



1859

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

“Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de pacientes hospitalizados”

Tesis previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio clínico

AUTORA:

Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz

DIRECTORA:

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

LOJA – ECUADOR

2021

Certificación

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del trabajo investigativo titulado: **“Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de pacientes hospitalizados”**, de autoría de la **Srta. Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, cumpliendo los requerimientos en el marco del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, faculto a la autora para su presentación, disertación y defensa.

Loja, 05 de noviembre del 2021



Firmado electrónicamente por:
**CARMEN ALEJANDRA
ULLAURI GONZALEZ**

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

Autoría

Yo **DANIELA ELIZABETH RUIZ RUIZ** con cédula número 1105097669 declaro ser autora del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma. Acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Firma:

Autora: Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz

Cédula: 1105097669

Fecha: Loja, 05 de noviembre del 2021

Carta de autorización

Yo, **Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz** declaro ser autora de la Tesis titulada “**Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de pacientes hospitalizados**”, como requisito para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDL, en las redes de información del País y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los cinco días del mes de noviembre del 2021.

Firma:

Autora: Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz

Cédula: 1105097669

Correo electrónico: danielizabeth19@gmail.com

DATOS COMPLEMENTARIOS

Directora de Tesis: Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

Tribunal de Grado:

Presidenta: Bioquím. Luisa Ivonne Celi Carrión, Mg. Sc.

Miembro del tribunal: Bioquím. María del Cisne Luzuriaga, Mg. Sc.

Miembro del tribunal: Dra. Mariela Alexandra Idrovo Vallejo, Mg. Sc.

Dedicatoria

Con amor y cariño dedico el siguiente trabajo:

Primeramente a Dios, por guiarme y bendecirme en todo este proceso de aprendizaje, para llegar a ser un buen profesional.

A mi madre, quien me ha brindado todo su apoyo incondicional para completar una de mis metas propuestas; por enseñarme a no caer y siempre mejorar, por todos sus buenos consejos y valores que me ha conferido a través de todos estos años.

Agradecimiento

Quisiera expresar mi agradecimiento primeramente a Dios, por llenarme de bendiciones para poder lograr esta meta. A mi madre y familiares, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento. Gracias por su amor, generosidad y paciencia.

A mi directora y tutora de Tesis Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc., por sus conocimientos, orientaciones, su manera de trabajo, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación. Ella ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa como profesional.

A la Lic. Loydi Zamora Gutiérrez, Mg. Sc., quien gentilmente colaboro para llevar a cabo este trabajo de investigación, favoreciendo al progreso investigativo.

A todos mis profesores a lo largo de toda mi formación académica, a quienes le debo gran parte de mis conocimientos y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abrió y abre sus puertas a jóvenes como yo, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

Índice

Caratula	i
Certificación.....	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice	vii
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
Abstract.....	3
3. Introducción	4
4. Revisión de literatura	7
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.1. Características microbiológicas.....	7
1.2. Patogenia	7
1.3. Métodos de identificación en el laboratorio	11
2. Resistencia antibiótica en <i>S. aureus</i>	15
2.1. Resistencia a glucopeptidos.....	15
2.2. Resistencia a mupirocina.....	19
2.3. Resistencia a meticilina en <i>S. aureus</i>	19
2.1. Resistencia a los macrólidos y lincosamidas.....	26
3. Epidemiología	28

4. Métodos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos	30
4.1. Métodos Fenotípicos	30
4.2. Métodos Genotípicos	32
5. Materiales y métodos	37
6. Resultados	40
7. Discusión	47
8. Conclusiones	52
9. Recomendaciones	53
10. Bibliografía	54
11. Anexos	63

1. Título

**Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de
pacientes hospitalizados**

2. Resumen

Se ha evidenciado un aumento en la resistencia a meticilina y macrólidos en *Staphylococcus aureus*, por lo cual se pone en peligro la eficacia del tratamiento antibiótico convirtiéndose así en un problema de salud; para la identificación de la resistencia se usan distintos métodos tanto fenotípicos como genotípicos. El presente estudio de tipo retrospectivo, descriptivo y transversal denominado “Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de pacientes hospitalizados” tuvo como objetivo identificar los genes de *Staphylococcus aureus* causantes de la resistencia a meticilina, clindamicina y eritromicina. Para el análisis e identificación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) se utilizó técnicas de bacteriología convencional y normas estandarizadas del manual M100 30th ed. del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2020), además se utilizaron técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa Convencional. La muestra estudiada fue de 29 cepas aisladas de pacientes hospitalizados durante el año 2019 en el Hospital Isidro Ayora, que cumplieron con los criterios de inclusión. Se obtuvieron los siguientes resultados, la prevalencia de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en pacientes hospitalizados fue del 50,88%; el 27,6% de éstas mismas cepas presentaron resistencia inducible a clindamicina. Las áreas de hospitalización que tienen menor frecuencia de pacientes infectados con SARM fueron neonatología y la unidad de quemados. Los genes prevalentes para la producción de meticilino resistencia fue *mecA* (100%) y *ermC* (96.9%) para la resistencia a clindamicina y macrólidos.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, resistencia, meticilina, macrólidos, lincosamidas

Abstract

There has been evidence of an increase in resistance to methicillin and macrolides in *Staphylococcus aureus*, which endangers the efficacy of antibiotic treatment, thus becoming a health problem; different methods, both phenotypic and genotypic, are used to identify resistance. The present retrospective, descriptive and cross-sectional study entitled "Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients" aimed to identify the *Staphylococcus aureus* genes causing resistance to methicillin, clindamycin and erythromycin. For the analysis and identification of resistant methicillin *Staphylococcus aureus* (MRSA), conventional bacteriology techniques and standardized standards from the M100 30th ed. manual of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2020) were used, in addition, molecular techniques such as the Conventional Polymerase Chain Reaction were used. The sample studied was 29 strains that met the inclusion criteria. The following results were obtained, the prevalence of MRSA infections in hospitalized patients was 50.88%; 27.6% of these same strains presented inducible resistance to clindamycin. The hospitalization areas that have the lowest frequency of patients infected with MRSA were neonatology and the burn unit. The prevalent genes for methicillin resistance production were *mecA* (100%) and *ermC* (96.9%) for resistance to clindamycin and macrolides.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, resistance, methicillin, macrolides, lincosamides

3. Introducción

Las especies de *Staphylococcus spp.* son patógenos oportunistas que tienen una gran capacidad para adaptarse al medio en el que habitan; dentro de este género destaca el *Staphylococcus aureus* microorganismo gram positivo, el cual forma parte de la microflora humana de la piel y mucosas, pero también representa a la especie patógena más común en el ambiente hospitalario causando un amplio rango de infecciones nosocomiales, ya sea en piel, huesos y mucosas e incluso infecciones sistémicas como bacteriemias y endocarditis (Castro et al., 2018; Jawetz et al., 2011).

Staphylococcus aureus fue el primer microorganismo en desarrollar diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos existentes, tanto intrínsecos como adquiridos. En 1940 se lograron importantes avances con la introducción de la penicilina como tratamiento para este microorganismo, pero a pocos años de su utilización se fue observando que los aislamientos presentaban resistencia a dicho antibiótico, debido a la producción de betalactamasas. A continuación, en 1950 se introdujeron nuevos antimicrobianos frente a *S. aureus*, luego de siete años observaron que ciertas cepas presentaban resistencia múltiple a penicilinas, estreptomicina, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina. Seguidamente, en 1959 se introdujo al mercado la meticilina, como una nueva alternativa de tratamiento, posteriormente después de dos años de su uso se detectó la primera cepa de *S. aureus* productora de resistencia a este agente antimicrobiano, denominándose cepas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), y además presentando resistencia intrínseca a todos los demás betalactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenémicos (Martínez et al., 2017; Toasa et al., 2020)

Por ende, la resistencia a meticilina en *S. aureus* se debe a la excesiva producción de una proteína de unión a penicilina (PBP2a) la cual posee una baja afinidad por los antibióticos

betalactámicos, la cual esta codificada por el gen *mecA*. La evolución ha dado origen a cepas que expresan la PBP2a constitutivamente como el complejo *mec* de clases B y C, así como también cepas que lo expresan solo bajo inducción por un betalactámicos como es el complejo *mec* de clase A (Velasco, 2016). Se ha descrito al gen *mecA* como un marcador molecular adecuado en la determinación de resistencia a meticilina en todos los estafilococos (Perozo et al., 2012)

De igual forma, la resistencia a macrólidos puede ser debido a varios mecanismos y, entre ellos los dos más importantes son la expulsión activa, la cual esta mediada por los genes *msrA* y la metilación del ribosoma, codificada por los genes *erm*. El mecanismo de flujo ocasiona resistencia a los macrólidos y a las estreptograminas B; pero no a lincosamidas. La metilación ribosomal confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B, conocido como fenotipo MLS_B. En estafilococos, los genes *ermA*, *ermB* y *ermC* son responsables por este fenotipo de resistencia cruzada, controlando la metilación del sitio de enlace de adenosina 2058 (A2058) del ARNr 23S (Díaz et al., 2019; Gómez et al., 2016).

Con respecto a un comunicado de prensa del 27 de febrero de 2017, en Ginebra, y difundido mundialmente, la OMS publica las problemáticas más serias con relación a los patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, publicando una lista de 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, dividiéndolas en tres categorías de prioridad de acuerdo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad critica, elevada o media; en la cual la OMS incluyo al *S. aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistente la vancomicina, clasificándola dentro de la lista con prioridad 2: Elevada, ya que esta describe a las bacterias que presentan una farmacorresistencia creciente (OMS, 2020; Toasa et al., 2020)

Además, la prevalencia de SARM varía según el área geográfica, por lo que Lee et al, en su estudio “Global Prevalence of MRSA” publicado en 2018, señalan que Europa tiene un número bajo de MRSA por debajo del 5% en los países nórdicos: Dinamarca, Holanda, Suecia y Noruega, mientras que en el sur: España, Italia, Portugal, Grecia, la prevalencia es mayor y se sitúa entre el 25 y el 50%. La notable diferencia se puede atribuir a las prácticas utilizadas en el control de infecciones y el uso de antibióticos por cada país (Aucay & Cárdenas, 2020; Lee et al., 2018).

De igual forma, los autores señalan que América del Norte y Central, Estados Unidos y México tuvieron frecuencias entre el 25% y menos del 50%, mientras que América Latina tiene recursos limitados para la vigilancia epidemiológica, sin embargo según estudios realizados la prevalencia en países como: Ecuador, Colombia, Argentina y Paraguay están entre el 25% y menos del 50%, este no es el caso, Uruguay, Guatemala, Chile y Perú tienen tasas mayores o iguales al 50% (Aucay & Cárdenas, 2020; Lee et al., 2018).

Cabe considerar que el desarrollo de la infección por *S. aureus* está mediado por la interacción entre factores ambientales, virulencia bacteriana y propiedades clínicas de los hospedadores, donde el papel de los factores ambientales está determinado por el contacto con el sistema de salud, dicho factor puede ser rectificado por medidas de higiene, sin embargo no son modificables los factores genéticos (Mayorga et al., 2020).

Por todo lo expuesto se propuso esta investigación en la que se seleccionó cepas causantes de infecciones en pacientes hospitalizados y se determinó por métodos fenotípicos y genotípicos la resistencia a meticilina y macrólidos.

4. Revisión de literatura

1. *Staphylococcus aureus*

En 1880 el cirujano escocés Alexander Ogston descubrió el microorganismo *Staphylococcus aureus*, el cual encontró que al observar un absceso de una herida quirúrgica se produjo pus generado por esta bacteria. Consecutivamente, Ogston en 1882, le dió el nombre de “Staphylococcus”, del griego “Staphylo” que significa “racimo de uvas”. Seguidamente, en 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach, nombró a las cepas de acuerdo a las pigmentaciones que producían: *Staphylococcus aureus*, del latín “aurum” por el pigmento color oro (Pasachova et al., 2019).

1.1. Características microbiológicas

La Familia Micrococcaceae está integrada por el género *Staphylococcus*, al cual pertenece la especie *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria está clasificada como un coco gram positivo de 0,5 a 1µm de diámetro, inmóviles, anaerobios facultativos, no forman esporas y generalmente no están capsulados que permanecen aislados o se agrupan en pares, cadenas o racimos, β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo, fermentan el manitol, son capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal y a temperaturas desde 18 a 40°C (Borraz, 2006; Jawetz et al., 2011).

Staphylococcus aureus es parte de la microflora humana de la piel, mucosas, zona nasofaríngea y de los pliegues axilas e inguinales, no obstante se lo considera como un patógeno oportunista ya que genera infecciones en la piel y tejidos blandos, invade los dispositivos médicos y juega un papel importante en las enfermedades de transmisión por alimentos (Borraz, 2006; Pasachova et al., 2019).

1.2. Patogenia

S. aureus presenta su patogenicidad debido a que se combinan los componentes de virulencia bacteriana con una disminución de las defensas del huésped, en su acción patógena participan los componentes de la pared celular y la producción de enzimas y toxinas favorecedoras de la invasión tisular, conjuntamente con la capacidad para diseminarse y multiplicarse en los tejidos del huésped (Borraz, 2006; Zendejas et al., 2014).

1.2.1. Estructura de la pared celular

- Peptidoglicano: es el elemento básico de la pared de *S. aureus*. Le concede resistencia y tolerancia osmótica. Presenta propiedades biológicas como actividad endotóxica, desencadena la producción de interleucina-1 por los monocitos, estimula la quimiotaxis y agregación de los leucocitos, activa el complemento e induce la creación de anticuerpos opsonizantes (Borraz, 2006; Zendejas et al., 2014).

- Ácidos teicoicos o polisacáridos A: son polímeros de fosfato específicos de especie, pueden encontrarse unidos covalentemente al peptidoglicano de la pared o ligados a los lípidos de la membrana celular. Mediante uniones específicas a la fibronectina, cumplen su función principal intercediendo en la unión de los estafilococos a las superficies mucosas e inducen la producción de anticuerpos (Borraz, 2006; Zendejas et al., 2014).

- Unión de diferentes proteínas a la capa externa del peptidoglicano mediante enlaces covalentes (Borraz, 2006; Zendejas et al., 2014):

1. proteínas que facilitan la adhesividad del microorganismo (proteína fijadora de colágeno, proteína fijadora de fibronectina).

2. factor de agregación (clumping factor) ó coagulasa ligada a la célula, se une al fibrinógeno facilitando así la agregación bacteriana.

3. proteína A, específica de *S. aureus*, activa el complemento y bloquea la fracción Fc de las IgG, por lo que previene la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos inhibiendo la opsonización y la fagocitosis.

- Cápsula externa o glucocálix: es de naturaleza polisacárida, proporciona la adherencia de las bacterias y tiene capacidad antifagocitaria. Se detallan 11 serotipos capsulares, de tal forma que los serotipos 5 y 8 se relacionan con la mayoría de infecciones (Borraz, 2006; Zendejas et al., 2014).

1.2.2. Enzimas

Según Hurtado, de la Parte, & Brito, 2002, el microorganismo produce las siguientes enzimas:

- Catalasa: degrada el peróxido de hidrógeno resguardando al microorganismo durante la fagocitosis.

- Coagulasa: se puede encontrar de dos formas: el factor de agregación o coagulasa ligada y la coagulasa libre o extracelular. Intervienen ambas en la formación de coágulos, convirtiendo el fibrinógeno en fibrina lo que facilita los procesos de formación de abscesos y sépticos. La prueba de detección de la coagulasa libre diferencia a *S. aureus* de los estafilococos coagulasa negativos ya que existe una correlación entre la formación de coagulasa y la virulencia de *S. aureus* (Borraz, 2006; Hurtado et al., 2002).

- Hialuronidasa: degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo y proporciona la propagación de la infección (Hurtado et al., 2002).

- Penicilinasas: Es una beta-lactamasa, producida en la actualidad por casi todas las cepas de *S. aureus*, la cual inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo beta-lactámico (Hurtado et al., 2002).

- Otros enzimas: la mayor parte de cepas de *S. aureus* sintetizan además otros enzimas como lipasas, proteasas, nucleasas o enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos y estafiloquinasas o sustancias fibrinolíticas (Hurtado et al., 2002).

1.2.3. Toxinas

Algunas cepas de *S. aureus* sintetizan adicionalmente proteínas extracelulares, las cuales producen su acción en las zonas distantes del foco de la infección. Su expresión está regulada por un gen accesorio regulador de proteínas (*agr*) y pueden ser codificadas por el ADN cromosómico o plasmídico (Castañón, 2012):

- Hemolisinas: se han identificado cuatro denominadas, alfa, beta, gamma y delta, las cuales son sintetizadas por la mayoría de las cepas *S. aureus*, actúan sobre determinadas células eucariotas del huésped debido a que poseen cierta capacidad citolítica y hemolítica, por ejemplo en macrófagos, leucocitos, fibroblastos y plaquetas. La toxina alfa es la mejor estudiada. Debido a los cambios del balance iónico y de permeabilidad inducidos en las células endoteliales, intervienen en el daño tisular y en el desarrollo del edema (Castañón, 2012; Hurtado et al., 2002).

- Leucocidina de Panton-Valentine: es sintetizada por el 2-3% de las cepas, está compuesta por dos subunidades proteicas, la F y S, sintetizadas independientemente, que actúan en forma sinérgica sobre las membranas de las células fagocíticas. Se une a los fosfolípidos de la membrana de los leucocitos y macrófagos induciendo la formación de poros que destruyen la célula al alterar la permeabilidad celular (Castañón, 2012).

- Toxinas exfoliativas o epidermolíticas: Las cepas productoras de dichas toxinas tienen una prevalencia inferior al 5-10%. Se conocen dos serotipos A y B, las cuales producen el síndrome conocido como piel escaldada, la toxina A es de codificación cromosómica y termoestable, mientras que la toxina B es de codificación plasmídica y es termolábil; Ambas toxinas destruyen

los desmosomas, sin inflamación ni citolisis, del estrato granuloso de la epidermis y debido a esto en la capa afectada de la epidermis no se produce ni estafilococos ni leucocitos, además poseen actividad proteasa serínica, lo que desencadenaría la exfoliación (Castañón, 2012; Zendejas et al., 2014).

- **Enterotoxinas:** son producidas por el 30-50% de las cepas de *S. aureus*. De las enterotoxinas estafilocócicas se conocen 8 serotipos (A, B, C, D, E, G, H, N, I), siendo la más común el serotipo A. Son termoestables y resistentes a los enzimas digestivos, siendo responsables de intoxicaciones alimentarias con cuadros de enterocolitis. Poseen las características inmunomoduladoras propias de los superantígenos (Castañón, 2012; Zendejas et al., 2014).

- **Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1):** conocida como enterotoxina F o exotoxina pirogénica C, dicha proteína es sintetizada por genes cromosómicos y es termoestable. A través de los macrófagos y linfocitos T se da la liberación de citosinas, por lo que la TSST-1 actúa como un superantígeno. A bajas concentraciones produce la extravasación de las células endoteliales, y a altas concentraciones tiene efecto citotóxico (Borraz, 2006; Castañón, 2012).

