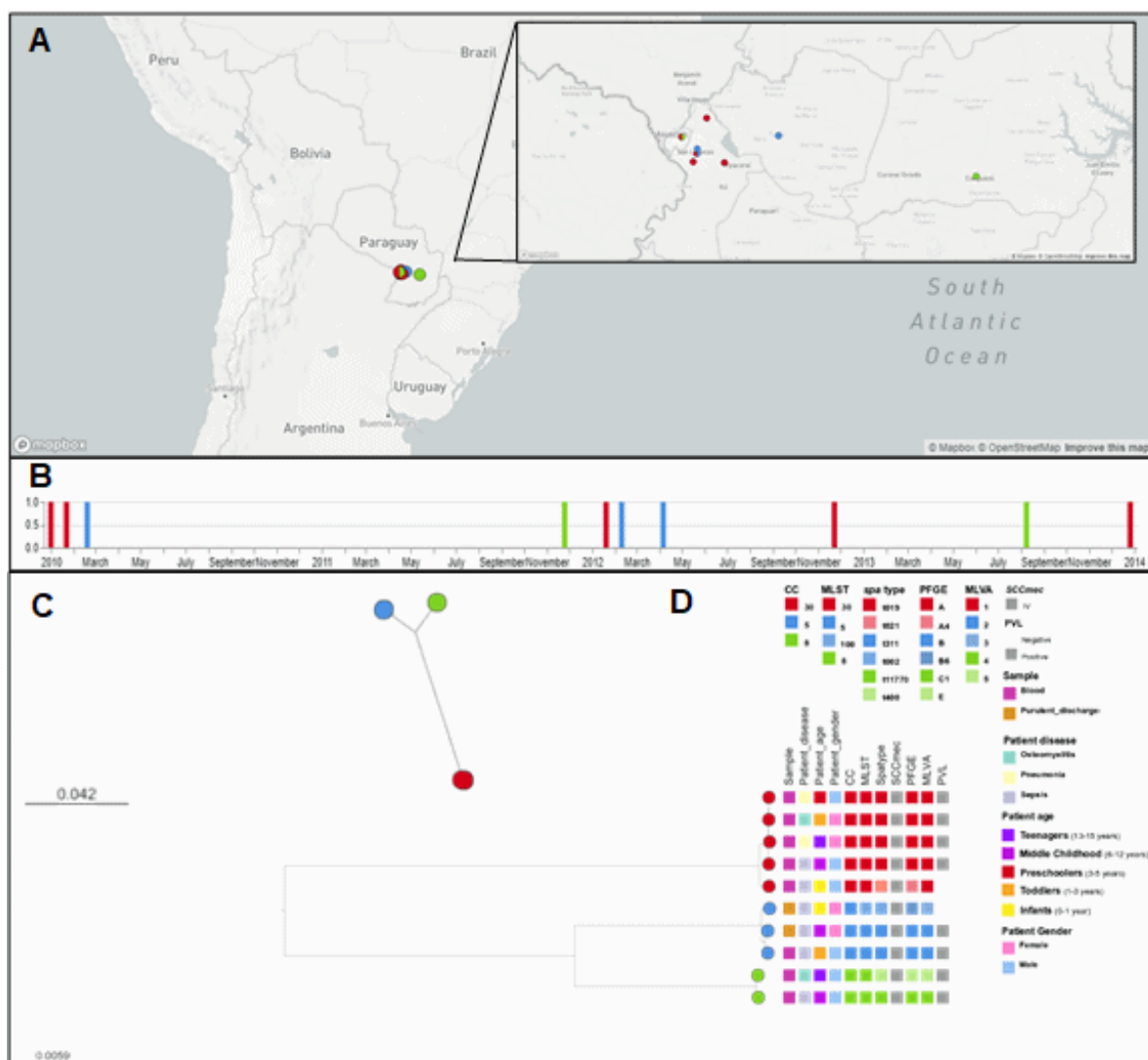


Figura 20: Características demográficas, filogenéticas y moleculares de SARM causante de infecciones invasivas en niños paraguayos (n=10). (A) Distribución geográfica de la zona de colecta de muestras biológicas de las cuáles provinieron los aislamientos en estudio; (B) Línea de tiempo de colecta de las muestras; (C) Árbol filogenético enraizado en punto medio inferido a partir de 35.402 SNP a partir del alineamiento de los 10 genomas en estudio (CC30, CC5 y CC8). Las ramas y los nudos del árbol están coloreados por complejo clonal (CC) de la cepa, así como también está indicado en (A) y en (B). La distribución de genotipos y características demográficas se muestran como bloques en la sección metadatos del árbol (D). Datos disponibles en: <https://microreact.org/project/3ws3rcf2vdzkzhcvpnxmx8>

7. DISCUSIÓN

Los clones SARM representan una gran preocupación para la salud a nivel mundial, por ello existe una clara necesidad de comprender mejor la dinámica de transmisión de éste microorganismo y su evolución en una región geográfica a lo largo del tiempo (4). A pesar de la elevada frecuencia de infecciones por SARM, tanto a nivel hospitalario como comunitario, en nuestro país aún no se disponen de estudios genómicos de SARM.

Éste estudio transversal, multidisciplinario y multicéntrico representa el primer trabajo en Paraguay donde se aborda la epidemiología molecular de aislamientos SARM causantes de infecciones invasivas provenientes de niños y su evolución a través de diez años de estudio (2009-2019), así como el análisis genómico de los clones bacterianos más representativos con el fin de evaluar su diversidad genética, repertorio de factores de virulencia y mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Todos los aislamientos de SARM analizados en éste estudio fueron recuperados de muestras clínicas, pacientes y hospitales diversos, en amplios periodos de tiempo, excluyendo brotes hospitalarios (109).

7.1. Clones SARM causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos

La combinación de métodos moleculares como MLVA, spa-typing, MLST, tipificación del *cassette SCCmec* y PFGE, permitió identificar las principales variantes de SARM causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos. Se identificaron cuatro complejos clonales: CC30 (66%, 56/85), CC5 (25%, 21/85), CC8 (7%, 6/85) y CC15 (2%, 2/85). El complejo CC30, además de ser el mayoritario, fue el que presentó menor diversidad, lo cual sugiere un ingreso más reciente del mismo al país. La totalidad de los 56 aislamientos pertenecientes al CC30 correspondían al clon CC30-ST30-IV mientras que el clon CC5-ST5-IV correspondió a 17/21 aislamientos del CC5. A su vez, las variantes spa predominantes en cada CC fueron CC30-ST30-t019-IV (53/56) y CC5-ST5-t311-IV (8/21), respectivamente. Un reporte preliminar de éste mismo estudio indica que los principales clones SARM circulantes en Paraguay entre los años 2009-2013 fueron: CC30-ST30-IV (77%) y CC5-ST5-IV (10%) en 115 aislamientos SARM responsables de procesos infecciosos diversos (IIPB e invasivas) en niños (62).

En Argentina en cambio, un estudio multicéntrico reportó al clon CC5-ST5-IV como predominante en aislamientos colectados de niños entre los años 2007 y 2008, tanto en casos asociados a la comunidad (82%), como en los asociados a la atención médica (57%) (57). Posteriormente, en 2013, Fernández y colaboradores a través de otro estudio multicéntrico, reportaron al clon CC30-ST30-IV como prevalente en infecciones

invasivas por SARM-AC en pacientes adultos, desplazando así al anteriormente prevalente CC5-ST5-IV (56).

Analizando los resultados obtenidos por periodo de colecta en éste estudio, se puede notar claramente cómo entre los años 2009-2011, el clon CC5-ST5-IV (54%) estaba instalado fuertemente en nuestro país y con el correr de los años fue desplazado ampliamente por el CC30-ST30-IV. Este fenómeno de desplazamiento exitoso del clon CC5-ST5-IV por el CC30-ST30-IV corresponde con lo descrito anteriormente en Argentina, donde el linaje clonal CC5-ST5-t311-IV surgió como el más prevalente en el 2004 y se mantuvo en la cima por casi diez años, cuando fue desplazado por CC30-ST30-t019-IV. Éste último considerado como el más prevalente hasta el día de hoy (56,110,111).

¿Cómo explicar éste fenómeno de desplazamiento exitoso del clon CC5-ST5-IV por el CC30-ST30-IV que se está dando a nivel regional desde hace aproximadamente una década? Fernández y colaboradores en el 2017, realizaron experimentos en modelos animales para buscar determinantes de virulencia que permitan comprender mejor el progreso de las infecciones ocasionadas por SARM-AC, así como el desplazamiento del clon CC5-ST5-IV por el CC30-ST30-IV. La primera evidencia que obtuvieron fue que una mayor proporción de las infecciones invasivas por SARM-AC en pacientes adultos se debieron al clon CC30-ST30-IV, cuya fuente primaria de la enfermedad constituyen principalmente las infecciones de piel y partes blandas, con una mayor capacidad para sobrevivir y replicarse en el nicho subcutáneo, reforzada por la observación de que la carga bacteriana recuperada de las lesiones de piel debidas a CC30-ST30-IV fue más de diez veces mayor que la del inóculo inicial. En segundo lugar, detectaron que la variante CC30-ST30-t019-IV exhibe una mayor tendencia a escapar del absceso de la piel y migrar hacia otros sitios, que se constituye en una ventaja para replicar en un órgano diferente como el bazo, estableciendo una asociación significativa entre SARM CC30-ST30-IV y su capacidad para desarrollar una infección invasiva. Fernandez y colaboradores sugieren que la variante emergente CC30-ST30-t019-IV tiene un comportamiento más agresivo que CC5-ST5-t311-IV, motivo por el que la desplaza (112).

7.2. Complejo Clonal 30: CC30

El CC30, agrupa a linajes pandémicos de *S. aureus* ampliamente distribuidos a nivel mundial (86), incluyendo al CC30-ST30-t019-IV portadora de PVL, una de las variantes más frecuentes en Argentina y Paraguay (56,62,113). En Uruguay entre los años 2002-2003, el clon CC30-ST30-IV PVL+ fue el responsable de un gran brote reportado en reclusos y sus contactos cercanos: el 74,5% de los aislamientos identificados

pertenecían a éste clon (limitándose al Este de Argentina) y se reportaron al menos 12 muertos y más de 1000 infectados, todos previamente sanos (60).

El clon SARM CC30-ST30-IV PVL+, cepa ancestral del CC30 se cree que evolucionó de un ancestro común con el fagotipo 80/81 de *S. aureus* resistente a la penicilina (114), un clon pandémico que surgió a lo largo de la década de 1950 y se convirtió en una reconocida cepa virulenta que causó un alto número de lesiones en la piel, sepsis y neumonía en niños y adultos jóvenes en hospitales y en la comunidad. En estudios descriptivos recientes se ha asociado al linaje clonal CC30-ST30-t019-IV con un mayor riesgo de endocarditis infecciosa (115) y bacteriemia persistente por *S. aureus* (116).

En nuestro estudio se pudo notar además que el establecimiento y expansión en nuestro país del linaje clonal mayoritario CC30-ST30-t019-IV (62%), dio paso a la aparición de nuevas variantes del clon CC30-ST30-IV, muy emparentados al linaje mayoritario, pero con perfil de virulencia, MLVA, así como spatipos diferentes. En cuanto a los spatipos, éstos se diferencian en una o más repeticiones, sea por inserción o delección en las secuencias del gen *spA*; así del spatipo t019 (n=53) se diferencia el t975 (n=1) por la delección de *r24* en la última posición (octava), el t021 y el t012 por dos inserciones (*r15-r12*) al inicio y el t021 además por una inserción (*r24*) al final. Este fenómeno, de inserción, delección o duplicación de repeticiones, aparece generalmente en infecciones crónicas o a repetición como un mecanismo de microevolución, indicando probablemente que el linaje clonal mayoritario CC30-ST30-t019-IV está comenzando a evolucionar cambiar hacia otros spatipos que le confieren mayor aptitud a la bacteria (112,117).

7.3. Complejo Clonal 5: CC5

El segundo lugar en cuanto a frecuencia de aparición ocupa el clon CC5-ST5-IV (20%), con mayor variabilidad genética respecto al CC30-ST30-IV, notado por la aparición con el correr de los años de nuevas variantes estrechamente relacionadas entre sí pero que difieren en sus spatipos, que van desplazando al CC5-ST5-t311-IV (9%, 8/85). Aún así el linaje clonal más representativo del complejo sigue siendo el CC5-ST5-t311-IV, caracterizado por ser virulento, portador de la PVL y no-multirresistente (portador de *cassette IV*), asociado a infecciones comunitarias y causante principalmente de IPPB, así como de algunos cuadros invasivos como osteomielitis y neumonía necrotizante (46).

Así el linaje CC5-ST5-t002-IV (6%, 5/85) se diferencia de CC5-ST5-t311-IV por la inserción de una repetición (*r17*) en la quinta posición del gen *spA*. Los demás spatipos reportados dentro del clon CC5-ST5-IV se diferencian en tres (t1062, t1791, t5300) o más (t149 y t7078) inserciones, delecciones y/o repeticiones del t311. Dentro de éste

complejo clonal se identificaron además otras variantes muy relacionadas entre sí y al CC5-ST5-t311-IV: CC5-ST5-t149-I, CC5-ST100-t002-IV y el CC5-ST4331-t7078-IV. Este estudio reporta por primera vez a la variante CC5-ST5-t149-I aislada a partir de infecciones en niños paraguayos, relacionado al clon cordobés/chileno y reportado anteriormente en nuestro país por Mayor y colaboradores en el 2007, a partir de muestras hospitalarias provenientes de adultos (61). El linaje clonal CC5-ST5-t149-I fue reportado por primera vez en Sudamérica en el año 1999 (110), coexistiendo en ese entonces con el clon brasileiro (CC8-ST239-III). A partir de ese momento se propagó por todo el Cono Sur de América y Paraguay, con un comportamiento endémico a partir del 2008 y con un aumento significativo en la prevalencia y carga de las infecciones por SARM-AH, ganando su espacio a expensas del desplazamiento del clon brasileiro, endémico en ese tiempo y considerado como el clon epidémico internacional de mayor éxito entre los SARM (42,118).

CC5-ST100-t002-IV (2%, 2/85) es una variante del clon pediátrico y estrechamente relacionada con el CC5-ST5-t311-IV, del que se diferencia por la adquisición de resistencia a rifampicina y una mutación puntual en el gen *aroE* (sustitución del alelo *aroE4*, característico de ST5, por el *aroE65* característico de ST100), así como por la inserción de una repetición *r17* en la quinta posición del gen *spA* que lo diferencia de t311 y lo convierte en tipo *spa* t002 (118). El linaje clonal CC5-ST100-t002-IV podría ser una vía en la evolución de CC5-ST5-t311-IV, permitiendo su adaptación a las condiciones sanitarias de la región, como la presión antibiótica por el uso de rifampicina en el tratamiento de IPPB en nuestro país, la cual se sustenta en la resistencia a la rifampicina que presenta este clon (57,118).

Ambos linajes clonales, el CC5-ST5-t311-IV y el CC5-ST5-t002-IV, estrechamente relacionados entre sí, están asociados a cuadros infecciosos de piel y partes blandas así como a infecciones graves (pulmonar, ósea, articular), que afectan principalmente a niños y adultos jóvenes de la comunidad (118).

El linaje clonal CC5-ST4331-t7078-IV, parte también del CC5, cuyo ST4331 se diferencia del ST5 por una mutación puntual en el gen *arcc* (sustitución del alelo *arcc1*, característico de ST5, por el *arcc510* característico del ST4331), así como por tres inserciones y una delección de repeticiones en el gen *spA* que lo diferencian del t311 y lo convierten en *spatipo* t7078. Este es el primer reporte a nivel mundial de una cepa CC5-ST4331-t7078-IV-PVL+, aislada de una muestra de sangre proveniente de una niña de 3 años que cursó con una neumonía adquirida en la comunidad con derrame pleural.

La variabilidad genética observada en el CC5, tanto en la diversidad de sus secuenciotipos, *spatipos* y *cassettes* que portan, argumenta a favor de la existencia de

un clon exitoso SASM (CC5-ST5-t002) con capacidad de adquirir la PVL, adaptarse a su nicho ecológico y receptivo a diferentes tipos de *cassette SCCmec* (como el I y el IV), lo que demuestra una ventaja selectiva frente a los demás y plantea la hipótesis de que éstos clones han evolucionado a partir de un ancestro SASM exitoso; se plantea que la integración en su genoma de los diferentes elementos que hacen a cada clon fue adquirido de forma independiente en diferentes periodos de tiempo (118).

7.4. Complejo Clonal 8: CC8

El CC8 fue identificado en el 7% (6/85) de los aislamientos en estudio, representado principalmente por el clon CC8-ST8-IV (5%, n=4) y en porcentajes menores: CC8-ST4335-IV (1%, n=1), estrechamente relacionado al ST8 y diferenciándose de éste por una mutación puntual en el gen *pta* (sustitución del alelo *pta4* característico del ST8, por el alelo *pta497* característico del ST4335) y ST72 (1%, n=1) con tan sólo 3/7 alelos del secuenciotipo similares al ST8 y ST4335, pero perteneciente también al CC8. El clon CC8-ST8/4335-IV comprende el spatipo t008 (2%, n=2) y otros genéticamente relacionados a él como: t024 (n=1), t400 (n=1) y t11770 (n=1), cada uno de ellos se diferencia del t008 por una mutación puntual en el gen *spA* (inserciones y deleciones) y el clon CC8-ST72-t148-IV (n=1) con mayores variaciones en la secuencia del gen *spA* y ST que lo ubican en el árbol entre los clones CC5-ST100-IV y CC8-ST8-IV. El linaje clonal identificado como CC8-ST8-t008-IV-PVL+ con pulsotipo C, presenta características similares con las descritas para el USA300 (119,120). USA300, un linaje particularmente virulento que sufrió una expansión clonal desde 1975, en 2 clados predominantes segregados por región geográfica, en Norteamérica (USA300 Norteamérica, USA300-NA) y en Sudamérica (USA300 variante latinoamericana, USA300-LV). USA300 es el clon predominante de SARM que circula en el ambiente comunitario en Norteamérica y se lo conoce como causa común de infecciones nosocomiales invasivas por *S. aureus*, lo que complica cada vez más la distinción clásica entre SARM-AC y SARM-AH. USA300-LV, diferenciado del USA300 por la ausencia del elemento móvil catabólico de arginina (ACME), pudo infiltrarse, diseminarse y convertirse en el clon SARM predominante en la comunidad, así como en entornos de atención médica en la mayor parte de América Latina(120,121). La identificación inequívoca de CC8-ST8-t008-IV-PVL+ como USA300 o USA300-LV dependerá de la detección o no del ACME, en este clon, si bien dos de los clones del CC8 fueron secuenciados genómicamente (CC8-ST8-t400/t11770-IV) en ninguno de ellos se detectó el ACME, lo que hace suponer que es USA300-LV la que circula en nuestro país, a ser corroborado posteriormente mediante la búsqueda del elemento

genético móvil COMER (copper and mercury resistant element), característico de ésta variante.

Se identificó también un aislamiento CC8-ST8-t024-IV, reportado por primera vez en el 2003 como responsable de un brote hospitalario en Dinamarca, uno de los países con tasas más bajas de infección por SARM, extendiéndose hacia asilos de ancianos y personal de salud a fines del 2012(122).

Los hallazgos científicos respecto a los clones pertenientes al CC8, identificados en un 7% (6/85) de los SARM analizados, demuestran su alta tasa de virulencia y capacidad de expansión, lo que demuestra la necesidad imperiosa de estudios de vigilancia epidemiológica intrahospitalarias que permitan su detección a tiempo real y consecuentemente el establecimiento de protocolos sanitarios estrictos que mitiguen su propagación.

7.5. Complejo Clonal 15: CC15

Fueron identificados además dos aislamientos pertenecientes al CC15, relacionados entre sí, con el mismo spatipo (t084) y perfil MLVA (M7), pero difieren en la portación de PVL: CC15-ST1160 PVL+ y CC15-ST5585 PVL-, así como endos alelos del secuenciotipo, sustituciones de *gmk1* y *yqil127* característicos del ST1160, por los alelos *gmk444* y *yqil13* característicos del ST5585. Las cepas SARM del CC15 son raras en la literatura y sólo se han informado esporádicos aislamientos en carne de camello en Arabia Saudita (123) y en humanos en Arabia Saudita (124,125), Irán (126,127), Italia (128) y en Kuwait (129), la mayoría corresponden a otros secuenciotipos, ST15/ST1535/ST585 (130). Este es el primer reporte de aislamientos CC15-ST1160/ST5585-t084-IV en humanos, su investigación exhaustiva y los datos que pudiera revelar el análisis del genoma completo son cruciales para su identificación inequívoca y seguimiento de su diseminación.

7.6. Análisis de Susceptibilidad a Antimicrobianos y Genes de Resistencia

En el presente estudio, el 99% (84/85) de los SARM analizados portaban el *cassette SCCmec IV*, caracterizado por ser el más pequeño entre todos, con una composición genética más simple, ya que porta solo el gen de resistencia a la meticilina (*mecA*) (4). El único aislamiento portador de *cassette SCCmec* diferente al tipo IV fue identificado como CC5-ST5-t149-I, correspondiente al clon brasileiro, además fenotípicamente fue el único que presentó un fenotipo multirresistente (MDR), con resistencia a más de tres familias de antimicrobianos: betalactámicos, macrólidos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (4,131).

La aparición global de SARM-AC desde 1980, estuvo relacionada con infecciones de piel y tejidos blandos, resistente sólo a antibióticos β -lactámicos y susceptible a una amplia gama de antimicrobianos (macrólidos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos), por la portación de una versión más pequeña del *cassette SCCmec*, generalmente los tipos IV y V, además de la leucocidina Panton-Valentine (PVL) como sello característico. Esta fue inicialmente la base para diferenciar SARM-AC de SARM-AH, pero actualmente se sabe que también pueden cursar con infecciones invasivas que requieren largas estancias hospitalarias para su regresión, además las cepas SARM-AC invadieron los entornos de atención médica y se los ha identificado como agente etiológico de importantes brotes nosocomiales (4).

El aumento de la frecuencia de infecciones por SARM en nuestro país, respecto al total de las infecciones por *S. aureus*, ha forzado a la incorporación cada vez más frecuente de clindamicina y otros antibióticos como parte de los esquemas de tratamientos antimicrobianos ante casos ambulatorios de infecciones causadas por SARM (132,133). Las resistencias a eritromicina (27%) y clindamicina (25%) reportadas en éste estudio, con mecanismo de resistencia inducible iMLS_B en un 43% (confirmado por Dtest+) y constitutivo en un 57% cMLS_B, son superiores a lo reportado en estudios anteriores realizados en Paraguay, que referían porcentajes de resistencia a eritromicina 4-15% y clindamicina del 4-13%, 84% fenotipo iMLS_B y 16% cMLS_B, con detección de los genes *ermC* y *msrA* en el 50% de los que presentaron fenotipo iMLS_B (132–134). En éste estudio la detección de genes asociados a la resistencia de macrólidos no se realizó de forma sistemática para todos los aislamientos, pero la secuenciación del genoma completo nos permitió identificar los genes *ermA* y *ermC* en 3/10 aislamientos secuenciados, que presentaron fenotipo iMLS_B, lo que sugiere que esos serían los mecanismos por los cuales la bacteria desarrolla resistencia a clindamicina inducida por eritromicina (135). Este es el primer estudio que reporta el gen *ermA* en aislamientos SARM en Paraguay y pone de manifiesto la necesidad imperiosa de realizar un cribado más amplio de genes que confieren resistencia a macrólidos como *ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA* y a lincosamidas como *lnuA* y *lnuB* que permita identificar el potencial de resistencia de los aislados SARM a los mismos. Éstos últimos genes codifican una enzima capaz de inactivar la acción de algunas lincosaminas por adenilación y que han sido referidas como causantes de fallas terapéuticas en el tratamiento con clindamicina en otros países (136).

El hecho de no registrar aislados resistentes a vancomicina y resistencias menores al 10% para gentamicina, rifampicina, ciprofloxacina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, pone de manifiesto el potencial de estos antibióticos para el tratamiento de infecciones por SARM. Estos resultados coinciden con los reportados en otras

publicaciones (137–139), que indican que los niveles de resistencia en aislados de SARM con cassette tipo IV son muy bajos y que en una gran proporción, sólo presentan niveles de resistencia a meticilina y a todos los betalactámicos, por no portar plásmidos y trasposones que codifican resistencia a múltiples antibióticos, los cuáles son característicos de aislados de ambientes hospitalarios. Sin embargo con la aparición en el año 2002 en EEUU de una cepa de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA), tras la adquisición de genes *vanA* de enterococcus vía transferencia conjugativa, así como otras con sensibilidad intermedia (VISA) en diferentes partes del mundo y en Latinoamérica; activó una alarma a nivel mundial, demostrando la necesidad de mantener sistemas de vigilancia eficientes que puedan dar alarmas a tiempo real (140–143).

Los plásmidos acarrean una amplia gama de genes de resistencia a antimicrobianos y a biocidas, así también pueden transportar genes de toxinas, principalmente las enterotoxinas. Las resistencias plasmídicas de *S. aureus* incluyen a los aminoglucósidos, β -lactámicos y macrólidos. En éste estudio identificamos un total de 16 plásmidos diferentes en las 10 muestras analizadas por genoma completo. La gran cantidad de grupos plasmídicos con más de un gen *rep* está relacionada a niveles altos de recombinación entre los plásmidos de SARM (144). Si bien la mayor cantidad de plásmidos por genoma secuenciado se vio en los clones SARM CC30-ST30-t019-IV, con un perfil plasmídico similar entre éstos aislamientos, principalmente por la presencia de los plásmidos *rep16*, *rep19*, *rep21*, asociados a la portación de los genes *blaZ* (*BlaZ* tipo A), *cadD*, *cadX*, respectivamente y a aislamientos SARM CC30-ST30-t019-IV (111). Los demás aislamientos pertenecientes a los CC5 y CC8 presentaron perfiles plasmídicos únicos y variados.

En cuanto al análisis de resistomas (n=10), la mayoría de los SARM mostraron concordancia fenotípica y genotípica en los resultados de susceptibilidad antibiótica (89%). Se informaron hallazgos similares en otros estudios que mostraron concordancia entre el 76-100% de los aislamientos (145,146). Nuestros resultados mostraron discordancia en el fenotipo en aislamientos que portaban genes para tetraciclina (80%) y gentamicina (10%). Esto podría deberse a mutaciones en estos genes de resistencia o defectos en su expresión que deberíamos explorar experimentalmente en el futuro.

