


## ARTICULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

**Estandarización del análisis MLVA para tipificación de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina causantes de infecciones invasivas en población pediátrica paraguaya****Standardization of automated MLVA for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing isolated from invasive infections in Paraguayan pediatric population**Florentín Melisa<sup>1</sup>, Salinas Claudia<sup>1</sup>, Rodríguez Fatima<sup>1</sup>, Grupo de estudio de *S. aureus*<sup>2,3,4,5</sup>, Guillén Rosa<sup>1</sup> <sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Microbiología, Paraguay<sup>2</sup>Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, Servicio de Pediatría y Laboratorio de Microbiología, San Lorenzo, Paraguay<sup>3</sup>Instituto de Previsión Social, Hospital Central, Servicio de Pediatría y Laboratorio de Microbiología, Asunción, Paraguay<sup>4</sup>Universidad Nacional de Asunción, Hospital de Clínicas, Servicio de Pediatría y Laboratorio de Microbiología, San Lorenzo, Paraguay<sup>5</sup>Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Hospital Nacional de Itauguá, Servicio de Pediatría y Laboratorio de Microbiología, Paraguay**Correspondencia:** Rosa Guillen, **Correo electrónico:** [rmguillen@gmail.com](mailto:rmguillen@gmail.com)**Responsable editorial:** Carlos Miguel Rios-González**Cómo referenciar este artículo:** Florentín M, Salinas C, Rodríguez F, Grupo de estudio de *S. aureus*, Guillén R. Estandarización del análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem automatizado para tipificación de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina causantes de infecciones invasivas en población pediátrica paraguaya. Rev. salud publica Parag. 2020; 10(2): 30-36

Recibido el 22 de Mayo del 2020, aprobado para publicación el 10 de setiembre del 2020

**RESUMEN****Introducción:** *Staphylococcus aureus* es considerado uno de los patógenos humanos más importantes a nivel mundial y sus niveles de resistencia a meticilina han aumentado incluso en cepas aisladas de personas sin factores de riesgo nosocomial, por lo que la tipificación genética de los clones circulantes es fundamental para comprender los patrones de diseminación.**Objetivo:** Obtener la tipificación de SARM que causaron infecciones invasivas a niños mediante el empleo de la técnica de análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA) automatizada.**Metodología:** Estudio observacional, descriptivo de corte transversal.**Resultados:** Se analizaron 25 cepas SARM que representan más de 700 aislamientos de *S. aureus* colectados en los años 2010, 2012 y 2013 de 4 hospitales de referencia nacional. La automatización de la técnica MLVA incluyó la tipificación del 88% (22/25) de los aislamientos en estudio, resultando 3 perfiles diferentes, cada uno asociado a un “spa tipo” distinto, siendo el perfil 1-t019 el predominante (86%), seguido por el perfil 3-t002 (9%), arrojando 100% de concordancia con el método MLVA manual, así como una alta concordancia con el método estándar de oro, PFGE.**Conclusión:** La inclusión de un método de análisis de fragmentos automatizado permitió llevar a cabo la caracterización de aislamientos mejorando el tiempo de respuesta y manteniendo una alta sensibilidad en comparación con el método manual.**Palabras clave:** infecciones estafilocócicas, resistencia a la meticilina; tipificación bacteriana; niño.**ABSTRACT****Introduction:** *Staphylococcus aureus* is considered one of the most critical human pathogens worldwide, and its levels of methicillin resistance have increased even in strains isolated from people without nosocomial risk factors. Therefore the genetic typing of circulating clones is essential to understand dissemination patterns**Objective:** Obtain the MRSA typing that caused invasive infections in children by using the automated multi-locus variable number of tandem repeats (MLVA) analysis technique.**Methodology:** Observational, descriptive, cross-sectional.**Results:** 25 strains MRSA representing more than 700 *S. aureus* isolates collected in 2010, 2012, and 2013 from 4 national reference hospitals were analyzed. The MLVA automation included the typing of 88% (22/25) isolates, resulting in 3 different profiles, each one associated with a different spa type, being the 1-t019 the predominant (86%), followed by the 3-t002 profile (9%), yielding 100% concordance with the MLVA manual, as well as high concordance with the standard gold method, PFGE.**Conclusion:** The inclusion of an automated fragment analysis method led to the characterization of isolates, improving response time, and maintaining high sensitivity compared to the manual process.**Keywords:** staphylococcal infections, methicillin resistance; bacterial typing; boy.