1.3. Métodos de identificación en el laboratorio

Para su identificación microbiológica y la fácil determinación de enzimas y toxinas que produce *S. aureus*, es necesario la utilización de medios de cultivos especiales y las respectivas pruebas bioquímicas.

1.3.1. Métodos convencionales

- **Agar Baird-Parker:** Es el medio selectivo más usado debido a que contiene telurito, glicina y cloruro de litio lo que lo hace excelente para el recuento de *S. aureus*, además contiene piruvato sódico que ayuda a la recuperación de las bacterias lesionadas; La interpretación de un resultado positivo para la presencia de *S. aureus* consta de un halo

transparente lo que representa la actividad lipolítica sobre la yema de huevo, además debido a la reducción del telurito se presenta un aspecto negro en el cultivo (Hernández et al., 2005; Jawetz et al., 2011).

- **Agar Salado Manitol:** Medio que inhibe completamente o parcialmente a otras bacterias diferentes de los estafilococos, por lo que es selectivo para el aislamiento de *S. aureus*, ya que contiene cloruro sódico de 7.5%. Para su interpretación si en el medio de cultivo se producen colonias de color amarillo y el medio circundante del mismo color corresponde a estafilococos coagulasa positivo como *S. aureus*, en cambio si las colonias son de color rojo y no provocan cambios en el indicador rojo fenol corresponde a estafilococos coagulasa negativos (Hernández et al., 2005; Koneman, 2008).

- **Agar estafilococos N° 110:** Está basado en la formación de pigmento, la fermentación del manitol y la actividad de la gelatinasa, por lo que es un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos provenientes de muestras clínicas y no clínicas. Para que se produzca la fermentación de manitol se añade unas gotas de azul de bromotimol, detectando colonias con un halo amarillo alrededor, para la prueba de gelatinasa se agrega una solución saturada de sulfato de amonio o se adiciona una gota de ácido sulfosalicílico al 20% y se incuba 12 minutos para que se produzca la hidrólisis de la gelatina, para una hidrólisis positiva se produce una zona clara – transparente alrededor de la colonia propia de los estafilococos que licúan la gelatina (Hernández et al., 2005; Koneman, 2008).

- **Agar DNAsa:** Medio utilizado para la investigación de microorganismos con la capacidad de producir enzimas que hidrolizan el ADN, el indicador de su patogenicidad es debido a la manifestación de la actividad de la desoxirribonucleasa. Se considera un resultado positivo con la aparición de halos transparentes alrededor del área de crecimiento, mientras que

para un resultado negativo los halos característicos no están presentes. Para complementar dicha prueba se emplean pruebas bioquímicas como la catalasa y la coagulasa (Hernández et al., 2005; Koneman, 2008).

- **Catalasa:** Se emplea para comprobar la capacidad de ciertas bacterias de sintetizar catalasa, ya que hidrolizan o convierten el peróxido de hidrogeno en oxígeno gaseoso y agua produciendo la liberación en forma de burbujas, dicha enzima se encuentra en la mayoría de microorganismos que poseen citocromos. La interpretación es positiva cuando la bacteria reacciona produciendo la liberación de burbujas, en cambio si no se produce se considera una prueba negativa (Fernández et al., 2010).

- **Coagulasa:** Esta prueba se emplea para microorganismos que tienen la capacidad de coagular dicha enzima, por lo que se emplea para diferenciar y determinar especies dentro del género estafilococos, es decir comprobar la existencia de *S. aureus*. La coagulasa representa un factor de virulencia y un factor de agregación ya que puede unirse al fibrinógeno convirtiéndolo en fibrina insoluble, formando depósitos donde los estafilococos pueden agregarse. Se realiza de dos maneras: en tubo y en portaobjetos se inoculan el plasma y la colonia sospechosa. Resulta positivo cuando se evidencia la aparición de un coágulo (Fernández et al., 2010; Koneman, 2008).

- **Sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas:** Contienen entre 10 y 50 pruebas bioquímicas, se encuentran en celdillas aisladas con un sustrato liofilizado el cual se inocula individualmente. Para la interpretación de resultados se debe agrupar de tres en tres de manera que el resultado queda reducido de forma numérica a un dígito, se procede a codificar, y de acuerdo al código numérico de cada especie se obtiene el resultado sumando el valor de las tres pruebas. Los sistemas disponibles son Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems, Enterotube

(BBL), API (bioMérieux), MicroID (Remel) y Biochemical ID systems (Microgen), etc (Bou et al., 2011).

1.3.2. Métodos automáticos

Métodos comerciales fenotípicos (Microdilución rápida)

- **MicroScan - AutoSCAN®-4:** Instrumento semi - automatizado utilizado para la Identificación y susceptibilidad de bacterias y levaduras presentes en muestras biológicas, el cual utiliza paneles deshidratados con un tipo de lectura colorimétrica de menos de 5 segundos. Cuenta con paneles convencionales para gram negativos y gram positivos con un amplio rango de antibióticos y paneles cromogénicos rápidos para la identificación de levaduras, anaerobios estrictos, etc (Siemens, 2008).
- **Equipo VITEK 2, BioMérieux®:** Utiliza tarjetas individuales de identificación microbiana y la prueba de susceptibilidad antibiótica, en el cual se coloca el inóculo en el casete de VITEK 2, en el SMART Carrier™, donde se vinculan virtualmente la tarjeta de VITEK 2 que contiene diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por NCCLS, y la muestra, así el sistema procederá a incubar y leer cada tarjeta respectivamente (Romeu et al., 2010).

Detección de perfiles proteómicos (Espectrometría de Masas)

- **Espectrometría de Masas (MALDI-TOF):** La espectrometría de masas permite la identificación molecular a través de la medición de su masa en relación a su carga, y de los fragmentos que se generan. El equipo MALDI – TOF MS emplea el cálculo de tiempo de la migración de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto establecido previa desorción/ionización laser de la molécula; midiendo macromoléculas, péptidos y proteínas que

forman parte de las bacterias y hongos, de hasta 100.000 Dalton. A través de la comparación del resultado de una bacteria con todos los datos de espectros de masa de los archivos contenidos y proporcionados por el fabricante y de acuerdo a los puntos de corte, se procede a la identificación (García et al., 2012).

2. Resistencia antibiótica en *S. aureus*

2.1. Resistencia a glucopéptidos

En 1959 se detectaron los primeros aislamientos *S. aureus* con resistencia a aminoglucósidos, relacionado al inicio con el uso tópico. Los primeros casos en Europa se detectan en los años 70 y en los años 80 se encuentran cepas *S. aureus* con resistencia combinada, con meticilina a varios grupos de antibióticos como macrólidos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclina, lincosamidas y fluroquinolonas. Se han hallado casos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a glucopéptidos, incluso cepas con un alto nivel de resistencia a vancomicina (Álvarez & Ponce, 2012; Lacueva, 2017).

Los glucopéptidos son fármacos de espectro reducido, este grupo está compuesto por vancomicina y teicoplanina. La vancomicina producida por *Streptomyces orientalis* se aisló en 1950 pero hasta 1958 no se introdujo. Su uso fue limitado debido a los efectos tóxicos que producía. Posteriormente, se redujo su toxicidad y se introdujo en la parte clínica un segundo glicopéptido, la teicoplanina, producido por *Actynoplanes teichomycetus*, que tiene pocos efectos tóxicos y es fácil de administrar. Ambos fármacos muestran una actividad similar contra *S. aureus* (Castellano & Perozo, 2010b).

Los puntos de corte para la vancomicina en *S. aureus* según los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) son, CMI 8-16 $\mu\text{g} / \text{ml}$ se considera intermedio a la vancomicina y los aislamientos con una CMI $\geq 32 \mu\text{g} / \text{ml}$ son resistentes a la vancomicina. El

instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI) recomienda considerar aislados de *S. aureus* sensibles con CIM a vancomicina 4 µg / ml, mientras que la CDC recomiendan estar atentos con dichas cepas, debido a que son las precursoras de VISA y deben ser consideradas potencialmente intermedio (CLSI, 2020).

Se ha considerado que la vancomicina es el principal vector de tratamiento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina durante más de 40 años, pero su uso excesivo provocó la aparición de cepas Intermedias (VISA) y resistentes a la vancomicina (VRSA). Ya en 1998, Kirst describió como un mayor uso de vancomicina para tratar infecciones causada por estafilococos resistentes a la meticilina es la causa a la aparición de estafilococos con resistencia intermedia a la vancomicina. La primera resistencia estafilocócica a la vancomicina se describió en un cepa de *Staphylococcus haemolyticus* (Castellano & Perozo, 2010b; E. Rodríguez et al., 1999a).

2.1.1. *Staphylococcus aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina (VISA-heterorresistente) y *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA)

El mecanismo de resistencia a la vancomicina se demostró con el estudio de la resistencia a glucopéptidos en enterococos y lograr transferir el plásmido *vanA* de *E. faecalis* a *S. aureus*, la posibilidad de que esto suceda en la clínica ha generado una gran preocupación en la comunidad científica (Labarca, 2015).

En Japón 1996, la primera cepa de *S. aureus* con hetero-resistencia a la vancomicina (hetero-VISA), se aisló en un paciente infectado por SARM que no ha respondido al tratamiento con vancomicina. La cepa hetero-VISA (Mu3) tiene una CMI ≤ 4 µg / ml, pero tiene subpoblaciones resistentes que pueden crecer en presencia de concentraciones > 4 µg / ml de vancomicina. La importancia potencial de las cepas hetero-VISA es que pueden asociarse con

fracaso de los tratamientos con glucopéptidos y ser precursores VISA (Rodríguez & Vesga, 2005).

Posteriormente, en julio de 1997, se aisló una nueva cepa VISA en Michigan de un paciente en diálisis peritoneal ambulatoria que padecía peritonitis. Un mes después, se identificó una tercera cepa VISA en sangre de un paciente de Nueva Jersey. Sucesivamente se presentaron casos similares en diferentes países del mundo lo que implica la posibilidad de diseminación de estas cepas con el consecuente problema terapéutico y su posible escalada hacia resistencia completa a la vancomicina (Castellano & Perozo, 2010b; C. Rodríguez & Vesga, 2005).

En *S. aureus* la resistencia a vancomicina ($\text{CMI} \geq 32 \mu\text{g} / \text{ml}$) es muy rara. Las cepas VISA y / o hVISA son más frecuentes, siendo la prevalencia de hVISA mayor que la prevalencia de VISA. La prevalencia de hVISA en todo el mundo varía del 0,5% al 20% de SARM, según el área geográfica. En Europa se sitúa entre el 0 y el 5%, siendo más frecuente en determinados países como Francia, Alemania, Italia, Holanda, España y Reino Unido; En Asia, fluctúa entre 0 y 20%, destacándose en Hong Kong, Japón y Corea; En América del Sur, la prevalencia es del 3%, en Brasil y América del Norte varía entre 0 y 3%, en Estados Unidos (Labarca, 2015; C. Rodríguez & Vesga, 2005) .

2.1.2. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA)

Se aislaron cuatro casos de infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) con CIM de 1024 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 32 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 64 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y 256 $\mu\text{g} / \text{ml}$, en Estados Unidos entre 2002 y 2005, esto causo gran preocupación ya que las cuatro cepas eran completamente resistentes a la vancomicina, presentaban diferente mecanismo de transmisión, y no tenían relación epidemiológica. Los dos primeros casos mostraron cepas de *S. aureus* que portaban el gen *vanA*. En 1992 se demostró in vitro que el gen *vanA* puede transferirse de

enterococos a *S. aureus* por conjugación, esto explicaría la aparición de VRSA, ya que el gen *vanA* se encuentra en el transposón Tn1546 de los enterococos (C. Rodríguez & Vesga, 2005; Rodríguez et al., 1999).

Al analizar los casos de *S. aureus* resistente a glucopéptidos, se puede identificar una serie de factores de riesgo asociados con infecciones causadas por VRSA, tales como: Ej. : edad, enfermedad subyacente como diabetes, inmunosupresión, insuficiencia renal y operaciones previas, hipertensión arterial, abscesos y úlceras, infecciones con alta carga bacteriana como endocarditis, e historial de tratamiento con vancomicina (Rodríguez & Vesga, 2005).

2.1.3. Mecanismos de resistencia a vancomicina

En *S. aureus* los mecanismos de resistencia a vancomicina son diferentes según se trate de vancomicina intermedia o vancomicina resistente. Las cepas VISA o hVISA no poseen genes *vanA*, *vanB* o *vanC* que confieren resistencia a glucopéptidos de alto nivel en enterococos, y se cree que el mecanismo de resistencia es intrínseco, debido al aumento de la síntesis de la pared celular cuya regulación se desconoce, y se debe a alteraciones en las PBPs. Las cepas VISA sintetizan grandes cantidades de peptidoglicano aumentando la cantidad de residuos de D-alanilD-alanina que se unen y capturan moléculas de vancomicina, evitando así que estas moléculas alcancen su objetivo en la membrana citoplasmática (Labarca, 2015; C. Rodríguez & Vesga, 2005).

Ciertos elementos genéticos reguladores como *tcaA*, codificados por una proteína transmembrana, y el gen regulador accesorio (*agr*), están asociados a una disminución de la sensibilidad de *S. aureus* a los glucopéptidos, desempeñando un papel notable en la expresión de resistencia a estos antibióticos. En un estudio reciente, planteó la hipótesis de que hVISA es un precursor de VISA y que ambos fenotipos se expresan en función de la presión selectiva en el

uso de glicopéptidos y β -lactámicos. Otros estudios sugieren que los cambios estructurales y / o metabólicos en los ácidos teicoicos de la pared celular también pueden desempeñar un papel en el mecanismo de resistencia al disminuir la tasa de degradación de la pared celular, en lugar de aumentar la tasa de degradación de la pared celular, correlacionando el grosor de la pared y la disminución de la sensibilidad a la vancomicina (Rodríguez & Vesga, 2005; Rodríguez et al., 1999).

2.2. Resistencia a mupirocina

La mupirocina o ácido pseudomónico A es para uso tópico, producido por una cepa de *Pseudomonas fluorescens*. La resistencia a la mupirocina se debe a la modificación de la diana. Puede ser de dos tipos (Vázquez et al., 2019):

- Resistencia de bajo nivel (CMI 8 a 256 mg / L): es de origen cromosómico. Se debe a la mutación del gen que codifica la enzima isoleucil-tRNA-sintetasa (*ileS*).
- Resistencia de alto nivel (CMI > 256 mg / L): mediada por un plásmido que lleva el gen *ileS2* que codifica una enzima isoleucil-ARNtsintetasa que no tiene afinidad por la mupirocina. Hasta la fecha, es raro encontrar resistencia a la mupirocina en *S. aureus*, pero según algunos autores su uso indiscriminado y tratamientos prolongados desarrollan resistencias (Vázquez et al., 2019).

2.3. Resistencia a meticilina en *S. aureus*

2.3.1. Resistencia a los β -lactámicos

En 1928, Fleming descubrió una sustancia producida por un hongo *Penicillium notatum*, llamado Penicilina, que causaba lisis en varias especies de *Staphylococcus*, convirtiendo a la familia de los antibióticos β -lactámicos en uno de los grupos más importantes en el tratamiento

antiinfeccioso; continúan siendo la primera opción en muchos procesos infecciosos. La familia de los antibióticos β -lactámicos se define químicamente por la presencia de un anillo beta-lactámico, en sí mismo desprovisto de actividad antimicrobiana y debe ser activado por otros radicales para poder unirse a las dianas donde ejerce su acción (PBP). La naturaleza de los radicales esenciales que se unen al ciclo de los betalactámicos define las diferentes clases o grupos de antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemasas, e inhibidores de betalactamasas) (Fuentes, 2018; Suárez & Gudiol, 2009).

En 1929, se obtuvo la primera penicilina natural a través del hongo *Penicillium chrysogenum* denominada penicilina G o bencilpenicilina, introducido en la década de 1940 para el tratamiento de las infecciones por estafilococos, pero su actividad se canceló rápidamente debido a la capacidad de los estafilococos para producir penicilinasas o betalactamasas, enzimas que hidrolizan el ciclo beta-lactámico inactivando antibióticos beta-lactámicos. Como resultado, la estructura química del 6-APA fue alterada por la agregación de diferentes cadenas laterales, lo que permitió el desarrollo de un nuevo grupo de antibióticos β -lactámicos, las penicilinas semisintéticas. El primero de este grupo es la dimetoxibencil penicilina o meticilina cuya cadena lateral la hace resistente a la acción hidrolítica de la betalactamasa estafilocócica. Tiene el inconveniente de ser inestable a pH gástrico y de requerir administración parenteral, razón por la cual se han sintetizado nuevos compuestos estables al ácido como oxacilina, cloxacilina y flucloxacilina (Sanjurjo, 2018; Suárez & Gudiol, 2009).

2.3.1.1. Mecanismos de resistencia a los β -lactámicos

La resistencia se debe a la producción de un plásmido de penicilinasas inducible que inactiva la penicilina G, las carboxipenicilinas y las ureidopenicilinas. El mecanismo de inducción es que la penicilina y sus análogos promueven la producción de una proteína

antirrepresiva que, al inhibir el gen represor de la betalactamasa (gen *blaI*), aumenta la síntesis de penicilinas. Esta penicilinas es inactivada por inhibidores de la β -lactamasa (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam). Las cefalosporinas no se hidrolizan (Fuentes, 2018; Monroy et al., 2003).

2.3.2. Resistencia a la meticilina

La meticilina es una penicilina semisintética que resiste los efectos de la betalactamasa, que descompone la penicilina. La resistencia a la meticilina implica una resistencia intrínseca a todos los β -lactámicos, incluidos las cefalosporinas y los carbapenémicos. Esto puede deberse a diferentes mecanismos según contengan o no el gen *mecA* (Echevarria & Iglesias, 2013).

En 1981, se descubrió el mecanismo de resistencia a la meticilina con la identificación de alteraciones en la afinidad de las proteínas que se unen a las penicilinas o PBP (proteínas de unión a penicilina) en SARM. Las PBP son enzimas ubicadas en la membrana bacteriana que catalizan las reacciones de transpeptidación de peptidoglicanos durante la síntesis de la pared celular. Las cepas estafilocócicas se caracterizan por la producción de al menos cuatro PBP (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) que son inhibidas por betalactámicos, incluida la meticilina.

Además de sintetizar estas proteínas, las cepas de SARM se caracterizan por el desarrollo de una PBP de baja afinidad por los antibióticos betalactámicos, denominada PBP 2a o PBP 2'. Esto permite que cuando las PBP 1, 2, 3 y 4 son inhibidas por la presencia de meticilina, la PBP2a continúe activa, manteniendo la síntesis de la pared celular. La PBP2a se diferencia del resto de las PBP en que en su lugar activo se bloquea la unión a todos los betalactámicos, pero permite que la reacción de transpeptidación continúe su proceso. Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina por este mecanismo también son resistentes a todos los betalactámicos, incluidas las

penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (Aguayo et al., 2018; Quiceno & Correa, 2009).