A partir del análisis del genoma completo detectamos también genes de resistencia a otros antimicrobianos que no se analizan de forma rutinaria en el laboratorio, como la fosfomicina y el cloranfenicol, con potenciales de resistencia entre el 100% (10/10) y el 40% (4/10) entre los aislamientos secuenciados respectivamente. Actualmente la fosfomicina no es utilizada para tratar infecciones estafilocócicas en Paraguay y en Argentina; es por ello que no se incluyó en el panel de susceptibilidad antibiótica

fenotípica. Sorprendentemente, se detectaron genes de resistencia a la fosfomicina en el 100% (10/10) de los genomas estudiados, portando el gen adquirido *fos-B* (111). La fosfomicina es un agente de amplio espectro activo contra patógenos bacterianos resistentes a los antimicrobianos, incluido el SARM; es un agente bactericida que inhibe la síntesis de la pared celular; utilizado con mayor frecuencia en combinación con otros agentes antimicrobianos (p. ej., β -lactámicos, carbapenémicos y aminoglucósidos) con un excelente perfil de seguridad, incluso en recién nacidos, niños y apto para administración a largo plazo (semanas). La fosfomicina alcanza grandes extensiones de tejidos; por lo que podría ser utilizado para las infecciones como bacteriemia, tracto urinario, piel y tejidos blandos e infecciones respiratorias y para infecciones de difícil tratamiento como meningitis ósea e infecciones oculares invasivas, y está siendo considerado para el tratamiento de infecciones por enterobacteriales multirresistentes. La desventaja que ya ha sido reportada en otros estudios, es que *S. aureus* tiene la capacidad de desarrollar rápidamente mecanismos de resistencia a éste antibiótico tras su inclusión en el esquema de tratamiento empírico. Sin embargo, algunos autores han postulado la reutilización de la fosfomicina para tratar infecciones por SARM-MDR (multi-droga resistentes), que no han respondido a los antimicrobianos de primera y, potencialmente, de segunda línea (147) El cloranfenicol es otro antibiótico antiguo y de amplio espectro que había sido desplazado en los países desarrollados, debido a que su administración sistémica se asociaba con anemia aplásica fatal. Actualmente, se ha comenzado a reutilizar en respuesta a la emergencia creciente de patógenos MDR (148). Nuestros hallazgos indican que fosfomicina y cloranfenicol no serían una excelente opción terapéutica para el tratamiento de infecciones por SARM en Paraguay y probablemente en la región, por la potencial resistencia que presentan los principales clones de SARM que circulan en nuestro país.

7.7. Factores de Virulencia, detección genética

SARM es un patógeno equipado con un gran repertorio de factores de virulencia, entre ellas varias toxinas que tienen propiedades superantigénicas (SAGs), que a menudo juegan un rol significativo en el desarrollo de diversas enfermedades mediadas por toxinas, incluido el síndrome del shock tóxico (SST), enfermedades estafilocócicas transmitidas por alimentos (SFD), el síndrome de la piel escaldada, endocarditis y sepsis, todas potencialmente mortales (4,149).

La era posgenómica de *S. aureus*, con el estudio de las secuencias genómicas públicas disponibles, permitió esclarecer aún más el conocimiento existente sobre la virulencia y la resistencia de aislamientos clínicos, revelando la presencia de factores de virulencia desconocidos anteriormente. En este contexto, el análisis genómico de los diez

aislamientos SARM incluidos en éste estudio, permitió la identificación de un grupo de genes codificantes de factores de virulencia muy frecuentes y nunca antes estudiados en nuestro país, como las enterotoxinas pertenecientes al *cluster* EGC (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* y *seu*) y el gen *tsst-1*, responsable del SST. A raíz de éste descubrimiento, los mismos fueron incluidos en el panel de factores de virulencia genotípico del presente estudio.

Esa búsqueda permitió detectar una elevada portación de genes codificantes de enterotoxinas pertenecientes al grupo EGC (59-85%), lo que aporta un indicio más que las SAgS codificadas en el *cluster* EGC podrían estar involucradas en el desarrollo de procesos infecciosos estafilocócicos y no sólo acompañar la portación del microorganismo en el hospedero humano (28,33).

El daño de la membrana celular en infecciones estafilocóccias es inducido por una variedad de toxinas de *S. aureus* que incluyen α -, β -, γ - y δ -hemolisinas, leucotoxinas y modulinas solubles en fenol (PSM), y eventualmente conduce a hemólisis, leucolisis e invasión bacteriana (150). Las frecuencias de portación de genes codificantes de α y β -hemolisinas en éste estudio son 39% y 25%, respectivamente, similar a otros estudios reportados a nivel nacional e internacional (62,151–153).

El gen *tsst-1* se detectó en un 18% (15/85), cifra alarmante por la gravedad del cuadro que podría ocasionar su expresión, 80% de ellos asociados al clon más frecuente en nuestro medio, el CC30-ST30-IV; incluso conllevando al óbito de uno de los niños infectados.

Los porcentajes generales de enterotoxinas A, B, C, D y H hallados en este estudio fueron bajos (0-9%) pero similares a otros estudios alrededor del mundo, con niveles de portación que oscilan entre el 0-8% para las enterotoxinas B, C, D y H (21,38,46,154). Para el caso de la enterotoxina A las publicaciones internacionales reportan niveles entre 12-35%, mayores a lo reportado en éste estudio (21,154). Esto es probablemente debido a los criterios de selección de muestras empleado, que provenían principalmente de cuadros clínicos invasivos, y no de cuadros gastrointestinales, en las que habría mayor posibilidad de aislamiento de cepas portadoras de éstas enterotoxinas. Sin embargo algunos autores indican que la prevalencia de enterotoxinas debe controlarse en aislados de *S. aureus* de todo tipo, sean éstos de cuadros infecciosos diversos u obtenidos de hisopados nasales de personas sanas, portadoras del microorganismo, debido al potencial riesgo de brotes, por contaminación de alimentos, transmisión horizontal y todos aquellos productos de manufactura que sean manipulados por el portador, lo cual representa un riesgo para la salud pública (38,39).

Se ha identificado en este estudio un aislamiento SARM portador del gen codificante de la toxina exfoliativa B (1%), hallazgo alarmante por la gravedad del cuadro clínico que

podría causar su expresión, el síndrome de la piel escaldada (SSSS). Aunque el porcentaje de portación en general de genes codificantes de las toxinas exfoliativas A (0%) y B (1%) en las muestras estudiadas son bajos, lo cual era de esperarse, porque no identificamos pacientes con SSSS. Los niveles reportados se encuentran dentro del rango para muestras no provenientes de SSSS, por diversos autores a nivel mundial (154–156).

La elevada portación de PVL (60%) frente a otros reportes realizados anteriormente en nuestro país (16-51%) (62,132,133,152), refuerza la teoría que lo postula como marcador de cepas SARM-AC portadoras de *cassette SCCmec IV* y con virulencia clínicamente relevante, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y las características genotípicas y fenotípicas que atañen a la población estudiada (157). En los últimos años se ha evidenciado la capacidad de SARM-IV PVL+ no sólo de infectar a individuos sanos en la comunidad, sino de infectar también a pacientes enfermos y/o inmunodeprimidos en los hospitales, ya que se han acumulado casos de transmisiones y brotes nosocomiales de SARM-IV PVL+ en todo el mundo, lo que indica que ha traspasado la barrera del hospital y desplazado en su nicho ecológico al SARM-AH (4,157). Esto demuestra no sólo la capacidad de SARM-AC de infectar a individuos sanos, sino con más razón a individuos enfermos. Además, denota el éxito en los hospitales de la implementación de comités de vigilancia epidemiológica que llevan a cabo programas de control de infecciones nosocomiales, con el objetivo de disminuir la frecuencia de infecciones intrahospitalarias causadas por microorganismos MDR como lo es SARM-AH. Su estrategia consiste en medidas de prevención que buscan evitar complicaciones en los pacientes y evitar también el uso inadecuado de los antibióticos, disminuyendo así los costos de atención y hospitalización, tanto para el paciente como para las instituciones.

7.8. Análisis de expresión de factor de virulencia: PVL

Estudios experimentales alrededor del mundo indican que la expresión de los genes *lukS/F-PV*, que codifican para la PVL, interfieren en una red regulatoria del sistema inmunológico encargada de potenciar la virulencia de la infección (158–161). Es por ello que en éste estudio decidimos estudiar la expresión del gen *lukS/F-PV* frente a un gen control *gyr-A*, en dos aislamientos caracterizados como pertenecientes a los clones identificados como más frecuentes CC30-ST30-IV PVL+ (GIP_64) y CC5-ST5-IV PVL+ (SCM_77) y no sólo limitarnos a la detección genotípica del mismo.

Los tiempos necesarios para el crecimiento exponencial (3h) y estacionario (6h) de las cepas SARM analizadas fue similar a lo reportado por otros estudios que analizaron la

expresión de factores de virulencia en aislados SARM (108,162), demostrando que las condiciones de crecimiento bacteriano del presente estudio fueron bien diseñadas.

A partir de los hallazgos en experimentos *in vivo* sobre expresión de factores de virulencia, se considera que existen muchos factores propios del organismo animal, incluidos los de la respuesta inmune celular y nutrientes que afectan su expresión, sugiriendo que los mecanismos de regulación de los factores de virulencia *in vivo* son muy complicados (108).

Todas las cepas SARM analizadas en el presente estudio provenían de infecciones invasivas y el 76% (65/85) de ellas provenía de sangre, como material biológico primario del cual se colectó el aislamiento. Es por ello que para el análisis de la expresión de factores de virulencia se utilizó suero de carnero estéril como medio de crecimiento y desarrollo bacteriano *in vivo*, ya que contiene muchos agentes bioquímicos, como proteínas séricas, carbohidratos e iones, simulando el ambiente del cual provenía la mayoría de nuestros aislamientos (108), bastante diferente de los medios habituales utilizados para el crecimiento bacteriano *in vitro* (BHI).

Si bien en ambas cepas identificadas como mayoritarias en este estudio la expresión de la leucocidina de Panton-Valentine fue significativamente mayor en la fase exponencial en suero de carnero estéril que en BHI y éste fenómeno se observó de forma más acentuada en el clon CC5-ST5-IV-PVL+, el comportamiento inestable del gen control interno *gyrA*, bajo diferentes condiciones de trabajo, no permite predecir si la expresión de la PVL es diferente en ambos medios estudiamos. Éste fenómeno observado deberíamos corroborarlo con otros ensayos de expresión génica mediante la utilización de otro gen control interno estable.

La fase exponencial es considerada como la etapa de mayor tasa del crecimiento bacteriano, la fase más activa en el proceso de multiplicación bacteriana, con mayores requerimientos de energía y nutrientes por parte del metabolismo bacteriano, con un consecuente aumento en la expresión de su repertorio de virulencia y adherencia celular. En el caso de la infección por SARM, su tasa de crecimiento inicial debería tener una importancia crítica en la etapa inicial de la infección, que es cuando se movilizan las células fagocíticas que eliminan fácilmente a SARM. Este es el proceso en huéspedes sanos, que evita o mitiga la multiplicación bacteriana, pero en los huéspedes inmunocomprometidos, si escapa a la fagocitosis durante su crecimiento inicial (exponencial), permite que SARM se multiplique exacerbadamente. Es por eso que una infección nosocomial causada por SARM causa una infección grave en huéspedes inmunocomprometidos y realza la importancia de su erradicación en los hospitales. También se deben realizar esfuerzos para mejorar la inmunidad de los pacientes

inmunocomprometidos y realizar la profilaxis adecuada cuando existe riesgo de infección por SARM (108,163).

Fernández y colaboradores en el 2017 publicaron un estudio donde compararon la virulencia de los clones SARM CC30-ST30-IV PVL+ y CC5-ST5-IV PVL+, los mismos clones prevalentes en nuestro estudio. En el mismo corroboraron la hipótesis inicial de que el clon CC30-ST30-IV presenta un mayor grado de virulencia que el desplazado CC5-ST5-IV, lo que le habría permitido ocasionar con mayor frecuencia infecciones invasivas en pacientes adultos sin factores de riesgo. Esta mayor virulencia fue demostrada al comparar ambos clones según el perfil de genes codificantes de factores de virulencia, la formación de biopelículas, la expresión de ciertos factores de adhesión y el comportamiento en modelos experimentales de infección en animales de laboratorio. Los resultados resaltan que una de las principales estrategias que exhibe *S. aureus* durante una infección es la habilidad de adherirse a las proteínas u otras moléculas de la matriz extracelular y el plasma, un evento crucial para la colonización y diseminación del patógeno en el hospedador(112).

Otro estudio genómico indica que el clon CC30-ST30-IV PVL+ presenta una particularidad: alberga fagos que codifican PVL con cabeza icosaédrica, en contraposición a otros clones como el South-West Pacific (SWP). Serían necesarios más estudios para determinar si estos diferentes profagos resultan en diferencias biológicas que afectan la expresión de PVL y la virulencia de estos dos clones(111).

7.9. Factores de Virulencia, detección genómica: VIRULOMA

En cuanto al análisis del viruloma de 10 aislamientos, identificamos la coexistencia de múltiples grupos de factores de virulencia. Todos los SARM analizados portaron genes codificantes de exotoxinas formadoras de poros (aureolisina, componentes alfa y gamma-hemolisina A, B y C) (164), activadores del plasminógeno (estafiloquinasa), proteínas de superficie ancladas a la pared celular (proteína A, operón de serina proteasa, elastina de la superficie celular, factor de aglomeración A y los componentes A, B, C, E, F y G de las proteínas determinantes de superficie reguladas por hierro)(165–167). Además de proteínas con funciones antifagocíticas (polisacárido capsular tipo 8, unión de IgG e IgA, inhibidor del complemento SCIN, éster de glicerol hidrolasa y parte de los componentes del sistema de secreción EsxA, EsaA/B y EssA/B), proteína del factor de propagación (hialuronidasa) (168), proteína de unión a inmunoglobulina (169) y una familia de enzimas bacterianas unidas a la membrana (sortasas) (170). La portación de este compendio de factores de virulencia en los tres linajes analizados demuestra su importancia para la supervivencia, reproducción, colonización y propagación bacteriana, por lo que probablemente formen parte del genoma core.

Aún así, los principales clones de SARM que circulan en Paraguay muestran diferentes perfiles de virulencia: el CC30-ST30-t019-IV se caracteriza por poseer el mayor número y diversidad de genes que codifican polisacáridos capsulares, proteínas con actividad antifagocítica y aquellas que inhiben la interacción entre C3b, inmunoglobulina y receptores. Este complejo clonal (CC30) adquirió genes que codifican la proteína del factor de coagulación (vWbp) y superantígenos (SAGs) codificados en el grupo EGC (G, I, M, N, O, U) y la toxina del síndrome de shock tóxico (*tsst-1*), todos ellos involucrados en el agravamiento del proceso infeccioso (29,31,33).

Los superantígenos (SAGs) codificados en el grupo EGC (G, I, M, N, O, U) se consideran actualmente las toxinas estafilocócicas más prevalentes entre los aislamientos clínicos y de colonización, presentes en el 50-70% de los portadores nasales y puede ser crucial su expresión para el desarrollo y agravamiento de ciertas infecciones, como las respiratorias y las endocarditis (28,33). Experimentalmente, se ha demostrado en modelos animales que la expresión conjunta de los genes del grupo EGC y el *tsst-1* contribuyen a una mayor mortalidad y/o a una progresión más rápida y complicada de la infección, generalmente acompañada de complicaciones letales como insuficiencia cardíaca y accidente cerebrovascular. Aún así, las infecciones causadas por SARM portador de toxinas del grupo EGC progresan incluso sin los efectos sistémicos o locales del *tsst-1*, por lo que también son responsables del empeoramiento del cuadro infeccioso en menor escala debido a su nivel de producción de infección (149).

Los clones CC30-ST30-IV y CC8-ST8-IV presentan los genes *spIE*, codificantes de las serina proteasas que actúan como evasinas con una posible actividad cooperativa y complementaria con otras proteasas *spI* (perdidas por CC30, pero presentes en CC8), juntas constituyen un sistema digestivo extracelular con un papel en la patogenia de *S. aureus* (149). A diferencia de los aislamientos del CC5, los del CC30 y CC8 perdieron además genes codificantes de proteínas del sistema de secreciones utilizadas por las bacterias para interactuar y manipular su entorno, significativo para la adhesión y la permanencia en la célula huésped (171), así como el inhibidor de la diferenciación de células epidérmicas (*edinA*), que está involucrado en el proceso de diseminación bacteriana y dificulta la fagocitosis mediada por el complemento (172). Esta disminución en su repertorio de genes de virulencia podría conferir a los linajes CC30 y CC8 una mayor eficiencia, en la propagación debido a su menor tamaño, con la consecuente disminución del paquete genético bacteriano (*fitness* bacteriano), seleccionando aquellos involucrados en la evasión de la respuesta inmune, la expansión de la infección y el proceso de propagación, desplazando a los demás linajes por su mejor aptitud (4). El análisis del viruloma de los linajes CC5-ST5-t311-IV, reveló la portación de genes codificantes de la enterotoxina A (*seA*), PVL (*lukF/S-PV*) y superantígenos (SAGs)

codificados en el grupo EGC (G, I, M, N, O, U) como la marca de cepas significativamente más citotóxicas para los neutrófilos que las no portadoras, involucradas en infecciones SARM-AC y muy reveladoras para nuestro estudio porque precisamente éstos aislamientos provienen de infecciones invasivas (118,173).

Los clones CC8-ST8-IV (t11770 y t400) portan el sistema de serina proteasas completo (*spa/B/E*), un sistema digestivo extracelular con un papel en la patogenia de SARM, así como la PVL y las enterotoxinas K, Q, características del CC8, que contribuyen a su perfil de virulencia convirtiéndolo en una superbacteria (4). Estas cepas están estrechamente relacionadas con el clon CC8-ST8-IV PVL+, identificado como la principal causa de infecciones por SARM-AC en América del Norte, y últimamente esparcido en todo el mundo (174).

Identificamos el potencial para la formación de biopelículas en casi todos los genomas de los 10 aislamientos de SARM analizados, excepto en el linaje clonal CC8-ST8-t400-IV. La biopelícula es otro factor crucial que contribuye a las infecciones estafilocócicas, implicadas en diversas enfermedades infecciosas persistentes, que permite a la bacteria evadir múltiples mecanismos de eliminación, como los antimicrobianos y el sistema inmunitario del huésped, lo cual conlleva al fracaso del tratamiento y a infecciones recurrentes/crónicas. La producción de biopelículas y factores de virulencia por SARM están estrechamente relacionadas, ya que el principal regulador de la biopelícula, el gen regulador accesorio *agr*, también es vital para la expresión de numerosos factores de virulencia. Por tanto, muchos factores de virulencia relacionados con las biopelículas han sido por mucho tiempo el objetivo principal de investigaciones en búsqueda de terapias contra *S. aureus* (31).

El 30% (3/10) de los aislamientos SARM analizados por NGS, representativos de los tres CC más frecuentes detectados en nuestro estudio (CC30, CC5 y CC8) poseen capacidad para la formación de biopelículas con intensidad moderada, según lo muestran los ensayos in vitro (175). Algunos de ellos (CC5 y CC8) podrían inhibirse en presencia de dos extractos metanólicos de plantas nativas paraguayas llamadas *Pterocaulon alopecuroides* y *Pterocaulon angustifolium* (176). La detección de la formación de biopelículas, especialmente en infecciones crónicas, es crucial ya que afecta en la elección de estrategias para su eliminación, tales como la extirpación quirúrgica, dada la ineficacia de las terapias antibióticas tradicionales en éstos casos (175,176).

8. CONCLUSIONES

Todos los aislamientos de SARM analizados en éste estudio fueron recuperados de muestras clínicas, pacientes y hospitales diversos, en amplios periodos de tiempo, excluyendo la posibilidad de brotes hospitalarios.

El estudio molecular de los aislamientos SARM que causaron infecciones invasivas en niños paraguayos, reveló la circulación de cuatro complejos clonales principales y diferentes (CC30, CC5, CC8 y CC15), cada uno compuesto por clones principales y variantes estrechamente relacionadas entre sí, con diferentes spatipos y perfiles de PFGE. Los principales clones SARM identificados fueron el CC30-ST30-IV (66%) y CC5-ST5-IV (21%), que cuentan con su principal reservorio en la comunidad.

Analizando los resultados obtenidos por periodo de colecta en éste estudio, se pudo notar claramente cómo entre los años 2009-2011, el clon CC5-ST5-IV (54%) estaba instalado fuertemente en nuestro país y con el correr de los años fue desplazado ampliamente por el CC30-ST30-IV, éste último considerado como el más prevalente hasta el día de hoy.

Este trabajo postula que el éxito del CC30-ST30-IV se debe a varios factores como un perfil de virulencia y resistencia característicos, que permiten su persistencia en nuestro medio y conducen al desplazamiento del CC5-ST5-IV, con el paso del tiempo.

El CC8-ST8-IV, aunque minoritario en este estudio, posee la capacidad patogénica para diseminarse en nuestro país y es uno de los clones predominantes en otras regiones, por lo cual debe ser monitoreado activamente.

En ambas cepas identificadas como mayoritarias en este estudio, CC30-ST30-IV PVL+ y CC5-ST5-IV PVL+, la expresión de la PVL fue significativamente mayor en la fase exponencial del crecimiento bacteriano, pero debería ser verificada con otro gen control interno de mayor estabilidad, diferente del *gyrA*.

Los diferentes métodos de caracterización molecular aportaron información complementaria para definir los clones y sus variantes y son una herramienta valiosa para fortalecer los estudios epidemiológicos futuros, para detectar pequeños y grandes cambios en la circulación de clones de SARM en Paraguay.

El análisis pangenómico de los diez clones SARM seleccionados en el presente estudio agregó valor a los protocolos clásicos de identificación y tipificación molecular, permitiendo obtener información valiosa sobre múltiples genes de virulencia, resistencia y clonalidad, nunca antes estudiados en nuestro país, dando a conocer la complejidad de los linajes de SARM que circulan en Paraguay.

9. PERSPECTIVAS

El conocimiento de los principales complejos clonales de SARM circulantes en nuestro país, a través de la utilización de las herramientas que nos proporciona la epidemiología molecular, genera información importante conducente a la vigilancia genómica activa, útil no sólo para comparación con datos regionales y/o mundiales y como contribución al conocimiento universal sobre el microorganismo, sino también para la detección oportuna y a tiempo de cambios significativos en la epidemiología local que nos permitan emitir alertas tempranas ante posibles brotes a nivel nosocomial o comunitario, así como los desplazamientos en nichos ecológicos detectados.

El análisis genómico de los clones SARM fue un salto cualitativo crítico que abrió un abanico de nuevas posibilidades para futuros proyectos y ensayos a desarrollar para próximos estudios sobre la epidemiología de SARM circulante en Paraguay, y arroja como resultado principal un equipo humano fortalecido con la capacidad de realizar análisis genómico transversal a cualquier microorganismo.