## INTRODUCCIÓN

La diversidad patogénica del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), manifestada por su destreza para colonizar, adaptarse y sobrevivir en distintos tejidos celulares durante la infección, se debe principalmente a la portación de genes que le confieren resistencia a los antibióticos, como la resistencia a meticilina que está determinada por el gen cromosómico “mecA”, así como genes codificantes de factores de virulencia que contribuyen con su patogenicidad<sup>(1)</sup>.

La determinación de la variabilidad genética de los aislamientos SARM, necesaria para la comprensión de la expansión y diseminación bacteriana, así como para establecer las estrategias necesarias para la limitación de su propagación, sólo pueden realizarse mediante el empleo de métodos moleculares combinados, debido a su gran complejidad genética. Entre los métodos que permiten establecer relaciones evolutivas entre clones se encuentran, aquellos basados en el estudio de restricción del genoma completo como la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), considerada como “gold estándar”; las técnicas basadas en amplificación de múltiples VNTR (Regiones de Número Variable de Repeticiones en Tándem) como la MLVA, así como las basadas en la secuenciación de locus hipervariables, que incluyen la tipificación de secuencias multilocus (MLST, por la sigla en inglés de (Multilocus sequence typing) y la tipificación del gen de la proteína A (Spa typing), entre otros<sup>(2-5)</sup>.

En Paraguay existen algunos estudios sobre la variabilidad genética de SARM<sup>(6,7)</sup>, sin embargo, queda mucho por estudiar respecto a la epidemiología de esta bacteria, para lo que la implementación de metodologías de identificación clonal de rápida respuesta y accesibles a nivel nacional resulta esencial.

En el 2017 nuestro grupo de investigación incursionó de forma exitosa con la utilización de la MLVA manual para la tipificación de *S. aureus* obteniendo excelentes resultados comparativos a la PGFE<sup>(8)</sup>, lo que ha permitido analizar aislamientos SARM y generar los primeros perfiles de agrupación en base a similitud genética de ADN aplicada al análisis de fragmentos, siendo una herramienta alternativa que permitió mejorar el tiempo de respuesta en la resolución de posibles casos de brotes. Sin embargo, debido al procesamiento manual de las muestras, esta técnica presenta como limitación la generación de resultados en un tiempo prolongado para evaluar múltiples aislamientos.

## OBJETIVO

En este contexto el presente estudio tuvo como principal objetivo el análisis de variabilidad genética de SARM-AC (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislado de la comunidad) y SARM-AH (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislado del hospital) que produjeron infecciones invasivas en niños paraguayos durante los años 2010, 2012 y 2013 mediante la estandarización y aplicación del método MLVA en su formato automatizado, siendo una tecnología de punta para estudios de brotes, y por tanto un aporte hacia la mejor comprensión de la epidemiología de las infecciones invasivas causadas por SARM en nuestro país.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño del estudio y Población

Se analizaron 25 cepas SARM, representantes de más de 700 aislamientos de *S. aureus* colectados en los años 2010, 2012 y 2013 de 4 hospitales de referencia del departamento Central de Paraguay, participantes del estudio (Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, Hospital Central del Instituto de Previsión Social, Hospital de Clínicas y el Hospital Nacional de Itauguá), todos provenían de muestras de niños con edades comprendidas entre 1 y 16 años. Los aislamientos analizados se encontraban criopreservados en BHI-glicerol en el Biobanco del IICS, con ficha de identificación y antibiograma correspondiente, así como datos clínicos mínimos del paciente a quien pertenecían. La colecta de muestras se realizó durante los años mencionados como parte de proyectos marcos existentes en el grupo de investigación de *S. aureus*.