- **Gen *mecA*:** El gen cromosómico *mecA* el cual codifica la síntesis de PBP2a, es el determinante genético de la resistencia a la meticilina. Esta secuencia tiene dos genes reguladores: el gen *mecRI* o gen regulador de la señal de transducción del gen *mecA* y el gen *mecI*, que codifica la proteína represora de la transcripción del gen *mecA*. La transcripción del gen *mecA* ocurre cuando el betalactámico alcanza la célula y se une al dominio del receptor de unión a penicilina de la membrana citoplasmática codificada por el gen *mecRI*, lo que da origen a que la proteasa autocatalítica se una a *mecI*, el cual se encuentra bloqueando la región de operación de *mecA*, quedando libre el operador *mecA* dando paso a la expresión de PBP2a (Cervantes et al., 2014)(Aguayo et al., 2018).

Se han descrito otros genes cromosómicos que no están incluidos en el gen "*mec*" y que son esenciales para la expresión fenotípica de la resistencia. Estos son los denominados "cinco" genes A-F (factores esenciales para la expresión de la resistencia a la meticilina), que se encuentran tanto en cepas sensibles como resistentes de los genes *S. aureus* y *chr**. Estos últimos son genes cromosómicos cuyas mutaciones conducen a un alto nivel de resistencia a la meticilina en presencia de PBP2a y se diferencian del operón *femAB*. Hasta la fecha, se desconoce su posición dentro del cromosoma. Katayama et al., 2004 han realizado algunos estudios en los que describen que cuanto mayor es el nivel de mutaciones que ocurren en el gen *mecA* y en su secuencia reguladora, mayor es el nivel de resistencia a los β -lactámicos, mientras que las mutaciones cromosómicas, en una área que es ajena a estos genes, juega un papel mucho menor (Aguayo et al., 2018; Katayama et al., 2004).

En *S. aureus* y otras especies de estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina, se encuentra el gen *mecA*. Se han descrito diferentes hipótesis sobre el origen del gen *mecA*, un fragmento de ADN de 2.1 Kb, en un principio se pensó que podría provenir de una especie estafilocócica distinta a *S. aureus*, posteriormente se sugirió la hipótesis de que podría haber sido se ha adquirido a partir de determinadas especies de estafilococos coagulasa negativos. In vitro, se ha demostrado que *S. sciuri mecA*, cuando se introduce en *S. aureus*, interviene en la síntesis de su pared celular, ocasionando un alto nivel de resistencia a los β -lactámicos, e incluso se ha encontrado un 88% de homología entre el gen *mecA* de *S. sciuri* con el gen *mecA* de *S. aureus*. También se ha demostrado in vivo la transferencia del gen *mecA* de *S. epidermidis* a *S. aureus* (Borraz, 2006; Gopegui, 2015; Severin et al., 2005)

Hay dos teorías básicas para explicar la evolución del gen *mecA* en cepas de *S. aureus* y su extensión a varios linajes filogenéticos bacterianos. Inicialmente, se asumió que las cepas de SARM contemporáneas se originan a partir de unos pocos clones en los que se había integrado el gen *mecA* y habían seguido las diversas líneas de evolución. Estudios recientes muestran que el gen *mecA* se transfirió entre diferentes líneas genéticas de *S. aureus* y se puede decir que la transferencia horizontal del gen *mecA* fue de gran importancia en el desarrollo de SARM. En este sentido, los resultados de estudios realizados mediante análisis de electroforesis enzimática multilocus (MLEE), tipado de secuencia multilocus (MLST) y electroforesis de campo pulsátil (PFGE) sugieren una transferencia horizontal de *mecA* entre cepas de diferentes líneas genéticas (Borraz, 2006; Gopegui, 2015).

- ***Staphylococcal cassette chromosome mec***: El gen *mecA* es parte de una estructura de casete en el cromosoma estafilocócico llamado SCC*mec* (casete de cromosoma *Mec* de estafilococo). SCC*mec* es un elemento genético móvil el cual se inserta en el cromosoma

de SARM, ubicado específicamente en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta *orfX* (ORF), se desconoce actualmente de su función. Su movilidad se basa en la presencia de dos genes específicos únicos, *ccrA* y *ccrB*, que codifican las denominadas recombinasas del casete cromosómico A y B. Se trata de polipéptidos recombinasas que son responsables de la integración cromosómica y la escisión de *SCCmec* (Aguayo et al., 2018; Cervantes et al., 2014).

Existen diferentes tipos de *SCCmec*, catalogados según las características de los genes *ccr* y secuencias adyacentes, así como la secuencia de la zona *mec* y sus genes reguladores. También difieren según los determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración del plásmido y el transposón. Se han descrito cinco tipos de *SCCmec* y una serie de variantes o subtipos (*IA, IIIA, IIIB, IVA, IVB, IVC*) clasificados según la secuencia de la región J (junkyard), resultando finalmente siete. Las últimas variantes (*IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IVE* y *FIV*) varían en composición genética y tamaño (20 Kb a 68 Kb) (Aguayo et al., 2018; Castellano & Perozo, 2010).

- *SCCmec* tipo I (34Kb): diseminado entre cepas de SARM en la década de 1960 en Inglaterra, está formado por el complejo génico *ccr* tipo 1 (*ccrA1, ccrB1*) el *mec* clase B (*mecA, mecR1*) una copia de secuencia de inserción IS1272 y IS431). No tiene genes de resistencia excepto *mecA* (Aguayo et al., 2018; Borraz, 2006).

- *SCCmec* tipo II (53 Kb): diseminación en 1982 entre cepas de SARM de Japón, Corea y Estados Unidos. Formado por la inserción IS431, el transposón Tn554, el plásmido pUB110, el complejo recombinasa tipo 2 (*ccrA2, ccrB2*) y el *mec* clase A (*mecI, mecR1, mecA*) (Aguayo et al., 2018; Borraz, 2006).

- *SCCmec* tipo III (67 Kb): distribución en países europeos, Arabia Saudita, India, Singapur, Hong Kong, Australia y Nueva Zelanda. Está compuesto por el complejo recombinasa

tipo 3 (*ccrA3*, *ccrB3*), del complejo *mec* clase A, Tn554, pT181, pI256 y las secuencias de inserción IS431 e IS256. También contiene una copia cortada de los genes *ccr* ubicados entre dos elementos IS431 (Aguayo et al., 2018; Borraz, 2006).

- SCC*mec* Tipo IV (21-24 Kb): formado por el complejo génico *ccr* tipo 2 (*ccrA2*, *ccrB2*), la clase B *mec*, la inserción IS1272. Es el elemento más pequeño, lo que le confiere una mayor movilidad genética y no lleva factores de virulencia adicionales ni genes de resistencia a antibióticos distintos de la meticilina (Aguayo et al., 2018; Borraz, 2006).
- SCC*mec* tipo V (28 Kb): diseminado en Australia, tiene un nuevo gen *cc* llamado *ccrC*, aislado de cepas SARM de origen comunitario y aún en estudio (Aguayo et al., 2018; Borraz, 2006).

Los tipos I, IV y V de SCC*mec* contienen solo genes reguladores de resistencia a la meticilina, mientras que los tipos II y III de SCC*mec* contienen elementos de transposición y genes que codifican resistencia a antibióticos no betalactámicos. Por tanto, Tn554 codifica resistencia a eritromicina y espectinomicina y ψ Tn554 a cadmio. En cuanto a los plásmidos, pUB110 codifica resistencia a kanamicina-tobramicina y bleomicina, y pT181 contiene genes de resistencia a tetraciclinas y mercurio (Castellano & Perozo, 2010b; Cervantes et al., 2014).

2.3.3. Resistencia a meticilina no mediada por el gen *mecA*

Existen otros mecanismos de resistencia a la meticilina en cepas que no portan el gen *mecA* y que se asocian con CIM de meticilina entre 8 y 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Borraz, 2006):

- Hiperproducción de penicilinasas, son las cepas BORSA (borderline *S. aureus*). Sintetizan una gran cantidad de β -lactamasa y no tienen ni el gen *mecA* ni el gen PBP2a. En estas cepas, la sensibilidad a la oxacilina se puede recuperar cuando se asocia con un inhibidor de β -

lactamasa, este es el mejor método para su detección fenotípica. Por lo general, no tienen resistencias asociadas con otros grupos de antibióticos (Borraz, 2006; Castellano & Perozo, 2010b).

- La modificación de PBP común en *S. aureus* son cepas MODSA (*S. aureus* modificado), cepas resistentes a oxacilina de bajo nivel que no producen β -lactamasa. Estas cepas presentan un cambio en la afinidad de sus PBP normales frente a β -lactámicos, esto puede deberse a la sobreexpresión de una de estas PBP o a la consecuencia de mutaciones genéticas que alteran la afinidad de la proteína final por el antibiótico (Borraz, 2006; Castellano & Perozo, 2010b).

2.1. Resistencia a los macrólidos y lincosamidas

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLSB) son grupos de antibióticos estructuralmente diferentes, pero comparten un mecanismo de acción similar. Todos se unen al dominio V del ARNr 23S, que es parte de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, lo que interfiere con la transferencia del polipéptido. Por tanto, evitan el alargamiento de la cadena peptídica y el complejo peptidil-ARNt se disocia del ribosoma (Morales et al., 2016a).

A partir del género *Streptomyces* y *Micromonospora* se obtuvieron los antibióticos lipídicos denominados macrólidos. Su estructura química consiste en un anillo lactónico macrocíclico unido por un enlace glicosídico a amino-desoxiazúcares. El número de átomos de carbono en el anillo de lactona permite clasificar los macrólidos en 3 grupos: macrólidos con 14 átomos (eritromicina), macrólidos con 15 átomos (claritromicina, azitromicina) y macrólidos con 16 átomos (espiramicina, josamicina) (Gopegui, 2015; Vignoli & Pardo, 2016).

Las lincosamidas incluyen dos antibióticos: la lincomicina y su derivado clorado, la clindamicina, se utilizan clínicamente por su mejor biodisponibilidad y mayor actividad. Desde

el punto de vista químico, están formados por un aminoácido y un azúcar unidos por una amida (Vignoli & Pardo, 2016).

A partir de diferentes especies del género *Streptomyces* se obtuvieron los antibióticos estreptograminas. Los dos ingredientes son quinupristina (estreptogramina B) y dalfopristina (estreptogramina A), derivados solubles semisintéticos (Vignoli & Pardo, 2016).

2.4.1. Mecanismos de resistencia a los macrólidos y lincosamidas

La resistencia se puede crear mediante cuatro mecanismos:

- Modificación y alteración de la diana (ARN ribosómico 23S): mediante la acción de metilasas codificadas por genes *erm* (*A*, *B* y *C* y en menor medida *F* e *Y*). Es el mecanismo de resistencia más común. Los genes *ermA* y *ermB* son cromosómicos y están ubicados en los transposones Tn554 y Tn551, respectivamente, mientras que el gen *ermC* está ubicado en un plásmido pMS97, que está presente en *S. aureus*. La presencia de genes *erm* confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptogramas del grupo B que forman el fenotipo MLSB constitutivo o inducible. En el fenotipo constitutivo MLSB, la cepa es resistente a todos los macrólidos (con un anillo de 14, 15 o 16 átomos), lincosamidas, cetólidos y estreptograminas B. Los estreptogramas A no se ven afectados, por lo que la asociación entre los dos permanece activa. El fenotipo MLSB inducible es el más común: la resistencia afecta a macrólidos de 14 y 15 átomos, pero no a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas, cetólidos y estreptogramas (Gopegui, 2015; Vignoli & Pardo, 2016).

- Expulsión activa de "bombas de flujo" antimicrobianas: codificadas por los genes *msrA*, *msrB*, *erpA*, *vgaA* y *vgaB*. La resistencia a estreptograminas y macrolidos (14 y 15 átomos) conferida por los genes *msrA*, presentándose el fenotipo MSB, encontrándose en el

plásmido Pul5050. Cuando la resistencia a la eritromicina está mediada por *msrA*, no hay resistencia inducible a la clindamicina (Gopegui, 2015; Morales et al., 2016a).

- Inactivación del antibiótico: genes *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vgbA*, *vgbB*, *lnuA*. La resistencia a las lincosamidas está dada por el gen *lnuA*, los genes *vat* y *vgb* a las estreptograminas (Gopegui, 2015).
- Modificación de la diana por mutación de rRNA 23S y / o proteínas ribosómicas (Gopegui, 2015).

3. Epidemiología

El Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la OMS reveló la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500.000 personas de 22 países con sospecha de infecciones bacterianas, entre las bacterias resistentes más comunes se encuentra *Staphylococcus aureus*. Aunque los datos aún no son representativos a nivel nacional, la mediana de la tasa observada para *S. aureus* resistente a meticilina fue 12,11% (OMS, 2020).

En los últimos años, el número de infecciones causadas por SARM en los Estados Unidos ha aumentado, reportando un aislamiento de aproximadamente 0.24% de las cepas de CA-SARM de todos los aislados de SARM. Sin embargo, una investigación reciente en tres hospitales mostró que la incidencia de infecciones por SARM osciló entre el 18% y el 25% por 100.000 habitantes, mientras que entre el 8% y el 20% de todos los aislados de SARM se clasificaron como cepas CA-SARM (Yépez, 2019).

En Europa, el análisis de los datos recopilados de los hospitales europeos que participaron en el sistema de supervivencia antimicrobiano European (EARSS) desde enero de 1999 hasta diciembre de 2002 mostró una prevalencia de SARM y CA-SARM de entre 0,5 y

44,4%. Además, el nivel de CA- SARM se mantuvo bajo con una prevalencia de 0,13 y 1,5 de todos los aislamientos. En América Latina, los problemas hospitalarios por SARM han aumentado. La información recopilada por la OPS (Organización Panamericana de la Salud) mostró que para 2004, la prevalencia de SARM fue la siguiente: Argentina 42%, Bolivia 36%, Chile 80%, Colombia 47%, Honduras 12%, Nicaragua 20%, Ecuador 25%, Guatemala 64%, Paraguay 44%, Perú 80%, Uruguay 59%, Venezuela 25% (Cervantes et al., 2015) .

Ecuador cuenta con el Plan Nacional de Prevención y Control de Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) 2019-2023. Entre los microorganismos sujetos a seguimiento de RAM y reportados en mayor porcentaje de los aislamientos de los servicios hospitalarios registrados por el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública CRN-RAM-INSP, *S. aureus* se encuentra con alta frecuencia dentro de los aislamientos hospitalarios, el antibiótico con mayor porcentaje de resistencia a *S. aureus* es la penicilina con 87%, seguido de cefazolina con 60% de resistencia. Los mismos altos niveles de resistencia están presentes en los aislados de la unidad de cuidados intensivos con una resistencia a la penicilina del 87% en los cuatro cursos académicos presentados (2014-2017). En cuanto a la resistencia a la eritromicina, se observan altos porcentajes del 35-43% entre 2014 y 2017. Con respecto a la oxacilina y cefoxitina para *S. aureus* resistente a meticilina, se observa un mayor porcentaje de resistencia a cefoxitina en los aislamientos hospitalarios en 33-59%. En el caso de la oxacilina, se puede observar que el porcentaje de resistencia en los cursos académicos disminuyó del 46% en 2014 al 35% en 2017 (MSP, 2018).

4. Métodos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos

4.1. Métodos Fenotípicos

4.1.1. Métodos fenotípicos para detección de resistencia a meticilina

- **Detección fenotípica de resistencia a la oxacilina:** Se puede detectar mediante la técnica de difusión con discos de oxacilina (1 μ g) o cefoxitina (30 μ g), mediante dilución en agar o caldo. Para ello, se utiliza el medio de Mueller Hinton con la adición de NaCl al 2% en el caso de realizar los métodos de dilución y también se ajusta con cationes (Ca + 2 y Mg + 2) en el caso en que se realice. método de dilución en caldo. El inóculo utilizado es equivalente a 0,5 en la escala de McFarland y requiere 24 horas completas de incubación en atmósfera aerobia a 35°C . La incubación a temperaturas superiores a 35 ° C puede evitar la detección de esta resistencia. Para la interpretación se considera resistente a la oxacilina una cepa *S. aureus* que contenga un halo de inhibición de oxacilina ≤ 10 mm o cuando la CMI de la oxacilina es ≥ 4 mg / L (Morales et al., 2016b; Morosini et al., 2012).

La cefoxitina es un marcador adecuado para la presencia de *mecA* porque es un compuesto inductor del sistema regulador *mecA* más potente que las penicilinas y, por tanto, al mejorar la expresión de este gen, también se mejora la detección de resistencia a la meticilina, el uso del disco de cefoxitina es particularmente útil y preferiblemente al disco de oxacilina para detectar la resistencia a la oxacilina mediada por el gen *mecA* en cepas heterorresistentes (Morosini et al., 2012) .

- **Detección fenotípica de resistencia tipo borderline (límite) a la oxacilina (BORSA) en *Staphylococcus aureus*:** Las cepas negativas de BORSA *mecA* son sensibles a la cefoxitina (halo ≥ 22 mm) mientras que las cepas positivas de *mecA* son resistentes a este antimicrobiano (halo ≤ 21 mm). Las cepas con resistencia intermedia a la oxacilina pero

sensibles a la cefoxitina deben notificarse como sensibles a la cefoxitina y nunca debe notificarse la sensibilidad intermedia a la oxacilina. Son sensibles a todos los betalactámicos (penicilinas antiestafilocócicas, cefalosporinas y carbapenémicos) las cepas borderline *mecA* negativas, y son resistentes a todos los betalactámicos las cepas *mecA* positivas (García et al., 2019; Morosini et al., 2012).

- **Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Microdilución en**

Caldo: El método de microdilución en caldo se puede utilizar para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de estafilococos con algunas modificaciones. El inóculo debe prepararse utilizando el método de suspensión directa de colonias. Además, el caldo Mueller-Hinton con ajuste catiónico más NaCl al 2% debe usarse como medio para la prueba de oxacilina.

Finalmente, se debe realizar una incubación de 24 horas antes de determinar la sensibilidad a oxacilina y vancomicina. Los criterios de interpretación de la oxacilina para *S. aureus* son una CMI $\leq 2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ es sensible y $\geq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$ es resistente (CLSI, 2020; Morosini et al., 2012).

También se puede determinar mediante el método automatizado VITEK disponible comercialmente, que utiliza mapas (GPS) adecuados para los antibióticos utilizados para estafilococos, que se basan en la técnica de microdilución MIC (Romeu et al., 2010)

4.1.2. Métodos fenotípicos de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

- **Método de difusión (D- test):** Para realizar la prueba D se coloca un disco de eritromicina de 15 μg y un disco de clindamicina de 2 μg a una distancia de 15 o 20 mm en la superficie de la placa inoculada, siendo posibles los siguientes resultados (CLSI, 2020; Morosini et al., 2012):

1) resistencia absoluta a eritromicina y clindamicina sin aplanamiento de la zona de inhibición de clindamicina (prueba D negativa, cMLS_B);

2) resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un aplanamiento del halo del disco de clindamicina cercano al de la eritromicina (prueba D positiva, iMLS_B).