- Se postula como perspectiva principal un análisis genómico profundo de las variantes del CC30 que circulan en Paraguay que nos permitan dilucidar las principales características que ayudan a la patogenia del microorganismo, así como un mapeo contra genomas de otras cepas SARM CC30 circulantes en otros países de la región como Argentina y Uruguay, disponibles en bases de datos internacionales, así como los resultados que serán obtenidos por la red StaphNet, proyecto regional en colaboración con Sanger Institute, UK.
- Además se pretende realizar la detección de los factores de virulencia más frecuentes encontrados en el análisis genómico y nunca antes estudiados como las enterotoxinas del cluster EGC en otras poblaciones bacterianas.
- Así como la búsqueda activa de genes asociados a la formación de biopelículas en todos los aislamientos del presente estudio (n=85).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koneman EW, Allen S. Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana; 2008. 1699 p.
2. OMS. Las 10 principales causas de defunción [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
3. Neri-Vela R, Neri-Vela R. Las enfermedades infecciosas en el hombre y su prevención a lo largo del tiempo. *Gac Médica México*. 2021;157(5):481–3.
4. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2018;31(4). Disponible en: <https://cmr.asm.org/content/31/4/e00020-18>
5. General Information | MRSA | CDC [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mrsa/community/index.html>
6. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latin Patol Clin*. 2014;61(1):28–40.
7. Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Bioméd*. 2014;25(3):129–43.
8. Salvador C, Acevedo C, Bennani A. Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica AEFA. 2005a ed. 2005.
9. Bustos-Martínez. JA Gutiérrez-Cárdenas, M, Hamdan-Partida, A, Gutiérrez-Cárdenas, M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*. 2006;17:287–305.
10. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–61.
11. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(10):e00816-17.
12. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629–41.
13. American Chemical Society. Descubrimiento y desarrollo de la penicilina [Internet]. 1999. Disponible en: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/historia-quimica/descubrimiento-desarrollo-penicilina.html>

14. Uehara Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antibiotics*. 2022;11(1):86.
15. Yamaguchi T, Ono D, Sato A. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Analysis of MRSA. Ji Y, editor. *Methicillin-Resist Staphylococcus aureus MRSA Protoc Cut-Edge Technol Adv*. 2020;59–78.
16. Figueiredo AMS. What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Virulence*. 2017;8(6):640–2.
17. Otter JA, French GL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect*. 2011;79(3):189–93.
18. Egea AL, Galletti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2014;304(8):1086–99.
19. Kateete DP, Bwanga F, Seni J, Mayanja R, Kigozi E, Mujuni B, et al. CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):94.
20. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primer*. 2018;4(1):1–23.
21. Sauer P, Šila J, Štosová T, Večeřová R, Hejnar P, Vágnerová I, et al. Prevalence of Genes Encoding Extracellular Virulence Factors Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J Med Microbiol*. 2008;57(4):403–10.
22. Mazzoleni V, Zimmermann K, Smirnova A, Tarasov I, Prévost G. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin triggers an alternative NETosis process targeting mitochondria. *FASEB J*. 2021;35(2):e21167.
23. Saeed K, Gould I, Esposito S, Ahmad-Saeed N, Ahmed SS, Alp E, et al. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*: a position statement from the International Society of Chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(1):16–25.
24. Fisher EL, Otto M, Cheung GYC. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Front Microbiol [Internet]*. 2018;9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00436/full>

25. Suzuki Y, Kubota H, Sato'o Y, Ono H k., Kato R, Sadamasu K, et al. Identification and characterization of novel *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands encoding staphylococcal enterotoxins originating from staphylococcal food poisoning isolates. *J Appl Microbiol.* 2015;118(6):1507–20.
26. Denayer S, Delbrassinne L, Nia Y, Botteldoorn N. Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of *Staphylococcus aureus* Strains and Importance of Toxin Detection. *Toxins.* 2017;9(12):E407.
27. Grispoldi L, Karama M, Armani A, Hadjicharalambous C, Cenci-Goga BT. *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. *Ital J Anim Sci.* 2021;20(1):677–90.
28. Etter D, Corti S, Spirig S, Cernela N, Stephan R, Johler S. *Staphylococcus aureus* Population Structure and Genomic Profiles in Asymptomatic Carriers in Switzerland. *Front Microbiol.* 2020;11:1289.
29. Tuffs SW, Herfst CA, Baroja ML, Podskalniy VA, DeJong EN, Coleman CEM, et al. Regulation of toxic shock syndrome toxin-1 by the accessory gene regulator in *Staphylococcus aureus* is mediated by the repressor of toxins. *Mol Microbiol.* 2019;112(4):1163–77.
30. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(18):3057–71.
31. Fetsch A, Johler S. *Staphylococcus aureus* as a Foodborne Pathogen. *Curr Clin Microbiol Rep.* 2018;5(2):88–96.
32. Umeda K, Nakamura H, Yamamoto K, Nishina N, Yasufuku K, Hirai Y, et al. Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2017;256:30–5.
33. Fischer AJ, Kilgore SH, Singh SB, Allen PD, Hansen AR, Limoli DH, et al. High Prevalence of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Gene Cluster Superantigens in Cystic Fibrosis Clinical Isolates. *Genes.* 2019;10(12):1036.
34. Tang J, Tang C, Chen J, Du Y, Yang X nong, Wang C, et al. Phenotypic Characterization and Prevalence of Enterotoxin Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates from Outbreaks of Illness in Chengdu City. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(12):1317–20.
35. Yan X, Wang B, Tao X, Hu Q, Cui Z, Zhang J, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Food Poisoning in Shenzhen,

- China. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2012; Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.01165-12>
36. Johler S, Giannini P, Jermini M, Hummerjohann J, Baumgartner A, Stephan R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. *Toxins*. 2015;7(3):997–1004.
 37. Omoe K, Hu DL, Ono HK, Shimizu S, Takahashi-Omoe H, Nakane A, et al. Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. *Infect Immun* [Internet]. 2013; Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/IAI.00550-13>
 38. Peck KR, Baek JY, Song JH, Ko KS. Comparison of Genotypes and Enterotoxin Genes Between *Staphylococcus aureus* Isolates from Blood and Nasal Colonizers in a Korean Hospital. *J Korean Med Sci*. 2009;24(4):585–91.
 39. Manfredi EA, Leotta GA, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de *Staphylococcus aureus*: Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev Argent Microbiol*. 2010;42(3):212–5.
 40. G. Abril A, G. Villa T, Barros-Velázquez J, Cañas B, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, et al. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins*. 2020;12(9):537.
 41. Imanishi I, Nicolas A, Caetano ACB, Castro TL de P, Tartaglia NR, Mariutti R, et al. Exfoliative toxin E, a new *Staphylococcus aureus* virulence factor with host-specific activity. *Sci Rep*. 2019;9(1):16336.
 42. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis*. 2010;14(7):e560–6.
 43. Lindsay JA. Evolution of *Staphylococcus aureus* and MRSA during outbreaks. *Infect Genet Evol*. 2014;21:548–53.
 44. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(2):98–103.
 45. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1008–15.
 46. Collery MM, Smyth DS, Twohig JM, Shore AC, Coleman DC, Smyth CJ. Molecular Typing of Nasal Carriage Isolates of *Staphylococcus Aureus* from an Irish University Student Population Based on Toxin Gene PCR, Agr Locus Types and Multiple Locus, Variable Number Tandem Repeat Analysis. *J Med Microbiol*. 2008;57(3):348–58.

47. Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, Huijsdens XW, Pluister GN, van Santen-Verheuve MG, et al. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Staphylococcus Aureus*: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa-Typing. *PLoS ONE*. 2009;4(4).
48. Blomfeldt A, Eskesen AN, Aamot HV, Leegaard TM, Bjørnholt JV. Population-based epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: clonal complex 30 genotype is associated with mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2016;35(5):803–13.
49. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* Larchmt N. 2000;6(3):189–98.
50. Rivero-Pérez B, Pérez-Roth E, Méndez-Álvarez S. Evaluation of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Typing a Polyclonal Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Population in an Area Where Such Infections Are Endemic. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2991–4.
51. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7687–92.
52. Giulieri SG, Holmes NE, Stinear TP, Howden BP. Use of bacterial whole-genome sequencing to understand and improve the management of invasive *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;1–14.
53. Rouli L, Merhej V, Fournier PE, Raoult D. The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes New Infect*. 2015;7:72–85.
54. Chatterjee SS, Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clin Epidemiol*. 2013;5:205–17.
55. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol*. 2012;15(5):588–95.
56. Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. *Infect Genet Evol*. 2013;14:401–5.
57. Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnera A, Kevric I, et al. Spread of Epidemic MRSA-ST5-IV Clone Encoding PVL as a Major Cause of Community

- Onset Staphylococcal Infections in Argentinean Children. PLoS ONE. 2012;7(1):e30487.
58. Sousa MA de, Miragaia M, Sanches IS, Ávila S, Adamson I, Casagrande ST, et al. Three-Year Assessment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Latin America from 1996 to 1998. J Clin Microbiol. 2001;39(6):2197–205.
 59. Senna JPM, Pinto CA, Mateos S, Quintana A, Santos DS. Spread of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Uruguayan and South of Brazil Hospitals. J Hosp Infect. 2003;53(2):156–7.
 60. Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. Emerg Infect Dis. 2005;11(6):973–6.
 61. Mayor L, Ortellado J, Menacho C, Lird G, Courtier C, Gardon C, et al. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected in Asunción, Paraguay. J Clin Microbiol. 2007;45(7):2298–300.
 62. Rodriguez F, Salinas C, Fernandez S, Haim S, Mollerach M, Basualdo W, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clones from Paraguayan children. J Infect Dev Ctries. 2020;14(03):290–7.
 63. Threat Report 2013 | Antimicrobial Resistance | CDC [Internet]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
 64. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MVN, et al. Genetic and molecular predictors of high vancomycin MIC in *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates. J Clin Microbiol. 2014;52(9):3384–93.
 65. Weiler, N, Leotta, GA, Zarate, MN, Manfredi, E, Alvarez, ME, Rivas, M. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. Revista Argentina de Microbiología. 2011;43:33–6.
 66. Guillén R, Basualdo W, Campuzano de Rolón A, Macchi M, Ortellado J, Almada P, et al. *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: Caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños que concurren a hospitales de referencia de Paraguay. Rev Inst Med Trop. 2011;6:49.
 67. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control. 2008;36(5):309–32.
 68. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-S19:2009 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th Edition. 2009.
 69. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-S21:2011 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 21th Edition. 2011.

70. Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M100-S22:2012 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 22nd Edition. 2012.
71. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-S23:2013 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 23th Edition. 2013.
72. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S27 [Internet]. 27a ed. Vol. 37. USA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2017. 250 p. Disponible en: www.clsi.org
73. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-ED28:2018 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition. 2018.
74. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-ED29:2019 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition. 2019.
75. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of Methicillin-Resistant Strains of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2240–4.
76. Lina G, Piémont 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. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1128–32.
77. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun*. 2002;70(2):631–41.
78. Wang D, Chen H, Li H, He Q, Ding X, Deng L. Detection of *Staphylococcus aureus* Carrying the Gene for Toxic Shock Syndrome Toxin 1 by Quantum-Dot-Probe Complexes. *J Fluoresc*. 2011;21(4):1525–30.
79. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(3):426–30.
80. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(1):264–74.
81. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1323–36.

82. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin-Resistant Staphylococcus haemolyticus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(7):1955–63.
83. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of Staphylococcus aureus Strains. *J Clin Microbiol*. 1999;37(11):3556–63.
84. Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;(45):95–8.
85. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, et al. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5442–8.
86. Bartels MD, Petersen A, Worning P, Nielsen JB, Larner-Svensson H, Johansen HK, et al. Comparing Whole-Genome Sequencing with Sanger Sequencing for *spa* Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4305–8.
87. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3:124.
88. Rodríguez F, Fernández S, Haim S, Mollerach M, Basualdo W, Castro H, et al. Estandarización del análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem para el estudio de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina aislados de la comunidad en Paraguay. *Duazary*. 2017;14(2):131–40.
89. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, et al. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *spa* Typing, and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of Staphylococcus aureus Isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3095–100.
90. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, et al. New Method for Typing Staphylococcus aureus Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1801–4.
91. 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. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233–9.
92. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(Web Server issue):W537–44.
 93. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* [Internet]. 2018;7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124377/>
 94. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014;15(3):R46.
 95. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–20.
 96. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *bioRxiv.* 2016;096412.
 97. Mikheenko A, Valin G, Prjibelski A, Saveliev V, Gurevich A. Icarus: visualizer for de novo assembly evaluation. *Bioinformatics.* 2016;32(21):3321–3.
 98. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics.* 2018;34(13):i142–50.
 99. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013;29(8):1072–5.
 100. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068–9.
 101. Cuccuru G, Orsini M, Pinna A, Sbardellati A, Soranzo N, Travaglione A, et al. Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics.* 2014;30(13):1928–9.
 102. Seemann T. [tseemann/mlst](https://github.com/tseemann/mlst) [Internet]. 2021. Disponible en: <https://github.com/tseemann/mlst>
 103. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691–3.
 104. Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A. Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Mol Biol Evol.* 2013;30(5):1188–95.
 105. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268–74.

106. Hadfield J, Croucher NJ, Goater RJ, Abudahab K, Aanensen DM, Harris SR. Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*. 2018;34(2):292–3.
107. Vandenesch, F, Naimi TS, Enright MC, Lina, Gerard G, Nimmo, GR, Heffernan, H, et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worlwide Emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(8):978–84.
108. Oogai Y, Matsuo M, Hashimoto M, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H. Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum[▽]. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(22):8097–105.
109. Barcudi D, Sosa EJ, Lamberghini R, Garnero A, Tosoroni D, Decca L, et al. MRSA dynamic circulation between the community and the hospital setting: New insights from a cohort study. *J Infect*. 2020;80(1):24–37.
110. Sola C, Gribaudo G, Vindel A, Patrino L, Bocco JL. Identification of a Novel Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic Clone in Córdoba, Argentina, Involved in Nosocomial Infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1427–35.
111. Di Gregorio S, Haim MS, Vielma Vallenilla J, Cohen V, Rago L, Gulone L, et al. Genomic Epidemiology of CC30 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Argentina Reveals Four Major Clades with Distinctive Genetic Features. *mSphere*. 2021;6(2):e01297-20.
112. Fernandez S, Ledo C, Lattar S, Noto Llana M, Bertelli AM, Di Gregorio S, et al. High virulence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019, the dominant community-associated clone in Argentina. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2017;307(4–5):191–9.
113. Lopez Furst MJ, de Vedia L, Fernández S, Gardella NM, Ganaha C, Prieto S, et al. Prospective Multicenter Study of Community-Associated Skin and Skin Structure Infections due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina. 2013; Disponible en: <http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/1341>
114. DeLeo FR, Kennedy AD, Chen L, Wardenburg JB, Kobayashi SD, Mathema B, et al. Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(44):18091–6.
115. Nienaber JJC, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlertthon S, Park L, Rude TH, et al. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *J Infect Dis*. 2011;204(5):704–13.

116. Xiong YQ, Fowler VG Jr, Yeaman MR, Perdreau-Remington F, Kreiswirth BN, Bayer AS. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia In Vitro and in an Experimental Endocarditis Model. *J Infect Dis*. 2009;199(2):201–8.
117. Garofalo A, Giaï C, Lattar S, Gardella N, Mollerach M, Kahl BC, et al. The Length of the *Staphylococcus aureus* Protein A Polymorphic Region Regulates Inflammation: Impact on Acute and Chronic Infection. *J Infect Dis*. 2012;206(1):81–90.
118. Sola C, Saka HA, Vindel A, Bocco JL. Emergence and Dissemination of a Community-Associated Methicillin-Resistant Panton-Valentine Leucocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Clone Sharing the Sequence Type 5 Lineage with the Most Prevalent Nosocomial Clone in the Same Region of Argentina. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1826–31.
119. Nurjadi D, Klein S, Zimmermann S, Heeg K, Zanger P. Transmission of ST8-USA300 Latin American Variant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on a Neonatal Intensive Care Unit: Recurrent Skin and Soft-Tissue Infections as a Marker for Epidemic Community-Associated-MRSA Colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38(7):883–5.
120. Sabat AJ, Hermelijn SM, Akkerboom V, Juliana A, Degener JE, Grundmann H, et al. Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-spa t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. *Sci Rep*. 2017;7(1):41050.
121. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis SO, Narechania A, Reyes J, Xing G, et al. Parallel Epidemics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Infection in North and South America. *J Infect Dis*. 2015;212(12):1874–82.
122. Larnier-Svensson H, Worning P, Bartels MD, Hestbjerg Hansen L, Boye K, Westh H. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain M1, a Unique t024-ST8-IVa Danish Methicillin-Resistant *S. aureus* Clone. *Genome Announc*. 2013;1(3):e00336-13.
123. Raji MA, Garaween G, Ehricht R, Monecke S, Shibl AM, Senok A. Genetic Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Retail Meat in Riyadh, Saudi Arabia. *Front Microbiol* [Internet]. 2016;7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00911>
124. Senok A, Ehricht R, Monecke S, Al-Saedan R, Somily A. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial

- infections in a tertiary-care facility: emergence of new clonal complexes in Saudi Arabia. *New Microbes New Infect.* 2016;14:13–8.
125. Hm AS, Ae B, Me H, Ma A. Staphylococcus aureus nasal carriage among outpatients attending primary health care centers: a comparative study of two cities in Saudi Arabia and Egypt. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis [Internet]*. 2015;19(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25523075/>
 126. Japoni-Nejad A, Rezazadeh M, Kazemian H, Fardmousavi N, van Belkum A, Ghaznavi-Rad E. Molecular characterization of the first community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from Central Iran. *Int J Infect Dis.* 2013;17(11):e949–54.
 127. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Nasiri MJ, Goudarzi H, Sajadi Nia R, Dabiri H. Molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from patients with bacteremia based on MLST, SCCmec, spa, and agr locus types analysis. *Microb Pathog.* 2017;104:328–35.
 128. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (HA-MRSA) in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009;8:22.
 129. Udo EE, Boswihi SS, Mathew B, Noronha B, Verghese T, Al-Jemaz A, et al. Emergence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Belonging to Clonal Complex 15 (CC15-MRSA) in Kuwait Hospitals. *Infect Drug Resist.* 2020;13:617–26.
 130. Goudarzi M, Eslami G, Rezaee R, Heidary M, Khoshnood S, Sajadi Nia R. Clonal dissemination of Staphylococcus aureus isolates causing nosocomial infections, Tehran, Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22(3):238–45.
 131. Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Pública.* 2019;43:e65.
 132. Guillén R, Carpinelli L, Rodríguez F, Castro H, Quíñonez B, Campuzano A, et al. Staphylococcus aureus adquiridos en la comunidad: caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos. *Rev Chil Infectol.* 2016;33(6):609–18.
 133. Abente S, Carpinelli L, Guillén R, Rodríguez F, Fariña N, Laspina F, et al. Frecuencia de Staphylococcus aureus meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. *Mem Inst Investig En Cienc Salud [Internet]*. 2016;14(2). Disponible en: <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/1086>

134. Silvagni M, Guillén R, Rodríguez F, Espínola C, Grau L, Velázquez G, et al. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de pacientes pediátricos en Paraguay. *Rev Chil Infectol*. 2019;36(4):455–60.
135. Castellano M, Perozo A, Molero M, Montero S, Primera F. Resistencia a la clindamicina inducida por eritromicina en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. *Kasmera* [Internet]. 2015;43(1). Disponible en: <http://200.74.222.178/index.php/kasmera/article/view/20069>
136. Mišić M, Čukić J, Vidanović D, Šekler M, Matić S, Vukašinović M, et al. Prevalence of Genotypes That Determine Resistance of *Staphylococci* to Macrolides and Lincosamides in Serbia. *Front Public Health*. 2017;5:200.
137. Kilic A, Li H, Stratton CW, Tang YW. Antimicrobial Susceptibility Patterns and *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* Types of, as Well as Panton-Valentine Leukocidin Occurrence among, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Children and Adults in Middle Tennessee. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4436–40.
138. Mensa, J., Gatell, J., García-Sánchez, J., Letang, E., López-Suñé, E., Marco, F. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2013. 23°. ANTARES; 2013.
139. Kaibni MH, Farraj MA, Adwan K, Essawi TA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Palestine. *J Med Microbiol*. 2009;58(5):644–7.
140. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet*. 2013;382(9888):205.
141. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):430–8.
142. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, et al. Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. *N Engl J Med*. 2014;370(16):1524–31.
143. Wu Q, Sabokroo N, Wang Y, Hashemian M, Karamollahi S, Kouhsari E. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10(1):101.
144. McCarthy AJ, Lindsay JA. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiol*. 2012;12(1):104.

145. Gordon NC, Price JR, Cole K, Everitt R, Morgan M, Finney J, et al. Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J Clin Microbiol*. 2014;52(4):1182–91.
146. Soliman MS, Soliman NS, El-Manakhly AR, ElBanna SA, Aziz RK, El-Kholy AA. Genomic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by High-Throughput Sequencing in a Tertiary Care Hospital. *Genes*. 2020;11(10):E1219.
147. Zhanel GG, Zhanel MA, Karlowsky JA. Intravenous Fosfomycin: An Assessment of Its Potential for Use in the Treatment of Systemic Infections in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018;2018:e8912039.
148. Drago L. Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota. *Microorganisms*. 2019;7(9):278.
149. Stach CS, Vu BG, Merriman JA, Herrera A, Cahill MP, Schlievert PM, et al. Novel Tissue Level Effects of the *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Gene Cluster Are Essential for Infective Endocarditis. *PLOS ONE*. 2016;11(4):e0154762.
150. Kim MK. *Staphylococcus aureus* Toxins: From Their Pathogenic Roles to Anti-virulence Therapy Using Natural Products. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2019;24(3):424–35.
151. Rodríguez F, Carpinelli L, Basualdo W, Castro H, Quiñónez B, Arguello R, et al. Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, 2010. *Mem IICS*. 2015;13(1):58–66.
152. Rodríguez Acosta F, Basualdo Acuña WD, Castro H, Campuzano A, Macchi ML, Ortellado de Canese J, et al. Análisis MLVA y perfil de virulencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina adquiridos en la comunidad causantes de infecciones pediátricas en Paraguay. *Rev Argent Microbiol*. 2018;50(2):151–6.
153. Motamedi H, Asghari B, Tahmasebi H, Arabestani MR. Identification of Hemolysine Genes and their Association with Antimicrobial Resistance Pattern among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in West of Iran. *Adv Biomed Res*. 2018;7:153.
154. 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. *J Med Microbiol*. 2011;60(1):35–45.

155. Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q, Tu SI, et al. Genotypes and Toxin Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from China. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28276.
156. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, et al. Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2002;70(9):4987–96.
157. Klein S, Hannesen J, Zanger P, Heeg K, Boutin S, Nurjadi D. Entry of Pantone–Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital: prevalence and population structure in Heidelberg, Germany 2015–2018. *Sci Rep*. 2020;10(1):13243.
158. Ritz N, Curtis N. The role of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(5):514–8.
159. Shallcross LJ, Williams K, Hopkins S, Aldridge RW, Johnson AM, Hayward AC. Pantone–Valentine leukocidin associated staphylococcal disease: a cross-sectional study at a London hospital, England. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(11):1644–8.
160. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, et al. Is Pantone-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease? *J Infect Dis*. 2006;194(12):1761–70.
161. Maria Labandeira-Rey FC. *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 2007;315(5815):1130–3.
162. Bryant AE, Gomi S, Katahira E, Huang DB, Stevens DL. The effects of iclaprim on exotoxin production in methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 2019;68(3):456–66.
163. Mizobuchi S, Minami J, Jin F, Matsushita O, Okabe A. Comparison of the Virulence of Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol*. 1994;38(8):599–605.
164. Gheorghe I, Popa M, Măruțescu LG. Molecular Features of Virulence and Resistance Mechanisms in Nosocomial and Community-Acquired *Staphylococcus aureus* [Internet]. *Staphylococcus Aureus*. IntechOpen; 2018. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/59943>
165. Skaar EP, Schneewind O. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect*. 2004;6(4):390–7.

166. Sitkiewicz I, Babiak I, Hryniewicz W. Characterization of transcription within sdr region of *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011;99(2):409–16.
167. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. *PLOS Pathog*. 2010;6(8):e1001036.
168. Ibberson CB, Jones CL, Singh S, Wise MC, Hart ME, Zurawski DV, et al. *Staphylococcus aureus* Hyaluronidase Is a CodY-Regulated Virulence Factor. *Infect Immun*. 2014;82(10):4253–64.
169. Gonzalez CD, Ledo C, Gai C, Garófalo A, Gómez MI. The Sbi Protein Contributes to *Staphylococcus aureus* Inflammatory Response during Systemic Infection. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0131879.
170. Vlaeminck J, Raafat D, Surmann K, Timbermont L, Normann N, Sellman B, et al. Exploring Virulence Factors and Alternative Therapies against *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Toxins*. 2020;12(11):721.
171. Cao Z, Casabona MG, Kneuper H, Chalmers JD, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. *Nat Microbiol*. 2016;2(1):1–11.
172. Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(12):2235–46.
173. Haim MS, Zaheer R, Bharat A, Di Gregorio S, Di Conza J, Galanternik L, et al. Comparative genomics of ST5 and ST30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequential isolates recovered from paediatric patients with cystic fibrosis. *Microb Genomics*. 2021;7(3).
174. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):441–6.
175. Salinas C, Escobar F, Rodríguez F, Rolón AC de, Almada P, Canese JO, et al. Evaluación de la capacidad formadora de biofilm de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina que infectaron a niños paraguayos. *Pediatría Asunción*. 2017;44(3):233–8.
176. Burgos-Edwards A, Franco S, Salinas C, Florentín M, García L, Guillén R, et al. In vitro antibacterial activity, biofilm formation inhibition and chromatographic profile of methanolic extracts of two *Pterocaulon* species against MRSA. *Nat Prod Res*. 2022;0(0):1–5.

11. ANEXOS

ANEXO 1

Informe de aceptación de protocolo: P20/2011



Universidad Nacional de Asunción

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : ROSA GUILLEN
Código : P20/2011
Fecha : 29/09/2011

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

“Caracterización fenotípica y genotípica de aislados de *Staphylococcus aureus* en niños que concurrieron a hospitales de referencia en al año 2010”

Ha sido aceptado



COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
Dra. Soledad Campos
Coordinadora



COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)
Dra. Norma Pistilli
Coordinadora

ANEXO 2

Informe de aceptación de protocolo: P29/2011



Universidad Nacional de Asunción
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : ROSA GUILLEN

Código : P29/2011

Fecha : 27/03/2012

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

“*Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad aislados de niños que concurren a hospitales de referencia en el periodo 2012-2013.”

Ha sido aceptado



COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
Dra. Soledad Campos
Coordinadora



COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)
Dra. Norma Pistilli
Coordinadora

ANEXO 3

Informe de aceptación de protocolo: P15/2016



Universidad Nacional de Asunción
RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
COMITÉ de ÉTICA en INVESTIGACIÓN (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : ROSA MARIA GUILLÉN FRETES
C.C. : RODRIGUEZ ACOSTA F, BASUALDO W, RODRIGUEZ M, CAMPUZANO
DE ROLON A, LEZCANO R, SAMUDIO G, ZARATE N, VELAZQUEZ G,
ORTELLADO J, GOMEZ G.
Código : P15/2016
Fecha : 19/01/2017

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

“Identificación de clones de *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad que infectaron a niños que concurren a hospitales de referencia en el año 2017”.



COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
Dra. Vivian Giménez
Coordinadora

J
Ha sido aceptado



Eva
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN (CEI)
Dra. Eva Nara
Coordinadora

Dr. Cecilio Báez c/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA

ANEXO 4

Informe de aceptación de protocolo: P34/2018



Universidad Nacional de Asunción
RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
COMITÉ de ÉTICA en INVESTIGACIÓN (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : FATIMA RODRIGUEZ
C.C. : CAMOU T., GUILLEN R., GARCIA G., LOPEZ M.,
GRUPO PARAGUAYO DE ESTUDIO DE *Staphylococcus aureus*
Código : P34/2018
Fecha : 29/06/2018

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

"Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina causante de infecciones invasivas en niños paraguayos (Periodo 2010, 2012 y 2017)".



COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
Dra. Vivian Giménez
Coordinadora

Ha sido aceptado



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN (CEI)
Dra. Eva Nara
Coordinadora

Dr. Cecilio Báez o/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA

ANEXO 5

ACTA SIS



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
Ministerio de Educación y Cultura - Universidad de la República

Área Biología

ACTA

CONSEJO CIENTÍFICO DEL ÁREA

3/10/17

Presentes: Dra. E. Castillo, Dra. C. Quijano, Dr. A. Trostchansky, Dr. R. Maneyro, Dra. S. Olivera, Dr. G. Francescoli, Mag. J. Fariás, Mag. N. Echeverría, Mag. L. Zubizarreta

Ausentes (con aviso): Dr. H. Botti, Dr. M. Graña, Dr. J.M. Verdes.

Ausente (sin aviso): Dr. A. Caputi

1. Informe de C. Directiva

- Convenio PEDECIBA Informática - Facultad de Ingeniería (Biblioteca INCO-PEDECIBA).
- Se designó una comisión (Dirección y QUI) para rever el Reglamento del personal académico.
- Entregas Premios RCB: 7 de noviembre.
- El programa "Liceo científico" comenzará en 2018.

2. Lectura de acta 19/9/17

Resolución: Se aprueba.

3. Asuntos entrados con proyecto de resolución

- 3.1 En Memo PB/FC 252.17 del 20.9.17, la Secretaría Académica informa sobre la siguiente defensa de tesis:

DOCTORADO

Cecilia Carolina Ortiz Carrión

Resolución: Se aprueba y eleva a C. Directiva.