Los aislamientos incluidos para el análisis fueron aquellos considerados resistentes a meticilina según los criterios del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)<sup>(9-11)</sup>, obtenidos a partir de cultivos de muestras biológicas de niños como sangre, secreción purulenta, líquido articular y secreción traqueal, consideradas como provenientes de infecciones invasivas, en alguno de los cuatro centros hospitalarios de referencia participantes del estudio. Además contaban con genotipificación previa que incluía la detección del gen de resistencia a meticilina (mecA) y codificantes de factores de virulencia (pvl, sea, seb, sec, sed, seh, hla, hlb, etA y etB)<sup>(12-15)</sup>, como también del análisis de tipificación molecular por MLVA manual<sup>(8)</sup>, Spa typing<sup>(5)</sup> y el análisis de PFGE.

Los aislamientos analizados eran representativos de perfiles PFGE obtenidos en estudios previos<sup>(16)</sup>.

Los aislamientos criopreservados se repicaron en medio TSA (Tripteína Soya Agar) e incubadas a 35°C por 24-48hs en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, para la posterior extracción del ADN genómico empleando dos métodos distintos con la finalidad de comparar la eficacia: kit comercial de purificación de ADN genómico (Wizard Genomic, Promega, EEUU) y kit de extracción de ADN genómico en columna (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, EEUU) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Posterior a la extracción el ADN fue conservado a -20°C y para la cuantificación de este se realizaron lecturas de absorbancia a 260nm utilizando el cuantificador de ADN NanoDrop (ND-2000).

### **Estandarización de la MLVA**

Se amplificaron 6 regiones VNTR Sa022, Sa0704, Sa1132, Sa1291, Sa2039 y Sa2511, según lo descrito por Sobral et al.(17), empleando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, sintetizados por las empresas Applied Biosystem (EEUU) y Macrogen (Corea), donde para cada sistema el oligonucleótido "forward" fue marcado con un fluoróforo en el extremo 5'.

Para la estandarización de las reacciones de PCR se realizaron varias pruebas con variaciones de calidad y cantidad de ADN (20ng/μL, 40ng/μL, 80ng/μL), concentración de cloruro de magnesio (2,5mM, 2,8mM, 3mM) y condiciones de ciclado en la que se probaron diferentes temperaturas de anillamiento. En base a la intensidad de los productos durante la amplificación se seleccionaron los sistemas que resultaron las mejores condiciones de reacción y ciclado de la PCR para ser detectados por fluorescencia.

Se verificó la amplificación por PCR de los fragmentos analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con Syber safe al 10%, previo al envío de productos para análisis automatizado (Macrogen, Corea).

#### **Análisis de MLVA por electroforesis capilar**

Los productos de PCR de los 6 sistemas fueron remitidos a Macrogen (Corea) para el análisis de electroforesis capilar con el analizador de ADN Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer.

### **Obtención de dendrograma**

Los datos generados por la electroforesis capilar se emplearon para la generación de un dendrograma mediante el software FigTree V.1.4.0. Las agrupaciones fueron numeradas para su identificación, según recomendación de Sabat *et al.* en el 2003(3), en base a su similitud. Se efectuó la comparación de patrones MLVA obtenidos para

establecer existencia de proximidad evolutiva.

### **Análisis Estadístico**

Los datos de los aislamientos obtenidos de las fichas epidemiológica, microbiológica y molecular fueron introducidos y almacenados en una planilla electrónica y los cálculos estadísticos fueron realizados empleando los softwares Microsoft Excel y Epiinfo Versión 7.2.2.6. Se empleó estadística descriptiva para referir las características de la población y los perfiles de MLVA automatizados analizados.

### **Aspectos Éticos**

Este proyecto contó con la aprobación del Comité Científico y de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (P15/2016). Todos los datos fueron manejados respetando estrictamente la confidencialidad.