En el último fenotipo, si se investiga la susceptibilidad a los macrólidos C16, la clindamicina y las estreptograminas del grupo B en ausencia de eritromicina (inductor), las cepas parecerán sensibles a estos antimicrobianos, cuando en realidad son resistentes ya que tienen el mecanismo que se inducirá in vivo y provocará fallos en el tratamiento (CLSI, 2020; Morosini et al., 2012).

Este fenotipo también se puede detectar por el **Método de microdilución en caldo** utilizando la combinación, en el mismo pocillo, de eritromicina (4 mg / L) y clindamicina (0,5 mg / L), además de pocillos individuales para determinar la CMI de eritromicina y clindamicina por separado. Después de la incubación (35-37 ° C durante 18-24 horas), una CMI de eritromicina en el rango de resistencia asociada con una CMI de clindamicina en el rango sensible, asociada con la presencia de crecimiento en el pozo asociado con eritromicina y clindamicina, indican que es el fenotipo de resistencia inducible, y

3) resistencia a eritromicina (macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono así como a estreptograminas B) y sensibilidad a clindamicina sin aplanamiento del halo del disco (prueba D negativa, MSB) (CLSI, 2020; Morosini et al., 2012).

4.2. Métodos Genotípicos

4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método molecular muy versátil, expresado de una manera simple, todo lo que hace la PCR es hacer múltiples copias de una secuencia de ADN diana a través de un

proceso de amplificación que da como resultado microgramos de ADN. De cada molécula inicial (Tamay et al., 2013).

Se puede amplificar cualquier segmento de ADN o ARN siempre que se conozcan las secuencias que flanquean la región diana o, en otras palabras, se puede amplificar cualquier porción de ácido nucleico, conocida o no, siempre que esté ubicada entre dos secuencias conocidas con aquellos que podrán hibridar oligonucleótidos complementarios que actuarán como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde. Por tanto, para que se produzca la reacción, sus componentes básicos y esenciales son: ADN molde a amplificar, ADN polimerasa, cebadores de secuencia específica, nucleótidos para la síntesis de nuevo ADN y el tampón de reacción que incluye las diferentes sales requeridas por la enzima (Bolívar et al., 2014; Tamay et al., 2013).

La PCR es una reacción que tiene lugar en un solo tubo luego de mezclar los componentes necesarios e incubarlos en un termociclador, dispositivo que permite variar la temperatura de incubación en el tiempo de manera programada. Los protocolos básicos de PCR incluyen los siguientes pasos fundamentales (Bolívar et al., 2014; Tamay et al., 2013):

1. Desnaturalización térmica del ADN que se utilizará como molde.
2. A una temperatura por debajo de la de desnaturalización, hibridación de cebadores sintéticos cuya secuencia les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.
3. Extensión por ADN polimerasa de los oligonucleótidos anillados que actúan como cebadores.
4. Este proceso de tres pasos se repite luego un número específico de veces (25-35), duplicando cada vez el número de moléculas de producto. Esta amplificación exponencial da como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueadas por el par de

oligonucleótidos. De esta manera, la reacción alcanza una alta sensibilidad al detectar cantidades muy bajas de ADN molde y especificidad al detectar solo la secuencia de ácido nucleico para la que se diseñaron los cebadores (Bolívar et al., 2014; Tamay et al., 2013).

Es necesario tener en cuenta varias premisas (Bolívar et al., 2014; Tamay et al., 2013):

1. elegir o diseñar oligonucleótidos que no interactúen entre sí, es decir, que no formen oligómeros.
2. temperaturas de anillamiento similares.
3. cada par amplifica una única secuencia objetivo.
4. generar amplicones de tamaño suficientemente diferente para poder ser separados y diferenciados después de la amplificación. En cuanto a la calidad y cantidad de la plantilla de ADN, por supuesto, debe intentar comenzar con la concentración más baja posible y en ausencia de sustancias inhibitoras que puedan interferir con la reacción (Bolívar et al., 2014; Tamay et al., 2013).

4.2.2. Macrorrestricción de DNA y electroforesis en gel de campo pulsado

Para una especie bacteriana específica, se pueden encontrar enzimas de restricción con una frecuencia de corte baja, es decir, enzimas cuyo sitio de restricción, debido a su longitud y secuencia, rara vez se encuentra a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión, dichas enzimas permiten la macrorrestricción del ADN de las bacterias, dividiendo el ADN en unos pocos fragmentos (10 y 30). Muchos de estos fragmentos son grandes, de más de 40 kb, y no pueden separarse mediante técnicas de electroforesis convencionales, en las que se aplica un campo eléctrico constante o estático, sino que necesitan un campo eléctrico es variable son las llamadas técnicas de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Coll et al., 2005; Gopegui, 2015).

La combinación de estas dos técnicas, y la separación de fragmentos por PFGE y macrorrestricción de ADN, se ha aplicado con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos en bacteriología. Obteniendo patrones de restricción simples que representan ADN cromosómico bacteriano el cual se encuentra en unas pocas bandas con diferentes movilidades electroforéticas. Sin embargo, las características de estas técnicas determinan una serie de cambios a tener en cuenta en las diferentes fases en las que se divide el proceso de macrorrestricción y PFGE (Borraz, 2006; Gopegui, 2015):

1. El procedimiento de extracción de ADN obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se realizará la lisis, de manera que el ADN cromosómico también se incluya en la agarosa, el objetivo es que el ADN permanezca intacto y no se fracture accidentalmente (durante el pipeteo, agitación, etc.) que distorsionaría los patrones de restricción y afectaría la reproducibilidad de la técnica
2. La restricción del ADN debe realizarse tal como se prepara, es decir, inmovilizado sobre los bloques de agarosa, utilizando enzimas de baja frecuencia de corte
3. La técnica electroforética para separar los fragmentos tiene que ser una PFGE (Borraz, 2006; Gopegui, 2015).

4.2.3. Análisis del ADN por secuenciación: Multilocus Sequence Typing (MLST)

Esta técnica sirve para identificar clones y / o líneas clonales, principalmente en poblaciones bacterianas. Es un marcador molecular para su aplicación en epidemiología global o de largo plazo (identificación de grupos de población independientemente de la pequeña variaciones que pueden ocurrir geográfica y / o temporalmente), aunque se ha utilizado ocasionalmente para responder preguntas planteadas en epidemiología local o de corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recaídas, reinfecciones y / o fallos en el tratamiento,

etc.)(Vázquez & Berrón, 2003). El método se basa en el principio desarrollado en el análisis de Isoenzimas (electroforesis enzimática multilocus) en las que se examina la movilidad electroforética de un cierto número de enzimas metabólicas ya sea en poliacrilamida o geles de almidón. Las variaciones corresponden a la ubicación o al gen codificante de cada enzima. A cada variante se la denomina “variante alélica”, además cada uno de los diferentes alelos de los genes componen el perfil de alelos determinando el tipo electroforético. El hecho de utilizar enzimas metabólicas que no están expuestas a presión selectiva, ayuda a la detección de variaciones neutras, las cuales definen líneas clonales relativamente estable (Coll et al., 2005; Vázquez & Berrón, 2003).

El proceso de selección de genes, así como de fragmentos internos de estos no es universal, es decir, este proceso debe llevarse a cabo para cada especie bacteriana individualmente. Existen regiones de genes específicos que son responsables de la mayoría de la variabilidad observada, mientras que el resto del locus tiene un alto grado de preservación. Este hecho permitió definir en el desarrollo del MLST que bastaría analizar, de cada gen, un solo fragmento interno entre 450 y 500 pb. Por tanto, el nivel combinado de variabilidad entre los genes analizados proporciona un alto grado de discriminación y reduce el número de loci o genes analizados (Coll et al., 2005; Vázquez & Berrón, 2003). Es una técnica diseñada para seguir clones y / o líneas clonal y es un buen marcador molecular para la epidemiología a largo plazo. Al contrario, es una técnica exigente en cuanto a metodología y muy cara, por tanto, su uso está generalmente reservado a los laboratorios de referencia (Coll et al., 2005).

5. Materiales y métodos

Tipo de estudio

La presente investigación fue de tipo retrospectivo, descriptivo y transversal.

Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la ciudad de Loja, en el Hospital Isidro Ayora, el cual brinda atención de complejidad de segundo nivel, con una cobertura que abarca la ciudad y provincia de Loja, la provincia de Zamora Chinchipe y la parte alta de la provincia del Oro. Este establecimiento de salud se encuentra ubicado en la parroquia Sucre, en la Avenida Iberoamericana (calle principal) y Juan José Samaniego (calle secundaria), cuenta con 255 camas hábiles para el servicio de la comunidad y brinda los servicios de emergencia, consulta externa, gineco-obstetricia, cirugía general, odontología, fisioterapia, pediatría, neonatología, hospitalización, unidad de quemados, unidad de cuidados intensivos, hemodiálisis y servicios de diagnóstico complementarios como laboratorio, imagenología y entre otros. Esta Unidad recibe referencias de unidades operáticas del primer nivel de atención.

Población y muestra

Estuvo constituida por 29 cepas SARM aisladas de pacientes hospitalizados durante el año 2019, estas cepas han sido identificadas por métodos automatizados usando el equipo VITEK 2 Compact de BioMérieux. A estas cepas que se mantuvieron congeladas se les completó el proceso de determinación de la resistencia por métodos fenotípicos y genotípicos.

Criterios de inclusión

- Muestras de pacientes hospitalizados que llegaron con pedido médico de cultivo y antibiograma al Laboratorio Clínico del Hospital General Isidro Ayora durante al año 2019.
- Cepas identificadas por métodos automatizados como *Staphylococcus aureus* con resistencia a meticilina.

Criterios de exclusión

- Cepas de SARM aisladas de pacientes de consulta externa y emergencia.
- Cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina.

Técnicas y procedimientos

Dentro del desarrollo del trabajo investigativo se cumplieron tres fases específicas:

Fase pre – analítica

- Solicitud dirigida al Decano de la Facultad de Salud Humana, pidiéndole que se facilite la utilización del Laboratorio de Biología Molecular, durante el proceso de análisis de las muestras. (Anexo N° 1)
- Elaboración de registros de recolección de datos. (Anexo N° 2)
- Planificación y adquisición de materiales, insumos y reactivos.

Fase analítica

- Se realizaron medios de cultivo Agar Sangre, Agar Mueller Hinton y Caldo de cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI). (Anexo N° 3)
- Reconstitución de cepas. (Anexo N° 4)

- Pruebas de susceptibilidad para la identificación fenotípica de resistencia a meticilina y resistencia inducible a clindamicina. (Anexo N° 5)
- Lectura e interpretación de resultados fenotípicos para las pruebas de susceptibilidad. (Anexo N° 6)
- Extracción de ADN bacteriano. (Anexo N° 7)
- Identificación genotípica: Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional y electroforesis (Anexo N° 8) (Anexo N° 9)
- Lectura e interpretación de los resultados. (Anexo N° 10)

Fase post – analítica

- Reporte de resultados, se almacenaron en una base de datos digital en Microsoft Excel y Word 2013, para la tabulación, análisis e interpretación conjunta.
- Certificado de proceso de las muestras en Laboratorio de Biología Molecular (Anexo N° 11)
- Evidencias Fotográficas (Anexo N° 12)

Análisis y tabulación de datos

Los resultados se tabularon mediante el cálculo de frecuencias utilizando estadística descriptiva, lo que se presenta en tablas y gráficos de barras porcentuales para su interpretación.

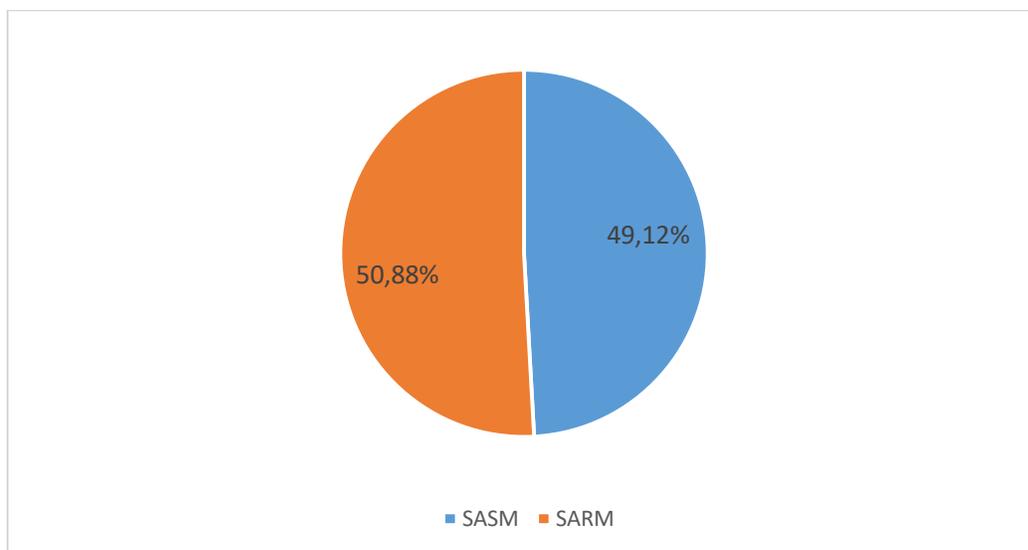
Consideraciones éticas

Para el desarrollo de la investigación, la recolección de datos de los pacientes que formaron parte del grupo de estudio se recopiló respetando el principio de confidencialidad, los resultados se usaron con fines académicos y científicos.

6. Resultados

Figura 1

Prevalencia de meticilino resistencia en S. aureus aislado de pacientes hospitalizados en el Hospital General Isidro Ayora, Loja. 2019



Nota: SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a metilina. SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina.

Interpretación:

El 50,88% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes hospitalizados en el Hospital Isidro Ayora durante el año 2019 presentaron resistencia a metilina, de forma que, en más de la mitad de infecciones causadas por este agente el tratamiento con betalactámicos no sería eficaz.

Tabla 1

Distribución de las cepas de Staphylococcus aureus en pacientes hospitalizados del Hospital General Isidro Ayora, Loja. 2019

MICROORGANISMO	ÁREAS DE HOSPITALIZACIÓN													
	Medicina Interna		Cirugía		Pediatria		Unidad de cuidados intensivos		Neonatología		Unidad de Quemados		Total General	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
SASM	7	43,8	8	47	3	33,3	5	50	3	100	2	100	28	49,1
SARM	9	56,2	9	53	6	66,7	5	50	0	0	0	0	29	50,9
TOTAL	16	100	17	100	9	100	10	100	3	100	2	100	57	100

Nota: SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina. SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. F: Frecuencia. %: Porcentaje

Interpretación:

Según los datos expuestos se nota que, en las áreas de hospitalización, excepto en neonatología y unidad de quemados, los aislamientos de *S. aureus* meticilino resistente predominan, así en Pediatría y Medicina Interna éstos constituyen el 66.7% y 56,2% de los aislados respectivamente.

Tabla 2*Métodos fenotípicos para la detección de resistencia a meticilina, macrólidos y lincosamidas*

STAPHYLOCOCCUS AUREUS						
Método de prueba	Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Resultado			
			P		N	
			F	%	F	%
Prueba para detectar resistencia a meticilina	Cefoxitina	30 µg	29	100	0	0
Prueba para detectar resistencia inducible a clindamicina (D – test)	Eritromicina	15 µg	8	27,6	21	72,4
	Clindamicina	2 µg				

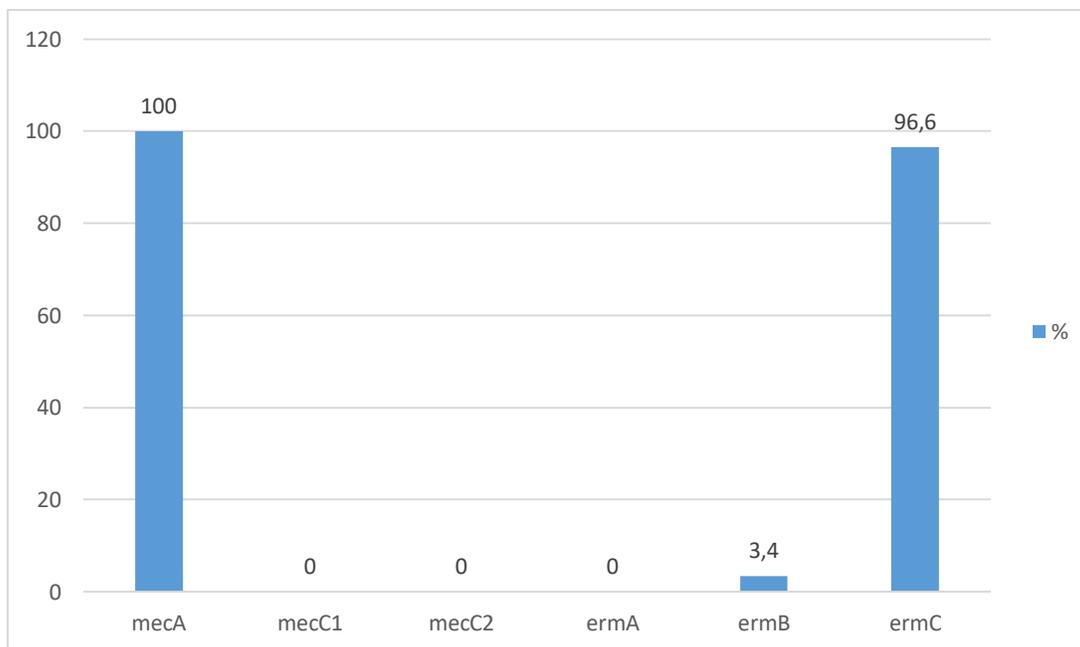
Nota: F: Frecuencia. %: Porcentaje. P: Positivo. N: Negativo.

Interpretación:

Según los datos expuestos se nota que, las 29 cepas SARM de pacientes hospitalizados en el Hospital Isidro Ayora durante el año 2019 presentaron fenotípicamente resistencia a meticilina, mientras que el 27,6 % de cepas SARM también presentaron resistencia inducible a clindamicina.