Secretaría Académica – Teléfono: (598) 2 525 86 18/24, int. 131. Fax: (598) 2 525 86 29. isolina@fcien.edu.uy academicabiologia@pedeciba.edu.uy
Secretaría Científica – Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. beasm@fmed.edu.uy
Secretaría Presupuesto: Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. presupuestobiologia@pedeciba.edu.uy
Facultad de Ciencias – Igua 4225 – C.P. 11400 – Casilla de Correo 16120 – Distrito 6 – Montevideo – URUGUAY
<http://www.pedeciba.edu.uy/biologia/indice.php>

03/10/2017

- 3.2 En Memo PB/FC 253.17 del 21.9.17, la Secretaría Académica informa sobre la siguiente defensa de tesis:

MAESTRÍA

Ignacio Gianelli Maizonave

Resolución: Se aprueba y eleva a C. Directiva.

- 3.3 En Memo PB/FC 256.17 del 26.9.17, la Secretaría Académica informa sobre la siguiente defensa de tesis:

MAESTRÍA

María Natalia Bobba Alves

Resolución: Se aprueba y eleva a C. Directiva.

- 3.4 En Memo PB/FC 257.17 fechado 27.9.17, la Subcomisión de Ingreso y Seguimiento Estudiantes (SIS), eleva la siguiente aspiración a ingreso a Doctorado:

FÁTIMA RODRÍGUEZ ACOSTA

Cuenta con el título de Magíster en Ciencias Biomédicas otorgado por la Universidad Nacional de Asunción, con directora (Dra. Teresa Camou), co-directora (Dra. Rosa María Guillén) y laboratorios de recepción (Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Inst. de Investigaciones en Ciencias de la Salud, U. Nacional de Asunción y Div. Epidemiología, Depto. de Laboratorios de Salud Pública, Dirección General de la Salud, Ministerio de Salud, Montevideo, Uruguay). Proyecto de tesis: Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina causantes de infecciones invasivas en niños paraguayos.

El 31.8.17 la Comisión de Admisión y Seguimiento aprobó el proyecto de tesis de dicho aspirante.

Resolución: Se aprueba y eleva a C. Directiva.

- 3.5 En Memo PB/FC 258.17 del 29.9.17, la Subcomisión de Ingreso y Seguimiento Estudiantes (SIS), eleva las siguientes aspiraciones a ingreso a Doctorado:

MARÍA JOSÉ ZULUAGA ROULLER

Cuenta con el título de Magíster en Ciencias Biológicas otorgado por PEDECIBA, con directora (Dra. Annabel Ferreira) y laboratorio de recepción (Laboratorio de la Sección Fisiología y Nutrición, F. Ciencias). Proyecto de tesis: Efecto del estrés temprano en el desarrollo de respuestas de miedo y de memorias aversivas en crías de *Rattus norvegicus*. El 21.7.17 la Comisión de Admisión y Seguimiento aprobó el proyecto de tesis de dicho aspirante.

JUAN ANDRÉS IMELIO VIERA

Cuenta con el título de Magister en Ciencias Biológicas otorgado por PEDECIBA, con director (Dr. Alejandro Buschiazzi), co-director (Dr. Felipe Trajtenberg) y laboratorio de recepción (Lab. de Microbiología Molecular y Estructural, Inst. Pasteur de Montevideo). Proyecto de tesis: Mecanismos de transmisión estímulo-respuesta en sistemas de señalización bacterianos. El 28.9.17 la Comisión de Admisión y Seguimiento aprobó el proyecto de tesis de dicho aspirante.

Resolución: Se aprueban y elevan a C. Directiva.

- 3.6 En Memo PB/FC 259.17 del 29.9.17, la Subcomisión de Ingreso y Seguimiento Estudiantes (SIS), eleva la propuesta de los siguientes tribunales:

MAESTRÍA

Estudiante: Marco Andrés Navatta Rodons

Presidente: Dr. Carlos Carmona

Vocales: Dras. María Moreno y Analía Rial

Título de la tesis: Caracterización de antígenos de *Echinococcus granulosus* con capacidad inmuno-moduladora y evaluación de los efectos de anticuerpos dirigidos contra estos antígenos sobre el establecimiento de la infección secundaria experimental

Directora de tesis: Dra. Sylvia Dematteis

Estudiante: Patricia Solari Saquieres

Presidente: Dr. Gustavo Folle

Vocales: Dres. Laura Franco Fraguas y Alfonso Cayota

Título de la tesis: Caracterización de GalNAc-T13 en cáncer de pulmón humano

Director de tesis: Dr. Eduardo Osinaga

Estudiante: Célica Cagide Diflore

Presidente: Dr. Jorge Monza

Vocales: Dras. Alexandra Castro y Margarita Sicardi

Título de la tesis: Análisis del establecimiento de soja mediante el uso del consorcio bradizobios – Delftia.

Directora de tesis: Dra. Susana Castro

Co-directora: Dra. María Morel

DOCTORADO

Estudiante: Daniel Prieto Mena

Presidente: Dr. Alfonso Cayota

Vocales: Dres. Cecilia Guillermo y Marcelo Hill

Título de la tesis: Caracterización de diferentes marcadores moleculares del microambiente tumoral asociados a la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica

Secretaría Académica – Teléfono: (598) 2 525 86 18/24, int. 131. Fax: (598) 2 525 86 29. isolina@fcien.edu.uy academicabiologia@pedeciba.edu.uy
 Secretaría Científica – Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. beasm@fmed.edu.uy
 Secretaría Presupuesto: Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. presupuestobiologia@pedeciba.edu.uy
 Facultad de Ciencias – Igua 4225 – C.P. 11400 – Casilla de Correo 16120 – Distrito 6 – Montevideo – URUGUAY
<http://www.pedeciba.edu.uy/biologia/indice.php>

Director de tesis: Dr. Pablo Opezzo

Estudiante: Emiliano Trías Tejería

Presidente: Dr. Raúl Russo

Vocales: Dres. Marcelo Hill, Felipe Cout

Título de la tesis: Caracterización del microambiente celular neurodegenerativo en un modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Director de tesis: Dr. Luis Barbeito

Resolución: Se aprueban y elevan a C. Directiva.

El Dr. Maneyro se retira de la sesión.

- 3.7 En Memo PB/FC 260.17 del 29.9.17, la Secretaría Académica informa sobre la siguiente defensa de tesis:

DOCTORADO

Cecilia Bardier Suárez

Resolución: Se aprueba y eleva a C. Directiva.

El Dr. Maneyro ingresa a la sesión.

4. Asuntos entrados

- 4.1 En nota fechada 28/8/17, el Dr. Leandro Bergamino solicita la transferencia para el próximo año, de los fondos correspondientes a la alícuota de estudiante Maestría de Meica Valdivia, a fin de poder financiar parte de los análisis de isótopos estables en hueso y tejido muscular así como algunos insumos de laboratorio.

Resolución: El CCA apoya la solicitud pero esta refiere a alícuota de estudiante, por tanto, la decisión final corresponde a la Administración Central. Se eleva.

- 4.2 El Dr. Alejandro Buschiazzi en nota del 29/9/17, informa que su estudiante de Doctorado Juan Imelio realizará una pasantía en la Unité de Biologie des Spirochètes (I. Pasteur Francia) con el Dr. Mathieu Picardeau y solicita la firma de un acuerdo de pasantía (*Convention de Stage*) entre el I. Pasteur Francia y la UdelaR.

Resolución: En virtud de la naturaleza del convenio, debe asesorarse con la Sección Convenios de la Facultad de Ciencias. En la medida de lo posible, este CCA apoyará la solicitud.

Secretaría Académica – Teléfono: (598) 2 525 86 18/24, int. 131. Fax: (598) 2 525 86 29. isolina@fcien.edu.uy academicabiologia@pedeciba.edu.uy
Secretaría Científica – Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. beasm@fmed.edu.uy
Secretaría Presupuesto: Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. presupuestobiologia@pedeciba.edu.uy
Facultad de Ciencias – Igua 4225 – C.P. 11400 – Casilla de Correo 16120 – Distrito 6 – Montevideo – URUGUAY
<http://www.pedeciba.edu.uy/biologia/indice.php>

5. Asuntos pendientes

5.1 (ver acta CCA 5/9/17, punto 6.2) Criterios asignación fondos del área (informe de avance).

5.2 En nota del 5/9/17, el Dr. Rafael Radi solicita que se envíen uno o dos candidatos con su currícula (antes del 10/10/17) para la Lindau Nobel Laureate Meeting en su 68va. edición. El área deberá contribuir con el pago del pasaje y la inscripción al evento y estadía (€ 1.500).

Resolución: Se agradece a la ANCIU por esta oportunidad, en el entendido que el evento es sumamente prestigioso y muy formativo para los participantes. En virtud del corto plazo para presentar los candidatos, este Consejo no se encuentra en condiciones de realizar un llamado abierto para la postulación de aspirantes y la evaluación de los mismos. Se lamenta no poder acceder a la solicitud de la ANCIU en esta oportunidad y se espera poder hacerlo en la próxima convocatoria.

5.3 La Dra. Laura Quintana en mail fechado 11/9/17, informa que por razones personales debe retirarse de la Comisión organizadora del "Premio MEC a las ciencias" y propone que en su lugar sea designada la Dra. Jessika Urbanavicius.

Resolución: Se toma conocimiento y se acepta la propuesta.

5.4 En mail del 15/9/17, Luciana Griffero se postula para el llamado actividades en el interior del país.

Resolución: Se aprueba y eleva a C. Directiva.

6. Asuntos varios7. Planteamientos Sres. Consejeros

7.1 Dra. S. Olivera: Plantea 2 asuntos: i) estudiantes de Doctorado designados como co tutores de Maestría y ii) Generales de la ley.

Resolución: Se ratifica la política de los CCA precedentes respecto a: i) los estudiantes deben culminar sus doctorados para oficiar como tutores y ii) la vigencia de las Generales de la ley.

7.2 Dr. R. Maneyro: Informa que Leonardo Latorre (informático), está trabajando en los formularios del área.

Resolución: Se toma conocimiento.

Secretaría Académica – Teléfono: (598) 2 525 86 18/24, int. 131. Fax: (598) 2 525 86 29. isolina@fcien.edu.uy academicabiologia@pedeciba.edu.uy
Secretaría Científica – Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. beasm@fmed.edu.uy
Secretaría Presupuesto: Teléfono: (598) 2 525 86 30. Fax: (598) 2 525 86 29. presupuestobiologia@pedeciba.edu.uy
Facultad de Ciencias – Igua 4225 – C.P. 11400 – Casilla de Correo 16120 – Distrito 6 – Montevideo – URUGUAY
<http://www.pedeciba.edu.uy/biologia/indice.php>

ANEXO 6

Figuras de electroforesis en geles de agarosa al 2%, realizadas para visualizar los productos de PCR para detección de genes codificantes de resistencia y factores de virulencia, así como determinación del *Spatipo* y el análisis por electroforesis en gel de campo pulsado.

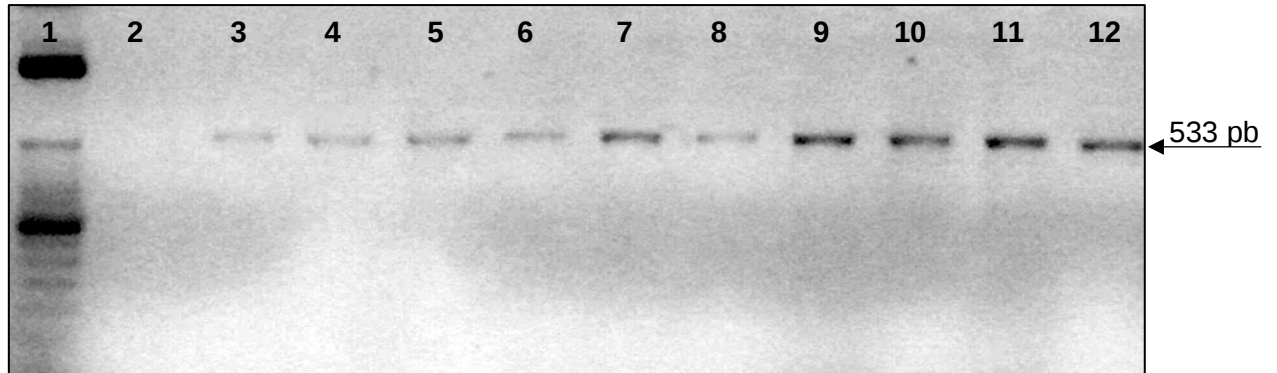


Figura A: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección del gen codificante de la resistencia a meticilina (*mecA* 533 pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 50 pb Jena Bioscience, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (533 pb). 4 al 12- Muestras positivas.

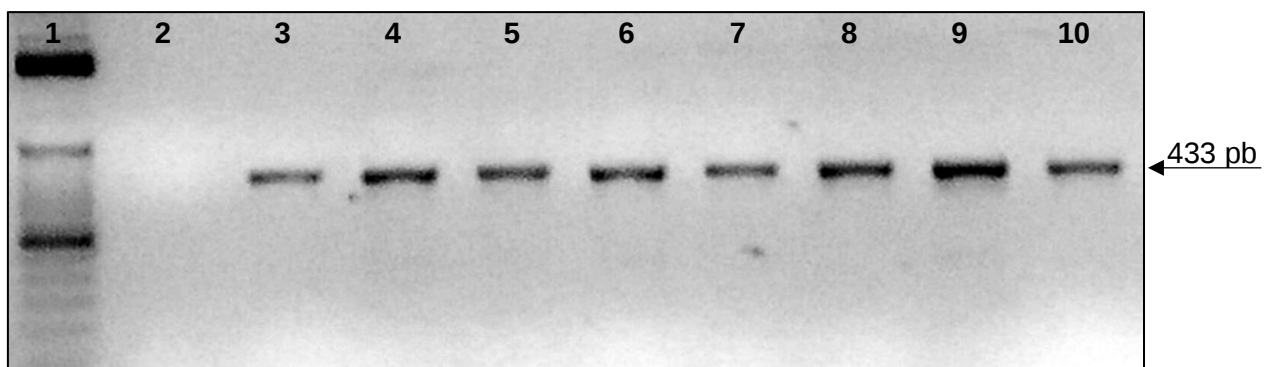


Figura B: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección del gen codificante de la PVL (*lukS/F-PV* 433 pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 50 pb Jena Bioscience, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (433 pb). 4 al 10- Muestras positivas.

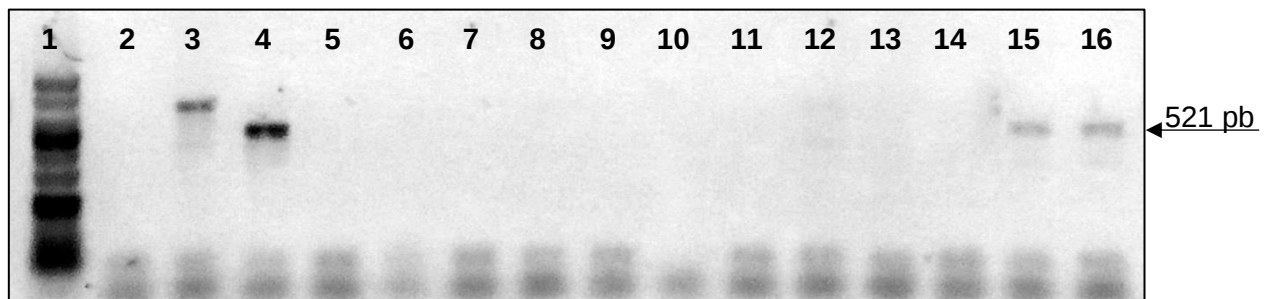


Figura C: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR múltiple para detección de los genes codificantes de las enterotoxinas A y B (*seA* 521 pb y *seB* 667 pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 50 pb GeneOn Bioscience, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo *seB* (667 pb). 4-Control Positivo *seA* (521 pb). 5 al 14- Muestras negativas. 15 y 16- Muestras positivas para *seA* (521 pb).

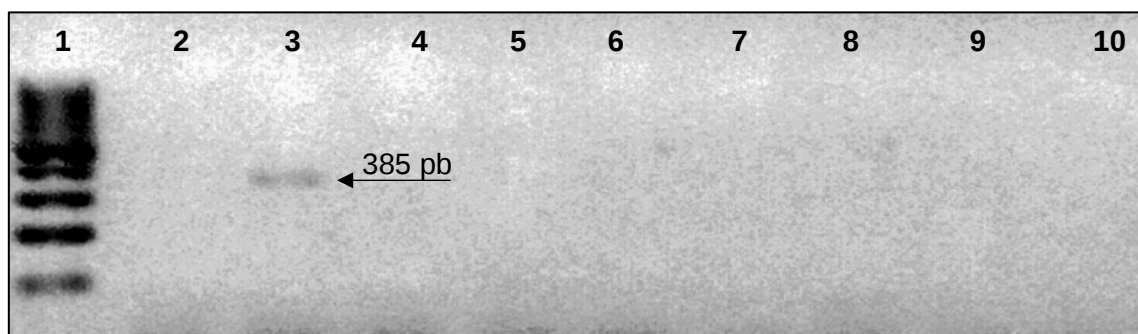


Figura D. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección del gen codificante de la enterotoxina D (*seD* 385pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (385pb). 4 al 10- Muestras negativas.

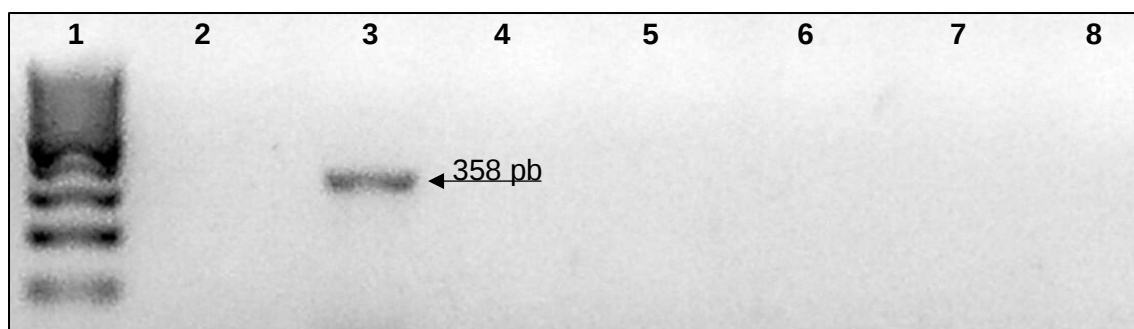


Figura E: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección del gen codificante de la enterotoxina H (*seH* 358pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (358pb). 4 al 8- Muestras negativas.

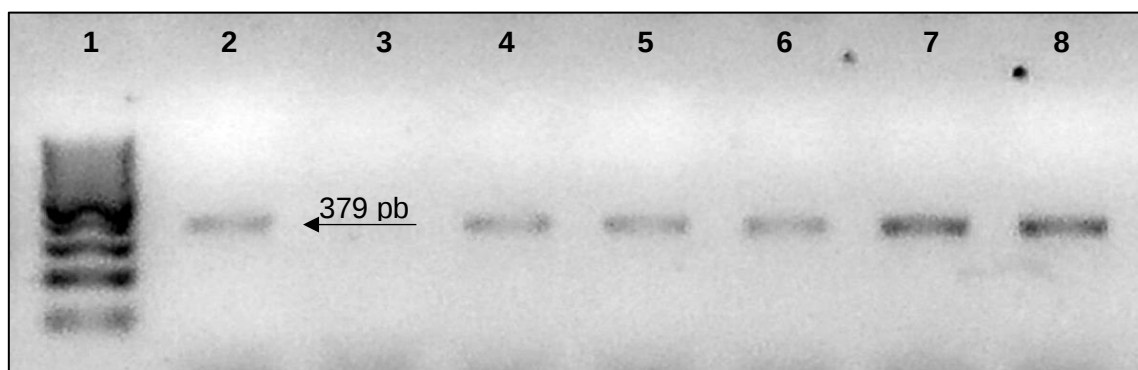


Figura F. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección gen codificante enterotoxina M: *seM* – 379pb. Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Positivo de Reacción (379pb). 3-Control Negativo de Reacción. 4 al 8- Muestras positivas (379pb).

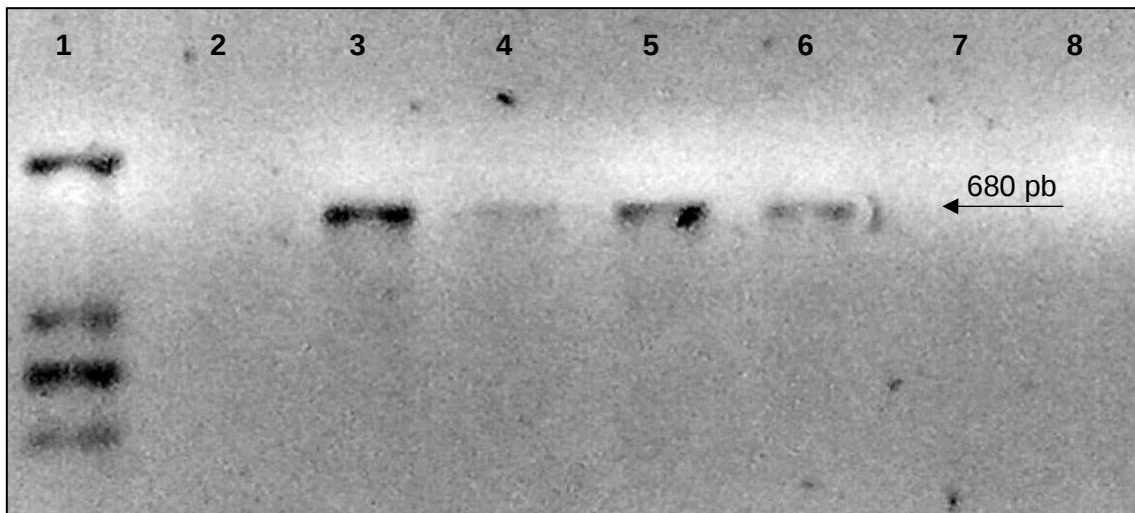


Figura G. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección del gen codificante de la enterotoxina N (seN 680pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (680pb). 4, 5 y 6-Muestras positivas (680pb). 7 y 8-Muestras negativas.

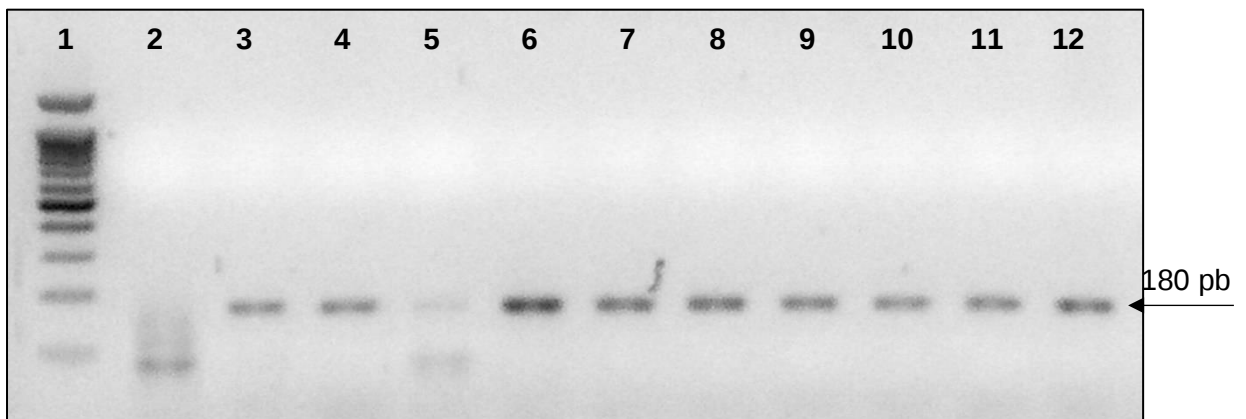


Figura H. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección del gen codificante de la enterotoxina O (seO 180pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (180pb). 4 y 6 al 12- Muestras positivas (180 pb). 5-Muestra negativa.

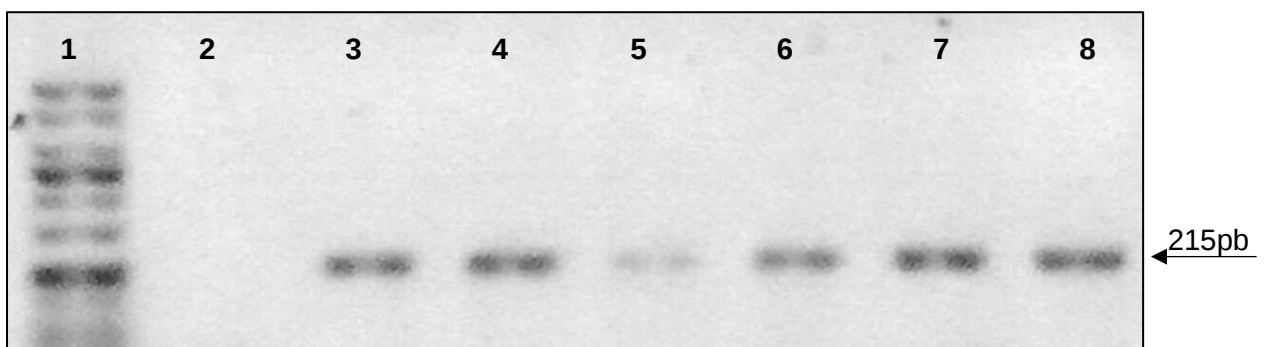


Figura I. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para detección del gen codificante de la enterotoxina U (seU 215pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (215pb). 5-Muestra negativa. 4 y 6 al 8-Muestras positivas (215pb).

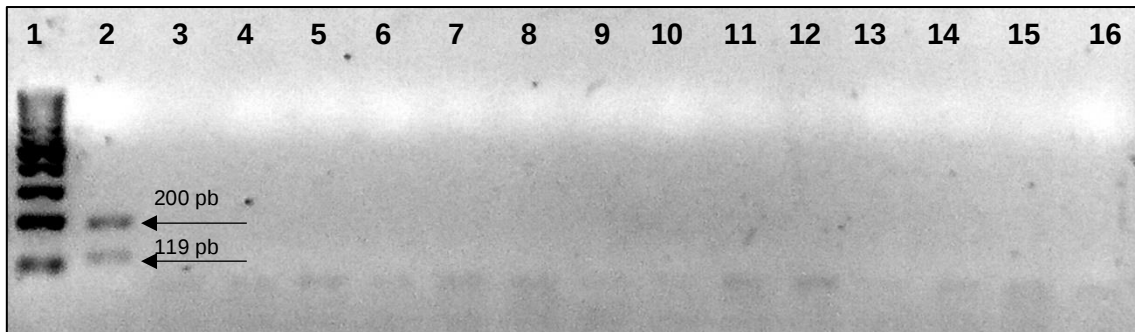


Figura J: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR múltiple para la detección de genes codificantes de las toxinas exfoliativas A y B (119 y 200pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Positivo de Reacción (*etB* 200pb y *etA* 119pb). 3-Control Negativo de Reacción. 4 al 16-Muestras negativas.