## **RESULTADOS**

De los 25 aislamientos que causaron infecciones invasivas en niños, el 64% corresponde a SARM adquiridos en la comunidad (SARM-AC) y el 16% restante corresponde a SARM adquiridos en el hospital (SARM-AH). La tendencia de distribución por franja etaria fue similar en los cuatro hospitales participantes del estudio. Los aislamientos fueron obtenidos de muestras de sangre (60%), secreciones purulentas (32%), líquido articular (4%) y secreción traqueal (4%), y las infecciones invasivas causadas por estos aislamientos incluyeron neumonía bilateral, sepsis neonatal, artritis séptica, osteomielitis, sepsis con foco abdominal o articular, absceso parietal, entre otras.

En cuanto al efecto de la calidad de ADN se observaron mejores resultados evidenciados por una mayor cantidad de producto obtenido utilizando 20ng/μL de ADN molde extraído por el kit de extracción en columna (Qiagen, USA).

Respecto al efecto de la concentración de cloruro de magnesio se observó que las reacciones de PCR para los sistemas Sa2511, Sa0704 y Sa1291 presentaron mejores resultados utilizando 2,8mM de MgCl<sub>2</sub> por tubo de reacción. Sin embargo, para los sistemas Sa0266, Sa2039 y Sa1132 la concentración óptima resultó 3mM por tubo de reacción.

Las condiciones de amplificación testadas se realizaron con variaciones en la temperatura de anillamiento respecto a los 6 sistemas VNTR. Para los sistemas Sa0704, Sa1291, Sa2039 y Sa1132 la temperatura de anillamiento que presentó mejores resultados fue de 51°C, mientras que la temperatura de anillamiento óptima para los sistemas Sa0266 y

Sa2511 fue de 50°C y 54°C respectivamente.

El ADN se amplificó por sistemas individuales que comprendían 6 loci descritos previamente. Los productos de cada aislado fueron remitidos a Macrogen agrupados en dos tubos en base a la combinación de fluoróforos y los rangos de tamaño de productos de amplificación esperados, el primero conteniendo los sistemas Sa1132, Sa0704, Sa2039, Sa2511 y Sa1291, y el segundo tubo para el sistema Sa0266, para la electroforesis capilar.

Del análisis de los electroferogramas correspondientes para cada aislamiento se observó 100% de eficiencia en la detección de productos compatibles con tamaño y marcación fluorescente en los sistemas Sa1132, Sa0704 y Sa2511, 96% en Sa2039 y Sa1291 y 88% en Sa0266.

Agrupaciones resultantes de análisis de MLVA manual

En el análisis de la MLVA manual previamente estandarizada y validada con PFGE y spa typing por nuestro Grupo de investigación de *S. aureus*, se logró la amplificación total de 7 loci VNTR (*cfiA*, *cfiB*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *Spa*, *SspA*) de los 25 aislamientos SARM en estudio, agrupados en 4 perfiles diferentes, Perfil 1-t019 (76%), Perfil 2-t311 (12%), Perfil 3-t002 (8%) y Perfil 4-t11770 (4%)(8).

Del análisis por MLVA automatizado, 20 aislamientos (20/25, 80%) generaron productos en todos los loci (n=6). De los 5 aislamientos que no generaron productos en algunos de los loci fueron excluidos 3 aislamientos del dendrograma, por no poder ser analizados según criterios internacionales de agrupación de aislamientos (Malachowa et al., 2005). Pudiendo incluirse en el análisis informático a 22 aislamientos<sup>(18)</sup>.

De los productos amplificados de los 6 sistemas VNTR de los 25 aislamientos SARM que fueron enviados a Macrogen (Corea), los sistemas Sa1132, Sa704 y Sa2511 resultaron los más eficientes, detectándose fragmentos en el 100% de los aislamientos, seguidos por los sistemas Sa2039 y Sa1291 en los que fueron detectados productos con una eficiencia del 96% y por último el sistema Sa0266 con 88% de eficiencia, presentando en uno de los aislamientos una banda secundaria, por lo que resultó ser el sistema menos eficiente. La distinción de la banda secundaria pudo discriminarse mediante la intensidad de los picos que se generaron en el análisis por electroforesis capilar, siendo mayor el valor de intensidad del pico de la banda primaria en comparación con la secundaria.

