

Leucocidina de Panton Valentine en cepas SAMR aisladas de pacientes del Hospital Universitario de Maracaibo

Panton Valentine leukocidin in MRSA strains isolated from patients at the University Hospital of Maracaibo

**Romero A. Sonia¹, Castellano G. Maribel¹,
Ginestre P. Messaria¹, Perozo M., Armindo².**

¹Bacteriología General. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia-Venezuela. ²Práctica Profesional de Bacteriología. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia-Venezuela.

Autor de correspondencia: Sonia Romero.
E-mail: sromero272@hotmail.com

Resumen

Staphylococcus aureus se presenta como un patógeno cada vez más importante, debido al arsenal de factores de virulencia que presenta, sumado a su elevada capacidad de generar resistencia a los antimicrobianos. Los objetivos de esta investigación fueron: confirmar la resistencia a meticilina mediante la amplificación del gen *mecA* y detectar la presencia de los genes que codifican el factor de virulencia leucocidina de Panton Valentine (PVL). Se investigaron estos genes empleando la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Todos los aislamientos presentaron el gen *mecA*, el 50% de estas cepas resultó portador del gen para PVL. El 54,17% de las muestras de pacientes pediátricos, dio positivo para esta leucocidina. El mayor porcentaje de aislamiento se encontró en muestras de piel y tejidos blandos (85,7%).

Palabras claves: *S. aureus* meticilino resistente; PVL; *mecA*

Abstract

Staphylococcus aureus is an increasingly important pathogen, due to the arsenal of virulence factors which presents, in addition to its high capacity to generate antimicrobial resistance. The objectives of this research were: confirm methicillin resistance by amplification the *mecA* gene and the presence of genes that encode Pantón Valentine leucocidin (PVL) virulence factor. These genes have been investigated using polymerase chain reaction (PCR). All isolates showed the *mecA* gene, 50% of these strains were carrying the gene for PVL. 54,17% of the samples from pediatric patients, yield positive for this leukocidin. The highest percentage of isolation was found in samples of skin and soft tissues (85.7%).

Keywords: Methicillin-resistant *S. aureus*, PVL; *mecA*

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una de las especies más comúnmente implicadas en estas infecciones. Uno de los principales desafíos que enfrentan hoy en día los sistemas de salud a nivel mundial, es el gran aumento de la resistencia a los antimicrobianos. El género estafilococo, principalmente *S. aureus*, ha desarrollado resistencia a prácticamente todas las familias de antibióticos (1, 2).

Una amplia variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel hasta infecciones de heridas postoperatorias pueden ser causada por *S. aureus*. Por tanto, se describen con frecuencia procesos focales como: foliculitis, forunculosis, abscesos, infecciones como celulitis donde el compromiso tegumentario es de piel y tejido celular subcutáneo. Por vía hematogena puede afectar órganos nobles como corazón, pulmón o sistema nervioso central (SNC), causando infecciones severas como neumonía, endocarditis, meningoencefalitis y sepsis (3,4).

Desde la aparición de *S. aureus* resistente a metilicina (SAMR) en Inglaterra en 1961, su incidencia ha ido en constante aumento constituyéndose en uno de los patógenos prevalentes en infecciones hospitalarias (5). Las infecciones por SAMR asociados a los hospitales (SAMR-AH), generalmente ocurren en

personas con factores de riesgo predisponentes, como cirugías o presencia de dispositivos médicos permanentes (3, 6); sin embargo, la epidemiología de SAMR ha ido cambiando con el transcurso del tiempo. En los últimos años, se ha observado un incremento de infecciones adquiridas en la comunidad causadas por este microorganismo, en pacientes sin factores de riesgo. Los primeros casos se reportaron en niños, luego en adultos y en la actualidad, están diseminados por todo el mundo (5,7).