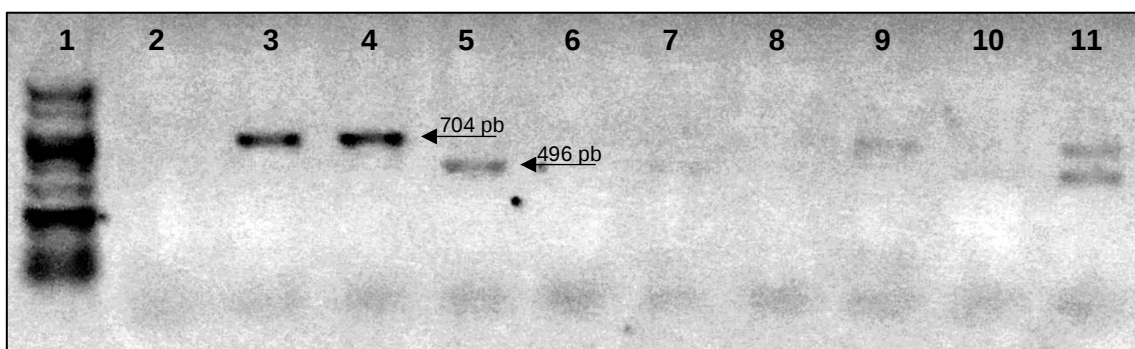


Figura K: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR múltiple para la detección de genes codificante de hemolisinas alfa y beta (*hla* 704 pb y *hlb* 496 pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3, 4 y 9- Muestras positivas para *hla* (704pb) 5 y 7-Muestras positivas para *hlb* (496pb). 6, 8 y 10-Muestras negativas. 11-Control Positivo de Reacción (*hla* 704pb y *hlb* 496pb).

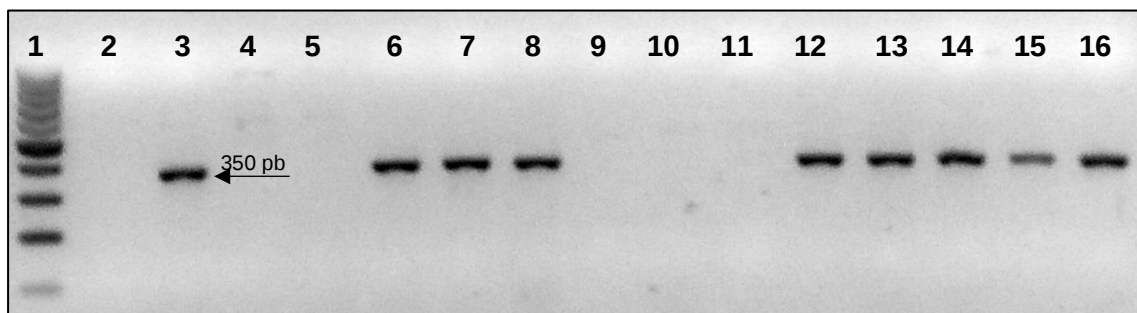


Figura L: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para la detección del gen codificante de la toxina del shock tóxico (*tsst-1* 350 pb). Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 50 pb Jena Bioscience, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3-Control Positivo de Reacción (*tsst-1* 350 pb), 6, 7, 8, 12 al 16- Muestras positivas para *tsst-1* 350 pb. 4, 5, 9, 10 y 11-Muestras negativas.

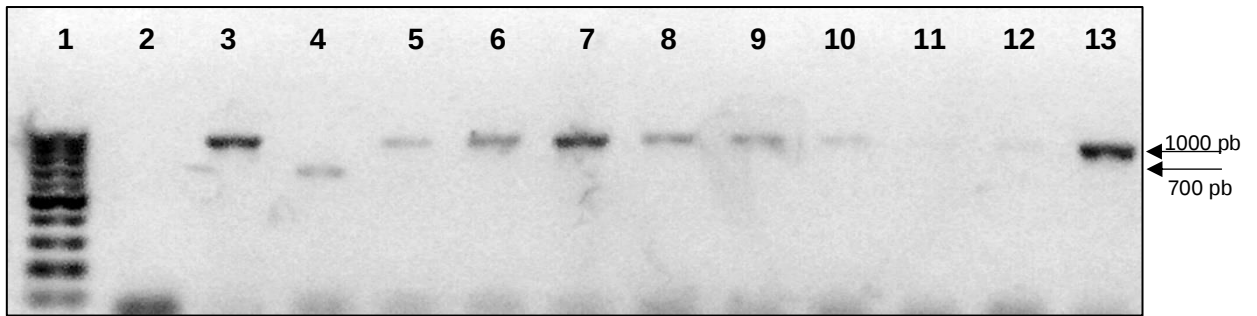


Figura M: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR múltiple para detección del complejo *ccrAB* (tipo de recombinasa), necesario para tipificación del *cassette SCCmec*. Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100 pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3, 5 al 12-Muestras positivas para *ccrA2/ccrB2* 1000 pb. 4-Muestra positiva para *ccrA1/ccrB1* 700 pb. 13-Control Positivo de Reacción (*ccrA2/ccrB2* 1000 pb).

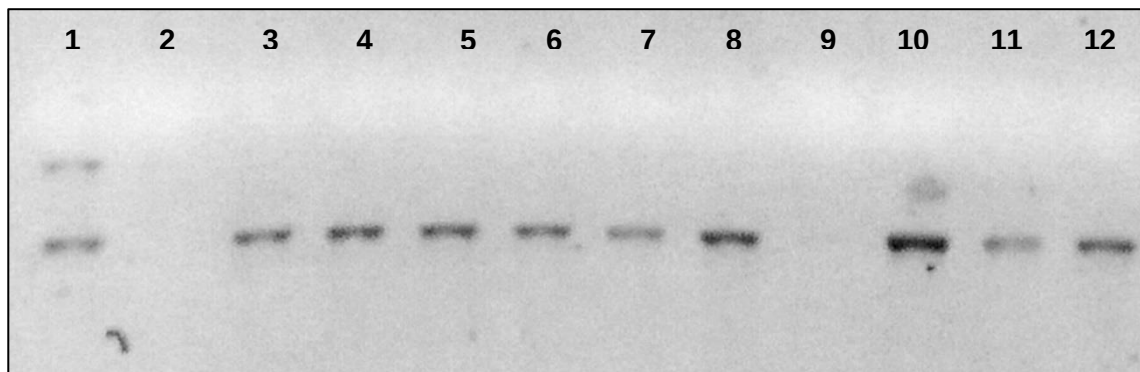


Figura N: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR múltiple para detección del tipo *mec*, necesario para tipificación del *cassette SCCmec*. Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 565 y 1000 pb. 2-Control Negativo de Reacción. 3- Control de Positivo de Reacción (Clase B, 565 pb). 4 al 8 y 10 al 12-Muestras positivas para *mecB* 565 pb. 9-Muestra negativa.

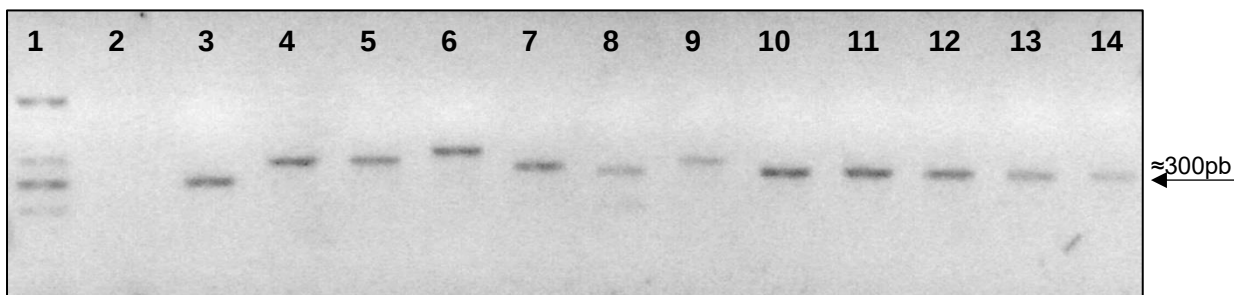


Figura O. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR simple para amplificación del gen de la proteína A (*SpA typing*): *spa* ≈300pb. Carriles: 1-Marcador de peso molecular de 100pb Bioron, Alemania. 2-Control Negativo de Reacción. 3 al 14: Muestras analizadas (*spa* ≈300pb). Todos los productos de PCR fueron secuenciados (Macrogen, Corea) y posteriormente la secuencia editada y analizada (Bioedit y spa.ridom.de). La variabilidad en el tamaño de los productos es debida a la variabilidad genética observada entre aislamientos.

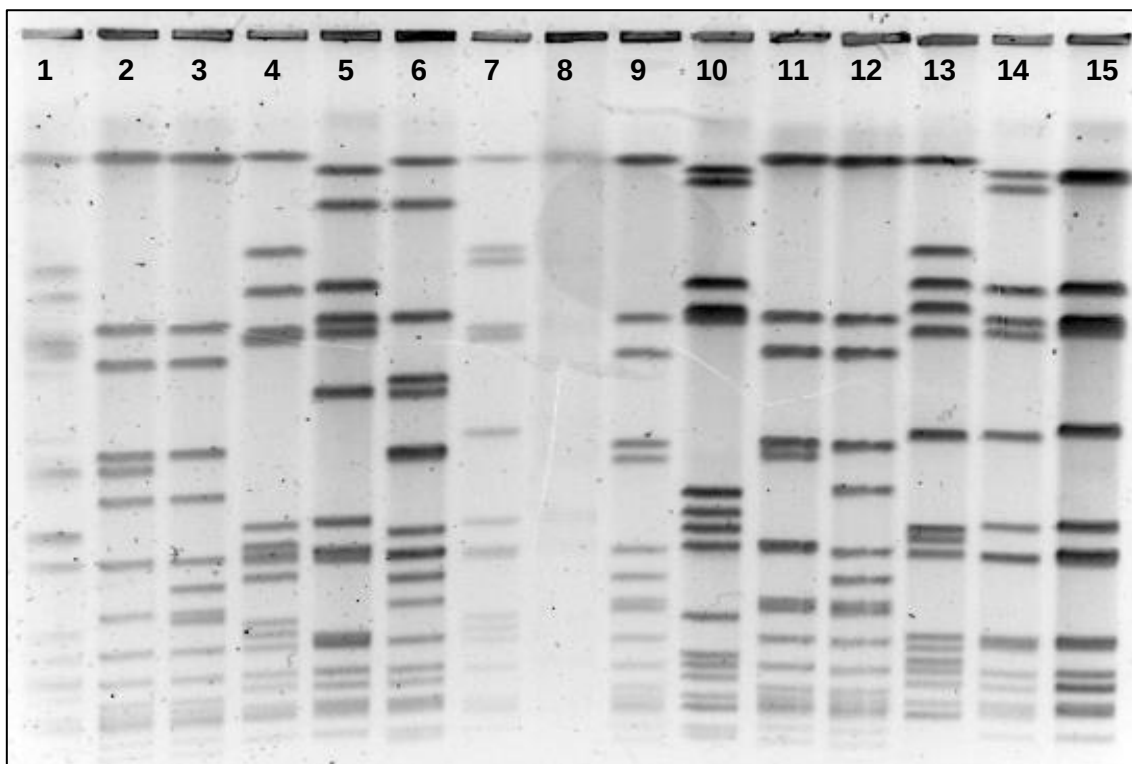


Figura P. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% en Campo Pulsado, para análisis de variabilidad genética. Carriles: 1 y 8-Cepa de referencia *S. aureus* NCTC 8325. 2 al 14: Muestras SARM invasivas analizadas, el patrón de bandas obtenido es característico de cada tipo de clon identificado. En los carriles 3 y 12 se observa el pulsotipo mayoritario PA, correspondiente al clon CC30-ST30-t019. En los carriles 2, 9, 11 y 12 se observan subtipos del PA ($1 \geq 6$ bandas diferentes al PA). En el carril 14 se observa el PB (≥ 7 bandas diferentes al PB), correspondiente al clon CC5-ST5-t311. En el carril 15 se observa un subtipo del PB ($1 \geq 6$ bandas diferentes al PB). En los carriles 4, 5, 6, 7, 10 y 13 se observan otros pulsotipos minoritarios.

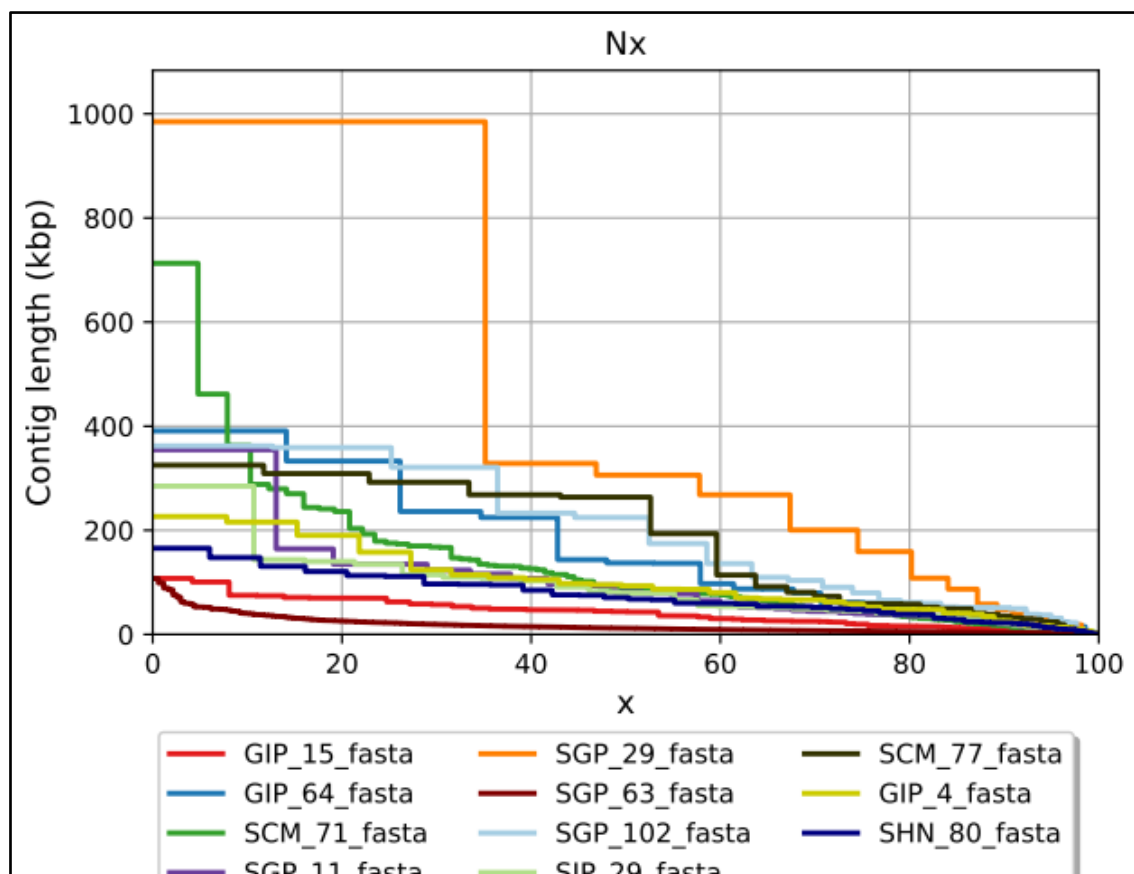
ANEXO 7

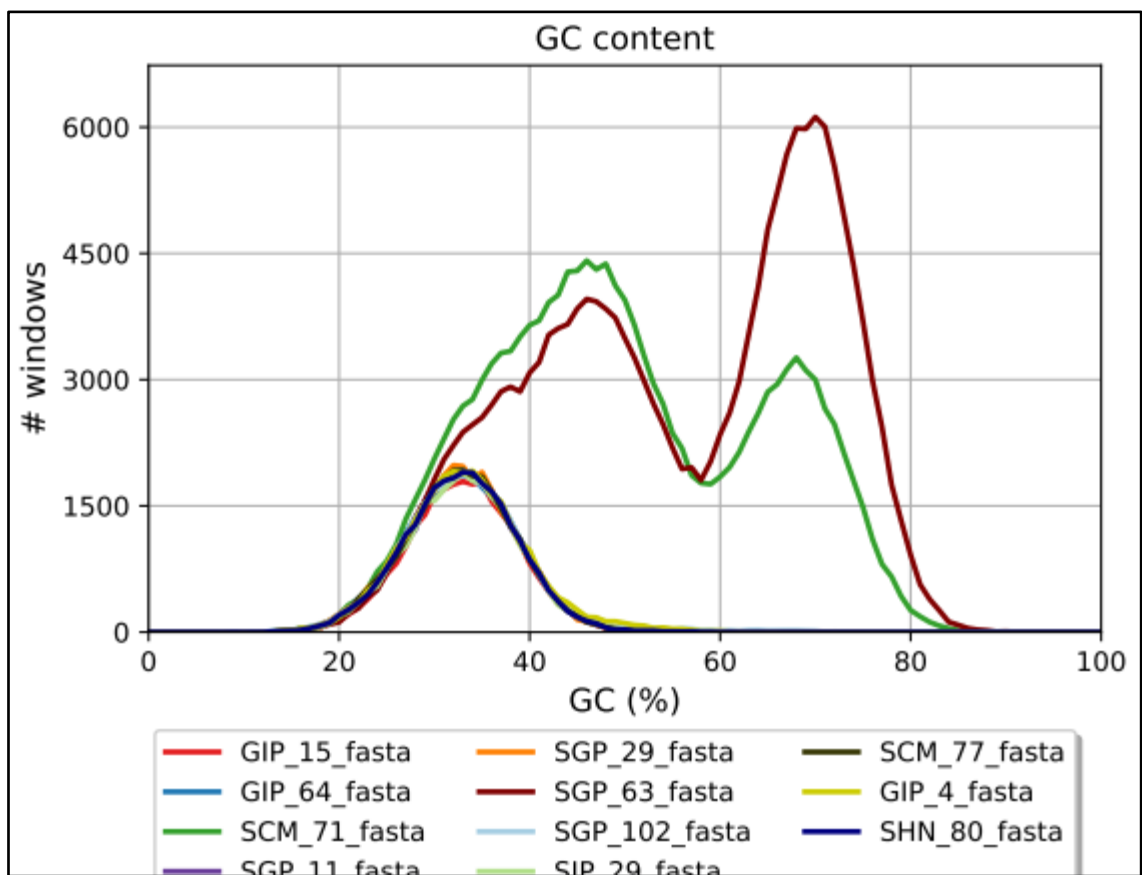
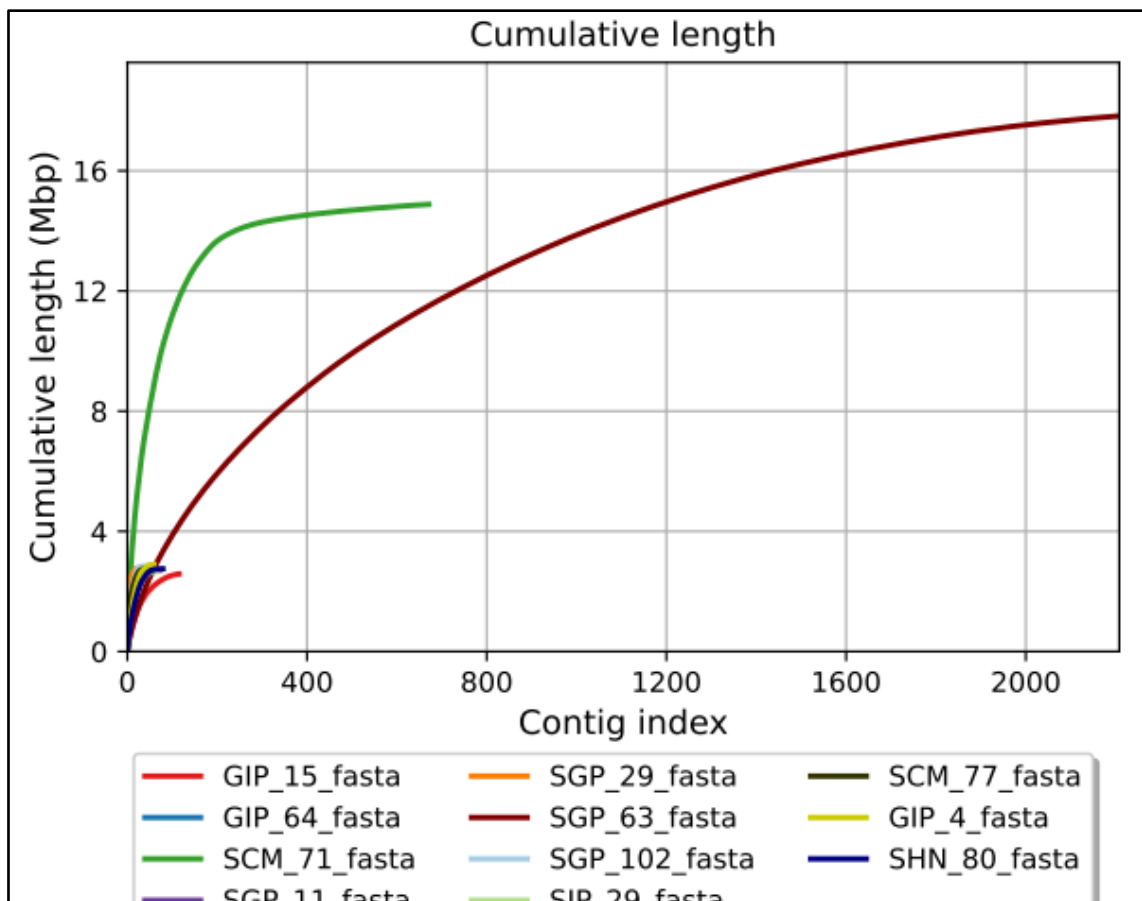
Valores de calidad de los ensambles obtenidos con la herramienta *Quast Genome assembly Quality* (n=10).

Report

	GIP_15_fasta	GIP_64_fasta	SCM_71_fasta	SGP_11_fasta	SGP_29_fasta	SGP_63_fasta	SGP_102_fasta	SIP_29_fasta	SCM_77_fasta	GIP_4_fasta	SHN_80_fasta
# contigs (>= 0 bp)	127	88	746	90	66	2229	67	79	72	72	93
# contigs (>= 1000 bp)	115	44	654	70	35	2201	45	61	50	57	72
Total length (>= 0 bp)	2583563	2775568	14898957	2723890	2806899	17828854	2863243	2669362	2775173	2900198	2755871
Total length (>= 1000 bp)	2581624	2762520	14869872	2718452	2797777	17817511	2856549	2663828	2770598	2896209	2748624
# contigs	115	52	671	72	40	2208	48	65	51	59	79
Largest contig	107643	390906	712921	354810	984945	107481	362040	284909	325044	226512	165559
Total length	2581624	2767805	14881909	2719656	2801912	17822726	2858763	2666158	2771113	2897788	2752704
GC (%)	32.99	32.68	50.16	32.83	32.67	55.65	33.32	32.85	32.74	33.35	32.78
N50	43870	137306	88914	81371	306045	11886	224570	79441	263702	93386	70837
N75	19543	61371	41819	39918	159034	6626	79856	44639	58944	58104	47871
L50	21	6	42	10	3	410	5	11	5	11	13
L75	44	13	100	22	6	922	11	23	12	20	25
# N's per 100 kbp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

All statistics are based on contigs of size >= 500 bp, unless otherwise noted (e.g., "# contigs (>= 0 bp)" and "Total length (>= 0 bp)" include all contigs).





ANEXO 8

Análisis de portación de genes codificantes de factores de virulencia a partir de los ensamblajes genómicos, utilizando el servicio online de la plataforma Center for Genomic Epidemiology, software Virulence Finder 2.0.3. (GIP_04)

Center for Genomic Epidemiology

[Home](#)
[Services](#)
[Instructions](#)
[Output](#)

VirulenceFinder-2.0 Server - Results

Organism(s): *S. aureus*

Exoenzyme genes for <i>S. aureus</i>						
Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
aur	100	1530 / 1530	NODE_1_length_297506_cov_119.917	140126..141655	aureolysin	AF014942.1
aur	100	1530 / 1530	NODE_1_length_297506_cov_119.917	140126..141655	aureolysin	AF014942.1
spIA	99.86	708 / 708	NODE_266_length_6508_cov_70.7341	5106..5813	serine protease spIA	AF014942.1
spIA	99.86	708 / 708	NODE_266_length_6508_cov_70.7341	5106..5813	serine protease spIA	BA000033.2
spIB	99.45	723 / 723	NODE_266_length_6508_cov_70.7341	4259..4981	serine protease spIB	AF014942.1
spIE	100	717 / 717	NODE_266_length_6508_cov_70.7341	1768..2484	serine protease spIE	AF009351.1
spIE	100	717 / 717	NODE_266_length_6508_cov_70.7341	1768..2484	serine protease spIE	CP007874.1

Hostimm genes for <i>S. aureus</i>						
Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
sak	99.8	492 / 492	NODE_65_length_48174_cov_86.6376	45923..46414	staphylokinase	CP000253.1
sak	99.8	492 / 492	NODE_65_length_48174_cov_86.6376	45923..46414	staphylokinase	CP003979.1
sak	99.8	492 / 492	NODE_65_length_48174_cov_86.6376	45923..46414	staphylokinase	HE681097.1
scn	100	351 / 351	NODE_1026_length_1789_cov_6.17329	954..1304	staphylococcal complement inhibitor	AF009351.1

Toxin genes for <i>S. aureus</i>						
Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
hlgA	100	930 / 930	NODE_4_length_193401_cov_95.2894	108758..109885	gamma-hemolysin chain II precursor	CP010295.1
hlgB	100	977 / 977	NODE_4_length_193401_cov_95.2894	111201..112177	gamma-hemolysin component B precursor	AP014942.1
hlgC	99.89	948 / 948	NODE_4_length_193401_cov_95.2894	110252..111199	gamma-hemolysin component C	CP007539.1
lukD	100	983 / 983	NODE_126_length_26661_cov_50.423	10731..11713	leukocidin D component	CP006638.1
lukD	100	983 / 983	NODE_126_length_26661_cov_50.423	10731..11713	leukocidin D component	CP007674.1
lukD	100	983 / 983	NODE_126_length_26661_cov_50.423	10731..11713	leukocidin D component	CP010300.1
lukE	100	936 / 936	NODE_126_length_26661_cov_50.423	11715..12650	leukocidin E component	BA000033.2
lukE	100	936 / 936	NODE_126_length_26661_cov_50.423	11715..12650	leukocidin E component	HF937103.1
lukF-PV	100	978 / 978	NODE_2_length_264418_cov_76.4537	160902..161879	Panton Valentine leukocidin F component	CP012119.1
lukF-PV	100	978 / 978	NODE_2_length_264418_cov_76.4537	160902..161879	Panton Valentine leukocidin F component	HM584707.1
lukS-PV	100	939 / 939	NODE_2_length_264418_cov_76.4537	159962..160900	Panton Valentine leukocidin S component	CP012119.1
sek	100	729 / 729	NODE_12_length_109091_cov_76.0307	26035..26763	enterotoxin K	CP000255.1
seq	99.86	729 / 729	NODE_12_length_109091_cov_76.0307	26787..27514	enterotoxin Q	CP000255.1

ANEXO 9

Análisis de portación de genes codificantes de factores de virulencia a partir de los ensamblajes genómicos, utilizando el servicio online de la plataforma Center for Genomic Epidemiology, software Virulence Finder 2.0.3.

