

ARTICULO ORIGINAL

Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, durante el año 2010

Frequency of gens that codify virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from children attending the Niños de Acosta Ñú Pediatric General Hospital in 2010

Rodríguez Acosta F^I, Carpinelli L^I, Basualdo W^{II}, Castro H^{II}, Quiñonez B^{II+}, Argüello R^{II}, *Guillén RM^I

^IDpto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

^{II}Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, Paraguay

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un microorganismo con habilidad de infectar diferentes tejidos celulares, por portar genes que le confieren resistencia a antibióticos, factores de virulencia y su plasticidad genética, que podrían contribuir a una progresión rápida y complicada de la enfermedad. El Paraguay no cuenta con datos epidemiológicos que indiquen los factores de virulencia que presentan las cepas de *S. aureus*, por lo que el objetivo del trabajo fue determinar un perfil de virulencia detectando los genes codificantes de: hemolisinas α y β , enterotoxinas A, B, C, D, H y toxinas exfoliativas A y B. Este estudio observacional descriptivo de corte transversal, con muestreo no probabilístico de casos consecutivos, incluyó 50 aislados de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras clínicas de secreciones de piel, partes blandas o líquidos corporales de pacientes menores de 17 años que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú durante el año 2010. Las reacciones de PCR incluyeron la detección de los genes: *sea+seb+sec+ADNr16S*, *h1A+h1B*, *eta+etb*, *sed* y *seh*. El 82% de los aislados provenía de niños que presentaron cuadros clínicos compatibles con infecciones de piel y partes blandas y el 18% de cuadros clínicos graves como sepsis, osteomielitis y neumonías. Los aislados contaban con datos de portación de Leucocidina de Pantón-Valentine, el cual fue el factor de virulencia más frecuentemente detectado (58%), seguido de las hemolisinas alfa (16%) y beta (8%). Las enterotoxinas y las toxinas exfoliativas fueron menos frecuentes (0-2%), y no se detectaron genes codificantes de las enterotoxinas C y D.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, factores de virulencia, PCR.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a pathogen that has the ability to successfully infect different tissues, because it carries genes that confer antibiotic resistance, virulence factors and its high genetic plasticity, that could contribute to a quick and complicated disease progression. Paraguay does not have epidemiological data indicating the virulence factors presented in *S. aureus* strains. Therefore, the aim of this study was to determine the virulence profile by molecular methods detecting the codifying genes of: α and β

*Autor Correspondiente: **Dra. Rosa María Guillén Fretes**. Dpto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay
Email: rmguillen@gmail.com

Fecha de recepción: setiembre 2014; Fecha de aceptación: diciembre 2014

hemolysin, enterotoxins A, B, C, D, H and exfoliative toxins A and B. This descriptive observational study with non-probability sampling of consecutive cases, included 50 *S. aureus* isolates obtained from clinical specimens from skin secretions, soft tissue or body fluids of patients younger than 17 years who attended the Niños de Acosta Nú Pediatric General Hospital in 2010. The PCR reactions included the detection of the following genes: *sea+seb+sec+ADNr16S, hIA+hIB, eta+etb, sed* and *seh*. The 82% of the isolates came from children skin and soft tissue infections and 18% came from invasive diseases such as sepsis, osteomyelitis and pneumonia. The Pantón Valentine leukocidin, which data was previously obtained, was the most frequently virulence factor detected (58%), followed by alpha (16%) and beta (8%) hemolysins. Enterotoxins and exfoliative toxins were less frequent (0-2%) and the enterotoxins C and D genes were not detected.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, virulence factors, PCR.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos patógenos más importantes en los seres humanos, responsable del incremento constante del número de infecciones, tanto nosocomiales, como adquiridas en la comunidad (1,2).

Las infecciones causadas por este microorganismo tienen un amplio rango de severidad, desde infecciones cutáneas leves e intoxicaciones alimentarias a enfermedades potencialmente mortales como el síndrome del shock tóxico, neumonía necrotizante y septicemia. La gravedad de la patología causada por *S. aureus* depende de un amplio espectro de factores de virulencia y de la resistencia a los antibióticos (2,3).