La presión de los antibióticos ha favorecido la evolución genética de *S. aureus*, con la consecuente aparición de cepas con diferentes determinantes de virulencia y patrones variables de susceptibilidad, que difieren no solo epidemiológicamente sino también en los tipos de infecciones que producen. Así, se reportan cepas de *S. aureus* sensibles a metilicina (SASM), SAMR asociadas al ambiente hospitalario o nosocomiales (SAMR-AH) y SAMR asociado a la comunidad (SAMR-AC) (6, 8). Aunque existen diferencias genéticas entre las cepas adquiridas en la comunidad y las nosocomiales, ambas presentan genes comunes como el *mecA* y el gen del factor de virulencia que codifica para la leucocidina de Pantón-Valentine, entre otros (9).

Actualmente, la resistencia a la metilicina es un hallazgo frecuente y representa un problema importante de salud pública a nivel mundial. El gen *mecA*, responsable de la resistencia a la metilicina en *S. aureus*,

no es endógeno y se encuentra integrado al cromosoma bacteriano. Este gen se encuentra dentro de un elemento cromosomal móvil heterogéneo conocido como “*Staphylococcal cassette chromosome mec*” (SSC*mec*). Hasta la fecha se han descrito 11 tipos de SSC*mec* (10). Este elemento genético también ha sido encontrado en otras especies de estafilococos y se cree que las especies coagulasa negativa constituyen un reservorio para la adquisición de SSC*mec*; así, que el surgimiento de linajes de estafilococos resistentes a la meticilina se debe a la adquisición y la inserción del elemento de SSC*mec* en el cromosoma de cepas susceptibles (10, 11, 12).

La leucocidina de Panton-Valentine (Panton-Valentine leukocidin; PVL, por sus siglas en inglés), es una leucocidina bicomponente codificada por dos genes cotranscritos, a saber, *lukS*-PV y *lukF*-PV (*lukS*/F-PV), que residen en el genoma de un bacteriófago templado *phi*PVL aislado de *S. aureus* V8 (ATCC 49775) (13, 14, 15). Este factor es una citotoxina que se une a los fosfolípidos de la membrana de los leucocitos y macrófagos, induciendo la formación de poros que alteran la permeabilidad celular, causando destrucción de leucocitos y necrosis tisular (16). Se cree que la PVL es uno de los factores de virulencia responsable de la alta patogenicidad de las cepas que la presenten, lo que ocasiona desde infecciones simples a nivel de piel y tejidos blandos, hasta enfermedades invasivas como neumonía necrotizante, sepsis severa y fascitis necrotizante, que ponen en riesgo la vida del individuo (5, 17).

Los intentos por demostrar que la PVL tiene un papel en la patogénesis de la enfermedad, ha llevado a realizar investigaciones con mutantes de delección isogénica (*lukF*-PV y *lukS*-PV) en modelos animales infectados que han producido resultados no concluyentes y han llamado también la atención sobre la importancia potencial de otros determinantes de virulencia, tales como: α -hemolisina, péptidos solubles de modulina α , y el regulador de virulencia *Agr* (18, 19). Al mismo tiempo, la investigación ha demostrado que la asociación epidemiológica entre SAMR asociado a la comunidad y la PVL está lejos de ser absoluto, con varias cepas SAMR asociadas a la comunidad PVL negativas

descritas en todo el mundo (20)

Recientemente, numerosos estudios han informado la aparición de cepas SAMR-AC dentro del ámbito hospitalario, lo que representa una amenaza significativa para la salud pública (16, 21, 22); por lo que, durante los últimos años, la distinción entre SAMR -AH y SAMR -AC ha comenzado a desaparecer, por lo que cepas de SAMR -AC ahora son endémicas en muchos hospitales de Estados Unidos (23).