Figura 2

Genes productores de resistencia a meticilina, macrólidos y lincosamidas



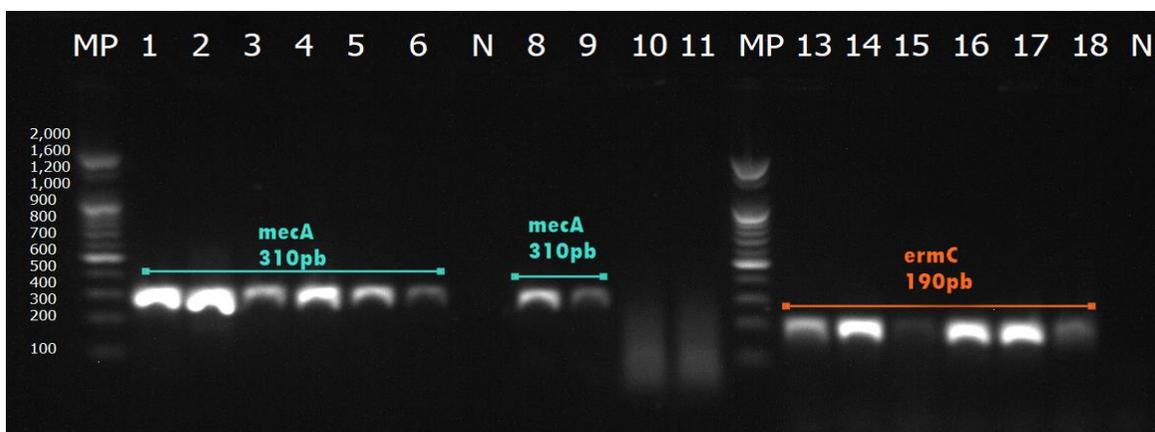
Nota: mecA-mecC1-mecC2: Genes de resistencia a meticilina; ermA-ermB-ermC: Genes de resistencia a macrólidos y lincosamidas

Interpretación:

El 100 % de las cepas en estudio presentó resistencia a meticilina debido a la presencia del gen *mecA* (n=29); mientras que el 27,6% de las cepas SARM también presentaron resistencia inducida a macrólidos y lincosamidas de los cuales el 96,6% (n=28) expresaron el gen *erm C* y el 3.4% (n=1) el gen *erm B*.

Figura 3

Resultados de PCR



Interpretación:

Los carriles 1-2-3-4-5-6-8-9 muestran una banda que corresponde a la amplificación del gen *mecA* (310 pb), los carriles 10-11 no presentan los genes *mecC1* ni *mecC2*, en los carriles 13 al 18 se muestra una banda correspondiente a la amplificación del gen *ermC* (190pb). Los carriles MP son los marcadores de peso molecular, los carriles N son controles negativos.

Figura 4

Resultados de PCR para resistencia a meticilina. Gen *mecA*

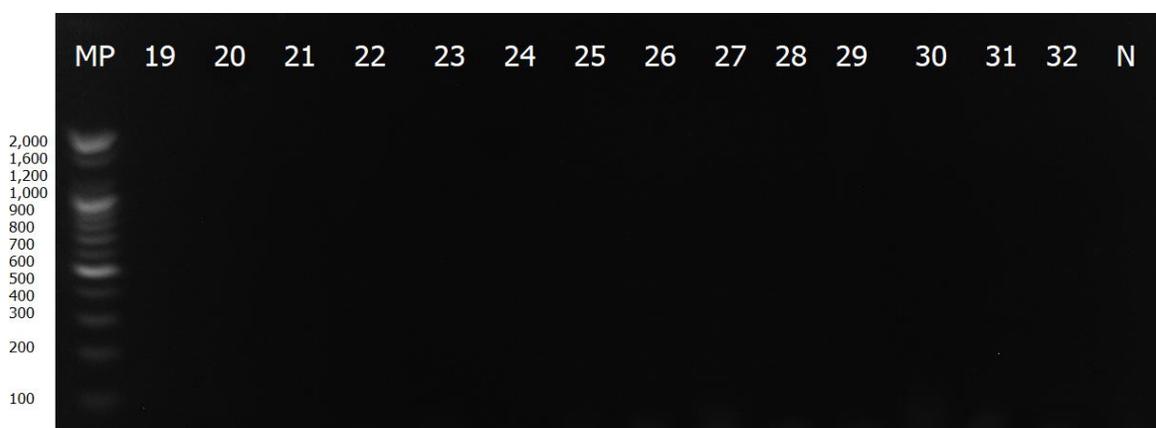


Interpretación:

Los carriles 16 hasta el 31 muestran una banda que corresponde a la amplificación del gen *mecA* (310pb). El carril P es un control positivo mientras que el carril N es un control negativo.

Figura 5

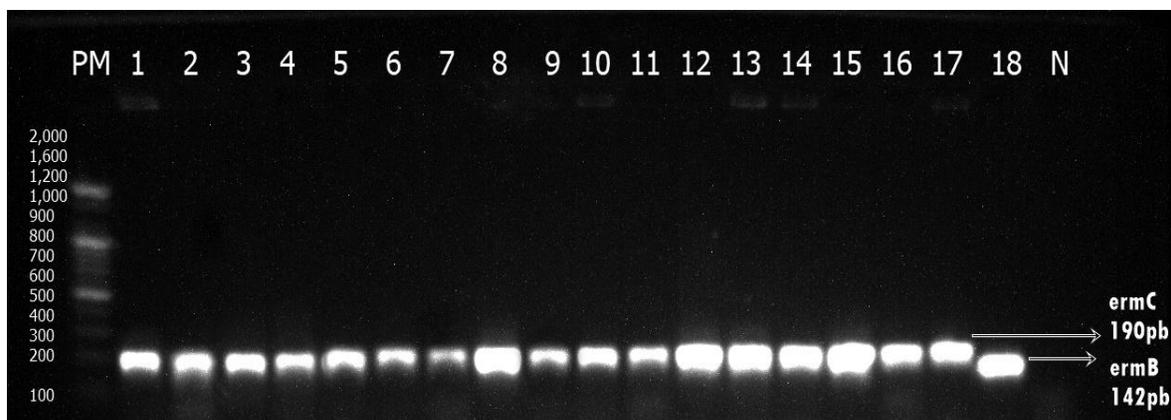
Resultados de PCR para resistencia a meticilina. Gen mecC1 – mecC2

**Interpretación:**

En ninguno de los carriles se muestran bandas que correspondan a la amplificación de los genes *mecC1* ni *mecC2*, el carril N es un control negativo.

Figura 6

Resultados de PCR para resistencia a clindamicina y eritromicina. Gen ermA – ermB – ermC



Interpretación:

Los carriles 1 hasta el 17 muestran una banda que corresponde a la amplificación del gen *ermC* (190pb), el carril 18 muestra una banda correspondiente a la amplificación del gen *ermB* (142pb). El carril N es un control negativo.

7. Discusión

Las infecciones hospitalarias son un importante problema de salud pública con consecuencias epidemiológicas y económicas con altas tasas de mortalidad y morbilidad. Es bien sabido que la prevalencia de *Staphylococcus aureus* y su variedad resistente a la meticilina varía según el área geográfica; a pesar de ello, los recursos para monitorear la epidemiología del SARM en América Latina siguen siendo limitados. Por tanto, el interés de este microorganismo está dado por su alta frecuencia, y su resistencia a diferentes fármacos (Cervantes et al., 2014; Martínez et al., 2017).

En la presente investigación se analizaron 57 cepas de *Staphylococcus aureus*, de estas 29 cepas SARM aisladas de pacientes hospitalizados durante el 2019 fueron consideradas para este estudio, las cuales representaron el 50,88% con resistencia a meticilina y el 27,6% de las mismas también fueron resistentes a macrólidos y lincosamidas, datos que concuerdan con otras investigaciones como la realizada por Togneri et al. (2017) en la cual menciona que la frecuencia de SARM fue del 50 %, según Castro et al., en su estudio durante los años 2010 – 2016 en un hospital de alta complejidad de Cartagena, demostró la prevalencia de SARM con un 47,5 %, los cuales son valores cercanos a la presente investigación.

Sin embargo, en otros estudios realizados presentaron menor prevalencia de SARM, resultados diferentes a esta investigación como la realizada en Cuenca en el Hospital Vicente Corral Moscoso en los años 2017-2018 por Aucay & Cárdenas (2020) en la cual obtuvieron una prevalencia de SARM del 26,92 %, del mismo modo Martínez et al. (2020) con el 25,7 %.

Juntamente, se ha evidenciado que determinadas áreas del hospital poseen mayor cantidad de pacientes SARM positivos, en esta investigación se evidencio que fueron mayores

los reportes positivos de los servicios de pediatría con un 66,7 %, medicina interna con 56,2% y cirugía con 53%, similar a estos resultados se encuentra el estudio realizado por Aucay & Cárdenas (2020), en el cual obtuvieron predominio en el área de pediatría con 27,85 %, seguida por clínica con 25,95 %, y Gómez et al. (2016) en Venezuela, presento un 50 % de aislados positivos para el servicio de pediatría. Por lo tanto las infecciones asociadas al cuidado de la salud se presentan en cualquier tipo de servicio hospitalario, pero los pacientes pediátricos, son más susceptibles de presentarlas. En la investigación presente no se encontraron casos en neonatología ni en unidad de quemados dato que es importante ya que se podría llegar a la conclusión de que los pacientes de estas áreas críticas corren menos el riesgo de contraer infecciones nosocomiales.

La diferencia de prevalencia por países puede atribuirse a las prácticas de control y vigilancia epidemiológica de cada país o de cada hospital. Inclusive de acuerdo con datos del Centro para el Control de Enfermedades, en los Estados Unidos, la proporción de infecciones resistentes a los antibióticos ha ido en aumento. El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (IN) determinó que la prevalencia de cepas SARM en pacientes hospitalizados se incrementó (Mengana & Turcaz, 2016), por lo que se debería incrementar las normas de prevención y control de las infecciones nosocomiales, manteniendo actualizado al personal de salud en los aspectos microbiológicos relacionados con las IN, en especial los mapas microbiológicos, la sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos en uso, que debe ser la base para el desarrollo de una política adecuada de racionalización en el uso de antibióticos. Cabe recalcar que es importante identificar los factores de riesgo asociados a IN por servicios y brindar las recomendaciones pertinentes, ya que de las decisiones que se tomen en estos servicios depende el tratamiento inicial del paciente y su destino final (Acosta, 2011). Además hay que

tener en cuenta que las complicaciones que se asocian al aumento de la permanencia hospitalaria y la aparición de cepas resistentes, es el saneamiento del ambiente hospitalario como la limpieza, desinfección y descontaminación de las áreas hospitalarias; También hay que tener en cuenta que siempre se debe tener presente los lineamientos que debe cumplir el personal de salud al ejecutar su trabajo.

El mecanismo de resistencia inducible a clindamicina en cepas *S. aureus* resistentes a meticilina se presentó en un 27,6%, demostrando la multirresistencia que haría que las cepas no puedan ser tratadas con betalactámicos, macrólidos y lincosamidas, mecanismo que es de suma importancia conocerlo, ya que de no sospecharlo puede llevar a fallas terapéuticas. La clindamicina es un antibiótico ampliamente utilizado para tratar infecciones estafilocócicas complicadas y no complicadas (del Valle, 2017); Sin embargo, se ha descrito resistencia a este antibiótico a pesar de sus ventajas terapéuticas. Diferentes investigaciones realizadas como la de Morales et al. (2016) obtuvo un 12% con resistencia inducible a la clindamicina, otro estudio realizado por del Valle (2017) mostro un 14% con dicha resistencia, según estudios realizados indican que esta falla al tratamiento puede ocurrir en el caso de la resistencia inducible, un mecanismo en que la exposición a un inductor realiza una metilación del sitio de unión de los antimicrobianos del grupo MLSB (del Valle, 2017).

El CLSI recomienda el uso de una prueba simple de laboratorio (D-test), método utilizado en el presente estudio, para diferenciar los aislamientos que tengan un alto potencial genético para convertirse en resistentes durante la terapia con clindamicina (aquellos con genes *erm*) de aquellos con bajo potencial genético para volverse resistentes (Morales et al., 2016a).

En este estudio se llevó a cabo la confirmación de SARM y la resistencia a macrólidos y lincosamidas mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

mediante la amplificación de los genes respectivos, como era de esperar todas las cepas analizadas son portadoras del gen *mecA*, debido a que la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*, cuyo producto es la PBP2a o PBP2', es la predominante en ambientes hospitalarios humanos en todo el mundo, esta enzima con función transpeptidasa posee menor afinidad por los β -lactámicos que las PBP nativas, debido a que su sitio de unión a estos antibióticos es estructuralmente más estrecho y por lo tanto de más difícil acceso. Es precisamente esta propiedad la que permite que SARM mantenga el entrecruzamiento del peptidoglicano en presencia de meticilina o algún antibiótico estructuralmente relacionado, ya que la función de transpeptidación de la PBP2a no se ve inhibida con las concentraciones que el β -lactámico alcanza in vivo (Aguayo et al., 2018) . Resultado que concuerda con otros estudios realizados como Aguayo (2020) en Chile, en el cual todas sus cepas en estudio presentaron el gen *mecA* y Fasihi et al. (2017) presentando un 39,5%.

En este estudio no se encontro ninguna cepa con el gen *mecC*, según Petersen et al. (2013) la PBP que se sintetiza a partir de este gen, si bien es la responsable de la meticilino resistencia, sólo tiene un 63% de homología con la PBP2a. Las cepas que tienen este tipo de gen, han sido asociadas con la actividad veterinaria, sin embargo, si se han conocido cepas aisladas de seres humanos portadoras del gen de resistencia *mecC*, por ejemplo en algunos países como Dinamarca en las que cepas de *S. aureus* portadoras de *mecC* pueden ser responsables de hasta 2% de los casos de infecciones por cepas meticilino resistentes en humanos.

En el análisis genotípico para el gen MLSB se encontró con mayor proporción aislamientos con el gen *ermC* (96,6%), similar al estudio realizado en Paraguay por Silvagni et al. (2019) y Fasihi et al. (2017) en Iran, en los cuales el gen predominante fue *ermC*, con excepción de un estudio en Brazil donde gen predominante fue el *ermA*. En la literatura se ha

reportado al gen *ermC* con mayor potencialidad para desarrollar resistencia inducible a clindamicina, pero ambos genes *ermA* y *ermC* in vitro desarrollan un disco D positivo (del Valle, 2017).

Los resultados moleculares de la detección de resistencia a meticilina tuvieron 100% de concordancia con los obtenidos mediante el método fenotípico empleado en esta investigación. La buena correlación entre los métodos fenotípicos (difusión con discos) y moleculares (PCR) permiten inferir el mecanismo de resistencia a meticilina, eritromicina y clindamicina e instaurar el tratamiento antimicrobiano más adecuado. Además las técnicas de epidemiología molecular permiten conocer características genéticas de los microorganismos, que no quedan reflejadas por otras técnicas de laboratorio fenotípicas en las que, en ocasiones, ocurren problemas de reproducibilidad y poder de discriminación (Morales et al., 2016a).

La rapidez y facilidad con que se originan cambios evolutivos en los microorganismos hacen conveniente la vigilancia epidemiológica utilizando sistemas microbiológicos de tipificación, fenotípicos y genotípicos, que nos permitan realizar estudios epidemiológicos más completos y así poder establecer medidas de control (Borraz, 2006).

8. Conclusiones

- La prevalencia de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en pacientes hospitalizados fue del 50,88%; el 27,6% de éstas mismas cepas presentaron resistencia inducible a meticilina y clindamicina.
- Las áreas de hospitalización que tienen menor frecuencia de pacientes infectados con SARM fueron neonatología y la unidad de quemados.
- Los genes prevalentes para la producción de meticilino resistencia fue *mecA* (100%) y *ermC* (96.9%) para la resistencia a clindamicina y macrólidos.

9. Recomendaciones

- Con el fin de minimizar el uso excesivo e innecesario de antibióticos en infecciones menores y así evitar resistencias, se recomienda al Ministerio de Salud Pública y a través de este a todas las Instituciones de salud tanto públicas como privadas desarrollar programas de educación para optimizar y racionalizar el uso de antibióticos, que estén dirigidos tanto al personal de salud como a la comunidad en general. Implementar simultáneamente programas de vigilancia en los hospitales para controlar y detectar cepas resistentes, mediante la elaboración de mapas microbiológicos en los diferentes departamentos hospitalarios, ya que permiten un resumen estadístico de las bacterias circulantes a nivel hospitalario y por tanto aporta información de gran interés para mejorar los tratamientos empíricos.

10. Bibliografía

- Acosta, S. (2011). *Manual de control de infecciones y epidemiología hospitalaria*.
- Aguayo, A. (2020). *Caracterización del cassette cromosómico estafilocócico SCCmec en aislados de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina con fenotipo comunitario*.
<https://bit.ly/3xQIIRx>
- Aguayo, A., Quezada, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo, A., Bello, H., Domínguez, M., & González, G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en Staphylococcus aureus. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 7–14. <https://bit.ly/2UTUZPG>
- Álvarez, I., & Ponce, J. (2012). Staphylococcus aureus, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*, 84(4), 383–391. <https://bit.ly/3rp9MOr>
- Aucay, J., & Cárdenas, P. (2020). *Prevalencia de Staphylococcus aureus meticilino resistente en muestras del laboratorio de microbiología del Hospital Vicente Corral Moscoso, 2017-2018*.
- Bolívar, A. M., Rojas, A., & García, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances En Biomedicina*, 3(1), 25–33.
- Borraz, C. O. (2006). *Epidemiología De La Resistencia A Meticilina Departamento: Patología I Terapéutica Experimental. Facultad de medicina*.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez-Nieto, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8, pp. 601–608). Elsevier. <https://bit.ly/3zsdFFp>

Castañón, C. A. (2012). Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evidencia Médica e Investigación En Salud*, 5(3), 79–84.

Castellano, M., & Perozo, A. (2010b). Mecanismos de resistencia a Glicopéptidos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera v.38 n.1, v.38 n.1*. <https://bit.ly/36JLMw7>

Castro, R., Villafañe, L., Rocha, J., & Alvis, N. (2018). *Resistencia Antimicrobiana en Staphylococcus Aureus Y Staphylococcus Epidermidis: Tendencia Temporal (2010-2016) y Fenotipos de multirresistencia, Cartagena (Colombia)*, 17(2), 25–36. <https://bit.ly/3hPCnJz>

Cervantes, E., García, R., Paz, M., & Salazar, S. (2015). *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). In *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* (Vol. 62, Issue 2). <https://bit.ly/3wPCU2B>

Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. (2014). Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(4), 196–204. <https://bit.ly/3kyTyRn>

CLSI. (2020). M100Ed30 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. In *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (Vol. 9, Issue January 2008). <https://bit.ly/2VZBnKD>

Coll, P., Coque, M. T., Domínguez, M. A., Vázquez, J., & Jordi, V. (2005). *Métodos Moleculares de Tipificación Epidemiológica en Bacteriología*.

del Valle, A. (2017). *Staphylococcus aureus con resistencia inducible a clindamicina causante de infección de tejidos blandos, en el Hospital para el Niño Poblano*. <https://bit.ly/3hNMaQo>

Díaz, M. S., Guillén, R., Rodríguez, F., Espínola, C., Grau, L., & Velázquez, G. (2019). Inducible resistance to clindamycin in methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from paraguayen children. *Revista Chilena de Infectología*, 36(4), 455–460. <https://bit.ly/2UX6RQW>

Echevarria, J., & Iglesias, D. (2013). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Medica Herediana*, 14(4), 195. <https://bit.ly/3BdOQi5>

Fasihi, Y., Saffari, F., Kandehkar Ghahraman, M. R., & Kalantar-Neyestanaki, D. (2017). Molecular detection of macrolide and lincosamide-resistance genes in clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Kerman, Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 5(1). <https://bit.ly/3sfZQHt>

Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*.