Algunos de los factores de virulencia que puede presentar *S. aureus* está representados por una familia de proteínas bacterianas con actividad superantigénica: las enterotoxinas, toxina del síndrome del shock tóxico, toxinas exfoliativas, otras toxinas como las toxinas α , β , γ , y δ , factores como la α y β -hemolisina, la arginina desaminasa y la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL). La PVL es una exotoxina producida por ciertas cepas de *S. aureus*, cuya acción causa la destrucción de células polimorfonucleares. En 1932, sus descubridores (Pantón y Valentine) sugirieron que era responsable de infecciones estafilocócicas severas en humanos. Las hemolisinas también son reconocidas como potenciales factores de virulencia de *S. aureus* que actúan atacando la membrana celular y producen destrucción plaquetaria, destrucción lisosomal, isquemia y necrosis, por lo que son importantes en el desarrollo de patologías graves (4-10).

Las toxinas exfoliativas (ET) de *S. aureus* son proteínas extracelulares responsables de las manifestaciones cutáneas de la enfermedad denominada impétigo bulloso y en su forma diseminada del síndrome estafilocócico de la piel escaldada (SSSS, por sus siglas en inglés). Este síndrome consiste en una dermatitis exfoliativa que afecta principalmente a neonatos y niños pequeños y resulta de la infección por *S. aureus* productor de estas toxinas. Se caracteriza por la formación de grandes ampollas sin infiltrado de células inflamatorias y separación de extendidos de la epidermis del estrato granuloso, dejando la queratina intacta (11,12).

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales problemas para la salud pública. *S. aureus* es el agente etiológico más frecuente entre las intoxicaciones de origen alimentario. Su presencia en alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, por inadecuadas prácticas de manufactura o por la utilización de materia prima contaminada. Uno de los principales factores de virulencia de *S. aureus* son las enterotoxinas (SE), proteínas simples, termotolerantes y de bajo peso molecular; las principales detectadas en intoxicaciones alimentarias son *sea, seb, sec, sed, see* y *seh* (13).

La aparición de cepas de *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR), portadoras de factores de virulencia, requiere una mayor vigilancia epidemiológica. El Paraguay no cuenta con datos epidemiológicos que indiquen si las cepas de *S. aureus* que circulan en niños son

portadoras de genes que codifican factores de virulencia, lo cual agravaría la infección causada por dicha bacteria. En el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), se han iniciado estudios que han mostrado la portación del *S. aureus* en trabajadores de la salud del Hospital General Pediátrico Acosta Nú (HGP) y arrojaron los primeros datos sobre caracterización molecular de aislados de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras clínicas de niños, en los que se detectó la presencia del gen *mecA* y el codificante de la PVL (14-16).

El presente estudio tuvo como objetivo principal la detección de genes codificantes de factores de virulencia: hemolisinas α y β y enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *seh*, toxinas exfoliativas A y B por métodos moleculares en aislamientos de *S. aureus* provenientes de infecciones en niños.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Se desarrolló un estudio con diseño observacional descriptivo de corte transversal, con muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

Aislados Bacterianos

Se incluyeron en el presente trabajo los aislamientos de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras clínicamente significativas como secreciones de piel, partes blandas y líquidos de punción provenientes de niños menores de 17 años que concurrieron al HGP durante el 2010. Estos aislados formaron parte de un proyecto de investigación anterior aprobado por el Comité de Ética del IICS, en el cual se realizó la detección del gen *mecA* (codificante de la resistencia a metilicina) y *pvl* (codificante de la Leucocidina de Pantón Valentine) por técnicas de PCR utilizando oligonucleótidos descritos por Murakami y Lina respectivamente (9,17). Los aislados incluidos cumplieron los criterios de inclusión para ser considerados *S. aureus* adquiridos en la comunidad, ya que fueron obtenidos por el laboratorio de microbiología de dicho nosocomio dentro de las 72 horas de internación de los pacientes. La totalidad de los aislados se encontraban criopreservados en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS y cuentan con ficha epidemiológica completa del paciente al que pertenecen así como con datos microbiológicos de la bacteria (9,15,16).

Fueron excluidos del trabajo aquellos aislados de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras clínicas como hisopados faríngeos, nasales y secreciones traqueales, para evitar incluir muestras de niños sanos que podrían ser portadores de *S. aureus*, así como también aquellos que hayan sido obtenidos posteriormente a las 72 horas de internación del paciente para evitar la inclusión de posibles *S. aureus* hospitalarios (18).