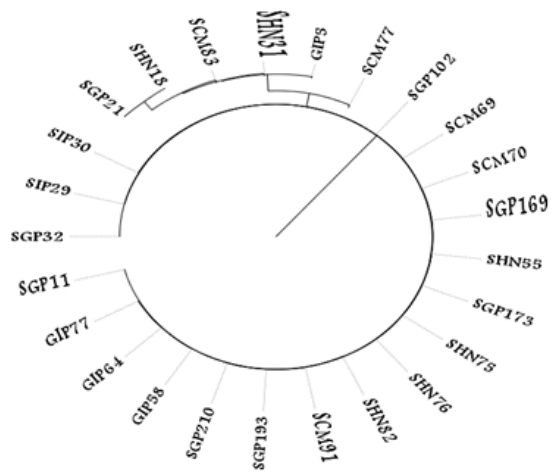
El análisis del patrón de bandas, así como la comparación de bandas comunes por la técnica MLVA automatizada permitió distinguir 3 perfiles o agrupaciones diferentes, siendo el Perfil 1-t019 más frecuente (86%), seguido del Perfil 3-t002 (9%) y

Perfil 2-t311 (5%).

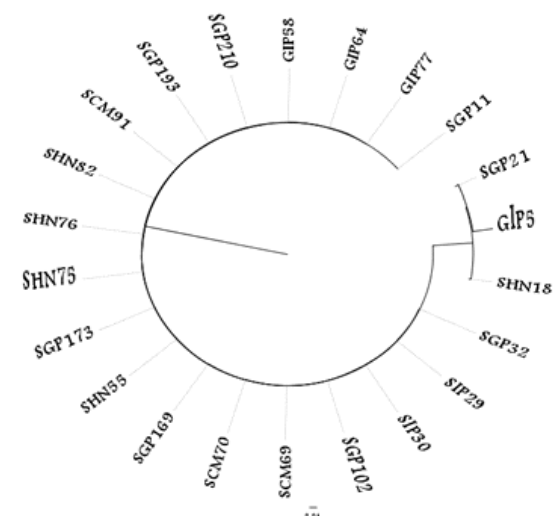
Los dendrogramas tanto el de referencia, obtenido por el método manual, y el obtenido por el método automatizado se muestran en la figura 1. La comparación de las agrupaciones por ambos métodos arrojó un nivel de concordancia del 100% con un índice Kappa igual a 1,0 en los 22 aislamientos SARM que fueron incluidos para la comparación.

**Figura 1: Agrupaciones de SARM causantes de infecciones invasivas. Dendrogramas obtenidos con "software" FigTree.**

A) Dendrograma a partir de método manual: Se visualizan 4 perfiles diferentes por el método de MLVA manual en 25 aislamientos SARM, siendo el Perfil 1-t019 más frecuente (n:19), seguido del Perfil 2-t311 (n:3), Perfil 3-t002 (n:2) y Perfil 4-t11770 (n:1)



B) Dendrograma a partir de método automatizado: Se visualizan 3 perfiles diferentes por el método de MLVA automatizado en 22 aislamientos SARM, siendo el Perfil 1-t019 más frecuente (n:19), seguido del Perfil 3-t002 (n:2) y Perfil 2-t311 (n:1).