Los objetivos de esta investigación fueron: a) confirmar la resistencia a meticilina mediante la amplificación del gen *mecA*. b) detectar la presencia de los genes *lukF*-PV y *lukS*-PV, que codifican el factor de virulencia PVL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se estudiaron 42 cepas SAMR aisladas en el laboratorio de referencia bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), de distintos tipos de muestras (secreciones de: herida, oído, conjuntiva ocular, traqueales; abscesos, úlceras y sangre), provenientes de pacientes adultos y pediátricos, que acudieron al centro hospitalario, en el lapso comprendido entre enero y marzo de 2015.

Amplificación del gen *mecA* y los genes productores de PVL mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Extracción del ADN: Para la extracción del ADN genómico de estas cepas, se utilizó la técnica de lisis enzimática para lo cual, a partir de un cultivo puro de 24 horas, se tomaron aproximadamente un mínimo de 10 colonias, y se colocaron en un tubo con 400 μ l de buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 25 ng/ μ l de lisostafina), como buffer de lisis, incubándose a 37°C por 1 hora. Luego, se le agregó 40 μ l de SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 1% y 10 μ l de proteinasa K a una concentración de 250 ng/ μ l, y se incubó a 50°C por 1 hora. Se tomaron 400 μ l de la mezcla y se realizó la extracción con una mezcla de fenol-cloroformo 1:1.

La mezcla se agitó y se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos. Con una pipeta, se extrajo

la fase acuosa, colocándola en un nuevo tubo eppendorf. El ADN contenido en la fase acuosa fue precipitado con 1 ml de etanol absoluto (100%) y se almacenó a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, previo descongelado, se procedió a centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al sedimento, se le agregó 400 μl de etanol al 70% y se dejó secar durante 30 minutos, colocando los tubos eppendorf destapados sobre un papel absorbente. El sedimento se resuspendió en 100 μl de buffer TE 10 mM. Para realizar los ensayos de amplificación se utilizaron 3 μl de la muestra.

Los iniciadores utilizados durante el proceso de amplificación para *mecA* fueron: 5'-AAC AGG TGA ATT ATT AGC ACT TGT AAG-3' y 5'-ATT GCT GTT AAT ATT TTT TGA GTT GAA-3'. Como controles positivos se utilizaron secuencias 16s RNAr específico de *Staphylococcus*: 5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3' y 5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3' (24).

La caracterización genotípica de la PVL se realizó por coamplificación de los genes *lukS-PV* y *lukF-PV* mediante PCR. Se empleó el mismo ciclo de reacción, actuando como iniciadores *luk-PV-1*: 5'-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3' y *luk-PV-2*: 5'-GCA TCA AST GTA ATT GGA TAG CAA AAG C-3' (14, 15, 16, 25).

Una alícuota de 3 μl del ADN previamente extraído de *S. aureus*, se transfirió directamente a 20 μl de mezcla para PCR, que contiene: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 9,0); 0,1% Tritón X-100; 2,5 mM MgCl₂; 0,4 μM de cada uno de los iniciadores, 200 μM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato y 0,5 U de ADN polimerasa Taq (Promega®). Las mezclas de PCR fueron sometidas a un ciclo térmico en un termociclador modelo PTC-200 (MJ Research, Inc®, Massachusetts, USA), como se describe a continuación: 5 minutos a 96°C ; 35 ciclos de 20 segundos a 95°C , 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C . Luego, 5 minutos a 72°C y conservados indefinidamente a 4°C .

Un volumen de 5 μl de los productos de la amplificación, fueron sometidos a la separación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% conteniendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio, en buffer tris-borato-EDTA (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) a 80

V/cm, durante 90 minutos. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta (254 nm) y se fotografiaron con una cámara digital.

El tamaño de los productos de amplificación de la PCR se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb. De manera que, la presencia de una banda de 174 pb fue indicativa de la presencia de *mecA* y una de 433 pb, mostró la presencia del gen que codifica para PVL. Todas las cepas amplificaron la banda de 108 pb, correspondiente al control interno para la identificación de *S. aureus*.