Extracción del ADN

Se utilizó un método simplificado basado en ebullición para la extracción rápida de ADN de los aislados de *S. aureus* (19).

Amplificación por PCR

Diversas PCRs múltiples fueron desarrolladas para la detección en paralelo de la presencia de los siguientes genes: *sea+seb+sec*, *sed*, *seh*, *h1A+h1B*, *eta+etb*. La presencia de ADN extraído en todas las muestras fue confirmada mediante detección del gen codificante del *ARNr 16s* como control interno de amplificación (13).

Las reacciones para la detección de los genes *sea+seb+sec*, *sed* y *ARNr 16S* fueron desarrolladas utilizando oligonucleótidos y condiciones descritas por Manfredi et al. (13). La reacción para detección del gen *seh* fue desarrollada según condiciones y oligonucleótidos descritos por Strommenger et al. (20).

La reacción para detección de los genes *hIA+hIB* fue llevada a cabo empleando oligonucleótidos y condiciones descritos por Wang et al., en el 2011. La detección de la toxinas exfoliativas A y B se realizó por medio de una reacción de PCR múltiple empleando oligonucleótidos y condiciones descritos por Johnson et al. (8,21).

Para la estandarización de la PCR para la detección de los distintos genes codificantes de factores de virulencia se utilizaron 259 muestras de ADN provenientes de un biobanco de ADN de *S. aureus*, a fin de aumentar la posibilidad de encontrar aislados portadores de estos factores de virulencia y usarlos posteriormente como controles positivos de reacción. Se confirmó la identidad de los productos de PCR obtenidos mediante la secuenciación de un producto de PCR de tamaño esperado para cada factor de virulencia detectado: *sea* 521pb, *seb* 667pb, *sec* 284pb, *sed* 385pb, *seh* 358pb, *hla* 704pb, *hlb* 496pb, *eta* 119pb y *etb* 200pb. La secuenciación fue realizada en el servicio de la empresa MacroGen, Corea. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information-EEUU) y alineadas mediante el uso del software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Las secuencias alineadas mostraron homología del 99% para los genes *sea*, *seb*, *sec*, *seh*, 95% para el gen *sed*, 96% *hla*, 100% *hlb*, 97% *eta* y 99% *etb*. Estos aislamientos con productos confirmados por secuenciación se emplearon como controles positivos de amplificación en las reacciones de PCR (Figura 1).

Separación de fragmentos

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) y 110 V. La tinción se realizó con Bromuro de Etidio al 1,2% y se procedió al revelado con cámara fotográfica bajo luz UV para la observación de los productos de amplificación obtenidos y documentación de los mismos. El tamaño de los productos obtenidos por amplificación fue estimado por comparación con un marcador de pesos moleculares (100 pb DNA ladder, Fermentas).

Estadística y gestión de datos

Los datos de las muestras obtenidos de la ficha clínica-epidemiológica, fueron introducidos y analizados en una planilla Excel 5.0. y en el programa Epi-Info (Versión 3.4.3; 2007). Las variables dicotómicas fueron expresadas como porcentajes. Se emplearon el test del Chi-cuadrado, test de Fisher y el valor de significancia estadística para evaluar diferencias estadísticas entre variables nominales.

Asuntos Éticos

Se mantuvo la confidencialidad en el manejo de los datos, registrando las muestras de manera estricta bajo códigos. La información obtenida se utilizó con fines científicos exclusivamente. Las muestras analizadas en este trabajo proceden de un protocolo de investigación anterior aprobado por los comités científico y de ética del IICS, por lo que para la realización del presente estudio se contó con el visto bueno de los investigadores del estudio original y se respetó la autoría de los mismos.