## DISCUSIÓN

La circulación regional y mundial de clones SARM exitosos, incluso epidémicos ha impulsado el desarrollo de herramientas moleculares precisas para el abordaje de la compleja epidemiología de este patógeno. En este aspecto uno de los brotes más graves registrados en Paraguay por *S. aureus* fue la intoxicación por consumo de leche ultrapasteurizada contaminada con *S. aureus* portador de enterotoxinas C y D en el cual resultaron intoxicadas 400 personas, de las cuales 60 requirieron hospitalización, registrándose incluso el óbito de una lactante menor, donde la investigación del brote desde el aspecto molecular tuvo que realizarse en el exterior en el 2011<sup>(19)</sup>; poniendo de manifiesto la imperiosa necesidad de implementar métodos moleculares sensibles pero de baja complejidad y fácilmente accesibles en Paraguay. En este contexto este grupo de investigación de *S. aureus* inició la puesta a punto, validación y empleo de la técnica MLVA, en formato manual, que si bien arrojó excelentes resultados en comparación con el estándar de oro (PFGE), presentaba el inconveniente de requerir un tiempo de análisis extendido y permitir el análisis de un número limitado de aislado debido al empleo de técnicas moleculares un tanto engorrosas<sup>(8)</sup>.

En este punto la inclusión de metodología automatizada de análisis de fragmentos se planteó para ampliar la capacidad de análisis de variabilidad genética de SARM y la disminución del tiempo de respuesta en la generación de resultados. La automatización de la técnica MLVA siguiendo el protocolo descrito por Sobral et al.<sup>(17)</sup>, requirió numerosas modificaciones ante la imperiosa necesidad de lograr el mayor rendimiento en cantidad de producto de PCR y disminuir en lo posible los artefactos como bandas secundarias y dímeros de oligonucleótidos. El conjunto de ajustes realizados permitió la tipificación por MLVA automatizado del 88% de los aislados analizados, obteniendo un rendimiento equiparable a otros estudios internacionales que reportan niveles de tipificación entre el 76 a 100%. Así mismo, el evento de no lograr la amplificación de la totalidad de los locus, que origina perfiles parciales es un hecho descrito por diversos autores y cuya causa podría asociarse a la presencia de mutaciones en las regiones de anillamiento de los oligonucleótidos<sup>(3,18,20,21)</sup>.

La comparación entre los dos métodos mostró excelente concordancia, indicando una fuerza de correlación perfecta entre estos dos métodos de tipificación genética, en donde se obtuvieron 3 perfiles MLVA distintos para los 22 aislamientos SARM que fueron comparados. Esta elevada correlación entre estos métodos ya fue demostrada en varios estudios como el realizado por Sobral et al en el año 2012<sup>(17)</sup>.

El método MLVA automatizado presenta alta

concordancia con el método MLVA manual que ya fue validada con el PFGE, por lo que la concordancia de la MLVA automatizada con el método "gold estándar" (PFGE) se mantiene, como también con otras técnicas ampliamente utilizadas como la tipificación de locus de la proteína A y MLST.

Este tipo de metodología de complejidad instrumental no sólo permite llevar a cabo la caracterización de aislamientos con alta sensibilidad y un óptimo tiempo de respuesta en comparación con el método manual sino que también podría optimizar el uso de recursos en el empleo de PFGE que hasta ahora es muy restringido en Paraguay. A futuro podrían ajustarse condiciones para una amplificación múltiple y cuya marcación con fluoróforo permita el análisis por electroforesis capilar en un solo tubo por muestra, reduciendo tanto costos como tiempo de generación de resultados.

La técnica de análisis automatizado de fragmentos tiene muchas aplicaciones como en la investigación genómica, diagnóstico molecular, clínica y farmacéutica, sin contar con las aplicaciones forenses<sup>(22)</sup>. La rapidez del análisis, conjugada con la automatización del sistema, colocan al análisis automatizado de fragmentos como una herramienta indispensable en el área diagnóstica<sup>(23)</sup>, por tanto la experiencia que describimos puede ser de utilidad para otros grupos nacionales interesados en el uso de esta técnica.