Base de Datos	<i>S.aureus_toxin</i>				
Aislamiento	Factor de Virulencia	% Identidad	Cobertura	Función Proteica	Número de Acceso
SGP_11	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP009554.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	LN626917.1
	hlgB	100.0	978 / 978	gamma-hemolysin component B precursor	BX571856.1
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	CP009554.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	AB04978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB045978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB256039.1
	Seg	99.87	771 / 778	enterotoxin G	CP002388.1
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	CP002388.1
	Sem	99.86	720 / 720	enterotoxin M	CP002388.1
	Sen	97.85	651 / 777	enterotoxin N	AP014653.1
	Seo	100.0	765 / 765	enterotoxin O	CP002388.1
SGP_29	Seu	100.0	579 / 786	enterotoxin U	CP002388.1
	edinA	99.83	1156 / 1156	epidermal cell differentiation inhibitor A	GQ900399.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP001781.1
	hlgB	100.0	977 / 977	gamma-hemolysin component B precursor	BA000018.3
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	BA000018.3
	lukD	100.0	984 / 984	leukocidin D component	BA000018.3
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	BA000018.3
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	CP001781.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	AB04978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB045978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB256039.1
	Sea	100.0	783 / 783	enterotoxin A	CP010526.1
	Sea	100.0	783 / 783	enterotoxin A	CP010526.1
	Seg	99.87	777 / 777	enterotoxin G	CP001844.2
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	BA000018.3
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	CP011147.1
	Sem	100.0	720 / 720	enterotoxin M	BA000018.3
	Sen	100.0	777 / 777	enterotoxin N	BA000018.3
	Seo	100.0	783 / 783	enterotoxin O	BA000018.3
	Seu	99.61	772 / 771	enterotoxin U	HE681097.1
SGP_63	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP010295.1
	hlgB	100.0	977 / 977	gamma-hemolysin component B precursor	AP014942.1
	hlgC	99.89	948 / 948	gamma-hemolysin component C	CP007539.1
	lukD	100.0	983 / 983	leukocidin D component	CP006838.1
	lukD	100.0	983 / 983	leukocidin D component	CP007674.1
	lukD	100.0	983 / 983	leukocidin D component	CP010300.1
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	BA000033.2
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	HF937103.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	CP012119.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	HM584707.1
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	CP012119.1
	Sek	100.0	460 / 729	enterotoxin K	CP000255.1
SGP_102	Seq	100.0	626 / 729	enterotoxin Q	CP000255.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP009554.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	LN626917.1
	hlgB	100.0	978 / 978	gamma-hemolysin component B precursor	BX571856.1
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	CP009554.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	AB04978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB045978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB256039.1
	Seg	99.87	778 / 778	enterotoxin G	CP002388.1
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	CP002388.1
	Sem	99.86	720 / 720	enterotoxin M	CP002388.1
	Sen	97.43	777 / 777	enterotoxin N	AP014653.1
SIP_29	Seo	100.0	765 / 765	enterotoxin O	CP002388.1
	Seu	100.0	786 / 786	enterotoxin U	CP002388.1
SIP_29	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP009554.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	LN626917.1

	hlgB	100.0	978 / 978	gamma-hemolysin component B precursor	BX571856.1
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	CP009554.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	AB04978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB045978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB256039.1
	Seg	99.73	752 / 778	enterotoxin G	CP002388.1
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	CP002388.1
	Sem	99.86	720 / 720	enterotoxin M	CP002388.1
GIP_04	Seo	100.0	765 / 765	enterotoxin O	CP002388.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP010295.1
	hlgB	100.0	977 / 977	gamma-hemolysin component B precursor	AP014942.1
	hlgC	99.89	948 / 948	gamma-hemolysin component C	CP007539.1
	lukD	100.0	983 / 983	leukocidin D component	CP006838.1
	lukD	100.0	983 / 983	leukocidin D component	CP007674.1
	lukD	100.0	983 / 983	leukocidin D component	CP010300.1
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	BA000033.2
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	HF937103.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	CP012119.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	HM584707.1
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	CP012119.1
GIP_64	Sek	100.0	729 / 729	enterotoxin K	CP000255.1
	Seq	99.86	729 / 729	enterotoxin Q	CP000255.1
	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	CP009554.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	BX571856.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP009554.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	LN626917.1
	hlgB	100.0	978 / 978	gamma-hemolysin component B precursor	BX571856.1
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	CP009554.1
	lukF-PV	100.0	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	AB04978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB045978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB256039.1
	Seg	99.87	778 / 778	enterotoxin G	CP002388.1
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	CP002388.1
	Sem	99.86	720 / 720	enterotoxin M	CP002388.1
	Sen	97.43	777 / 777	enterotoxin N	AP014653.1
	Seo	100.0	765 / 765	enterotoxin O	CP002388.1
SCM_71	Seu	100.0	786 / 786	enterotoxin U	CP002388.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	BA000018.3
	hlgB	100.0	977 / 977	gamma-hemolysin component B precursor	BA000018.3
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	BA000018.3
	lukD	100.0	984 / 984	leukocidin D component	BA000018.3
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	BA000018.3
	lukE	100.0	936 / 936	leukocidin E component	CP001781.1
	Seg	99.87	777 / 777	enterotoxin G	CP001844.2
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	BA000018.3
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	CP011147.1
	Sen	100.0	777 / 777	enterotoxin N	BA000018.3
	Seo	100.0	783 / 783	enterotoxin O	BA000018.3
	Seu	99.48	772 / 771	enterotoxin U	HE681097.1
	edinA	99.83	1156 / 1156	epidermal cell differentiation inhibitor A	GQ900399.1
SCM_77	hlgA	99.89	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP001781.1
	hlgB	100.0	977 / 977	gamma-hemolysin component B precursor	BA000018.3
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	BA000018.3
	lukD	100.0	984 / 984	leukocidin D component	BA000018.3
	lukE	99.89	936 / 936	leukocidin E component	BA000018.3
	lukE	99.89	936 / 936	leukocidin E component	CP001781.1
	lukF-PV	99.9	978 / 978	Panton Valentine leukocidin F component	AB04978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB045978.2
	lukS-PV	100.0	939 / 939	Panton Valentine leukocidin S component	AB256039.1
	Sea	100.0	783 / 783	enterotoxin A	CP010526.1
	Sea	100.0	783 / 783	enterotoxin A	CP010526.1
	Seg	99.87	777 / 777	enterotoxin G	CP001844.2
	Sei	100.0	726 / 729	enterotoxin I	BA000018.3
	Sei	100.0	726 / 729	enterotoxin I	CP011147.1
	Sem	100.0	720 / 720	enterotoxin M	BA000018.3
	Sen	100.0	777 / 777	enterotoxin N	BA000018.3
	Seo	100.0	783 / 783	enterotoxin O	BA000018.3
	Seu	99.61	772 / 771	enterotoxin U	HE681097.1
SHN_80	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	CP009554.1
	hlgA	100.0	930 / 930	gamma-hemolysin chain II precursor	LN626917.1
	hlgB	100.0	978 / 978	gamma-hemolysin component B precursor	BX571856.1
	hlgC	100.0	948 / 948	gamma-hemolysin component C	CP009554.1

	Sea	100.0	774 / 774	enterotoxin A	AP009351.1
	Sea	100.0	774 / 774	enterotoxin A	DQ530361.1
	Seg	99.87	778 / 778	enterotoxin G	CP002388.1
	Sei	100.0	729 / 729	enterotoxin I	CP002388.1
	Sem	99.72	720 / 720	enterotoxin M	CP002388.1
	Sen	97.3	777 / 777	enterotoxin N	AP014653.1
	Seo	100.0	745 / 765	enterotoxin O	CP002388.1
	Seu	100.0	786 / 786	enterotoxin U	CP002388.1
	Tst	100.0	705 / 705	toxic shock syndrome toxin-1	CP009554.1
Base de Datos	<i>S.aureus_hostimm</i>				
Aislamiento	Factor de Virulencia	% Identidad	Cobertura	Función Proteica	Número de Acceso
SGP_11	Sak	99.8	492 / 492	Staphylokinase	CP000253.1
	Sak	99.8	492 / 492	Staphylokinase	CP003979.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	HE681097.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	AP009351.1
SGP_29	Sak	100.0	492 / 492	staphylokinase	CP007447.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	KF831354.1
SGP_63	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP000253.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP003979.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	HE681097.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	AP009351.1
SGP_102	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP000253.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP003979.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	HE681097.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	AP009351.1
SIP_29	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP000253.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP003979.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	HE681097.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	AP009351.1
GIP_04	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP000253.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP003979.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	HE681097.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	AP009351.1
GIP_64	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP003979.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	HE681097.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	AP009351.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP000253.1
SCM_71	Sak	100.0	492 / 492	staphylokinase	CP007447.1
	Scn	99.72	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	KF831354.1
SCM_77	Sak	100.0	492 / 492	staphylokinase	CP007447.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	KF831354.1
SHN_80	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP000253.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	CP003979.1
	Sak	99.8	492 / 492	staphylokinase	HE681097.1
	Scn	100.0	351 / 351	staphylococcal complement inhibitor	AP009351.1
Base de Datos	<i>S.aureus_exoenzyme</i>				
Aislamiento	Factor de Virulencia	% Identidad	Cobertura	Función Proteica	Número de Acceso
SGP_11	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	CP009554.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	BX571856.1
SGP_29	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	BA000018.3
	splA	99.86	708 / 708	serine protease splA	BA000018.3
	splB	93.91	723 / 723	serine protease splB	AP014942.1
SGP_63	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	AP014942.1
	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	AP014942.1
	splA	99.86	708 / 708	serine protease splA	AP014942.1
	splA	99.86	708 / 708	serine protease splA	BA000033.2
	splB	99.45	723 / 723	serine protease splB	AP014942.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	AP009351.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	CP007674.1
SGP_102	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	CP009554.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	BX571856.1

SIP_29	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	CP009554.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	BX571856.1
GIP_04	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	AP014942.1
	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	AP014942.1
	splA	99.86	708 / 708	serine protease splA	AP014942.1
	splA	99.86	708 / 708	serine protease splA	BA000033.2
	splB	99.45	723 / 723	serine protease splB	AP014942.1
	splE	100.0	717 / 717	serine protease splE	AP009351.1
	splE	100.0	717 / 717	serine protease splE	CP007674.1
GIP_64	Aur	100.0	1530 / 1530	aureolysin	CP009554.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	BX571856.1
SCM_71	Aur	100.0	1530 / 1530	Aureolysin	BA000018.3
	splA	100.0	708 / 708	serine protease splA	BA000018.3
	splB	100.0	511 / 723	serine protease splB	BA000018.3
SCM_77	Aur	100.0	1530 / 1530	Aureolysin	BA000018.3
	splA	100.0	708 / 708	serine protease splA	BA000018.3
	splB	100.0	723 / 723	serine protease splB	BA000018.3
SHN_80	Aur	100.0	1530 / 1530	Aureolysin	CP009554.1
	splE	99.86	717 / 717	serine protease splE	BX571856.1

ANEXO 10

Detección de genes codificantes de Factores de Virulencia: Abricate + Virulence Factor Data Base (VFDB)

Aislamiento	Gen	%Cobertura	%Identidad	PRODUCT
SGP 11	geh	100.00	97.64	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SGP 11	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 11	esaB	100.00	98.35	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 11	essa	100.00	99.78	(essa) type VII secretion system protein Essa monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 11	esaA	100.00	99.14	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 11	esxA	100.00	99.66	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 11	cap8P	100.00	98.95	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8O	100.00	99.13	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8N	100.00	97.97	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8M	100.00	98.57	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8L	100.00	98.92	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8K	100.00	99.03	(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8J	100.00	98.92	(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8I	100.00	98.85	(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8H	100.00	98.61	(cap8H) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8H [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8G	100.00	99.02	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8F	100.00	98.38	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8E	100.00	98.74	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8D	100.00	98.19	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8C	100.00	99.61	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8B	99.85	92.86	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
SGP 11	cap8A	100.00	99.03	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
SGP 11	spa	100.00	97.90	(spa) immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SGP 11	hld	100.00	99.26	(hld) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
SGP 11	hlyB	82.07	96.44	(hlyB) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
SGP 11	map	99.15	86.07	(map) extracellular proteins Map [Eap/Map (VF0016)]**
SGP 11	clfB	99.89	90.27	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SGP 11	aur	100.00	89.08	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SGP 11	icaR	100.00	99.47	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 11	icaA	100.00	99.44	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin (PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 11	icaD	99.67	98.37	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin (PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 11	icaB	100.00	99.31	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin (PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 11	icaC	100.00	97.15	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin (PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 11	lip	100.00	98.39	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SGP 11	cna	100.00	98.23	(cna) collagen adhesin precursor [CNA (VF0005)]
SGP 11	adsA	100.00	97.15	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
SGP 11	sdrE	99.59	88.68	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDR (VF0019)]
SGP 11	hysA	98.69	92.89	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SGP 11	fnbA	90.78	88.22	(fnbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
SGP 11	clfA	100.00	90.01	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SGP 11	vWbp	98.30	82.15	(vWbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor [vWbp (VF0420)]*
SGP 11	lukS-PV	100.00	99.79	(lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
SGP 11	lukF-PV	100.00	100.00	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SGP 11	sspC	100.00	99.09	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
SGP 11	sspB	100.00	97.29	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SGP 11	sspA	96.04	94.03	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SGP 11	isdB	99.85	95.80	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SGP 11	isdA	100.00	94.18	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SGP 11	isdC	100.00	96.78	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SGP 11	isdD	100.00	98.51	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SGP 11	isdE	100.00	99.89	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SGP 11	isdF	100.00	99.07	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SGP 11	srtB	100.00	98.91	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SGP 11	isdG	100.00	99.38	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SGP 11	sak	100.00	99.39	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
SGP 11	chp	100.00	100.00	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
SGP 11	scn	100.00	100.00	(scn) complement inhibitor SCIN [SCIN (VF0425)]*

SGP 11	hysA	97.88	80.66	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SGP 11	sdrC	96.48	87.73	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP 11	sbi	100.00	94.44	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
SGP 11	hlgA	100.00	99.46	(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 11	hlgC	100.00	95.67	(hlgC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 11	hlgB	99.90	94.58	(hlgB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 11	ebp	100.00	98.77	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
SGP 29	hly/hla	100.00	99.79	(hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor [<alpha>-hemolysin (VF0001)]
SGP 29	isdG	100.00	99.69	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SGP 29	srtB	100.00	99.59	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SGP 29	isdF	100.00	99.59	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SGP 29	isdE	100.00	100.00	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SGP 29	isdD	100.00	99.72	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SGP 29	isdC	100.00	100.00	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SGP 29	isdA	100.00	100.00	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SGP 29	isdB	100.00	98.92	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SGP 29	sspA	100.00	94.95	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SGP 29	sspB	100.00	99.83	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SGP 29	sspC	100.00	99.70	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
SGP 29	clfA	92.68	89.83	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SGP 29	sdrE	99.47	95.06	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP 29	sdrD	95.23	92.80	(sdrD) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP 29	sdrC	97.00	91.88	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP 29	hlb	82.98	99.27	(hlb) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
SGP 29	hld	100.00	99.26	(hld) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
SGP 29	adsA	100.00	96.46	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
SGP 29	sea	100.00	98.84	(sea) staphylococcal enterotoxin A precursor [SE (VF0020)]
SGP 29	ebp	100.00	99.80	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
SGP 29	lukF-PV	100.00	100.00	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SGP 29	lukS-PV	100.00	99.79	(lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
SGP 29	lukF-PV	98.98	82.37	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SGP 29	hysA	98.73	94.67	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SGP 29	sbi	99.77	98.17	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
SGP 29	hlgA	100.00	99.78	(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 29	hlgC	100.00	99.47	(hlgC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 29	hlgB	100.00	99.80	(hlgB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 29	fnbB	99.22	85.83	(fnbB) fibronectin-binding protein B [FnBPs (VF0010)]
SGP 29	fnbA	91.73	95.96	(fnbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
SGP 29	clfB	96.59	90.94	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SGP 29	aur	100.00	99.67	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SGP 29	icaR	100.00	99.82	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 29	icaA	100.00	99.84	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 29	icaD	100.00	99.67	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 29	icaB	100.00	99.89	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 29	icaC	100.00	99.43	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 29	lip	100.00	98.97	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SGP 29	esxB	100.00	97.46	(esxB) type VII secretion system protein secreted protein EsxB [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	esxC	100.00	97.71	(esxC) type VII secretion system protein secreted protein EsxC [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	essC	100.00	98.47	(essC) type VII secretion system protein EssC FtsK/SpoIIIE family ATPase [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	esaB	100.00	99.59	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	essa	100.00	98.26	(essa) type VII secretion system protein EssA monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	esaA	100.00	98.91	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	esxA	100.00	100.00	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 29	cap8P	100.00	99.56	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8O	100.00	99.05	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8N	100.00	99.44	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8M	100.00	99.46	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8L	100.00	99.50	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8G	100.00	99.47	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8F	100.00	99.46	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8E	100.00	99.22	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8D	100.00	99.73	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8C	100.00	99.74	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]

SGP 29	cap8B	100.00	98.98	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
SGP 29	cap8A	100.00	99.81	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
SGP 29	geh	100.00	99.13	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SGP 29	sak	100.00	99.59	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
SGP 29	chp	100.00	99.33	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
SGP 29	scn	100.00	99.72	(scn) complement inhibitor SCIN [SCIN (VF0425)]*
SGP 29	map	80.91	89.44	(map) extracellular proteins Map [Eap/Map (VF0016)]**
SGP 29	spa	100.00	97.01	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SGP 63	sbi	99.77	97.87	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
SGP 63	hlqA	100.00	99.46	(hlqA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 63	hlqC	100.00	99.47	(hlqC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 63	hlqB	100.00	99.90	(hlqB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP 63	clfA	98.10	95.55	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SGP 63	hlb	82.98	100.00	(hlb) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
SGP 63	clfB	98.35	91.42	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SGP 63	sdrD	95.13	96.94	(sdrD) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP 63	sdrC	98.33	94.26	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP 63	spa	100.00	94.89	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SGP 63	icaB	100.00	100.00	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 63	icaD	100.00	100.00	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 63	icaA	100.00	99.92	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 63	icaR	91.80	100.00	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP 63	fnbB	98.91	86.55	(fnbB) fibronectin-binding protein B [FnBPs (VF0010)]
SGP 63	fnbA	99.64	87.68	(fnbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
SGP 63	lukF-PV	98.98	82.06	(lukF-PV) Panton-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SGP 63	aur	100.00	99.61	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SGP 63	cap8P	100.00	99.39	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8O	100.00	98.73	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8N	100.00	98.65	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8M	100.00	99.82	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8L	100.00	99.75	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SGP 63	geh	100.00	99.61	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SGP 63	esxB	100.00	99.36	(esxB) type VII secretion system protein secreted protein EsxB [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	esxC	100.00	98.73	(esxC) type VII secretion system protein secreted protein EsxC [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	essC	100.00	98.69	(essC) type VII secretion system protein EssC FtsK/SpoIIIE family ATPase [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	essB	100.00	99.92	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	esaB	100.00	100.00	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	essa	100.00	99.78	(essa) type VII secretion system protein Essa monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	esaA	100.00	99.14	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	esxA	100.00	100.00	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP 63	lukS-PV	100.00	100.00	(lukS-PV) Panton-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
SGP 63	lukF-PV	100.00	99.90	(lukF-PV) Panton-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SGP 63	ebp	100.00	98.02	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
SGP 63	adsA	100.00	96.72	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
SGP 63	sspC	100.00	99.70	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
SGP 63	sspB	100.00	99.07	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SGP 63	sspA	100.00	96.44	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SGP 63	chp	89.11	99.75	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
SGP 63	sak	100.00	99.39	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
SGP 63	hysA	98.53	90.58	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SGP 63	isdB	100.00	100.00	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SGP 63	isdA	100.00	100.00	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SGP 63	isdC	100.00	100.00	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SGP 63	isdD	100.00	99.81	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SGP 63	isdE	100.00	100.00	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SGP 63	isdF	100.00	99.69	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SGP 63	srtB	100.00	99.59	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SGP 63	isdG	100.00	100.00	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SGP 63	cap8A	88.18	98.90	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8B	100.00	98.98	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8C	100.00	99.61	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8D	100.00	99.84	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8E	100.00	99.12	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8F	100.00	99.55	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
SGP 63	cap8G	100.00	99.56	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]

SGP_63	lip	100.00	100.00	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SGP_63	acpXL	94.94	80.89	(acpXL) acyl carrier protein [LPS (CVF383)]****
SGP_63	hld	94.07	99.21	(hld) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
SGP_63	sdrE	98.69	96.62	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP_102	hysA	97.88	80.66	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SGP_102	sdrC	89.61	88.94	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP_102	sdrD	83.11	90.11	(sdrD) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP_102	sdrE	99.59	88.68	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SGP_102	hlyb	82.07	96.44	(hlyb) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
SGP_102	hld	100.00	99.26	(hld) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
SGP_102	sak	100.00	99.39	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
SGP_102	chp	100.00	100.00	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
SGP_102	scn	100.00	100.00	(scn) complement inhibitor SCIN [SCIN (VF0425)]*
SGP_102	map	99.15	86.07	(map) extracellular proteins Map [Eap/Map (VF0016)]**
SGP_102	geh	100.00	97.64	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SGP_102	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP_102	esaB	100.00	98.35	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP_102	essA	100.00	99.78	(essA) type VII secretion system protein EssA monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP_102	esaA	100.00	99.14	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP_102	esxA	100.00	99.66	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SGP_102	cap8P	100.00	98.95	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8O	100.00	99.13	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8N	100.00	97.97	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8M	100.00	98.57	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8L	100.00	98.92	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8K	100.00	99.03	(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8J	100.00	98.92	(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8I	100.00	98.85	(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8H	100.00	98.61	(cap8H) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8H [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8G	100.00	99.02	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8F	100.00	98.38	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8E	100.00	98.74	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8D	100.00	98.19	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8C	100.00	99.61	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8B	99.85	92.86	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
SGP_102	cap8A	100.00	99.03	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
SGP_102	spa	100.00	97.90	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SGP_102	hysA	98.69	92.89	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SGP_102	sbi	100.00	94.44	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
SGP_102	hlgA	100.00	99.46	(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP_102	hlgC	100.00	95.67	(hlgC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP_102	hlgB	99.90	94.58	(hlgB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SGP_102	clfB	99.89	90.27	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SGP_102	aur	100.00	89.08	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SGP_102	icaR	100.00	99.47	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP_102	icaA	100.00	99.44	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP_102	icaD	99.67	98.37	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP_102	icaB	100.00	99.31	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP_102	icaC	100.00	97.15	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SGP_102	lip	100.00	98.39	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SGP_102	adsA	100.00	97.15	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
SGP_102	wWbp	98.30	82.15	(wWbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor [wWbp (VF0420)]*
SGP_102	clfA	92.75	89.35	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SGP_102	hly/hla	100.00	94.69	(hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor [<alpha>-hemolysin (VF0001)]
SGP_102	isdG	100.00	99.38	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SGP_102	srtB	100.00	98.91	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SGP_102	isdF	100.00	99.07	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SGP_102	isdE	100.00	99.89	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SGP_102	isdD	100.00	98.51	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SGP_102	isdC	100.00	96.78	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SGP_102	isdA	100.00	94.18	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SGP_102	isdB	99.85	95.80	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SGP_102	sspA	96.04	94.03	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SGP_102	sspB	100.00	97.29	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SGP_102	sspC	100.00	99.09	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]