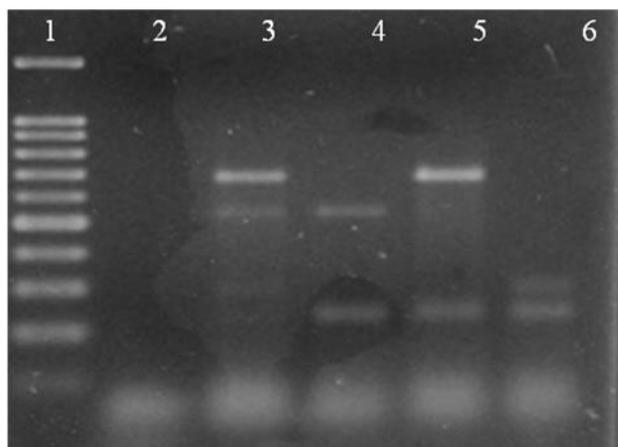


Figura 1: Estandarización PCR *sea+seb+sec+ARNr 16S* con muestras del biobanco; 1) Marcador de pesos moleculares de 100 pb; 2) Control negativo de reacción; 3) Controles positivos genes *sea* (521pb), *seb* (667pb), *sec* (284pb) y *ARNr 16S* (228pb); 4) Muestra positiva genes *sea* y *ARNr 16S*; 5) Muestra positiva genes *seb* y *ARNr 16S*; 6) Muestra positiva gen *sec* y *ARNr 16S*.

RESULTADOS

Se estudiaron 50 aislados de *S. aureus* provenientes de niños cuyas edades estaban comprendidas entre 1 mes y 17 años, con un promedio de edad de 6,2 años, remitidos por el HGP en el período comprendido entre enero y noviembre del año 2010. Las características poblacionales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de la población estudiada (n=50)

Características de la Población	Cantidad (%)
Sexo	
Masculino	28 (56)
Femenino	22 (44)
Origen de los aislamientos	
Infecciones de Piel y Partes blandas	41 (82)
Sepsis (Hemocultivos)	9 (18)
Óbito	3 (6)

Los pacientes que fallecieron presentaron cuadros clínicos de sepsis con focos múltiples, uno de ellos tenía diagnóstico de neumonía bilateral y presentaba como comorbilidad asociada Lupus Eritematoso Sistémico (LES), el segundo padecía Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), el tercero sin comorbilidad, con diagnóstico de absceso cerebral y neumonía bilateral. Los aislados de estos tres pacientes fueron sensibles a metilicina (SASM) y uno de ellos presentaba *pvl*. Dos se aislaron en enero y el tercero en febrero, con un promedio entre 15 y 30 días de aparición entre uno y otro.

En referencia a los factores de virulencia, 29 (58,0%) aislados eran portadores del gen codificante de la PVL, de los cuales 26 (90%) produjeron infecciones de piel y partes blandas y 3 (10%) produjeron sepsis, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Test de Fischer, $p=0,100$).

Al analizar la presencia de enterotoxinas en los 50 aislados sólo se encontró 1 aislado (2%) portador del gen *seh*, (Figura 2). El paciente infectado presentaba como diagnóstico clínico osteomielitis de fémur distal derecho, sin enfermedad de base y presentó remisión del cuadro a los cinco días, sin necesidad de procedimientos invasivos para su tratamiento.

En este trabajo hemos detectado, por métodos fenotípicos, 2 (4%) aislados α -hemolíticos, 43 (86%) β -hemolíticos y 5 (10%) aislados γ -hemolíticos. Los aislados portadores del gen *h1B* resultaron ser β -hemolíticos y portadores del gen *h1A* de manera simultánea (Tabla 2). Los aislados que presentaron α y γ hemólisis no eran portadores de genes que codifican para hemolisinas. No se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de hemolisinas y la gravedad del cuadro clínico ($p=0,177$, Test Exact Fisher).

Se detectó un solo aislado que portó de manera simultánea los genes codificantes de las toxinas exfoliativas A (2%) y B (2%).



Figura 2: PCR para detección gen *seh* (358pb). Carriles: 1) Marcador de pesos moleculares de 100pb; 2) Control negativo de reacción; 3) Muestra positiva para el gen *seh*; 4 y 5) Muestras negativas.

Tabla 2. Resultados de detección molecular (n=50)

Gen (factor de virulencia que codifica)	Cantidad (%)
<i>pvl</i> (Leucocidina de Pantón Valentine)	29 (58)
Enterotoxinas	
<i>seh</i> (enterotoxina H)	1 (2)
Hemolisinas	
<i>hIA</i> (α - hemolisina)	8 (16)
<i>hIB</i> (β - hemolisina)	4 (8)
Toxinas Exfoliativas	
<i>eta</i> (toxina exfoliativa A)	1 (2)
<i>etb</i> (toxina exfoliativa B)	1 (2)

DISCUSIÓN

En este estudio, en el que se analizaron *S. aureus* adquiridos de la comunidad que produjeron infecciones en niños, la portación del gen codificante de la PVL se observó en más de la mitad de los aislados estudiados y la mayoría de ellos (90%) produjo infecciones de piel y partes blandas. Estos hallazgos coinciden con los encontrados por Shallcross et al., en Londres (6) que determinaron que la infección causada por aislados SAMS PVL positivos estaba fuertemente asociada a infecciones de piel y tejidos blandos y existía una probabilidad cuatro veces mayor de que estos aislados contengan PVL, que los provenientes de otros tipos de muestras (OR 4,4, 95% CI 2,2-8,9, $p < 0,001$), independientemente de si los aislados eran SARM o no.