El análisis estadístico de los datos de este estudio se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS™ versión 21. Para determinar si existe asociación entre las variables estudiadas se utilizó el estadístico de contraste χ^2 (chi-cuadrado), empleando un valor de $p < 0,05$, como índice de confiabilidad estadística.

RESULTADOS

Todas las cepas amplificaron para el gen *mecA*, confirmándose genotípicamente su resistencia a meticilina. (Figura 1)

El análisis de PCR efectuado para determinar la presencia de los genes codificadores de PVL reveló que de las 42 cepas SAMR, 21 (50,00%) fueron positivas (Figura 2). Del total de cepas, 24 provenían de muestras de pacientes pediátricos (57,14%) y 18 cepas (42,86%) fueron aisladas de muestras de adultos. Al aplicar el chi-cuadrado, se encontró asociación significativa entre el tipo de paciente y la presencia de estos genes ($p < 0,05$).

De los 24 aislamientos SAMR de muestras pediátricas positivos para PVL, 13 (54,17%) presentaron genes que codifican esta toxina y 11/24 (45,83%) resultaron negativos. En relación con las cepas aisladas de muestras de pacientes adultos, los resultados obtenidos fueron 8/18 cepas, dieron resultados positivos (44,44 %) y 10 (55,56%) reflejaron negatividad para esta prueba (Tabla 1).

Los resultados obtenidos en la determinación de los genes para la PVL según el tipo de muestra clínica revelaron diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el tipo de muestra y la producción de esta toxina (Tabla 2); observándose, que el mayor porcentaje provenía de muestras de piel y tejidos blandos

(PTB) (85,71%).

En la Tabla 3 se evidencia la relación entre presencia del gen *lukS/F-PV* que codifican la PVL, con los tipos de pacientes

y tipo de muestras. Aquí se refleja que el tipo de muestras donde existe el mayor número de aislamientos SAMR productor de PVL fue en PTB (18), de las cuales 12 cepas provenían de

muestras pediátricas y 6 de muestras de adultos.

Figura 1. Amplificación mediante PCR del gen *mecA* en cepas SAMR

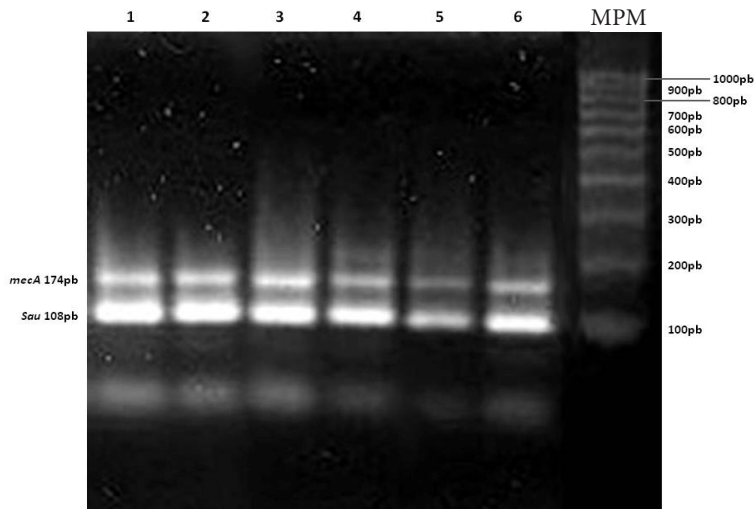
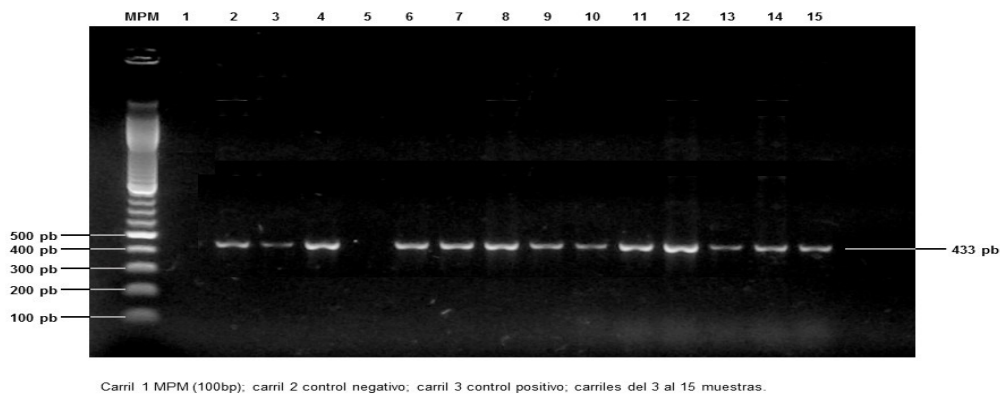