SGP_102	ebp	100.00	98.77	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
SGP_102	lukF-PV	100.00	100.00	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SGP_102	lukS-PV	100.00	99.79	(lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
SIP_29	sbi	100.00	94.44	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
SIP_29	hlqA	100.00	99.46	(hlqA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SIP_29	hlqC	100.00	95.67	(hlqC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SIP_29	hlqB	99.90	94.58	(hlqB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SIP_29	fmbA	90.78	88.22	(fmbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
SIP_29	isdB	99.85	95.80	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SIP_29	isdA	100.00	94.18	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SIP_29	isdC	100.00	96.78	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SIP_29	isdD	100.00	98.51	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SIP_29	isdE	100.00	99.89	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SIP_29	isdF	100.00	99.07	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SIP_29	srtB	100.00	98.91	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SIP_29	isdG	100.00	99.38	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SIP_29	sspA	96.04	94.03	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SIP_29	sspB	100.00	97.29	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SIP_29	sspC	100.00	99.09	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
SIP_29	ebp	100.00	98.77	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
SIP_29	lukF-PV	100.00	100.00	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SIP_29	lukS-PV	100.00	99.79	(lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
SIP_29	cap8A	100.00	99.03	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8B	99.85	92.86	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8C	100.00	99.61	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8D	100.00	98.19	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8E	100.00	98.74	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8F	100.00	98.38	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8G	100.00	99.02	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
SIP_29	geh	100.00	97.64	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SIP_29	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SIP_29	esaB	100.00	98.35	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SIP_29	essA	100.00	99.78	(essA) type VII secretion system protein EssA monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SIP_29	esaA	100.00	99.14	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SIP_29	esxA	100.00	99.66	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SIP_29	adsA	100.00	97.15	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
SIP_29	spa	100.00	97.90	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SIP_29	map	99.15	86.07	(map) extracellular proteins Map [Eap/Map (VF0016)]**
SIP_29	vWbp	98.30	82.15	(vWbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor [vWbp (VF0420)]*
SIP_29	clfA	92.75	89.35	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SIP_29	cap8P	100.00	98.95	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8O	100.00	99.13	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8N	100.00	97.97	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8M	100.00	98.57	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8L	100.00	98.92	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8K	100.00	99.03	(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8J	100.00	98.92	(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J [Capsule (VF0003)]
SIP_29	cap8I	100.00	98.85	(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I [Capsule (VF0003)]
SIP_29	hysA	97.88	80.66	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SIP_29	hysA	98.69	92.89	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SIP_29	clfB	99.89	90.27	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SIP_29	aur	100.00	89.08	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SIP_29	icaR	100.00	99.47	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SIP_29	icaA	100.00	99.44	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SIP_29	icaD	99.67	98.37	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SIP_29	icaB	100.00	99.31	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SIP_29	icaC	100.00	97.15	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SIP_29	lip	100.00	98.39	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SIP_29	cna	100.00	98.23	(cna) collagen adhesin precursor [CNA (VF0005)]
SIP_29	sdrC	96.48	87.73	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SIP_29	sdrE	99.59	88.68	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
GIP_4	sdrC	98.95	94.89	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
GIP_4	fmbA	99.64	87.68	(fmbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
GIP_4	fmbB	98.91	86.55	(fmbB) fibronectin-binding protein B [FnBPs (VF0010)]

GIP_4	spa	100.00	96.27	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
GIP_4	lukS-PV	100.00	100.00	(lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
GIP_4	lukF-PV	100.00	99.90	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
GIP_4	ebp	100.00	97.95	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
GIP_4	chp	100.00	100.00	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
GIP_4	sak	100.00	99.39	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
GIP_4	hlb	82.98	100.00	(hlb) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
GIP_4	hld	100.00	99.26	(hld) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
GIP_4	sbi	99.77	97.79	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
GIP_4	hlga	100.00	99.46	(hlga) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
GIP_4	hlgc	100.00	99.47	(hlgc) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
GIP_4	hlgb	100.00	99.90	(hlgb) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
GIP_4	esxB	100.00	99.36	(esxB) type VII secretion system protein secreted protein EsxB [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	esaC	100.00	98.73	(esaC) type VII secretion system protein secreted protein EsxC [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	essC	100.00	98.69	(essC) type VII secretion system protein EssC FtsK/SpolIIE family ATPase [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	essB	100.00	99.92	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	esaB	100.00	100.00	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	essa	100.00	99.78	(essa) type VII secretion system protein Essa monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	esaA	100.00	99.14	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	esxA	100.00	100.00	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP_4	lukF-PV	98.98	82.06	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
GIP_4	coa	98.58	80.34	(coa) staphylocoagulase precursor [Staphylocoagulase (VF0421)]
GIP_4	cap8P	100.00	99.39	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8O	100.00	98.65	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8N	100.00	98.65	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8M	100.00	99.82	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8L	100.00	99.75	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8G	100.00	99.56	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8F	100.00	99.55	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8E	100.00	98.93	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8D	100.00	99.84	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8C	100.00	99.48	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8B	100.00	98.98	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
GIP_4	cap8A	100.00	99.42	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
GIP_4	map	100.00	99.60	(map) extracellular proteins Map [Eap/Map (VF0016)]**
GIP_4	hysA	98.53	90.58	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
GIP_4	sspC	100.00	99.70	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
GIP_4	sspB	100.00	99.07	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
GIP_4	sspA	100.00	96.44	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
GIP_4	isdB	100.00	100.00	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
GIP_4	isdA	100.00	100.00	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
GIP_4	isdC	100.00	100.00	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
GIP_4	isdD	100.00	99.81	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
GIP_4	isdE	100.00	100.00	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
GIP_4	isdF	100.00	99.69	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
GIP_4	srtB	100.00	99.59	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
GIP_4	isdG	100.00	100.00	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
GIP_4	selq	99.86	97.67	(selq) staphylococcal enterotoxin G precursor [SE (VF0020)]
GIP_4	selk	100.00	96.57	(selk) staphylococcal enterotoxin K precursor [SE (VF0020)]
GIP_4	vWbp	100.00	99.94	(vWbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor [vWbp (VF0420)]*
GIP_4	clfA	98.10	95.55	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
GIP_4	geh	100.00	99.61	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
GIP_64	hysA	98.69	92.89	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
GIP_64	sbi	100.00	94.44	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
GIP_64	hlga	100.00	99.46	(hlga) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
GIP_64	hlgc	100.00	95.67	(hlgc) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
GIP_64	hlgb	99.90	94.58	(hlgb) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
GIP_64	fnbA	90.78	88.22	(fnbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
GIP_64	sspC	100.00	99.09	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
GIP_64	sspB	100.00	97.29	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
GIP_64	sspA	96.04	94.03	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
GIP_64	spa	100.00	97.90	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
GIP_64	map	99.15	86.07	(map) extracellular proteins Map [Eap/Map (VF0016)]**
GIP_64	scn	100.00	100.00	(scn) complement inhibitor SCIN [SCIN (VF0425)]*
GIP_64	chp	100.00	100.00	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
GIP_64	sak	100.00	99.39	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]

GIP 64	hld	100.00	99.26	(hld) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
GIP 64	hly	82.07	96.44	(hly) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
GIP 64	hysA	97.88	80.66	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
GIP 64	clfB	99.89	90.27	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
GIP 64	aur	100.00	89.08	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
GIP 64	icaR	100.00	99.47	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
GIP 64	icaA	100.00	99.44	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
GIP 64	icaD	99.67	98.37	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
GIP 64	icaB	100.00	99.31	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
GIP 64	icaC	100.00	97.15	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
GIP 64	lip	100.00	98.39	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
GIP 64	adsA	100.00	97.15	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
GIP 64	lukF-PV	100.00	100.00	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
GIP 64	lukS-PV	100.00	99.79	(lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
GIP 64	Wbp	98.30	82.15	(Wbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor [Wbp (VF0420)]*
GIP 64	clfA	92.75	89.35	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
GIP 64	geh	100.00	97.59	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
GIP 64	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP 64	esaB	100.00	98.35	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP 64	essA	100.00	99.78	(essA) type VII secretion system protein EssA monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP 64	esaA	100.00	99.14	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP 64	esxA	100.00	99.66	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
GIP 64	cap8A	100.00	99.03	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8B	99.85	92.86	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8C	100.00	99.61	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8D	100.00	98.19	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8E	100.00	98.74	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8F	100.00	98.38	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8G	100.00	99.02	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8H	100.00	98.61	(cap8H) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8H [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8I	100.00	98.85	(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8J	100.00	98.92	(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8K	100.00	99.03	(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8L	100.00	98.92	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8M	100.00	98.57	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8N	100.00	97.97	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8O	100.00	99.13	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
GIP 64	cap8P	100.00	98.95	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
GIP 64	ebp	100.00	98.77	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
GIP 64	isdB	99.85	95.80	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
GIP 64	isdA	100.00	94.18	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
GIP 64	isdC	100.00	96.78	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
GIP 64	isdD	100.00	98.51	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
GIP 64	isdE	100.00	99.89	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
GIP 64	isdF	100.00	99.07	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
GIP 64	srtB	100.00	98.91	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
GIP 64	isdG	100.00	99.38	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
GIP 64	hly/hla	100.00	94.69	(hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor [<alpha>-hemolysin (VF0001)]
SCM 71	fmbB	99.22	85.83	(fmbB) fibronectin-binding protein B [FnBPs (VF0010)]
SCM 71	fmbA	91.73	95.96	(fmbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
SCM 71	clfB	96.59	90.94	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SCM 71	aur	100.00	99.67	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SCM 71	icaR	100.00	99.82	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 71	icaA	100.00	99.84	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 71	icaD	100.00	99.67	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 71	icaB	100.00	99.89	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 71	icaC	100.00	99.43	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 71	lip	100.00	98.97	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SCM 71	hysA	98.73	94.67	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SCM 71	hlgB	100.00	99.80	(hlgB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SCM 71	hlgC	100.00	99.47	(hlgC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SCM 71	hlgA	100.00	99.68	(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SCM 71	sbi	99.77	98.17	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]

SCM 71	geh	92.33	99.11	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SCM 71	clfA	92.68	89.83	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SCM 71	lukF-PV	98.98	82.37	(lukF-PV) Panton-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SCM 71	scn	100.00	99.43	(scn) complement inhibitor SCIN [SCIN (VF0425)]*
SCM 71	sak	100.00	99.59	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
SCM 71	sdrC	99.93	93.12	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SCM 71	sdrD	95.23	92.77	(sdrD) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SCM 71	sdrE	99.47	95.00	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SCM 71	adsA	100.00	96.42	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
SCM 71	hly/hla	83.02	99.88	(hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor [<alpha>-hemolysin (VF0001)]
SCM 71	isdB	100.00	98.97	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SCM 71	isdA	100.00	100.00	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SCM 71	isdC	100.00	100.00	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SCM 71	isdD	100.00	99.72	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SCM 71	isdE	100.00	100.00	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SCM 71	isdF	100.00	99.69	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SCM 71	srtB	100.00	99.59	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SCM 71	isdG	100.00	99.69	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SCM 71	esxB	100.00	97.46	(esxB) type VII secretion system protein secreted protein EsxB [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	esaC	100.00	97.71	(esaC) type VII secretion system protein secreted protein EsxC [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	essC	100.00	98.51	(essC) type VII secretion system protein EssC FtsK/SpoIIIE family ATPase [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	esaB	100.00	99.59	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	essa	100.00	98.26	(essa) type VII secretion system protein EssA monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	esaA	100.00	98.91	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	esxA	100.00	100.00	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 71	cap8P	100.00	99.56	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8O	100.00	99.05	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8N	100.00	99.44	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8M	100.00	99.64	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8L	100.00	99.50	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8G	100.00	99.56	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8F	100.00	99.46	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8E	100.00	99.22	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8D	100.00	99.73	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8C	100.00	99.74	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8B	100.00	98.98	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
SCM 71	cap8A	100.00	99.81	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
SCM 71	spa	100.00	95.35	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SCM 71	sspA	100.00	94.85	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SCM 71	sspB	100.00	99.83	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SCM 71	sspC	100.00	99.39	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
SCM 71	hly	82.98	99.27	(hly) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
SCM 71	hlyD	100.00	99.26	(hlyD) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
SCM 71	ebp	100.00	99.80	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
SCM 71	hysA	98.73	94.72	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SCM 77	sbi	99.77	98.17	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
SCM 77	hlgA	100.00	99.68	(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SCM 77	hlgC	100.00	99.47	(hlgC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SCM 77	hlgB	100.00	99.80	(hlgB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SCM 77	hly/hla	100.00	99.79	(hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor [<alpha>-hemolysin (VF0001)]
SCM 77	clfA	92.68	89.38	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SCM 77	spa	100.00	97.01	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SCM 77	hlyD	100.00	99.26	(hlyD) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
SCM 77	isdG	100.00	99.69	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SCM 77	srtB	100.00	99.59	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SCM 77	isdF	100.00	99.69	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SCM 77	isdE	100.00	100.00	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SCM 77	isdD	100.00	99.72	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SCM 77	isdC	100.00	100.00	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SCM 77	isdA	100.00	100.00	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SCM 77	isdB	100.00	98.97	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SCM 77	sspA	100.00	94.85	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SCM 77	sspB	100.00	99.83	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SCM 77	sspC	100.00	99.70	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
SCM 77	adsA	100.00	96.46	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]

SCM 77	geh	100.00	99.13	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SCM 77	esxB	100.00	97.46	(esxB) type VII secretion system protein secreted protein EsxB [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	esaC	100.00	97.71	(esaC) type VII secretion system protein secreted protein EsxC [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	essC	100.00	98.47	(essC) type VII secretion system protein EssC FtsK/SpoIIIE family ATPase [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	esaB	100.00	99.59	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	essA	100.00	98.26	(essA) type VII secretion system protein EssA monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	esaA	100.00	98.91	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	esxA	100.00	100.00	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SCM 77	cap8P	100.00	99.56	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8O	100.00	99.05	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8N	100.00	99.44	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8M	100.00	99.64	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8L	100.00	99.42	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8G	100.00	99.56	(cap8G) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8G [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8F	100.00	99.46	(cap8F) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8F [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8E	100.00	99.22	(cap8E) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8D	100.00	99.73	(cap8D) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8C	100.00	99.74	(cap8C) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8B	100.00	98.98	(cap8B) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B [Capsule (VF0003)]
SCM 77	cap8A	100.00	99.81	(cap8A) capsular polysaccharide synthesis enzyme [Capsule (VF0003)]
SCM 77	hIb	82.98	99.27	(hIb) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
SCM 77	chp	100.00	99.33	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
SCM 77	sak	100.00	99.59	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
SCM 77	fnbB	99.22	85.83	(fnbB) fibronectin-binding protein B [FnBPs (VF0010)]
SCM 77	fnbA	91.73	95.96	(fnbA) fibronectin-binding protein A [FnBPs (VF0010)]
SCM 77	clfB	87.11	91.95	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SCM 77	aur	100.00	99.67	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SCM 77	icaR	100.00	99.82	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 77	icaA	100.00	99.84	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 77	icaD	100.00	99.67	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 77	icaB	100.00	99.89	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 77	icaC	100.00	99.43	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SCM 77	lip	100.00	98.97	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SCM 77	sea	100.00	98.84	(sea) staphylococcal enterotoxin A precursor [SE (VF0020)]
SCM 77	sdrE	99.47	95.06	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SCM 77	sdrD	94.86	92.66	(sdrD) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SCM 77	sdrC	99.93	92.98	(sdrC) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SCM 77	ebp	100.00	99.80	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]
SCM 77	lukF-PV	100.00	99.90	(lukF-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain F precursor [PVL (VF0018)]
SCM 77	lukS-PV	100.00	99.79	(lukS-PV) Pantone-Valentine leukocidin chain S precursor [PVL (VF0018)]
SCM 77	map	80.91	89.44	(map) extracellular proteins Map [Eap/Map (VF0016)]**
SHN 80	cap8I	100.00	98.85	(cap8I) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8I [Capsule (VF0003)]
SHN 80	cap8J	100.00	98.92	(cap8J) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8J [Capsule (VF0003)]
SHN 80	cap8K	100.00	99.03	(cap8K) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8K [Capsule (VF0003)]
SHN 80	cap8L	100.00	98.92	(cap8L) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L [Capsule (VF0003)]
SHN 80	cap8M	100.00	98.57	(cap8M) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M [Capsule (VF0003)]
SHN 80	cap8N	100.00	98.09	(cap8N) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N [Capsule (VF0003)]
SHN 80	cap8O	100.00	99.13	(cap8O) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O [Capsule (VF0003)]
SHN 80	cap8P	100.00	98.95	(cap8P) capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P [Capsule (VF0003)]
SHN 80	esxA	100.00	99.66	(esxA) type VII secretion system protein secreted protein EsxA [Type VII secretion system (VF0403)]
SHN 80	esaA	100.00	99.14	(esaA) type VII secretion system protein EsaA [Type VII secretion system (VF0403)]
SHN 80	essA	100.00	99.78	(essA) type VII secretion system protein EssA monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SHN 80	esaB	100.00	98.35	(esaB) type VII secretion system protein EsaB [Type VII secretion system (VF0403)]
SHN 80	essB	100.00	99.03	(essB) type VII secretion system protein EssB monotopic membrane protein [Type VII secretion system (VF0403)]
SHN 80	geh	100.00	97.69	(geh) glycerol ester hydrolase [Lipase (VF0012)]
SHN 80	adsA	100.00	97.15	(adsA) Adenosine synthase A [AdsA (VF0422)]
SHN 80	spa	100.00	97.01	(spa) Immunoglobulin G binding protein A precursor [SpA (VF0017)]
SHN 80	hysA	98.69	92.97	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SHN 80	icaR	100.00	99.47	(icaR) ica operon transcriptional regulator IcaR [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SHN 80	icaA	100.00	99.44	(icaA) N-acetylglucosaminyltransferase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SHN 80	icaD	100.00	98.37	(icaD) intercellular adhesion protein D involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SHN 80	icaB	100.00	99.31	(icaB) N-deacetylase involved in polysaccharide intercellular adhesin(PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]

SHN 80	icaC	100.00	97.06	(icaC) intercellular adhesion protein C involved in polysaccharide intercellular adhesin (PIA) synthesis [Intercellular adhesion proteins (VF0014)]
SHN 80	lip	100.00	98.39	(lip) triacylglycerol lipase precursor [Lipase (CVF091)]
SHN 80	hly	82.98	96.00	(hly) beta-hemolysin [<beta>-hemolysin (VF0002)]***
SHN 80	tsst-1	100.00	99.86	(tsst-1) toxic shock syndrome toxin-1 [TSST-1 (VF0022)]****
SHN 80	hly/hla	100.00	94.58	(hly/hla) Alpha-Hemolysin precursor [<alpha>-hemolysin (VF0001)]
SHN 80	isdG	100.00	99.07	(isdG) iron-regulated surface determinant protein G [Isd (VF0015)]
SHN 80	srtB	100.00	98.91	(srtB) NPQTN specific sortase B [Isd (VF0015)]
SHN 80	isdF	100.00	99.07	(isdF) iron-regulated surface determinant protein F ATP-binding-cassette-type transmembrane transporter [Isd (VF0015)]
SHN 80	isdE	100.00	99.89	(isdE) iron-regulated surface determinant protein E [Isd (VF0015)]*
SHN 80	isdD	100.00	98.51	(isdD) iron-regulated surface determinant protein D [Isd (VF0015)]
SHN 80	isdC	100.00	96.78	(isdC) iron-regulated surface determinant protein C [Isd (VF0015)]*
SHN 80	isdA	100.00	94.27	(isdA) iron-regulated surface determinant protein A [Isd (VF0015)]*
SHN 80	isdB	99.85	95.21	(isdB) iron-regulated surface determinant protein B haemoglobin receptor [Isd (VF0015)]*
SHN 80	sspA	96.04	94.03	(sspA) serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase [V8 protease (VF0023)]
SHN 80	sspB	100.00	97.21	(sspB) staphopain cysteine proteinase SspB [Staphopain (VF0006)]
SHN 80	sspC	100.00	99.09	(sspC) Staphostatin B [Staphopain (VF0006)]
SHN 80	sdrE	99.24	88.43	(sdrE) Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein [SDr (VF0019)]
SHN 80	clfA	92.54	89.68	(clfA) Clumping factor A fibrinogen-binding protein [Clumping factor (VF0004)]
SHN 80	vwbp	98.23	82.15	(vwbp) secreted von Willebrand factor-binding protein precursor [vwbp (VF0420)]*
SHN 80	hysA	97.83	80.70	(hysA) hyaluronate lyase precursor [Hyaluronate lyase (VF0013)]
SHN 80	sbi	100.00	94.44	(sbi) IgG-binding protein SBI [Sbi (VF0423)]
SHN 80	hlgA	100.00	99.46	(hlgA) gamma-hemolysin chain II precursor [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SHN 80	hlgC	100.00	95.67	(hlgC) gamma-hemolysin component C [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SHN 80	hlgB	99.90	94.58	(hlgB) gamma-hemolysin component B [<gamma>-hemolysin (VF0011)]
SHN 80	hld	94.07	99.21	(hld) delta-hemolysin [<delta>-hemolysin (VF0007)]
SHN 80	chp	100.00	100.00	(chp) chemotaxis-inhibiting protein CHIPS [CHIPS (VF0424)]*
SHN 80	sak	100.00	99.39	(sak) Staphylokinase precursor [Staphylokinase (VF0021)]
SHN 80	sea	100.00	98.71	(sea) staphylococcal enterotoxin A precursor [SE (VF0020)]
SHN 80	clfB	88.44	91.82	(clfB) Clumping factor B adhesin [Clumping factor (VF0004)]
SHN 80	aur	100.00	89.08	(aur) zinc metalloproteinase aureolysin [Aureolysin (VF0024)]
SHN 80	ebp	100.00	98.84	(ebp) cell surface elastin binding protein [EbpS (VF0008)]

Las cepas de referencia fueron:

[Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2]

*[Staphylococcus aureus subsp. aureus str. Newman]

**[Staphylococcus aureus str. Newman D2C (ATCC 25904)]

***[Staphylococcus aureus subsp. aureus COL]

**** [Staphylococcus aureus subsp. aureus N315]

***** [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]

ANEXO 11

Artículo publicado como producto de los resultados parciales de la tesis

Primer autor: Fátima Rodríguez (doctorando)

Revista The Journal of Infection in Developing Countries (Indexada en Scopus y Thompson Reuters)



Original Article

Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clones from Paraguayan children

Fátima Rodríguez^{1*}, Claudia Salinas^{1*}, Silvina Fernández², Sol Haim², Marta Mollerach², Wilma Basualdo^{3,4}, Héctor Castro^{3,4}, Beatriz Quiñónez³, Rocío Arguello³, Mónica Rodríguez⁴, Lorena Grau⁴, Carmen Espínola⁴, Gladys Velázquez⁴, Gloria Samudio⁵, Gloria Gómez⁵, Ana Campuzano⁶, Juana Ortellado⁶, Patricia Almada⁶, Rosa Guillén^{1*}

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay

² Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

³ Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, San Lorenzo, Paraguay

⁴ Instituto de Previsión Social, Asunción, Paraguay

⁵ Hospital Nacional de Itauguá, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Itauguá, Paraguay

⁶ Hospital de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción San Lorenzo, Paraguay

* Authors equally contributed to this work.

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* is considered one of the most important human pathogens, and its levels of resistance to methicillin have increased even in strains isolated from people without nosocomial risk factors. Molecular analysis is essential for understanding the patterns of dissemination. The objective of this study was to identify community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) clones that infected Paraguayan children patients in two periods of time.

Methodology: An observational, descriptive study was designed to determine the genetic variability of 115 isolates of CA-MRSA recovered from children who attended four reference centers in Paraguay between 2009-2010 and 2012-2013.

Results: The combined use of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multi-Locus Sequencing Typing, Multi-Locus Variable Analysis (MLVA) and *Spa* typing techniques allowed the identification of two dominant clones: ST30-IV-t019 (77%) and ST5-IV-t311 (10%), and the establishment of the former as the leading cause of CA-MRSA infections in children during the study period.

Conclusions: This is the first study that provides epidemiological information as well as microbiological and molecular characteristics of CA-MRSA isolates recovered from children from Asunción and the Central Department of Paraguay.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA; children; community-associated.

J Infect Dev Ctries 2020; 14(3):290-297. doi:10.3855/jidc.12108

(Received 14 October 2019 – Accepted 24 February 2020)

Copyright © 2020 Rodríguez *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates were once confined mostly to hospitals, healthcare environments, and their patients. Since the 1990s, virulent community-acquired MRSA (CA-MRSA) clones spread worldwide, first in the community in healthy young patients, but later also in healthcare facilities [1]. They have been associated predominantly with skin and soft tissue infections (SSTIs), but due to the invasive nature of this pathogen and the carriage of antibiotic resistance and virulence factors genes (mainly the toxin Pantón-Valentine Leukocidin, PVL), they have also been linked to severe

clinical syndromes such as necrotizing pneumonia, osteomyelitis, meningitis, sepsis, and death. However, the frontier between CA-MRSA and healthcare-associated MRSA (HA-MRSA) has begun to fade [1,2].

Different CA-MRSA lineages have been described worldwide: ST1 reported in Asia, Europe, and the United States; ST8 in Europe, and the United States; ST30 in Australia, Europe, and South America; ST59 in Asia and the United States and ST80 in Asia, Europe, the Middle East, and Africa. Some african studies also reveal other frequent sequence types in addition to the ST80, such as ST22 and ST239. This global ST239 was also common in other countries, such as China and

Taiwan. Clones ST8-IV, also known as USA300, and ST30-IV, Southwest Pacific clone (SWP), have spread globally and are considered pandemic [3–5].

In South America, the MRSA lineages found most frequently (including CA-MRSA and HA-MRSA) are the Pediatric clone (CC5-ST5-IV), the Cordobés/Chilean clone (CC5-ST5-I), the SWP clone (CC30-ST30-IV), the Brazilian clone (CC8-ST239-III) and the New York/Japan (CC5-ST5-II) clone [6].

In Argentina, the main clone recovered from patients with CA-MRSA invasive infections between 2010 and 2011 was CC30-ST30-IV-t019-PVL positive, which has become predominant and replaced the previously described CA-MRSA clone: CC5-ST5-IV-t311-PVL positive [7].

Information about MRSA clones circulating in Paraguay is limited to one report of two HA-MRSA clones, but there is no information about those circulating in the community. The objective of this study was to identify the CA-MRSA clones that infected Paraguayan children patients in two periods of time: 2009-2010 and 2012-2013.

Methodology

An observational, descriptive, and cross-sectional study was designed to analyze phenotypic and molecular characteristics of CA-MRSA isolates recovered from Paraguayan children.

S. aureus isolates recovered in two phases; phase one between 2009-2010 and phase two between 2012-2013, from children under sixteen years old attending four reference hospitals from Asunción and the Central Department of Paraguay, were collected. The isolates were recovered from different clinical specimens, including skin and soft tissue secretions, pleural, cerebrospinal, peritoneal body fluids and blood, and stored at -80°C at the Health Sciences Research Institute (IICS in Spanish). Identification data, epidemiology files, and records of antimicrobial susceptibility were provided by the microbiology laboratories of the participating hospitals.

Only CA-MRSA recovered from both study phases were characterized molecularly. CA-MRSA infection was defined according to the CDC criteria by a positive MRSA culture at the time of hospital admission or within the 48 h after hospital admission and the absence of HA-MRSA associated risk factors [8].