El rol de la PVL en la patogénesis y desarrollo de infecciones estafilocócicas invasivas severas es en, general, controversial. Las cepas de *S. aureus* portadoras de la PVL han surgido mundialmente como causantes de infecciones severas de piel y tejidos blandos, neumonía necrotizante y sepsis, afectando principalmente a personas jóvenes, niños e individuos saludables que no han tenido contacto previo con el personal de salud, lo cual sugiere que la infección es adquirida en la comunidad. Estudios más recientes destacan la ausencia del rol de PVL en infecciones de piel y partes blandas, pero sugieren la influencia de ésta en el curso de infecciones pulmonares y de huesos en modelos animales (5,6).

Las enterotoxinas producidas por *S. aureus* son causantes de una gran mayoría de las infecciones de origen alimentario (ETA); si bien las enterotoxinas no tienen un papel muy importante en infecciones de piel y partes blandas. De allí la baja frecuencia encontrada (2,0%) en este trabajo con respecto a otros como el de Manfredi et al. y colaboradores en 2010 (13), quienes encontraron sobre 61 aislados, un 53% de aislados positivos para enterotoxinas por métodos moleculares, siendo el más frecuente el gen *sea* con 55,7%; pudiendo éstas ser potencialmente riesgosas para infecciones alimentarias. Existe el antecedente de una industria láctea paraguaya en el que un operario de la línea de producción, portador sano de *S. aureus* positivo para enterotoxinas C y D, originó un brote de intoxicación alimentaria en el que se reportaron 400 casos, 60 debieron ser hospitalizados y 1 lactante menor de 1 año falleció (22). Este hecho pone de manifiesto la importancia de la detección de portación de *S. aureus* que puede traducirse en intoxicaciones alimentarias. En el caso de nuestra población en estudio, es importante destacar la baja frecuencia de portación de estos factores de virulencia, pero deben extremarse cuidados para evitar que los niños previamente infectados se conviertan posteriormente en portadores sanos.

En el presente estudio el gen más frecuentemente hallado fue el *hIA* (16,0%), pero en bajo porcentaje, tal como lo reportan Wang et al. (8). No se detectaron genes codificantes de hemolisinas en aislados fenotípicamente no hemolíticos. Sin embargo, se observó una discordancia entre fenotipo α -hemolítico y la presencia del gen *hIA*, tanto como el fenotipo β -hemolítico y la presencia del gen *hIB*. Este fenómeno fue anteriormente descrito en estudios realizados por otros autores (8), que encontraron que el gen *hIB* (42,6%) es más frecuente que el *hIA* (34,9%). En las cepas α -hemolíticas se encontró que el gen *hIB* aparece con mayor frecuencia que *hIA*, sin embargo, en las cepas β -hemolíticas detectaron igual frecuencia de genes *hIA* y *hIB*. Los resultados obtenidos por ellos muestran fenotipos no hemolíticos que contienen ambos genes, sugiriendo que la presencia de éstos de manera simultánea hace que se silencien mutuamente y por eso no se observa el fenotipo hemolítico. Postulan además, que en las cepas α y β hemolíticas, en las cuales no fueron detectadas los genes *hIA* o *hIB*, podrían ser expresadas las γ o δ hemolisinas (8).

En un estudio realizado por Larsen et al., en 2002, el 97% de los aislados fue positivos por PCR para el gen *hIB* y producía β -hemólisis en agar sangre al 5%, exceptuando 3, que fueron negativos por PCR pero produjeron β -hemólisis en agar sangre (23). En nuestro trabajo también observamos un alto porcentaje de aislados β -hemolíticos (86%), pero sólo en un 9,3% de ellos se pudo detectar el gen *hIB*.