Figura 2. Detección del gen *lukS/F-PV* por PCR en cepas SAMR



MPM (100bp); carril 1 control negativo; carril 2 control positivo; carriles del 3 al 15 muestras

Tabla 1. Distribución del gen *lukS/F-PV* en grupos de pacientes

Genes de LPV			
Tipo de Paciente	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)
Pediátrico	13(54,17)	11(45,83)	24(100)
Adulto	8(44,44)	10(55,56)	18(100)

Tabla 2. Distribución de genes que codifica PVL de acuerdo al tipo de muestra

Gen <i>lukS/F-PV</i>		
Tipo de Muestra	Positivo n (%)	Negativo n (%)
PTB*	18(85,71)	13(61,90)
Sangre	1(4,76)	3(14,29)
Otras**	2(9,53)	5(23,81)
Total	21(100)	21(100)

*Piel y tejidos blandos

** Catéter, secreción traqueal, oído externo y conjuntiva ocular

Tabla 3. Relación entre presencia de genes para PVL, tipo de paciente y muestras

Tipo de Muestra	Gen <i>lukS/F-PV</i>				Total	
	Adulto		Pediátrico		Positivo n=21	Negativo n=21
	Positivo n=8	Negativo n=10	Positivo n=13	Negativo n=11		
PTB*	6	5	12	8	18	13
Sangre	1	3	0	0	1	3
Otras**	1	2	1	3	2	5

*Piel y tejidos blandos

** Catéter, secreción traqueal, oído externo y conjuntiva ocular

DISCUSION

En la actualidad *S. aureus* es un patógeno cada vez más importante, debido al arsenal de factores de virulencia del microorganismo, sumado a su elevada capacidad de generar resistencia a los antimicrobianos. Los estudios sobre las características epidemiológicas moleculares de las cepas SAMR han demostrado su diversidad genética y geográfica (26).

Todos los aislamientos SAMR obtenidos en este estudio presentaron el gen *mecA*. Otros autores (5, 27, 28), obtuvieron resultados similares al de esta investigación, en cuanto a la presencia del gen *mecA* en todas las cepas SAMR aisladas. Sin embargo, Montes (5) en una investigación realizada en Colombia, de un total de 37 aislamientos, solo 7 (18.9%) presentaron este gen. En un estudio realizado en Irán (29)

de 50 cepas SAMR, solo el 30% (15) de estas cepas fueron positivas para este gen.

El mecanismo que confiere resistencia a meticilina, es complejo, ya que la bacteria ha generado una variación genética, que se encuentra codificada por el gen *mecA*, la cual modifica la estructura de su proteína ligadora o fijadora a penicilina (PBP2a), lo que impide que la meticilina pueda adherirse al lugar donde va a ejercer la acción de bloquear la enzima transpeptidasa (cuya función en el ciclo de vida bacteriana es sintetizar la pared bacteriana) (11, 12, 30, 31). Este mecanismo confiere a esta bacteria resistencia absoluta contra las penicilinas semi sintéticas (meticilina y oxacilina) y cefalosporinas de primera y segunda generación. Pero además, es el determinante central que codifica la resistencia

a los betalactámicos de amplio espectro; dejando sin efecto todos los betalactámicos, incluyendo cefalosporinas de tercera, cuarta generación y los carbapenemes (imipenem, meropenem). La resistencia conferida por este gen se extiende a otras familias de antibióticos como las quinolonas y lincosamidas, lo que limita grandemente el tratamiento terapéutico (10, 11, 12).