Fuentes, X. (2018). *Resistencia a β -lactámico por Staphylococcus aureus*.

García, A., Martínez, C., Juárez, R., Téllez, R., Paredes, M., del Rocío, M., & Giono, S. (2019). Methicillin resistance and biofilm production in clinical isolates of Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcus in Mexico. *Biomedica*, 39(3), 1–11. <https://bit.ly/2VZAPEz>

García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Gajardo, S. S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. In *Revista Chilena de Infectología* (Vol. 29, Issue 3, pp. 263–272). Sociedad Chilena de Infectología. <https://bit.ly/3rj2kEu>

Gómez, L., Núñez, D., Perozo, A., Bermúdez, J., & Marín, M. (2016). *Staphylococcus aureus con resistencia múltiple a los antibióticos (MDR) en un Hospital de Maracaibo-Venezuela*. <https://bit.ly/3Bj6ErT>

Gopegui, E. R. (2015). Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus spp.* en centros sanitarios de mallorca durante los últimos 15 años (1999-2013). *Universitat de Les Illes Balears*.

Hernández, O., Ulloa, Y., Méndez, D., & del Carmen, M. (2005). *Staphylococcus aureus y su identificación en los laboratorios microbiológicos: Revisión bibliográfica*. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 9(1). <https://bit.ly/3wQR7MP>

Hurtado, M., de la Parte, M., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 112-118. <https://bit.ly/2Tk9Cv9>

Jawetz, Adelberg, & Melnick. (2011). *Microbiología médica*.

Katayama, Y., Zhang, H. Z., & Chambers, H. F. (2004). PBP 2a Mutations Producing Very-High-Level Resistance to Beta-Lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 453–459. <https://bit.ly/2TjAknE>

Koneman, E. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y ...* - Elmer W. Koneman, Stephen Allen - Google Libros. In *Ed. Médica Panamericana*. <https://bit.ly/3zcBErH>

Labarca, J. (2015). Hetero-resistencia en *Staphylococcus aureus* con Resistencia intermedia a vancomicina, ¿susceptible o resistente? In *Revista Chilena de Infectología* (Vol. 32, Issue 5, pp. 497–498). Sociedad Chilena de Infectología. <https://bit.ly/3xS5XE2>

Lacueva, M. A. (2017). *Resistencia a antibióticos en Staphylococcus aureus. Evolución y perspectiva actual*. 20. <https://bit.ly/3kA1nXk>

Lee, A., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. <https://bit.ly/3kvqLgJ>

Martínez, A., Montes de Oca Rivero, M., Alemañy Co, J., Marrero Silva, I., Reyna Reyes, R., & Cedeño Morales, R. (2017). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. In *MediSur* (Vol. 15, Issue 2). Centro de Información de la Facultad de Ciencias Médicas. <https://bit.ly/3hNsOuD>

Martínez, R. M., Sandoval, F. D. M.-, Aquino, M. M.-, Figueroa, Y. T.-, & Urizar, J. T. P.-. (2020). Prevalencia y caracterización genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina aisladas en un hospital regional mexicano. In *Revista Chilena de Infectología* (Vol. 1, Issue 1). <https://bit.ly/3CB3CzY>

Mayorga, D., Arnao, A., & Pereira, H. (2020). Factores de Riesgo asociados con la Estancia Hospitalaria en niños con Bacteriemia por *Staphylococcus Aureus*. *Revista Ecuatoriana de Pediatría*, 21(2), 1–9. <https://bit.ly/3eyTIVi>

Mengana, K., & Turcaz, M. (2016). *Incidencia de Staphylococcus aureus resistente a metilina en pacientes pediátricos hospitalizados | Pascual Mengana | Revista Información Científica*. <https://bit.ly/3rkH5SJ>

Monroy, E., Paniagua, G., Vaca, S., & González, S. (2003). β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus aureus*. 6, 6–12.

Morales, G., Yaneth, M., & Zuleta, A. (2016a). Fenotipos de resistencia a meticilina, macrólidos y lincosamidas en *Staphylococcus aureus* aislados de un hospital de Valledupar, Colombia. *Artículos de Investigación Científica*. <https://bit.ly/3BiUBejv>

Morosini, M. I., Cercenado, E., Ardanuy, C., & Torres, C. (2012). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 30, Issue 6, pp. 325–332). Elsevier. <https://bit.ly/3hQa11X>

MSP. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018. *Ministerio de Salud Pública*, 10. <https://bit.ly/2Uk2OOU>

OMS. (2020). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report*.

Pasachova, J., Ramirez, S., & Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25–38. <https://bit.ly/2UV8Xku>

Perozo, A., Parra, A., Ginestre, M., & Rincón, G. (2012). *Genotipos de resistencia antimicrobiana y su expresión fenotípica en cepas de Staphylococcus aureus*. <https://bit.ly/3riWwep>

Petersen, A., Stegger, M., Heltberg, O., Christensen, J., Zeuthen, A., Knudsen, L. K., Urth, T., Sorum, M., Schouls, L., Larsen, J., Skov, R., & Larsen, A. R. (2013). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark

corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(1). <https://bit.ly/37D8uGC>

Quiceno, N., & Correa, M. (2009). *Staphylococcus aureus resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación*.

Rodríguez, C., & Vesga, O. (2005). Staphylococcus aureus resistente a vancomicina. In *Biomédica* (Vol. 25).

Rodríguez, E., Rayo, N., Otero, M., & Ruiz Sánchez, F. (1999a). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Volumen 19, Núm. 5, septiembre-octubre*. <https://bit.ly/3BIRqmf>

Romeu, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., & Eslava, C. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1–9. <https://bit.ly/36ITJBL>

Sanjurjo, M. (2018). La penicilina, pionera de la era de los antibióticos. *Educación Química*, 8(2), 68. <https://bit.ly/3zdpM8T>

Severin, A., Wu, S. W., Tabei, K., & Tomasz, A. (2005). High-level β -lactam resistance and cell wall synthesis catalyzed by the *mecA* homologue of *Staphylococcus sciuri* introduced into *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 187(19), 6651–6658.

<https://bit.ly/2UV8NcS>

Siemens, H. (2008). *AutoSCAN@-4*. <https://sie.ag/36LyHSV>

Silvagni, M., Guillén, R., Rodríguez, F., Espínola, C., Grau, L., Velázquez, G., Silvagni, M., Guillén, R., Rodríguez, F., Espínola, C., Grau, L., & Velázquez, G. (2019). Resistencia

inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de pacientes pediátricos en Paraguay. *Revista Chilena de Infectología*, 36(4), 455–460.

<https://bit.ly/2VHpNUJ>

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://bit.ly/3eA9IM6>

Tamay, Ibarra, & Velasquillo. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real* (Vol. 2). <https://bit.ly/2TlnpBH>

Toasa, A., Medina, F., Anchundia, G., & Peñaranda, C. (2020). *Staphylococcus Aureus Resistente a Meticilina*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 94–101.

<https://bit.ly/3BidLAY>

Togneri, A., Podestá, L., Pérez, M., & Santiso, G. (2017). Estudio de las infecciones por *Staphylococcus aureus* en un hospital general de agudos (2002-2013). *Revista Argentina de Microbiología*. <https://bit.ly/3xRPjUI>

Vázquez, N., Cáceres, P., Fiorilli, G., & Moreno, S. (2019). Resistencia emergente a la mupirocina en aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un hospital pediátrico terciario en la Argentina. *Arch Argent Pediatr*, 117(1), 30–37.

Vázquez, J., & Berrón, S. (2003). *Multilocus sequence typing : el marcador molecular de la era de Internet*. 113–120.

Vignoli, R., & Pardo, L. (2016). *Manual de Mecanismos de Resistencia a Antibióticos Macrólidos y Lincosaminas*.

Yépez, G. (2019). *Prevalencia de Staphylococcus aureus meticilino resistente en mucosa nasal del Centro Médico Familiar Integral y de Especialidades, Diálisis “La Mariscal”, 2018.*

Zendejas, G., Flores, H., & Soto, M. (2014). *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación.* <https://bit.ly/3kMTHB9>

11. Anexos

ANEXO 1



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Facultad
de la Salud
Humana

Of. Nro. 2021-0015-DFSH-UNL
Loja, 11 de enero de 2021

Señores

Allison Loretho Paz
David Alejandro Gallegos Criollo
Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz

ESTUDIANTES DEL OCTAVO CICLO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

Ciudad.-

De mi especial consideración:

Acuso recibo de comunicación de 29 de octubre de 2020, recibido en este Decanato el 08 de enero de 2021, relacionado con el uso del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de la Salud Humana.

Al respecto, y con base al protocolo PCR MULTIPLEX, en mi calidad de Autoridad Académica de esta Facultad, autorizo el uso del Laboratorio de Biología Molecular a partir del 18 de enero de 2021 para la ejecución de los proyectos de tesis denominados: **"COLISTIN RESISTENCIA EN ENTEROBACTERIOACEAE PRODUCTORAS DE CARBAPENEMAS AISLADAS DE PACIENTES A CARBAPENEMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS"**, **"ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTES A CARBAPENEMICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS"** y **"CARACTERIZACION MOLECULAR DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE AISLADO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS"**, teniendo en cuenta como requisito obligatorio el acudir al referido laboratorio con el Tutor o Director de Tesis.

Aprovecho la oportunidad para reiterar mi sentimiento de consideración y estima.

Atentamente,
**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA.**



SANTOS AMABLE
BERMEO FLORES

Dr. Amable Bermeo Flores, Mg. Sc.
DECANO DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

cc. Lcda. Nathaly Moscoso, Carrera Laboratorio Clínico, Archivo
ABF/yadycordova

Anexo 2

Registro de recolección de datos

CÓDIGO	MICROORGANISMO		A. HOSPITALIZACIÓN	SASM
190415225	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Cirugía	NEO= 3
190915225	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Cirugía	PED= 3
190513277	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Cirugía	CIR=8
190711323	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	E. Pediatría	UCI= 5
190504144	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	UCI	MED=7
190419101	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	E. Cirugía	UQUE= 2
190416272	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Pediatría	
190618384	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G-Medicina Interna	Año 2019 = 57 S. aureus
190613218	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	UCI	
190811113	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	E. Pediatría	
190703116	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	UCI	
190701271	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Pediatría	
190501053	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G-Pediatría	
190726389	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Cirugía	
190917300	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G-Medicina Interna	
190516275	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G- Medicina Interna (Clínica)	
190422291	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Cirugía	
190615089	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	UCI - Diálisis	
190930363	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	Pediatría	
191102076	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G-UCI	
190419131	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	E. Cirugía	
190602159	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G- Medicina Interna (Clínica)	
190420089	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	E. Cirugía	
190509409	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G- Medicina Interna (Clínica)	
190510208	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G- Medicina Interna (Clínica)	
190613218	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G- Medicina Interna (Clínica)	
191022291	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G- Medicina Interna (Clínica)	
191123002	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	E. Cirugía	
191020175	<i>Staphylococcus aureus</i>	SARM	G- Medicina Interna (Clínica)	

Anexo 3

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico		Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc
			Fecha de Elaboración: Marzo - 2021
	PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR SANGRE		Versión: 001
			Páginas: 3
Área: Laboratorio			
Responsable: Estudiante			
Objetivo: Preparar medio de cultivo agar sangre			
Indicaciones: <p style="text-align: center;">Preparación del medio de cultivo agar sangre</p>			
Uso:	Medio diferencial, enriquecido y no selectivo, proporciona el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas así como de hongos (mohos y levaduras), a partir de una base rica y complementada, ofreciendo óptimas condiciones de desarrollo. La conservación de los eritrocitos íntegros favorece la formación de halos de hemólisis nítidos, facilitando la diferenciación de algunas especies hemolíticas.		
Composición: Fórmula (en gramos por litro)	Ingredientes HM peptona B (Polvo de extracto de carne) Triptosa Cloruro de sodio Agar PH final (a 25 ° C)	G / Litro 10.000 10.000 5.000 15.000 7,3 ± 0,2	
Fundamento:	El medio contiene una rica base de nutrientes, que proporciona condiciones óptimas de crecimiento para todos los microorganismos involucrados. El extracto de carne		

	<p>aporta fosfatos, minerales y fuentes de energía, la infusión de triptona aporta aminoácidos y otros factores de crecimiento esenciales en el medio para el crecimiento de microorganismos. El cloruro de sodio proporciona un equilibrio osmótico en el medio. El agar es un agente solidificante. Al agregar sangre, el pH de 6.8 estabiliza y promueve la formación de áreas claras de hemólisis.</p>
Control de Calidad:	<ul style="list-style-type: none"> - Incubar todas las cajas bipetri de agar sangre a temperatura 37°C por 48 horas, revisando cada 24 horas. - Utilizar cepa control de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, para verificar el crecimiento de la bacteria controlando el medio preparado. - No hubo crecimiento: “Ausencia de crecimiento microbiano después de 48h de incubación a 37°C”, listas para usar. - Si hay crecimiento: cajas bipetri contaminadas, no se puede usar.
Resultados:	<ul style="list-style-type: none"> - Cepa control: <p><i>Staphylococcus aureus</i>: Colonias grandes, opacas, cremosas con borde circular, elevación convexa, de coloración blanca o amarilla, en general β-hemolítica.</p>
Almacenamiento:	<p>Las placas deben ser colocadas en posición invertida, y almacenarse a una temperatura de 4 a 8°C, no menos de 0°C para evitar congelamiento del medio.</p>
Procedimiento:	
<p>Materiales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Medio de cultivo agar sangre - Papel filtro o papel reciclable - Espátulas o depresor lingual - Matraces Erlenmeyer - Gasas, Algodón - Cajas bipetri - Lápiz graso o marcador para vidrio 	<p>Equipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Balanza - Autoclave - Cocineta - Refrigeradora

- Agua destilada

1. Encender la balanza
2. Tarar
3. Pesar 40 gr de agar sangre
4. Disolver en 1000ml de agua destilada
5. Tapar la boca del matraz con gasa y algodón
6. Homogenizar
7. Calentar hasta hervir.
8. Autoclavar a 121°C por 15 minutos y 15 libras de presión
9. Esperar a que se enfríe, temperatura menor a 50°C
10. Añadir 50 ml de sangre al agar (5%)
11. Limpiar con cloro la superficie donde se dispensará los agares
12. Dispensar los agares frente a llama de mechero
13. Cuando se hayan solidificado, colocarlos en la incubadora a 37^a C y dejarlos por 48 horas, revisando cada 24 horas.
14. Si no existe crecimiento en ellos, poner las iniciales del medio preparado y la fecha de preparación.
15. Guardar los agares a temperatura de 4 a 8°C

Nota: ATCC: Colección de cultivo tipo americano

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico		Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc
			Fecha de Elaboración: Marzo - 2021
	PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR MUELLER HINTON		Versión: 001
			Páginas: 3
Área: Laboratorio			
Responsable: Estudiante			
Objetivo: Preparar medio de cultivo Muller Hinton			
Indicaciones: <p style="text-align: center;">Preparación del medio de cultivo agar Mueller Hinton</p>			
Uso:	El medio Mueller Hinton es un medio semisólido nutritivo usado para el estudio de la sensibilidad de las bacterias frente a agentes antimicrobianos. Se usa como medio de cultivo para llevar a cabo la técnica de antibiograma.		
Composición: Fórmula (en gramos por litro)	Ingredientes Infusión B de HM (Infusión de carne de res) Acicasa (Hidrolizado de ácido de caseína) Almidón Agar PH final (a 25 ° C)	G / Litro 300.000 17.500 1.500 17.000 7. 3 ± 0,1	
Fundamento:	El agar Mueller Hinton se sugiere para la difusión de agentes antimicrobianos impregnados en un disco de papel a través de un gel de agar. HM infusión B y la acicasa aportan compuestos nitrogenados, carbono, azufre y otros nutrientes fundamentales. El almidón trabaja como coloide asegurador frente a las sustancias tóxicas presentes en el medio. La hidrólisis del almidón produce dextrosa, que sirve como fuente de energía.		

Control de Calidad:	<ul style="list-style-type: none"> - Incubar todas las cajas bipetri de agar Mueller Hinton a temperatura 37°C por 48 horas, revisando cada 24 horas. - No hubo crecimiento: “Ausencia de crecimiento microbiano después de 48h de incubación a 37°C”, listas para usar. - Si hay crecimiento: cajas bipetri contaminadas, no se puede usar. 		
Almacenamiento:	Las placas deben ser colocadas en posición invertida, y almacenarse a una temperatura de 4 a 8°C, no menos de 0°C para evitar congelamiento del medio.		
<p>Procedimiento:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Materiales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Medio de cultivo agar Mueller Hinton - Papel filtro o papel reciclable - Espátulas o depresor lingual - Matraces Erlenmeyer - Gasas, Algodón - Cajas bipetri - Lápiz graso o marcador para vidrio - Agua destilada </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Equipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Balanza - Autoclave - Cocineta - Refrigeradora </td> </tr> </table> <ol style="list-style-type: none"> 1. Encender la balanza 2. Tarar 3. Pesar 38 gr de agar Mueller Hinton 4. Disolver en 1000ml de agua destilada 5. Tapar la boca del matraz con gasa y algodón 6. Homogenizar 7. Calentar hasta hervir 		<p>Materiales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Medio de cultivo agar Mueller Hinton - Papel filtro o papel reciclable - Espátulas o depresor lingual - Matraces Erlenmeyer - Gasas, Algodón - Cajas bipetri - Lápiz graso o marcador para vidrio - Agua destilada 	<p>Equipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Balanza - Autoclave - Cocineta - Refrigeradora
<p>Materiales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Medio de cultivo agar Mueller Hinton - Papel filtro o papel reciclable - Espátulas o depresor lingual - Matraces Erlenmeyer - Gasas, Algodón - Cajas bipetri - Lápiz graso o marcador para vidrio - Agua destilada 	<p>Equipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Balanza - Autoclave - Cocineta - Refrigeradora 		

8. Autoclavar a 121°C por 15 minutos y 15 libras de presión
9. Esperar a que se enfríe
10. Limpiar con cloro la superficie donde se dispensará los agares
11. Dispensar los agares frente a llama de mechero, el grosor del medio de cultivo debe ser de 4 mm.
12. Cuando se hayan solidificado, colocarlos en la incubadora a 37° C y dejarlos por 48 horas, revisando cada 24 horas.
13. Si no existe crecimiento en ellos, poner las iniciales del medio preparado y la fecha de preparación.
14. Guardar los agares a temperatura de 4 a 8°C

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico		Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc
			Fecha de Elaboración: Marzo - 2021
	PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DEL CALDO DE CULTIVO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN		Versión: 001
			Páginas: 3
Área: Laboratorio			
Responsable: Estudiante			
Objetivo: Preparar el caldo de cultivo infusión cerebro corazón			
Indicaciones: <p style="text-align: center;">Preparación del caldo de cultivo infusión cerebro corazón</p>			
Uso:	Medio líquido de uso general para una amplia variedad de especies fúngicas y bacterianas a partir de muestras clínicas.		
Composición: Fórmula (en gramos por litro)	Ingredientes Infusión de cerebro y corazón Digerido péptico de tejido animal Digerido pancreático de caseína Cloruro sódico Glucosa Fosfato disódico de hidrógeno pH	G / Litro 12,5 5,0 10,0 5,0 2,0 2,5 7,4 ± 0,2	
Fundamento:	La rica base nutricional de las infusiones cerebro y corazón, la peptona y glucosa proporcionan fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza esenciales para el crecimiento de una variedad de microorganismos. La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. Se utiliza fosfato disódico como tampón en el medio.		
Control de Calidad:	- Incubar todos los tubos de agar infusión cerebro y corazón a temperatura 37°C por 48 horas, revisando cada 24 horas.		