Identification of the isolates was based on standard bacteriological methods, including cultural characteristics, Gram's stain and biochemical tests such as oxidative/fermentative, catalase and coagulase tube tests. The phenotypic identification process was carried

out too by testing the beta hemolysis and pigment production and analyzing the morphology of the colony on sheep blood agar. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing was done by the Kirby-Bauer diffusion method, using Oxoid/BBI discs following the criteria recommended by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) from 2009 to 2013, according to the strain collection date or by automated systems using Vitek®2 (BioMérieux, La Balme, French) following the manufacturer's instructions. D-test was also performed. Results were interpreted based on CLSI breakpoints [9,10].

The strains were cultured on TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Le Pont de Claix, France) medium and incubated at 35°C for 24-48 hours under 5% CO₂ for subsequent extraction using a commercial genomic DNA extraction kit (Wizard Genomic, Promega, Madison, USA), following the manufacturer's instructions. The amplification of 16S rRNA genes was performed according to conditions described by Manfredi *et al.* to recognize genus *Staphylococcus* [11].

The detection of *mecA* and Panton-Valentine leukocidin (PVL) coding genes (*lukS/F-PV*) were carried out as previously described [12]. Genes encoding enterotoxins: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh* were detected as described elsewhere [11,13]. Detection of genes encoding hemolysins (*hla* and *hlb*) and exfoliative toxins (*eta* and *etb*) was carried out using oligonucleotides and protocols described by Wang *et al.* and Johnson *et al.* respectively [14,15].

The *SCCmec* types were determined by PCR with a simplified version of Kondo's typing system [16].

The polymorphic region of the *spa* gene was amplified by PCR with primers described by Shopsis *et al.*, 1999 [17]. DNA sequences (Macrogen, Seoul, Korea) were analyzed, and *spa*-types were determined with the Ridom Spa Server [18].

Multiple-Locus Variable Analysis (MLVA) was performed using five pairs of oligonucleotides amplifying seven VNTR loci (*clfA*, *clfB*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *spa*, and *sspA*), followed by polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% separator, 5% concentrator) staining with silver nitrate to visualize the products [19]. Gels were digitized using UN SCAN IT GEL software, and the data was analyzed. All the strains with bands of equal size or up to 1 band of difference (≥ 85% similarity) were included in the same cluster, following the criterion used by Malachowa *et al.* 2005. Clusters were numbered for identification as recommended by Sabat *et al.* 2003 [19,20].

All the CA-MRSA were studied by MLVA, spa typing, and virulence profile. Isolates that presented

differences in *Spa* typing and virulence profile were chosen as representatives of each MLVA cluster for PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), performed with *SmaI* as previously described [18,21]. In the process, the clones ST5-IV-t311-PVL positive, ST30-IV-t019-PVL positive, and ST8-IV-t008-PVL positive (USA 300) were included as references [7,21,22]. PFGE analysis was carried out by visual inspection, and the dendrogram was constructed (FigTree v1.4.0 software) applying the algorithm for cluster analysis (UPGMA, applying unweighted pair-group method clustering analysis) and the Dice's coefficient. Isolates with similar band patterns (> 80%) were considered to belong to the same pulsotype.

Representative isolates of the major pulsotypes were studied by multilocus sequence typing (MLST), by amplification and posterior sequencing (Macrogen, Seoul, Korea) of seven constitutive loci (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi*) performed as previously described [23]. Sequences were analyzed with the MLST database (<http://saureus.mlst.net>).

The statistical analyses were carried out with the Epi Info software (v 7.2.) and the calculations with Fisher's Exact or Chi-Square Test as appropriate.

Ethical considerations

The study was approved by the Scientific and Ethics Committee of the IICS, Universidad Nacional de Asunción (UNA) (P29/2011 and P44/2012). The samples were strictly managed by codes, and the results obtained were exclusively used for epidemiological purposes.

Results

In this study, a total of 281 community-acquired *S. aureus* (CA-SA) isolates were collected (113 CA-SA from phase one and 168 CA-SA from phase two): 115 (41%) were MRSA. The prevalence of CA-MRSA was 21% (24/113) between 2009-2010 and 54% (91/168) between 2012-2013. Eighty-five CA-MRSA isolates (74%) caused skin and soft tissue infections (SSTI), and 30 (26%), invasive diseases (sepsis, osteomyelitis, and pneumonia).

Antimicrobial resistance analysis of CA-MRSA isolates (N = 115) showed susceptibility to tetracycline (100%), tigecycline (100%), teicoplanin (100%), and vancomycin (100%) in all tested isolates. Most CA-MRSA isolates (95%) were resistant to penicillin. Chloramphenicol was the second antibiotic with the highest level of global resistance (21%: 38% phase one and 16% phase two), followed by erythromycin (17%: 21% phase one and 16% phase two), inducible

Table 1. Molecular characteristics of CA-MRSA isolates (N = 115).

PT	ST	CC	spa type	MLVA	Virulence genes	CA-MRSA isolates (N = 115)
A	ST30	30	t019	M1	-	44
					lukS/F-PV	41
			t975	M2	lukS/F-PV, hIB	1
					lukS/F-PV, hIA, hIB	2
					lukS/F-PV	1
t975	M3	-	1			
		lukS/F-PV	1			
B	ST30	30	t363	M4	lukS/F-PV	1
C	ST30	30	t021	M5	-	1
D	ST8	8	t11770	M6	lukS/F-PV, hIA, hIB, seB	1
E	ST25	No data	t081	M7	-	1
F	ST435	30	t021	M8	lukS/F-PV	1
G	ST5	5	t311	M10	-	1
					lukS/F-PV	6
					lukS/F-PV, hIA	3
					hIA	1
					lukS/F-PV, hIA, seA	1
			t002	M11	-	1
			t1791	M9	hIA	1
H	ST5	5	t7078	M12	lukS/F-PV	1
					-	1
I	ST100	5	t002	M13	hIA	2
					ST669	97
J	ST72	8	t148	M15	hIA	1

PT: Pulsotype; ST: Sequence type; CC: Clonal complex; -: No virulence factor gene detected.

clindamycin resistance (15%: 8% phase one and 16% phase two) and gentamicin (7%: 17% phase one and 4% phase two). Global resistance levels to ciprofloxacin, rifampicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole were lower than 3% (N = 4).

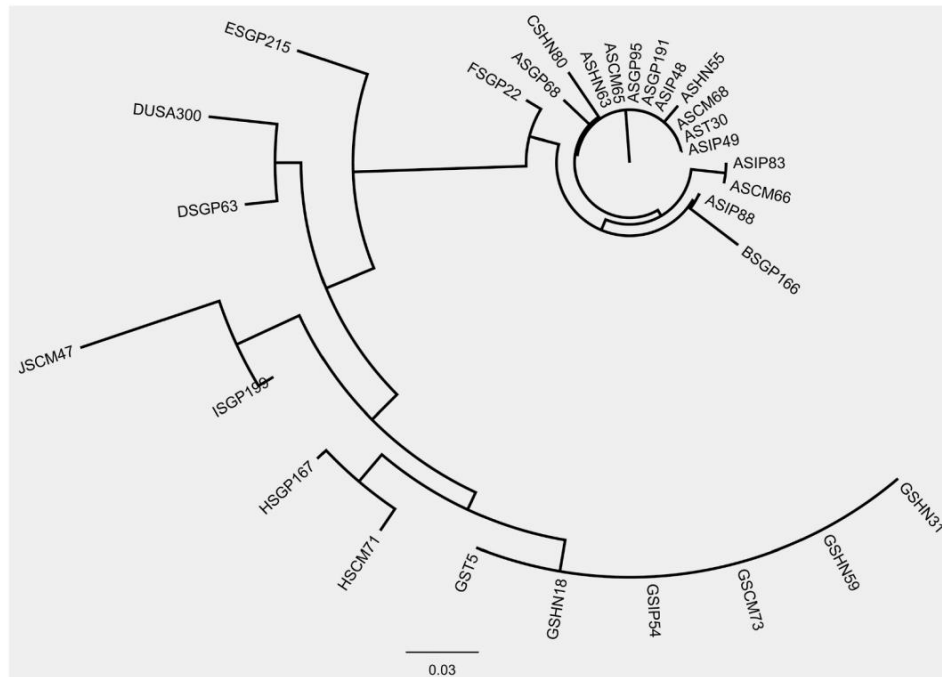
All CA-MRSA isolates (N = 115) were *mecA* positive and harbored *SCCmec* type IV. Genes encoding PVL and hemolysin A were detected in 51% (79% phase one and 44% phase two), and 10% (29% phase one and 5% phase two) of the CA-MRSA isolates analyzed, respectively. Hemolysin B, enterotoxin A, and B were detected in less than 3% of the isolates. Enterotoxin C, D, H, and exfoliative toxins A and B were not detected in this study.

The most frequent *spa* type was t019 (77%), followed by *spa* type t311 (10%) and others representing less than 3% of the 115 CA-MRSA

isolates (Table 1). MLVA analysis recognized fifteen different profiles (Table 1). Congruently, all samples with a certain *spa*-type were grouped within the same MLVA profile. MLVA 1 (M1) profile with t019 *spa* type was the most frequent (M1/t019, N = 88), followed by profile 10 (M10/t311, N = 12) and profile 12 (M12/t7078, N = 2). Other profiles included only one isolate each.

Representative isolates of each MLVA profile, sequence types and, virulence genes profile were chosen for PFGE analysis, revealing ten different PFGE types, and the dendrogram was constructed (Figure 1) Pulsotype A was the most frequent band pattern obtained (78%). Eight different sequence types (ST) were determined within the isolates analyzed; ST30 was the most common (80%), followed by ST5 (14%). Overall, two significant clones were identified among

Figure 1. Dendrogram of representative CA-MRSA isolates (N = 26), revealing ten different PFGE types using FigTree v1.4.0 software. The ST5-IV-t311-PVL positive, ST30-IV-t019-PVL positive, and ST8-IV-t008-PVL positive (USA 300) clones were included as references. The Pulsotype A includes the following isolates: SIP48, SIP49, SIP83, SIP88, SCM65, SCM66, SGP68, SGP95, SGP191, SHN55 and SHN63. The Pulsotype G includes the following isolates: SHN18, SHN31, SHN59, SCM 73 and SIP54. The Pulsotype H includes the isolates SCM71 and SGP167. And the following pulsotypes are represented by a single isolated: Pulsotype B-SGP166, Pulsotype C-SHN80, Pulsotype D-SGP63, Pulsotype E-SGP215, Pulsotype F-SGP22, Pulsotype I-SGP199, Pulsotype J-SCM47.



the isolates: ST30-IV-t019 77% (88/115) and ST5-IV-t311 10% (12/115). Table 1 shows the molecular characteristics of all CA-MRSA isolates.

In the phase one of the study (2009-2010) a predominance of ST30-IV-t019 (54%) over ST5-IV-t311 clone (17%) was observed, this difference increased even more in phase two (65% ST30-IV-t019 to 5% ST5-IV-t311 clone, respectively), being statistically significant ($p = 0.01$). ST30-IV-t019 ($N = 88$) was the main clone circulating in the four hospitals included and was persistent throughout the study time. Sixty-nine isolates belonging to this clone (78%) were associated with SSTIs, while the remaining 22% with invasive type infections. Furthermore, eight isolates (67%) belonging to the ST5-IV-t311 clone were responsible for SSTIs, and the other 33% ($N = 4$) associated with invasive infections. Interestingly, one isolate presented the ST8-IV-t11770-PVL positive profile, similar to ST8-USA300-LV (Latinoamerican Variant).

Discussion

In Paraguay, this study constitutes the first epidemiological report that includes phenotypic and genotypic data of CA-MRSA isolates recovered from children from Asunción and the Central Department. The limited number of reports that refer to molecular data and genetic variability of *S. aureus* include only one description of two nosocomial clones recovered from adults: most isolates analyzed were CC5-ST221-I-t049, similar to the Cordobés/Chilean clone that expanded through South America in the past decade and the minority belonged to CC8-ST239-III-t037 clone (related to the Brazilian clone) [24].

The increase in the prevalence of CA-MRSA observed between these two phases is in accordance with the regional trend of an increase in the incidence rate of infections caused by community isolates and with the methicillin-resistant phenotype among the infections caused by this pathogen. Increases of up to 12 times in this rate are reported in a study conducted over ten years in Argentina [25,26].

The dominant clone identified in this study was CC30-ST30-IV-t019-PVL positive (77%). Although some isolates belonging to this major clonal complex shared the same pulsotype, there were differences in the presence of virulence factors and the MLVA analysis. Two ST30-IV isolates were *spa* type t975; this *spa* type differs from the main found in this study, t019, in the deletion of one repeat. The loss of repeated regions is suggested as a novel mechanism of microevolution during chronic diseases [27]. In this case, one of the

isolates was recovered from a child with a chronic infection that started with a skin abscess and evolved to bilateral pneumonia and sepsis. The second isolate was recovered from an abscess in the nasal region.

ST30-IV-t019 has also been described as the main CA-MRSA clone found in other countries of South America [7,28]. This clone emerged initially in the SWP region (Australia, New Zealand); however, given the reports of its circulation in Europe, the USA, and South America, it is now considered a pandemic clone. The SWP clone is related to other virulent CC30 clones, such as the penicillin-resistant phage-type 80/81 clone and the HA-MRSA clone EMRSA-16 [29]. In 2008, the SWP clone was described as a minor community-associated clone causing skin and soft tissue infections and invasive diseases in Argentina [30,31]. Later, ST30-IV clone has replaced the previously prevalent CA-MRSA clone in this region, ST5-IV-t311-PVL positive, and it is well adapted to the community environment infecting both adult and adolescent patients [7,32,33].

The second most frequent clone identified in this study (ST5-IV-t311), is closely related to other CA-MRSA clones circulating in our region [6,22,30]. Interestingly, the SWP clone is the prevalent clone found in this study and the ST5-IV-t311 clone in second place. This observation reinforces the successful adaptation of the SWP clone to this region of South America.

In Paraguay, we observe a similar trend: during 2009-2010 ST30-IV-t019 (54%) was predominant over ST5-IV-t311 (17%) in the second phase of this study (2012-2013), the difference was higher (65% and 5%, respectively) suggesting the replacement of ST5-IV-t311 by ST30-IV-t019 again. This replacement could be due to the presence or increased expression of certain virulence and adhesion factors, such as fibrinogen binding proteins (FnBPs), in the ST30 clone that determine greater success in establishing in certain niches and the subsequent dissemination to other tissues [34].

In this study, we also described for the first time in Paraguay the CC5-ST100-IV-t002 clone closely related to the Argentinian pediatric clone [35]. Moreover, two other minor clones were also identified: CC30-ST435-IV-t021-PVL positive and CC8-ST72-IV-t148, both reported previously in other countries of the region such as Argentina, Brazil, and Uruguay [6,7,28,35–38].

One clone MRSA ST8-IV-t11770 (additionally resistant to tetracycline) was recovered from an SSTI in a ten-year-old child with no comorbidities (starting spot on foot) that was complicated by sepsis with multiple

foci. This is the first report in Paraguay of a strain related to the ST8-USA300-LV (Latin American Variant) clone. This epidemic and hypervirulent clone was determined to be frequent in the northern region of South America and is associated with the carrying of a pathogenicity island that encodes the genes of enterotoxins *sek* and *seq* (SaPI5), as well as mobile genetic elements such as COMER (Copper and mercury resistance mobile element), which promotes bacterial survival by providing resistance against certain defense mechanisms used by the innate immune system [39,40].

The absence of vancomycin, tetracycline, tigecycline, and teicoplanin-resistant isolates reveals the still intact potential of these antibiotics for the treatment of CA-MRSA infections in Paraguay. Other reports also indicate that CA-MRSA isolates are usually susceptible to other families of antibiotics, in contrast to HA-MRSA [41–43]. However, due to the appearance of vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) strains in EEUU in 2002, after the increase in vancomycin treatment in hospitalized patients infected with MRSA, it is necessary to maintain an efficient surveillance system that could alert in real-time changes in the susceptibility for vancomycin [44–48].

The levels of resistance to chloramphenicol (21%), erythromycin (17%), clindamycin (15%), and gentamicin (7%) are similar to the reported by other authors in CA-MRSA isolates [49,50]. The increasing frequency of CA-MRSA infections has forced the incorporation of clindamycin and other antibiotics as part of the antimicrobial treatment schemes in cases of staphylococcal SSTIs. The clindamycin resistance levels detected in this study have exceeded the cutoff point of 10%, considered a reasonable limit for the use of clindamycin in the empirical treatment of mild or moderate skin and soft tissue infection produced by MRSA (or by MSSA in patients allergic to beta-lactams) [42]. This fact increases the possibilities of therapeutic failure, being able to have a direct impact on the empirical scheme that should be taken into account in daily pediatric practice [43,51].

The extraordinary genetic success of CA-MRSA clones is now well known. The spread of CA-MRSA virulent clones in the hospital setting is currently a major cause of concern worldwide [52].

Conclusion

The ST30-IV-t019 clone was identified as the dominant CA-MRSA clone that infected Paraguayan children patients in the studied period. This is the first report of CA-MRSA clones isolated from children in Paraguay, and it demonstrates the imperative need for a

better understanding of the transmission dynamics of this microorganism to establish an effective epidemiological surveillance system.

Acknowledgements

The present study was funded by CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) from Paraguay (14-INV-328).

References

- David MZ, Daum RS (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 23: 616–687.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 8: 747–763.
- Chatterjee SS, Otto M (2013) Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. Clin Epidemiol 5: 205–217.
- Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN (2012) Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Curr Opin Microbiol 15: 588–595.
- Bendary MM, Solyman SM, Azab MM, Mahmoud NF, Hanora AM (2016) Genetic diversity of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and non clinical samples in Egypt. Cell Mol Biol 62: 55–61.
- Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, Zurita J, Labarca J, Luna CM, Salles MJC, Gotuzzo E (2010) Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. Int J Infect Dis 14: e560–e566.
- Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotying F, Stryjewski ME, Mollerach M (2013) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. Infect Genet Evol 14: 401–405.
- Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S, Matayoshi K, Miller LG (2007) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and healthcare-associated infections. Emerg Infect Dis 13: 236–242.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S19 (ISBN 1-56238-690-5).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22nd Informational Supplement. CLSI document M100-S22 (ISBN 1-56238-786-3).
- Manfredi EA, Leotta GA, Rivas M (2010) Multiplex PCR for the detection of *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes of *Staphylococcus aureus*: Characterization of isolates from food. Rev Argent Microbiol 42: 212–215. [Article in Spanish].
- Carpinelli Acevedo ML, Guillén Fretes RM, Fariña NJ, Basualdo W, Aquino R (2012) Multiplex PCR for simultaneous detection of *mecA* and *pvl* genes in *Staphylococcus spp.* Mem Inst Investig En Cienc Salud 10: 5–13.

13. Strommenger B, Bräulke C, Pasemann B, Schmidt C, Witte W (2008) Multiplex PCR for rapid detection of *Staphylococcus aureus* isolates suspected to represent community-acquired strains. J Clin Microbiol 46:582–587.
14. Wang D, Chen H, Li H, He Q, Ding X, Deng L (2011) Detection of *Staphylococcus aureus* carrying the gene for toxic shock syndrome toxin 1 by quantum-dot-probe complexes. J Fluoresc 21: 1525–1530.
15. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 29: 426–430.
16. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K (2007) Combination of multiplex PCRs for *Staphylococcus aureus* cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 51: 264–274.
17. Shopin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN (1999) Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 37: 3556–3563.
18. Hammen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol 41: 5442–5448.
19. Sabat A, Krzysztos-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, Travis J, Potempa J (2003) New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol 41: 1801–1804.
20. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzysztos-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC, Hryniewicz W (2005) Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 43: 3095–3100.
21. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanchez I, Song JH, Tassios PT, Villari P, Multilaboratory Project Collaborators (2000) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. Microb Drug Resist 6: 189–198.
22. Gardella N, Murzicato S, Di Gregorio S, Cuirolo A, Dese J, Crudo F, Gutkind G, Mollerach M (2011) Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. Infect Genet Evol 11: 1066–1071.
23. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 38: 1008–1015.
24. Mayor L, Ortellado J, Menacho C, Lird G, Courtier C, Gardon C, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, Etienne J (2007) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asunción, Paraguay. J Clin Microbiol 45: 2298–2300.
25. Ensinck DG, Ernst BA, Lazarte DG, Romagnoli DA, Sguassero DY, Miguez LN, Lopez Papucci S, Aletti A, Chiossone A, Pigozzi F, Pinotti M, Cantador A (2018) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: 10-years' experience in a children's hospital in the city of Rosario, Argentina. Arch Argent Pediatr 116: 119–125.
26. Lopez Furst MJ, de Vedia L, Fernández S, Gardella NM, Ganaha C, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotzring F, Morera G, Mollerach M, Stryjewski M (2013) Prospective multicenter study of community-associated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina. Plos One 8: e78303.
27. Garofalo A, Gai C, Lattar S, Gardella N, Mollerach M, Kahl BC, Karsten Becker K, Prince A, Sordelli D, Gomez M (2012) The length of the *Staphylococcus aureus* protein A polymorphic region regulates inflammation: Impact on acute and chronic infection. J Infect Dis 206: 81–90.
28. Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, Lope L, Benaderet S, Buela F, Vicentino W, Albini M, Bertaux O, Constela I, Bagnulo H, Llosa L, Ito T, Hiramatsu K (2005) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. Emerg Infect Dis 11: 973–976.
29. DeLeo FR, Kennedy AD, Chen L, Wardenburg JB, Kobayashi SD, Mathema B, Braughton K, Whitney A, Villaruz A, Martens C, Porcella S, McGavin M, Otto M, Musser J, Kreiswirth B (2011) Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci 108: 18091–18096.
30. Sola C, Saka HA, Vindel A, Bocco JL (2008) Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant panton-valentine leucocidin-positive *Staphylococcus aureus* clone sharing the sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina. J Clin Microbiol 46: 1826–1831.
31. Gardella N, von Specht M, Cuirolo A, Rosato A, Gutkind G, Mollerach M (2008) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, eastern Argentina. Diagn Microbiol Infect Dis 62:343–347.
32. Egea AL, Galletti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, Tosoroni D, Garnero A, Saka HA, Galas M, S. aureus Study group-Argentina, Bocco JL, Corso A, Sola C (2014) New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. Int J Med Microbiol 304: 1086–1099.
33. Benoit SR, Estivariz C, Mogdasy C, Pedreira W, Galiana A, Galiana A, Bagnulo H, Gorwitz R, Fosheim G, McDougal L, Jernigan D (2008) Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002–2004. Emerg Infect Dis 14: 1216–1223.
34. Fernandez S, Ledo C, Lattar S, Noto Llana M, Bertelli AM, Di Gregorio S, Sordelli DO, Gomez MI, Mollerach ME (2017) High virulence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spa019, the dominant community-

- associated clone in Argentina. *Int J Med Microbiol* 307: 191–199.
35. Sola C, Griboaud G, Vindel A, Patrito L, Bocco JL (2002) Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Córdoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol* 40: 1427–1435.
 36. Zuma AVP, Lima DF, Assef APDC, Marques EA, Leão RS (2017) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non- β -lactam antibiotics. *Braz J Microbiol* 48: 237–241.
 37. Vivoni AM, Diep BA, de Gouveia Magalhães AC, Santos KRN, Riley LW, Sensabaugh GF, Moreira B (2006) Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: Identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol* 44: 1686–1691.
 38. Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Gamero A, Kevric I, Culasso C, Vindel A, Study Group of CA-MRSA in Children, Argentina 2007, Lopardo H, Bocco JL (2012) Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset Staphylococcal infections in Argentinean children. *PLoS ONE* 7: e30487.
 39. Purves J, Thomas J, Riboldi GP, Zapotoczna M, Tarrant E, Andrew PW, Londoño A, Planet PJ, Geoghegan JA, Waldron KJ, Morrissey JA (2018) A horizontally gene transferred copper resistance locus confers hyper-resistance to antibacterial copper toxicity and enables survival of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in macrophages. *Environ Microbiol* 20: 1576–1589.
 40. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis S-O, Narechania A, Reyes J, Xing G, Rincon S, Smith H, Panesso D, Ryan C, Smith DP, Guzman M, Zurita J, Sebra R, Deikus G, Nolan RL, Tenover FC, Weinstock GM, Robinson DA, Arias CA (2015) Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 infection in North and South America. *J Infect Dis* 212: 1874–1882.
 41. Kilic A, Li H, Stratton CW, Tang YW (2006) Antimicrobial susceptibility patterns and Staphylococcal cassette chromosome mec types of, as well as Panton-Valentine leukocidin occurrence among, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. *J Clin Microbiol* 44: 4436–4440.
 42. Mensa J, Gatell J, García-Sánchez J, Letang E, López-Suñé E, Marco F (2013) Antimicrobial Therapy Guideline, 23rd edition. Spain: Antares Press 760p. [Book in Spanish].
 43. Kaibni MH, Farraj MA, Advan K, Essawi TA (2009) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Palestine. *J Med Microbiol* 58: 644–647.
 44. Hasan R, Acharjee M, Noor R (2016) Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. *Tzu-Chi Med J* 28: 49–53.
 45. Gardete S, Tomasz A (2014) Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 124: 2836–2840.
 46. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M (2013) First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet* 382: 205.
 47. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM (2002) Vancomycin resistance in *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 15: 430–438.
 48. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandao D, Van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA (2014) Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med* 370: 1524–1531.
 49. Paganini H, Della MP, Muller B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, Ensínck G, Kamiya M, Miranda MR, Ciriaci C, Hernandez C, Casimir L, Rial MJ, Schenonne N, Ronchi E, Rodriguez MC, Aprile F, De Ricco C, Saito V, Vrátnica C, Pons L, Ernst A, Morinigo S, Toffoli M, Bosque C, Monzani V, Monaco A, Pinheiro JL, López MP, Maninno L, Sarkis C (2009) Community onset of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in previously healthy or health care-associated children in Argentina. *Rev Chil Infectol* 26:406–412. [Article in Spanish].
 50. Cortes JA, Gómez CA, Cuervo SI, Leal AL (2007) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogotá, Colombia: Public Health implications. *Rev Salud Pública* 9: 448–454.
 51. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos M, Bouza E (2004) Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* in Spain: Five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4240–4245.
 52. Otter JA, French GL (2011) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect* 79: 189–193.

Corresponding author

Professor Rosa Guillén, PhD
Head of the Microbiology Department
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción.
Dr. Cecilio Báez casi Dr. Gaspar Villamayor.
Campus Universitario, San Lorenzo. Central, Paraguay. CP: 2160.
Tel: 595-994318520
Email: rmguillen@gmail.com

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.