El gen *mecA* es una región altamente conservada entre las especies de estafilococos, muestra alto nivel de homología en SAMR y estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina, por lo que es considerado como un marcador molecular adecuado en la determinación de resistencia en todas las especies de estafilococos (12). Sin embargo, en la actualidad se han descrito en varios países europeos, aislamientos SAMR portadores del gen *mecC*, procedentes de humanos y diversas especies animales. No obstante, los escasos estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha indican que la prevalencia de SAMR portador de *mecC* es baja entre la población humana (32, 33). En esta investigación, la resistencia a meticilina estuvo codificada por el gen *mecA* ya que todos los aislamientos dieron positivo para este gen, razón por la cual no se investigó este nuevo gen.

Las cepas de *S. aureus* portadoras de los genes de leucocidina Pantón-Valentine, son una amenaza emergente en todo el mundo, causando una variedad de infecciones incluso en individuos sanos. Se han realizado esfuerzos intensivos a lo largo de los últimos años hacia la detección y análisis de estos genes (15).

Los resultados obtenidos para verificar la producción del gen *lukS/F-PV* en el presente estudio son similares a los valores presentados por Giusty y cols (6) y Osman y cols (15), quienes obtuvieron 65,00% y 58,10% de positividad, respectivamente. Sin embargo, otros autores (29, 34, 35), reportaron porcentajes inferiores 18,8%, 7,1% y 6%, respectivamente, en la amplificación de estos genes.

En la población pediátrica evaluada en este estudio, los genes *lukS/F-PV* se detectaron en un 54,17%. Resultados diferentes obtuvieron Jiménez y cols (36) y Correa y cols (37), quienes mostraron cifras para estos genes de 73,00% y 80,92%, respectivamente.

Otros estudios han demostrado una fuerte

predisposición de estas cepas en pacientes más jóvenes y previamente sanos, Munckhof y cols (38), observaron una disminución constante de la presencia de PVL con el aumento de la edad, esto lo atribuyeron al fortalecimiento de la inmunidad asociado a la edad y a la inclinación natural de niños y adultos jóvenes de adquirir estas cepas por contaminación de piel durante la práctica de algún deporte o por juegos propios de su edad (39).

La relación entre la presencia de PVL, tipos de pacientes y tipo de muestras en esta investigación, reflejan resultados similares con los presentados por Giusty y cols (6), quienes reportaron que la incidencia de SAMR productores de PVL en infecciones de PTB fue de 81% en pacientes pediátricos y 59% en adultos, no existiendo diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de dichas infecciones entre ambos grupos de pacientes.

En España se han publicado alrededor de 40 casos, casi la mitad en edades pediátricas. La mayoría concierne a la experiencia obtenida de varios hospitales hasta el año 2007. Fundamentalmente concernientes a infecciones cutáneas leves, pero también se han comunicado casos graves de neumonía y meningitis (3).

Todas las cepas SAMR analizadas en este estudio son productoras del gen *mecA*. La determinación de los genes de PVL revelaron un porcentaje de positividad de 50% (21 cepas). Se observó una mayor recuperación de genes codificadores para PVL en cepas asociadas con muestras de PTB tanto en pacientes pediátricos como adultos.