	<ul style="list-style-type: none"> - No hubo crecimiento: “Ausencia de crecimiento microbiano después de 48 horas de incubación a 37°C”, listas para usar. - Si hay crecimiento: tubos de agar contaminados, no se puede usar.
Almacenamiento:	Almacenarse a una temperatura de 4 a 8°C, no menos de 0°C para evitar congelamiento del medio.

Procedimiento:**Materiales:**

- Medio de cultivo agar infusión de cerebro y corazón
- Papel filtro o papel reciclable
- Espátulas o depresor lingual
- Matraces Erlenmeyer
- Gasas, Algodón
- Tubos
- Gradilla
- Lápiz graso o marcador para vidrio
- Agua destilada

Equipos:

- Balanza
- Autoclave
- Cocineta
- Refrigeradora

1. Encender la balanza
2. Tarar
3. Pesar 11,1 gr de agar infusión de cerebro y corazón
4. Disolver en 300 ml de agua destilada
5. Tapar la boca del matraz con gasa y algodón
6. Homogenizar
7. Calentar hasta hervir
8. Limpiar con cloro la superficie donde se dispensará los agares

9. Dispensar el agar en los tubos, tapar y colocarlos en un recipiente
10. Autoclavar a 121°C por 15 minutos y 15 libras de presión
11. Esperar a que se enfríe
12. Colocarlos en la incubadora a 37° C y dejarlos por 48 horas, revisando cada 24 horas.
13. Si no existe crecimiento en ellos, poner las iniciales del medio preparado y la fecha de preparación.
14. Guardar los agares a temperatura de 4 a 8° C.

Anexo 4

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico	Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc
		Fecha de Elaboración: Mayo - 2021
	PROTOCOLO PARA RECUPERACIÓN DE CEPAS	Versión: 001
		Páginas: 3
Área: Laboratorio		
Responsable: Estudiante		
Objetivo: Recuperar las cepas congeladas de <i>Staphylococcus aureus</i>		
Indicaciones: <p style="text-align: center;">Recuperación de cepas congeladas de <i>Staphylococcus aureus</i></p>		
Método de conservación	Crioperlas: Perlas de cerámica que se impregnan con la solución celular a congelar.	
Temperatura de descongelado	Temperatura ambiente	
Medio de inoculación	Agar sangre	
Inóculo	Estriado para aislar	
Condiciones de incubación	Ambiente de incubación con temperaturas de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	
Duración de la incubación	18–24 horas	
Resultados	- Si hay crecimiento: listas para usar.	



- Si hay crecimiento con contaminación: suspender en suero fisiológico las colonias y volver a inocular en placas agar sangre utilizando el estriado para aislar.



- No hubo crecimiento: “Ausencia de crecimiento microbiano después de 24h de incubación a 37°C”, volver a inocular la cepa bacteriana.

Procedimiento:

Materiales:

- Cajas de medio de cultivo agar sangre
- Asas desechables

Equipos:

- Incubadora

1. Se procede a descongelar los crioviales los cuales contienen las crioperlas a una temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. A partir de las crioperlas, tomar el asa e introducirla en el criovial y tomar una perla.
3. Colocar la perla en la caja petri de agar sangre.
4. Con el asa impregnada de la muestra se efectúa un pequeño inóculo en el borde, de allí se parte la primera estriación.

5. Estriar con técnica de agotamiento; realizar picaduras sobre las estrías para observar mejor la hemólisis que produjeran las bacterias.
6. Tape la caja y se lleva a la incubadora a 37°C por 24 horas, colocándola de lado contrario al que se sembró.
7. Al siguiente día saque las cajas y observe las colonias que han crecido.
8. Una vez recuperadas, se realiza un inóculo 2 Mac Farland en infusión cerebro corazón.
9. Incubar a 37° C por 24 horas.
10. Las cepas están listas para realizar la extracción de ADN.

Anexo 5

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico		Revisado/Autorizado: Lcda. Carmen Ullauri G. Mg.sc
			Fecha de Elaboración: Mayo - 2021
	PROTOCOLO PARA PRUEBA DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LA METICILINA		Versión: 001
			Páginas: 2
Área: Laboratorio			
Responsable: Estudiante			
Objetivo: Identificar fenotípicamente la resistencia mediada por <i>mecA</i> usando Cefoxitin			
Indicaciones: De acuerdo a las recomendaciones del (CLSI, 2020) Prueba para detectar resistencia a la meticilina mediada por <i>mecA</i> usando Cefoxitin			
Difusión de disco		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Medio		Agar Mueller Hinton	
Concentración antimicrobianos de		Disco de cefoxitina 30 µg	
Inóculo		Procedimiento estándar de difusión de disco con una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland.	
Condiciones de incubación		Ambiente de incubación con temperaturas de 35°C a 37°C	
Duración de la incubación		18–24 horas	
Resultados		≤ 21 mm = <i>mecA</i> positivo ≥ 22 mm = <i>mecA</i> negativo	
			
		Positivo	

Pruebas e informes adicionales		Negativo
Control de calidad Recomendaciones – rutina	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 – <i>mecA</i> positivo	
<p>Procedimiento :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. A partir de una placa (Agar Sangre) de cultivo de 18 a 24 horas. 2. Coger varias colonias con un asa estéril y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland, es decir 0.5 en suero fisiológico. 3. Agitar en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos. 4. Antes de que transcurran 10 minutos de haber ajustado el inóculo. 5. Introducir un escobillón dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. 6. Inocular las placas de Agar Mueller Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. 7. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos. 8. Colocar los discos con los dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar. 9. Colocar el disco de cefoxitina 30 µg. 10. Incubar las placas invertidas (agar en la parte superior), en un ambiente de incubación con temperaturas de 35°C a 37°C por 18 - 24 horas. 		

Nota: ATCC: Colección de cultivo tipo americano

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico	Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc
	PROTOCOLO PARA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD PARA LA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS	Fecha de Elaboración: Marzo - 2021
		Versión: 001
		Páginas: 2
Área: Laboratorio		
Responsable: Estudiante		
Objetivo: Identificar fenotípicamente la resistencia a macrólidos y lincosamidas.		
Indicaciones: De acuerdo a las recomendaciones del (CLSI, 2020) Prueba para detectar resistencia inducible a clindamicina en Staphylococcus spp		
Staphylococcus spp		
Difusión de disco (D – test)	ICR	
Medio	Agar Mueller-Hinton	
Concentración antimicrobianos	de Discos de eritromicina de 15 µg y clindamicina de 2 µg	
Inóculo	Procedimiento estándar de difusión de discos o área inoculada de la placa con una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland.	
Condiciones de incubación	Ambiente de incubación con temperaturas de 35°C ± 2°C	
Duración de la incubación	18–24 horas	
Resultados	Aplanamiento de la zona de inhibición adyacente al disco de eritromicina (denominada zona D) = ICR. Crecimiento turbio dentro de la zona de inhibición alrededor de la clindamicina = resistencia a la clindamicina, incluso si no hay una zona D aparente.	
		

Pruebas e informes adicionales	Informe de los aislamientos con ICR como “resistentes a la clindamicina”. El siguiente comentario puede incluirse con el informe: “Se presume que este aislado es resistente en base a la detección de ICR, según se determina mediante la prueba de clindamicina en combinación con eritromicina”.
Control de calidad Recomendaciones – rutina	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 para el control de calidad de rutina de los discos de eritromicina y clindamicina
<p>Procedimiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. A partir de una placa (Agar Sangre) de cultivo de 18 a 24 horas. 2. Coger varias colonias con un asa estéril y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland, es decir 0.5 en suero fisiológico. 3. Agitar en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos. 4. Antes de que transcurran 10 minutos de haber ajustado el inóculo. 5. Introducir un escobillón dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. 6. Inocular las placas de Agar Mueller Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. 7. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos. 8. Colocar los discos con los dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar. 9. Colocar los discos de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) respectivamente. 10. Incubar las placas invertidas (agar en la parte superior), en un ambiente de incubación con temperaturas de 35°C ± 2 °C por 18 - 24 horas. 	

Nota: ICR: Resistencia Inducible a Clindamicina; ATCC: Colección de cultivo tipo americano

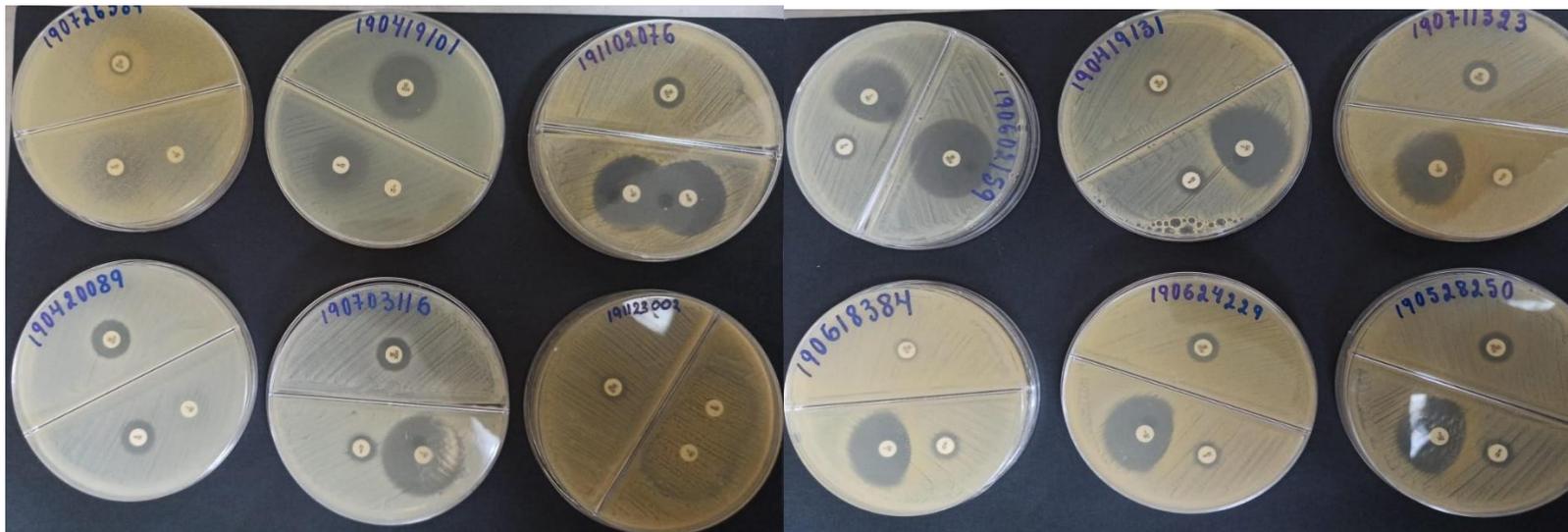
Anexo 6

Lectura e interpretación de resultados para pruebas de susceptibilidad

Codificación	Código	Bacteria aislada	Pruebas de identificación fenotípica	
1	190419101	S. aureus	FOX: 8 mm	DA: R E: 7 mm
2	190701271	S. aureus	FOX: 2 mm	DA: 12 mm E: 10 mm
3	190419131	S. aureus	FOX: 1 mm	D-test: +
4	190711323	S. aureus	FOX: 3 mm	D-test: +
5	191020175	S. aureus	FOX: 1 mm	DA: 11 mm E: 10 mm
6	191123002	S. aureus	FOX: R	DA: R E: R
7	190917300	S. aureus	FOX: 1 mm	DA: 10 mm E: 10 mm
8	190920199	S. aureus	FOX: 1 mm	DA: R E: R
9	190615089	S. aureus	FOX: 9 mm	DA: 11 mm E: 10 mm
10	190501053	S. aureus	FOX: 12 mm	DA: 12 mm E: 11 mm
11	190715199	S. aureus	FOX: 3 mm	DA: 11 mm E: 11 mm
13	190510208	S. aureus	FOX: 11 mm	DA: 11 mm E: 12 mm
14	190915225	S. aureus	FOX: 10 mm	DA: 12 mm E: 11 mm

15	190811113	S. aureus	FOX: 2 mm	D-test: +
16	191102076	S. aureus	FOX: 2 mm	DA: 10 mm E: 11 mm
17	190509409	S. aureus	FOX: 2 mm	DA: 9 mm E: 11 mm
18	191022291	S. aureus	FOX: 12 mm	D-test: +
19	190618384	S. aureus	FOX: 1 mm	D-test: +
20	190513277	S. aureus	FOX: R	DA: 15 mm E: 12 mm
21	190415225	S. aureus	FOX: 9 mm	DA: 11 mm E: 10 mm
22	190422291	S. aureus	FOX: 6 mm	DA: R E: R
23	190416272	S. aureus	FOX: 4 mm	D-test: +
24	190516275	S. aureus	FOX: 4 mm	D-test: +
25	190602159	S. aureus	FOX: 12 mm	D-test: +
26	190504144	S. aureus	FOX: 4 mm	DA: R E: 2 mm
27	190726389	S. aureus	FOX: 1 mm	DA: R E: R
29	190420089	S. aureus	FOX: 4 mm	DA: R E: 3 mm
30	190703116	S. aureus	FOX: 3 mm	DA: 11 mm E: 2 mm
31	191028063	S. aureus	FOX: 11 mm	DA: 10 mm E: 10 mm
32	ATCC	S. aureus	FOX: 11mm	DA: 14 mm

			E: 13mm
Tabla de Interpretación (CLSI, 2020)			
FOX/mecA	S/N = ≥ 22	R/P = ≤ 21	
E	S = ≥ 23	R = ≤ 13	I = 14-22
DA	S = ≥ 21	R = ≤ 14	I = 15-20



Anexo 7

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico	Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc
	PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO	Fecha de Elaboración: Mayo- 2021
		Versión: 001
		Páginas: 3
Área: Laboratorio		
Responsable: Estudiante		
Objetivo: Extraer el ADN de las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> recuperadas.		
Indicaciones: <p style="text-align: center;">Extracción de ADN bacteriano</p>		
Proteinasas K	Disolver 25 mg de proteinasas K liofilizada en 1,25 ml de agua libre de nucleasas y almacenarla a 4 °C.	
ARNasa A	Disolver 24 mg de ARNasa A liofilizada en 600 ml de agua libre de nucleasas y almacenarla a 4 °C.	
EA Buffer	Antes de iniciar el proceso de extracción, debe precalentar el EA Buffer a 60°.	
Lisozima	100 mg / ml	
Tampón de lisis para bacterias grampositivas	Tris-HCl 1M (pH 8.0) EDTA sódico 1M Tritón al 2% ® X-100	
Cálculos:		
Tris-HCl 1M (pH 8.0)		
$157,64 \text{ g} \longrightarrow 1\text{L} \longrightarrow 1\text{M} \qquad x = 15,76 \text{ g} / 100 \text{ ml}$ $x \qquad 100\text{ml}$		
EDTA sódico 1 M		

372,24 g → 1L → 1M x= 37,24 g/ 100 ml
 x 100 ml

Tritón al 2% ® X-100

2 g → 100 ml → 2%

Procedimiento:

Reactivos:

- Proteinasa K, liofilizada
- ARNasa A, liofilizada
- Búfer GB
- Búfer WA1
- Búfer W2
- Búfer EA
- Tris-HCl
- EDTA sódico
- Tritón X-100
- Etanol absoluto
- Lisozima

Materiales:

- Microcentrífuga
- Baño maria
- Puntas con filtro y sin filtro
- Mezclador Vortex
- Columna de encuadernación
- Tubos de recogida (para filtración)
- Tubos de 1,5 ml o 2 ml
- Gradillas
- Pipetas

1. Recoger las células bacterianas en un tubo eppendorf y centrifugar a 8.000 rpm durante 5 min. Desechar el sobrenadante (medio) con una pipeta.
2. Agregar 180 µl de tampón de lisis para bacterias grampositivas al sedimento celular recolectado y resuspender completamente usando un mezclador vórtex o pipeteando.
3. Añadir 20 µl de lisozima y 10 µl de ARNasa A a cada tubo, mezclar bien con un mezclador vórtex.
4. Incubar los tubos a 37 ° C durante 30 min.
5. Añadir 20 µl de proteinasa K a cada tubo.
6. Añadir 200 µl de tampón GB a cada tubo y mezcle bien con un mezclador vórtex.
7. Incubar los tubos a 60 ° C durante 30 min.
8. Añadir 400 µl de etanol absoluto y mezcle bien con la pipeta.

9. Transferir con cuidado el lisado al depósito superior del tubo de la columna de unión (ajuste en un tubo de recolección) sin mojar el borde.
10. Cerrar el tubo y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
11. Desechar la solución del tubo de recolección y reutilice el tubo de recolección.
12. Añadir 500 µl de tampón WA1 sin mojar el borde, cerrar el tubo y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
13. Desechar la solución del tubo de recolección y reutilice el tubo de recolección.
14. Añadir 500 µl de tampón W2 sin mojar el borde, cierre el tubo y centrifugue a 8.000 rpm durante 1 min.
15. Desechar la solución del tubo de recolección y reutilice el tubo de recolección.
16. Centrifugar una vez más a 13.000 rpm durante 1 minuto para eliminar el etanol por completo y compruebe que no haya gotas adheridas al fondo del tubo de la columna de unión.
17. Transferir el tubo de la columna de unión a un tubo nuevo de 1,5 ml para elución y agregar 50µl de tampón EA (o agua libre de nucleasas) al tubo de la columna de unión y espere al menos 1 minuto a temperatura ambiente (15 - 25 °C) hasta que EA se absorba completamente en la fibra de vidrio del tubo de la columna de unión.
18. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto para eluir.
19. Almacenar el ADN a 4 ° C.
20. Se procedió a cuantificar y evaluar la pureza de ADN, se lo realizo en el equipo Espectrofotómetros NanoDrop™. Observando que todas las extracciones si contenían ADN.