En este trabajo se analizaron 25 aislamientos que son representativos de más de 700 aislamientos de *S. aureus* provenientes de 4 hospitales distintos, ha permitido señalar como mayoritario al Perfil 1-t019, relativo al clon SARM ST30-t019-IV-PVL, como el clon predominante causante de infecciones invasivas en niños asociadas a SARM en el país, concluyendo que la elevada prevalencia del mismo podría deberse a una ventaja adaptativa que permita desplazar a los demás clones, ya que se está instalando en el país en varios hospitales y en la comunidad, facilitando aún más su diseminación<sup>(24)</sup>. En efecto, el mismo es considerado como un clon pandémico en Sudamérica, ya que existen estudios previos que lo reportan en Chile, Argentina, Colombia y Paraguay<sup>(25)</sup>. En segundo lugar el Perfil 2-t311 (12%), relacionado al clon SARM ST5-t311-IV-PVL y portador del gen codificante de la enterotoxina A (sea), descrito como causante de infecciones severas en la comunidad<sup>(13,19,26-28)</sup>. Además, otro estudio argentino realizado por Egea y colaboradores, resultaron como "spatipos" más frecuentes relacionados a infecciones por SARM, el t019 (45%) y el t311 (45%). Estos resultados, agregados a los generados por este estudio, muestran un gran predominio y amplia distribución de estos dos clones a nivel regional<sup>(29,30)</sup>.

La baja frecuencia del Perfil 3-t002 es similar a lo reportado en Argentina en el año 2018 en un estudio de aislamientos *S. aureus* en adultos hospitalizados<sup>(31)</sup>, lo que hace que el mismo sea considerado como esporádico. Además un aislamiento fue categorizado como el Perfil 4-t11770, relacionado con el clon SARM ST8-IV-t11770-PVL que es genéticamente similar a la Variante Latinoamericana USA300 que es un clon hipervirulento y epidémico frecuente en la región norte y sur de Sudamérica<sup>(32)</sup>.

## CONCLUSIÓN

El clon SARM predominante hallado en este estudio fue el de Perfil 1-t019, seguidamente de los clones de Perfil 2-t311, Perfil 3-t002 y Perfil 4-t11770. La agrupación por el método MLVA automatizado presentó excelente concordancia con el método MLVA manual y el PFGE, además nos permitió ampliar la capacidad de análisis de variabilidad genética de SARM, mejorando la respuesta en la generación de resultados.

La técnica tiene un gran potencial en el estudio de brotes hospitalarios e intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus*, así como es una herramienta muy interesante útil para la aplicación en otras áreas de salud en el país.

**Conflicto de interés:** Los autores declaran la no existencia de conflicto de intereses.

**Financiación:** El presente estudio fue financiado por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) de Paraguay (PINV-15.101).

**Agradecimientos:** Por la invaluable contribución a los Miembros del "Grupo de estudio de *S. aureus*" incluyen a: Dra. Ana Campuzano, Dra. Juana Ortellado de Canese y la Dra. Patricia Almada del Hospital de Clínicas-Facultad de Ciencias Médicas-UNA. Dra. Noemí Zárate, Dra. Wilma Basualdo† y la Dra. Beatriz Quiñónez† del Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, MSPyBS. Dra. Mónica Rodríguez, Dr. Héctor Castro, Dra. Lorena Grau, Dra. Gladys Velázquez y Carmen Espínola del Hospital Central del Instituto de Previsión Social. Dra. Gloria Samudio y la Dra. Gloria Gómez del Hospital Nacional de Itauguá, MSPyBS.

**Contribuciones:** RG, FM, CS, y FR colaboraron en la concepción del estudio original, recolección de los datos y la redacción del manuscrito. RG realizó el análisis de datos e interpretación de datos. FM y CS participó en la concepción del estudio original y en la redacción del manuscrito. RG, FM, CS colaboró en la concepción del estudio original, la interpretación de datos, la redacción del manuscrito. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión

**Declaración.** Las opiniones expresadas en este manuscrito son responsabilidad del autor y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la RSPP y/o del INS.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;49(1):22-7.
2. Strandén A, Frei R, Widmer AF. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis?. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3181-6.
3. Sabat A, Krzysztos-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.
4. Saunders NA, Holmes A. Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2007;391:71-85.
5. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):792-9.
6. Rodríguez F, Salinas C, Fernández 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.
7. Guillén R, Carpinelli L, Rodríguez F, Castro H, Quiñónez 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.
8. Rodríguez-Acosta 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 metilina aislados de la comunidad en Paraguay. *Duazary.* 2017;14(2):131.
9. Hecht D, Citron DJ, Dzink W, Gregory N, Jacobus S, Jemkins J, et al. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard- Eighth Edition.* Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
10. Weinstein M, Patel JA, Bobenchik S, Campeau S, Cullen, Galas M, et al. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.