Tener conocimiento sobre la prevalencia de SAMR y sus factores de virulencia es útil para el tratamiento y control de las infecciones adquiridas en los hospitales y en la comunidad. Estudios moleculares han evidenciado, que algunos de estos aislamientos portan genes codificadores de PVL, las cuales conducen a infecciones con diferente apariencia clínica, cuya mortalidad puede llegar al 75%. Por lo tanto, la monitorización frecuente de este patógeno, su susceptibilidad a los antibióticos y la determinación de sus factores de virulencia es de gran importancia en el control y tratamiento de las infecciones (29).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cervantes, E.; García, R.; Salazar, P. Características generales de *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2014; 61(1):28-40.
2. Carpinelli M, Guillén R, Fariña N, Basualdo W, Aquino R. PCR múltiple para la detección simultánea de los genes mecA y PVL en *Staphylococcus* spp. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2012; 10(1): 5-13.
3. Cobos N, Pitart C, Marco F, Almela M, Ortega M, Soriano A, et al. Epidemiología y forma de presentación clínica de las infecciones originadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina productor de leucocidina de Pantón-Valentine. Rev Esp Quimioter 2010; 23(2):93-99.
4. Echevarría J, Iglesias D. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Med Hered 2003;14(4): 195-203.
5. Montes O. 2014. Caracterización microbiológica y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* colonizantes de pacientes con patología nasal atendidos en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario del Caribe de la ciudad de Cartagena de Indias. Trabajo de Grado para Magister en Microbiología. Facultad de Medicina Universidad de Cartagena. Disponible en: http://190.242.62.234:8080/jspui/bitstream/11227/2661/1/TESIS_OSCAR_29_AGOSTO_MONTES%20OSCAR.pdf. Fecha de consulta: 25/11/2016.
6. Giusti A, Baroni M, Mendosa M, Nagel A, Virgolini S, Ochoteco C, et al. *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente adquirida en la comunidad: Detección de leucocidina de Pantón-Valentine y su relación con el sitio de aislamiento en pacientes de la ciudad de Santa Fe-Argentina. Rev Panam Infectol 2011; 13(2): 8-11.
7. Scribel da Silva L. 2009. Epidemiología clínica e molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina
carreadores de cassette cromosómico estafilocócico mec tipo IV de pacientes atendidos em hospital universitário de Porto Alegre. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Faculdade De Medicina Programa De Pós-Graduação Em Medicina: Ciências Médicas. Disponible en: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/17452?show=full>. Fecha de consulta: 03/11/2016.
8. Jiménez J, Correa M. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. Iatreia. 2009; 22 (2): 147-158.
9. Boyle S, Daum R. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón-Valentine leucocidin. Laboratory Investigation 2007; 87: 3-9.
10. Sánchez M, Hernández O, Velásquez L, Rivas D, Marín A, González L, et al. Caracterización del gen mecA de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. Infect 2013; 17(2): 66-72.
11. Sánchez L, Pavas N, Rojas A, Pérez N. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad en pacientes de Villavicencio, Colombia. Rev Cubana Med Trop 2016; 68(1). Disponible en: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/125/109> Fecha de consulta: 03/08/2016.
12. Castellano M, Perozo A. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Kasmera 2010; 38(1): 18-35.
13. Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Pantón-Valentine leukocidin genes. Gene. 1998; 215(1): 57-67.
14. McClure J, Conly J, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W et al. Novel Multiplex PCR assay for detection of the *Staphylococcal* virulence marker