Tomado de: AccuPrep ® Kit de extracción de ADN genómico

Anexo N 8

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico		Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc		
			Fecha de Elaboración: Mayo - 2021		
	PROTOCOLO PARA PCR CONVENCIONAL		Versión: 001		
			Páginas: 6		
Área: Laboratorio					
Responsable: Estudiante					
Objetivo: Realizar PCR convencional a cepas <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM)					
Indicaciones: <p style="text-align: center;">PCR convencional a cepas <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM)</p>					
Primers Liofilizados reconstituir: 250 µl de Agua destilada ultrapura para un volumen de 100 pmol/µl					
Oligonucleótido	Secuencia	bp	GC%	Vol. 100 pmol/µl	
<i>mecA_fw</i>	5' – GTAGAAATGACTGAACGTCCGAT – 3'	310	43	250	
<i>mecA_rev</i>	5' – CCAATTCCACATTGTTTCGGTCT – 3'		43	250	
<i>mecC1_fw</i>	5' – TGAACGAAGCAACAGTACACC – 3'	238	48	250	
<i>mecC1_rev</i>	5' – GATCTTTTCCGTTTTTCAGCCT – 3'		41	250	
<i>mecC2_fw</i>	5' – CCCGAATTATTGGTAAATCTGGC – 3'	163	43	250	
<i>mecC2_rev</i>	5' – GCATTATAGCTGGCCATCCC – 3'		55	250	

<i>ermA_fw</i>	5' – TATCTTATCGTTGACAAGGGATT – 3'	139	35	250
<i>ermA_rev</i>	5' – CTACACTTGGCTTAGGATGAAA – 3'		41	250
<i>ermB_fw</i>	5' – CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT – 3'	142	33	250
<i>ermB_rev</i>	5' – GTTACTCTTGGTTTAGCATGAAA – 3'		33	250
<i>ermC_fw</i>	5' – CTTGTTGATCACGATAATTTCC – 3'	190	36	250
<i>ermC_rev</i>	5' – ATCTTTTAGCAAACCCGTATTC – 3'		36	250

PCR Master Mix

ADN Polimerasa - dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - tampón de reacción con 1,5 mM de MgCl₂ - tinte de seguimiento y estabilizador químico patentado.

Almacenar a -20 ° C

Componentes	20 µl volumen de reacción
Mezcla Master Mix	10 µl
ADN bacteriano	1 µl - 5 µl
Forward Primer	0.5 µl - 2 µl
Reverse Primer	0.5 µl - 2 µl
Agua Ultrapura	Variable

Procedimientos:**Reactivos:**

- AccuPower® PCR Master Mix
- Forward Primers
- Reverse Primers
- Agua Ultrapura

Equipos y Materiales:

- Microcentrífuga
- Termociclador
- Pipetas
- Puntas con filtro

- Tubos de 0,5 - 1,5 o 2 ml

- Gradillas

PCR para la detección del gen *mecA*

11. Reconstituir los primers forward y reverse del gen *mecA*, colocando 250 μ l de agua ultrapura en cada uno de ellos.
12. Centrifugar por 15 segundos
13. Rotular dos tubos para realizar la dilución de los primers *mecA* (*mecA* reverse y *mecA* forward)
14. Diluir los primers con 90 μ l de agua ultrapura y 10 μ l de primer, cada uno de ellos
15. Rotular un tubo para la mezcla de trabajo (mezcla PCR gen *mecA*)
16. Preparar la mezcla de trabajo (tomando en cuenta el número total de muestras más un control negativo):

Componentes	20 μ l volumen de reacción	Volumen final por 34 muestras
Agua ultrapura	8	272
Master mix	10	340
Forward Primer	0,5	17
Reverse Primer	0,5	17

17. Centrifugar por 15 segundos
18. Dependiendo del número de muestras rotular tubos de 0,5 ml (en este caso 34 tubos)
19. Colocar en cada tubo rotulado 19 μ l de la mezcla de trabajo
20. Colocar 1 μ l de la muestra de ADN bacteriano respectivamente en cada tubo rotulado
21. Llevar al Termociclador con las condiciones necesarias:

PCR	Temperatura	Hora	Ciclos
Predesnaturalización	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95	45 segundos	35
Alineamiento	50	45 segundos	
Extensión	72	1 minutos	
Extensión final	72	2 minutos	1

22. Almacenar las muestras a -20°C .

PCR para la detección del gen *mecC1* – *mecC2*

1. Reconstituir los primers forward y reverse de los genes *mecC1* y *mecC2*, colocando 250 μl de agua ultrapura en cada uno de ellos
2. Centrifugar por 15 segundos
3. Rotular cuatro tubos para realizar la dilución de los primers *mecC1* y *mecC2* (*mecC1* reverse - *mecC1* forward y *mecC2* reverse y *mecC2* forward)
4. Diluir los primers con 90 μl de agua ultrapura y 10 μl de primer, cada uno de ellos
5. Rotular un tubo para la mezcla de trabajo (mezcla PCR gen *mecC1* y *mecC2*)
6. Preparar la mezcla de trabajo (tomando en cuenta el número total de muestras más un control negativo):

Componentes	20 μl volumen de reacción	Volumen final por 34 muestras
Agua ultrapura	7	238
Master mix	10	340
Forward Primer <i>mecC1</i>	0,5	17
Reverse Primer <i>mecC1</i>	0,5	17
Forward Primer <i>mecC2</i>	0,5	17
Reverse Primer <i>mecC2</i>	0,5	17

7. Centrifugar por 15 segundos
8. Dependiendo del número de muestras rotular tubos de 0,5 ml (en este caso 34 tubos)
9. Colocar en cada tubo rotulado 19 μl de la mezcla de trabajo
10. Colocar 1 μl de la muestra de ADN bacteriano respectivamente en cada tubo rotulado
11. Llevar al Termociclador con las condiciones necesarias:

PCR	Temperatura	Hora	Ciclos
Predesnaturalización	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95	45 segundos	35
Alineamiento	50	45 segundos	

Extensión	72	1 minutos	
Extensión final	72	2 minutos	1

12. Almacenar las muestras a -20°C.

PCR para la detección del gen *erm A – erm B – erm C*

1. Reconstituir los primers forward y reverse de los genes *erm A – erm B – erm C*, colocando 250 µl de agua ultrapura en cada uno de ellos
2. Centrifugar por 15 segundos
3. Rotular seis tubos para realizar la dilución de los primers *erm A – erm B – erm C* (*erm A* reverse - *erm A* forward - *erm B* reverse - *erm B* forward - *erm C* reverse - *erm C* forward)
4. Diluir los primers con 90 µl de agua ultrapura y 10 µl de primer, cada uno de ellos
5. Rotular un tubo para la mezcla de trabajo (mezcla PCR gen *erm A – erm B – erm C*)
6. Preparar la mezcla de trabajo (tomando en cuenta el número total de muestras más un control negativo):

Componentes	20 µl volumen de reacción	Volumen final por 34 muestras
Agua ultrapura	6	204
Master mix	10	340
Forward Primer <i>erm A</i>	0,5	17
Reverse Primer <i>erm A</i>	0,5	17
Forward Primer <i>erm B</i>	0,5	17
Reverse Primer <i>erm B</i>	0,5	17
Forward Primer <i>erm C</i>	0,5	17
Reverse Primer <i>erm C</i>	0,5	17

7. Centrifugar por 15 segundos
8. Dependiendo del número de muestras rotular tubos de 0,5 ml (en este caso 34 tubos)
9. Colocar en cada tubo rotulado 19 µl de la mezcla de trabajo
10. Colocar 1 µl de la muestra de ADN bacteriano respectivamente en cada tubo rotulado

11. Llevar al Termociclador con las condiciones necesarias:

PCR	Temperatura	Hora	Ciclos
Predesnaturalización	96	5 minutos	1
Desnaturalización	95	20 segundos	35
Alineamiento	55	30 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	1

12. Almacenar las muestras a -20°C

Nota: AccuPower PCR PreMix de Bioneer – Primers Humanizing Genomics macrogen

Anexo 9

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad De La Salud Humana Carrera De Laboratorio Clínico		Revisado/Autorizado: Lic. Carmen Ullauri G. Mg. Sc		
			Fecha de Elaboración: Mayo - 2021		
	PROTOCOLO PARA ELECTROFORESIS		Versión: 001 Páginas: 2		
Área: Laboratorio					
Responsable: Estudiante					
Objetivo: Realizar electroforesis en gel de agarosa para la identificación de genes en cepas <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM)					
Indicaciones: <p style="text-align: center;">Electroforesis en gel de agarosa</p>					
Tampón de electroforesis TBE 5X	Contenido: Base trizma 54g/l Ácido bórico 27.5 g/l 0.5M EDTA (pH8.0) 20 ml/l Diluir 0.5X: 100 ml TBE con 900 ml agua destilada				
Gel de agarosa	Concentración de agarosa	Rango de resolución	Agarosa para 50 ml		
	0.8%	500 bp – 12 kb	0.40 g		
	1.0%	400 bp – 10 kb	0.50 g		
	1.5%	200 bp – 4 kb	0.75 g		
	2.0%	100 kb – 2 kb	1.00 g		
	4.0%	10 bp – 400 bp	2.00 g		
Procedimientos: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Reactivos: - Tampón de electroforesis TBE 5X </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Equipos y Materiales: - Microondas o placa calefactora </td> </tr> </table>				Reactivos: - Tampón de electroforesis TBE 5X	Equipos y Materiales: - Microondas o placa calefactora
Reactivos: - Tampón de electroforesis TBE 5X	Equipos y Materiales: - Microondas o placa calefactora				

- | | |
|---|-----------------------------|
| - Agarosa | - Transiluminador de luz UV |
| - Solución de tinción de ácido nucleico GreenStar | - Computadora |
| - Agua destilada | - Balanza |
| - Marcador de peso molecular 100 bp | - Puntas con filtro |
| | - Matraces |
| | - Gradillas |
| | - Probetas |
| | - Equipo de electroforesis |

Preparación del gel de agarosa

13. Se vierten en un matraz 100 ml del tampón de electroforesis TBE y 1.50 g de agarosa (1.5 %).
14. Se funde la solución de agarosa en un microondas o placa calefactora.
15. Se deja enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50° C aproximadamente.
16. Se prepara el equipo de electroforesis, colocando el soporte, el peine que servirá para formar los pocillos del gel
17. Una vez que la solución de agarosa ha alcanzado los 50°C, se le añaden 500 µl de solución de tinción de ácido nucleico GreenStar y se mezcla bien.
18. Se vierte la solución de agarosa en el soporte y se deja polimerizar durante unos 15 minutos.

Electroforesis

(**Genes: *mecA* – *mecC1* – *mecC2* - *erm A* – *erm B* – *erm C***)

13. Se quitan los peines y el soporte del gel y se lo coloca en la cubeta de electroforesis. Los pocillos deben de estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
14. Se añade tampón de electroforesis TBE, de forma que cubra bien el gel de agarosa.
15. En los pocillos se colocan:
 - Marcador de peso molecular 100bp: 4 µl
 - Muestras: 4 µl
 - Control negativo: 4 µl

16. Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Se comprueba que está bien conectada.
17. Se programa la fuente a 120 voltios y 90 minutos, se comienza a correr la electroforesis.
18. Una vez acabada la electroforesis se visualiza mediante el equipo transiluminador Blue Light Base y se realiza una fotografía de la imagen.

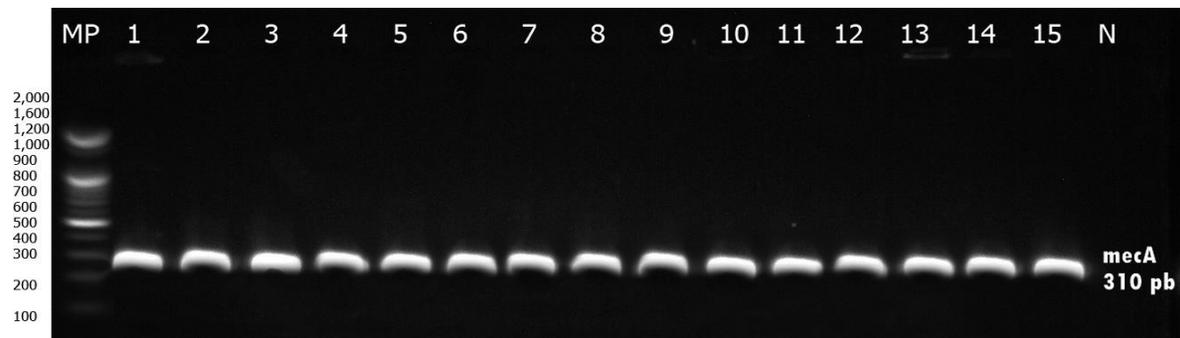
Anexo 10

Lectura e interpretación de resultados

Ubicación en Gel de electroforesis

7- Junio-2021																
<i>mecA</i>																
MP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	N
	<i>mecA</i>															

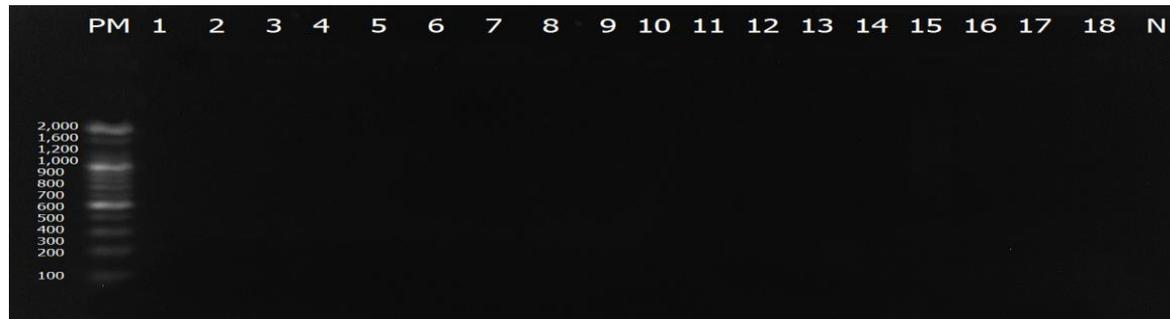
7- Junio-2021																		
<i>mecA</i>																		
MP	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	P	N
	<i>mecA</i>																	

Resultados de PCR para resistencia a meticilina. Gen *mecA*

8- Junio-2021																
<i>mecC1 – mecC2</i>																
MP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	N

8- Junio-2021																		
<i>mecC1 – mecC2</i>																		
MP	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	N

Resultados de PCR para resistencia a meticilina. Gen *mecC1 – mecC2*



9- Junio-2021																			
<i>ermA – erm B – erm C</i>																			
MP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	N
	<i>erm C</i>	<i>erm B</i>																	

Anexo 11

Certificado de procesamiento de muestras



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Facultad
de la Salud
Humana

En mi calidad como técnico docente y responsable de Laboratorio de Biología Molecular me permito certificar que la estudiante egresada de la carrera de Laboratorio Clínico, Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz con CI. 1105097669 con tema de tesis “CARACTERIZACION MOLECULAR DE STAPHYLOCOCCUS UREUS METICILINO RESISTENTE AISLADO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS” procesó 30 muestras en el periodo comprendido del 21 de abril hasta 22 junio del presente año.

Faculto a la interesada hacer uso de la presente certificación como a bien tuviere. Lo certifico en honor a la verdad.

Loja, 03 de agosto de 2021

NATHALY
KASSANDRA
MOSCOSO
MORENO

Digitally signed by NATHALY KASSANDRA
MOSCOSO MORENO
DN: cn=NATHALY KASSANDRA MOSCOSO
MOSCOSO MORENO, o=INSTITUTO DE CERTIFICACION DE
INFORMACION
Reason: I agree to specified parts of this
document
Location:
Date: 2021.08.03 17:45:25.00

Lic. Nathaly Moscoso Moreno, Mgs.

TÉCNICO DOCENTE Y RESPONSABLE DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Anexo 12

Evidencias fotográficas

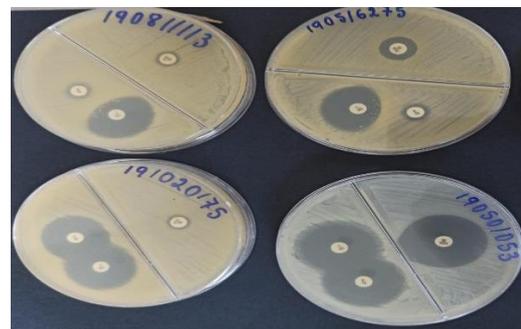
Elaboración de medios de cultivo



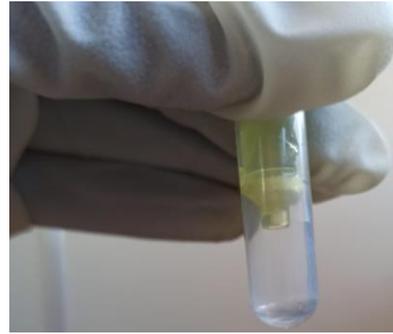
Recuperación de cepas



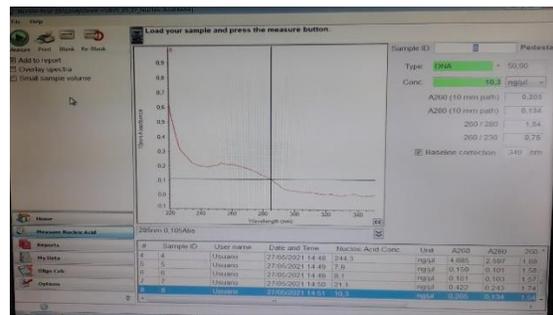
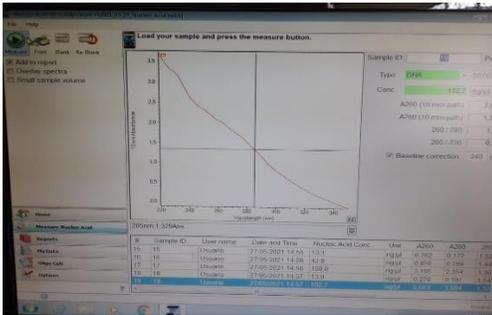
Pruebas fenotípicas



Extracción de ADN bacteriano



Cuantificación y evaluación de la pureza de ADN (Espectrofotómetro NanoDrop™)



PCR convencional y electroforesis



Anexo 13

Certificado de inglés

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que ha realizado la traducción de español a inglés del resumen derivado de la tesis: **“Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de pacientes hospitalizados”**.

De la autoría de la Señorita: **Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz**, portadora de la cédula de identidad número 1105097669, egresada de la carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

Es todo en cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando al interesado hacer uso del presente en lo que estime conveniente.

Loja, 05 de noviembre del 2021



Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

Anexo 14

Certificado de similitud



PLAGIARISM SCAN REPORT



Content Checked For Plagiarism

2. TESIS FINAL DANIELA RUIZ.docx

Matched Source

No plagiarism found