La frecuencia de aislados portadores de los genes codificantes de toxinas exfoliativas A y B en este estudio fue baja, lo cual coincide con los datos clínicos de las muestras de las cuáles provenían, ya que ninguno de ellos ocasionaron el síndrome de la piel escaldada, aún así estos niveles se encuentran dentro del rango reportado por otros autores a nivel mundial (24–26).

El impacto de este estudio no sólo se circunscribe al hallazgo y descripción de la frecuencia de estos factores de virulencia en esta población de *S. aureus*, sino que puede tener una proyección a futuro, con el potencial de empleo de estas técnicas moleculares para la caracterización de *S. aureus* en otros contextos, como por ejemplo en infecciones alimentarias y en el control de portadores tanto en ámbitos hospitalarios como en manipuladores de alimentos. Si bien no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre estos factores de forma individual y el desarrollo de cuadros graves, es necesario realizar estudios más amplios destinados a analizar el resultado de las infecciones causadas por aislados con múltiples factores de virulencia asociados. En este estudio, se logró caracterizar el perfil de virulencia de aislados de *S. aureus* de niños del HGP, siendo el gen codificante de la leucocidina de Pantón Valentine (PVL) el más frecuentemente detectado, seguido de las hemolisinas alfa, beta, la enterotoxina H y las toxinas exfoliativas A y B.

AGRADECIMIENTOS

Al GRUPO DE ESTUDIO de *Staphylococcus aureus*, compuesto por médicos, microbiólogos y biólogos moleculares del Hospital General Pediátrico, Hospital de Clínicas, Hospital Nacional, Instituto de Previsión Social e Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, que colaboran de forma activa en la colecta de muestra y análisis crítico de los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. 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.

3. Paganini M, Della LP, Muller OB, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, et al. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. *Rev chil infectol.* 2009; 26(5):406–12.
4. Sauer P, Síla 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.
5. Ritz N, Curtis N. The role of panton-valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31(5):514–8.
6. Shallcross LJ, Williams K, Hopkins S, Aldridge RW, Johnson AM, Hayward AC. Pantón–valentine leukocidin associated staphylococcal disease: A cross-sectional study at a London hospital, England. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(11):1644–8.
7. Bae I-G, Tonthat GT, Stryjewski ME, Rude TH, Reilly LF, Barriere SL, et al. Presence of genes encoding the panton-valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Results of a multinational trial. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(12):3952–7.
8. Wang X, Meng J, Zhang J, Zhou T, Zhang Y, Yang B, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. *Int J Food Microbiol.* 2012; 153(1-2):142–7.
9. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, 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.
10. Day SR, Moore CM, Kundzins JR, Sifri CD. Community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence toward *Caenorhabditis elegans* compared. *Virulence.* 2012 ;3(7): 576-82
11. Plano LRW, Gutman DM, Woischnik M, Collins CM. Recombinant *Staphylococcus aureus* Exfoliative toxins are not bacterial superantigens. *Infect Immun.* 2000; 68(5):3048–52.
12. Kato F, Kadomoto N, Iwamoto Y, Bunai K, Komatsuzawa H, Sugai M. Regulatory mechanism for Exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2011; 79(4):1660–70.
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. *Revista argentina de microbiología.* 2010;42(3):212–5.
14. Sola C, Gribaudo G, Vindel A, Patrio 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.
15. Carpinelli L. Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus aureus* aislados de trabajadores de la salud de un centro hospitalario de referencia nacional /Tesis/. Asunción: UNA. Dirección General de Postgrado, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, IICS; 2011.
16. 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.
17. 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.
18. Wertheim H, Melles D, Vos M, Vanleeuwen W, Vanbelkum A, Verbrugh H, et al. The role of nasal carriage in infections. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5(12):751–62.
19. Lan J, Walboomers JM, Roosendaal R, van Doornum GJ, MacLaren DM, Meijer CJ, et al. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(5):1060–5.
20. Strommenger B, Bräulke C, Pasemann B, Schmidt C, Witte W. Multiplex PCR for rapid detection of *Staphylococcus aureus* isolates suspected to represent community-acquired strains. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(2):582–7.
21. Johnson AP, Pearson A, Duckworth G. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(3):455–62.
22. 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.

23. Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol.* 2002; 85(1):61-7.
24. Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q, Tu S-I, et al. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *PLoS ONE.* 2011; 6(12):e28276.
25. 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.
26. 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.