11. F. Cockerill, J. Patel, J. Alder, P. Bradford, M. Dudley, G. Eliopoulos, D. Hardy, D. Hecht, J. Hindler, M. Powell. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty- Third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
12. 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 Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1999;29(5):1128-32.
13. 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.
14. 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.
15. Escobar-Pérez JA, Castro BE, Márquez-Ortiz RA, Gaines S, Chavarro B, Moreno J, et al. Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates related to USA300 clone: Origin of community-genotype MRSA in Colombia *Biomédica.* 2014;34:124-36.
16. 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.
17. Sobral D, Schwarz S, Bergonier D, Brisabois A, Feßler AT, Gilbert FB, et al. High Throughput Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from Human, Animal and Food Sources. *PLOS ONE;* 2012;7(5):e33967.
18. 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.
19. Weiler N, Leotta GA, Zárate MN, Manfredi E, Álvarez ME, Rivas M. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43(1):33-6.
20. Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, Huijsdens XW, Pluister GN, van Santen-Verheuvél 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).
21. Tenover FC, Vaughn RR, McDougal LK, Fosheim GE, McGowan JE. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Assay Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol.* 2007;45(7):2215-9.
22. Magaña JJ, Arenas-Sordo M de la L, Gómez R. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Rev Médica Chile.* 2009;137(7):946-56.
23. Kourkine IV, Hestekin CN, Buchholz BA, Barron AE. High-Throughput, High-Sensitivity Genetic Mutation Detection by Tandem Single-Strand Conformation Array Polymorphism/Heteroduplex Analysis Capillary Array Electrophoresis. *Anal Chem.* 2002;74(11):2565-72.
24. Koning S, van Belkum A, Snijders S, van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen J, et al. Severity of Nonbullous *Staphylococcus aureus* Impetigo in Children Is Associated with Strains Harboring Genetic Markers for Exfoliative Toxin B, Panton-Valentine Leukocidin, and the Multidrug Resistance Plasmid pSK41. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3017-21.
25. Pascual DB. Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans*. Universidad de La Rioja; 2015;130-4
26. Jiménez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodríguez EA, Garcés CG, Patiño LA, et al. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(8):980-5.
27. Corredor LF, Moncayo J, Santacruz J, Álvarez A. Detección de genes de toxinas pirogénicas y toxinas exfoliativas en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* en Colombia. *Investig Andin.* 2012;09;14(25):577-87.
28. Kanzaki H, Ueda M, Morishita Y, Akiyama H, Arata J, Kanzaki S. Producibility of Exfoliative Toxin and *Staphylococcal* Coagulase Types of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Skin Infections and Atopic Dermatitis. *Dermatology.* 1997;195(1):6-9.
29. Coombs GW, Monecke S, Pearson JC, Tan H, Chew Y-K, Wilson L, et al. Evolution and diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a geographical region. *BMC Microbiol.* 2011;11:215.
30. González MJC, Porro MEC, Mena AJP. Tipo de Cassette Cromosómico Estafilocócico en Cepas Clínicas de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Metilicina. *Kasmera.* 2015;42(2).
31. Tomatis C, Baroni MR, Mendosa MA, Nagel A, Mollerach A, Alvarez C, et al. Tipos de spa no reportados en nuestro país en *Staphylococcus aureus* de pacientes adultos de un hospital escuela, Santa Fe, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2018;50(3):244-8.
32. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis S-O, 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.