- Panton-Valentine Leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. *J Clin Microbiol*, 2006; 44 (3): 1141–1144.
15. Osman N, Alrayah I, Mohamed Y, El-Eragi A, Eldirdery M, Salih M. 2015. Molecular study of Panton-Valentine Leukocidin genes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Khartoum State, Sudan. *American J Microbiol Research*, 2015, Vol. 3, No. 3, 107-111.
 16. Borrás C. 2006. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis Doctoral. Programa de Doctorado: Microbiología Médica. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. España. Disponible en: http://www.tesisenred.net/TDX/TDX_UB/TESIS/AVAILABLE/TDX1027106105221//CBO_TESIS_DOCTORAL.pdf. Fecha de consulta: 10/08/2016.
 17. Lozano D, Díaz L, Echeverry M, Pineda S, Máttar S. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba. *Universitas Scientiarum* 2010; 15 (2):159-165.
 18. Kobayashi S, Malachowa N, Whitney A, Braughton K, Gardner D, Long D, et al Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* 2011; 204: 937–41.
 19. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Rev Microbiol* 2010; 64: 143–62.
 20. Day N. Panton-valentine leukocidin and staphylococcal disease Vol 13 January 2013. Published Online: <http://www.thelancet.com/infection> Fecha de consulta: 06/11/2016.
 21. Moroney S, Arbuckle J, Talavera M, Widen R. Staphylococcal cassette chromosome mec and Panton-Valentine leukocidin characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1019-1021.
 22. Bratu, S, Eramo A, Koec R, Coughlin E, Ghitan M, Yost R, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. *Emerg Infect Dis* 2005;11:808–813.
 23. Deurenberg R, Vink C, Kalenic S, Friedrich A, Bruggeman C, Stobberingh E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 222–235.
 24. Martineau F, Picard F, Lansac N, Menard C, Roy P, Ouellette M, et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(2):231-238.
 25. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29(5): 1128-1132.
 26. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Rev Med Hered* 2010; 21: 4-10.
 27. Vandenesch F, Naimi T, Enright M, Lina G, Nimmo G, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: carrying worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9: 978-984.
 28. Baran C, Mutlu D, Baysan B, Günseren F, Ergani A, Oğünç D, et al. Investigation of Panton-Valentine leukocidin gene, SCCmec gene cassette types and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from outpatients. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(4):533-545.
 29. Motamedi H, Rahmat S, Moosavian S, Torabi M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients referred to educational hospitals

- in Ahvaz, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4601108/>. Fecha de consulta: 10/11/2016.
30. Hanssen A, Ericson Sollid J. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 46 (1):8-20.
 31. Velázquez-Meza, M. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Publica Mex* 2005; 47:381-387.
 32. Paterson G., Morgan F., Harrison E., Cartwright E., Török M., Zadoks E., et al. Prevalence and characterization of human mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(4): 907–910.
 33. Cano M, Monteagudo I, Mellado P, Ortega C. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina portador del gen mecC en un paciente con infección de herida. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(4):287–294.
 34. Shariati L, Validi M, Hasheminia A, Ghasemikhah R, Kianpour F, Karimi A et al. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: their frequency, antimicrobial patterns, and association with infectious disease in Shahrekord city, Southwest Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(1): Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4834141/pdf/jjm-09-01-28291.pdf>. Fecha de consulta: 10/11/2016.
 35. Bhatta D, Cavaco L, Nath G, Kumar K, Gaur A, Gokhale S. Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *Infect Dis.* 2016; 16:1-6.
 36. Jiménez J, Ocampo A, Vanegas J, Rodríguez E, Garcés C, Patiño L et al. Characterization of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a pediatric population in a University Hospital of Medellín, Colombia *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 2011; Rio de Janeiro, Vol. 106(8): 980-985.
 37. Correa O, Pinzón H y Reyes N. High frequency of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* causing pediatric infections in the city of Cartagena-Colombia. *J Infect Public Health.* 2016; 9(4):415-20.
 38. Munckhof W, Nimmo G, Carney J, Schooneveldt J, Huygens F, Inman-Bamber J. et al. Methicillin-susceptible, non-multiresistant methicillin-resistant and multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a clinical, epidemiological and microbiological comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27:355–364.
 39. Shrestha B, Singh W, Raj S, Pokhrel B, Mohapatra T. High prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes in nosocomial-acquired *Staphylococcus aureus* isolated from Tertiary Care Hospitals in Nepal. *BioMed Research International.* 2014: 1-7.