



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**“FRECUENCIA DEL GEN *mecA* EN AISLAMIENOS DE *Staphylococcus aureus*,
PROVENIENTES DE LOS DIFERENTES SERVICIOS DEL HOSPITAL
REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. ANTHONY MARTÍN BUSTAMANTE CABRERA

ASESOR:

DR. MBLGO. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT ©
ANTHONY MARTÍN BUSTAMANTE CABRERA
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Bustamante A. 2022. **Frecuencia del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus aureus*, provenientes de los diferentes servicios del Hospital Regional Docente de Cajamarca** /Anthony Martín Bustamante Cabrera.

Asesor: Dr. Mglgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo
– UNC 2022

**FRECUENCIA DEL GEN *mecA* EN AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus*,
PROVENIENTES DE LOS DIFERENTES SERVICIOS DEL HOSPITAL
REGIONALDOCENTE DE CAJAMARCA.**

Autor: Bach. Anthony Martín Bustamante Cabrera.

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del título profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca por los siguientes jurados:

JURADO EVALUADOR



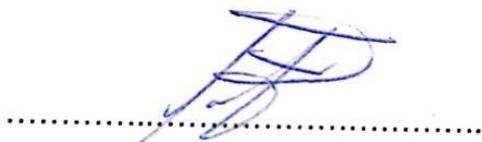
PRESIDENTE

M.Cs. Rodolfo Raul Orejuela Chirinos



SECRETARIO

M.Cs. John Víctor López Orbegoso



VOCAL

Dr. José Armando Padilla Sobrados

Cajamarca, 2022 Perú

Anexo 1

Universidad Nacional de Cajamarca
Facultad de Ciencias de la Salud

Acta de sustentación de tesis virtual, basado en el Reglamento de sustentación de tesis virtuales Resolución 944-2020 artículo 8

Siendo las 6:05 pm del día 22 de marzo del año 2022 se procedió a iniciar la sustentación virtual de la tesis titulada: "Frecuencia del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus aureus*, provenientes de los diferentes servicios del Hospital Regional Docente de Cajamarca"

presentada por el(la) Bachiller en: Ciencias Biológicas

Nombres y Apellidos: Anthony Martín Bustamante Cabrera

El Jurado Evaluador está integrado por:

Presidente : M. Cs. Rodolfo Raul Orejuela Chirinos

Secretario : M. Cs. John Victor López Orbegoso

Vocal : Dr. José Armando Padilla Sobrados

Asesor : Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Terminado el tiempo de sustentación estipulado en el Reglamento.

El tesista ha obtenido el siguiente calificativo: letras dieciséis números (16).

Siendo las 7:11 pm del día 22 de marzo del año 2022 se dio por concluido el proceso de Sustentación Virtual de Tesis.

| | |
|---|---|
|  Presidente Apellidos y nombres: <u>Orejuela Chirinos, Rodolfo Raul</u> |  Secretario Apellidos y nombres: <u>López Orbegoso, John Victor</u> |
|  Vocal Apellidos y nombres: <u>Padilla Sobrados, José Armando</u> |  Asesor Apellidos y nombres: <u>Rivera Jacinto, Marco Antonio</u> |
|  Tesista Apellidos y nombres: <u>Bustamante Cabrera, Anthony Martín</u> | |

A:

Mis amados Padres, Héctor Bustamante Vásquez y Medalit Cabrera Molocho, por enseñarme a caminar y no ir tan apresurado, por enseñarme que un abrazo es más valioso que un buen regalo, por darme la vida y seguir dándomela, por su esfuerzo y confianza puesta en mí para conseguir un primer objetivo en este camino de mi formación personal y profesional

“Antes de hablar, infórmate”

Eclesiástico capítulo 18 versículo 19, La Biblia.

Agradecimiento

Al Dr. MBlgo. Marco Antonio Rivera Jacinto, por aceptar ser mi asesor y contribuir con su experiencia y conocimiento en mi formación académica y personal.

Tabla de Contenido

| | |
|--|------|
| Título | xii |
| Resumen | xiii |
| Abstract..... | xiv |
| CAPÍTULO I..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO II..... | 3 |
| MARCO TEÓRICO | 3 |
| 2.1. Antecedentes de la Investigación | 3 |
| 2.2. Bases Teóricas (Marco Teórico y Conceptual) | 9 |
| 2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 9 |
| 2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM) | 11 |
| 2.2.3. Resistencia bacteriana | 13 |
| 2.2.4. Mecanismos de resistencia | 15 |
| 2.2.4.1. Inactivación por enzimas | 16 |
| 2.2.4.2. Modificaciones bacterianas para evitar el contacto del antibiótico al punto diana | 16 |
| 2.2.4.3. Modificación del punto diana..... | 17 |
| 2.2.5. Método de tamizaje con los discos de oxacilina y cefoxitina para la detección de resistencia en <i>S. aureus</i> | 17 |
| CAPÍTULO III | 20 |
| DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS | 20 |
| 3.1. Material de estudio | 20 |
| 3.2. Recolección de los aislamientos | 20 |
| 3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos..... | 21 |
| 3.3.1. Descripción clínica de los aislamientos..... | 21 |
| 3.3.2. Reactivación de los aislamientos de <i>S. aureus</i> | 21 |
| 3.3.4. Extracción de ADN por shock térmico | 22 |
| 3.3.5. Evaluación de la calidad del ADN extraído..... | 22 |
| 3.3.6. PCR (Cepa de referencia de <i>S. aureus</i> : ATCC 29213 y ATCC 33592) | 23 |

| | |
|--|----|
| 3.3.7. Electroforesis en gel de agarosa..... | 24 |
| 3.4. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos..... | 25 |
| CAPÍTULO IV | 26 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 4.1 Resultados..... | 26 |
| 4.2 Discusión | 32 |
| CAPÍTULO V | 39 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 39 |
| 5.1. Conclusiones..... | 39 |
| 5.2. Recomendaciones | 40 |
| LISTA DE REFERENCIAS..... | 41 |
| APÉNDICES | 47 |
| Apéndice 1. Descripción clínica de los aislamientos | 47 |
| Apéndice 2. Reactivación de los aislamientos de <i>S. aureus</i> | 48 |
| Apéndice 3. Evaluación de la calidad del ADN extraído..... | 49 |
| Apéndice 4. Análisis estadístico..... | 52 |

Lista de abreviaciones

HRC: Hospital Regional Docente de Cajamarca

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

PVL: Leucocidina de Pantón Valentine

CoNS: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* coagulasa negativo

CLSI: Estándares Clínicos y de Laboratorio

SCCmec: Cassette cromosómico estafilocócico

UCIs: Unidad de cuidados intermedios e intensivos

EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos

PBP2a: Proteína de fijación de la penicilina 2a

Glosario

mecA

Gen que codifica para la proteína PBP2a la cual sustituye a las proteínas PBP de la pared bacteriana otorgándole resistencia a la meticilina y a todos los demás antibióticos betalactámicos (6).

Staphylococcus

Género de bacterias Gram positivas con forma esférica (cocos), con diámetros que van de 0.5 a 1.5 μm ; no tienen movilidad, no forman esporas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una capa de polisacárido (14).

Shock térmico

Procedimiento físico que ayuda al rompimiento de la Pared Bacteriana para liberar la molécula de ADN de interés (43).

**FRECUENCIA DEL GEN *mecA* EN AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus*,
PROVENIENTES DE LOS DIFERENTES SERVICIOS DEL HOSPITAL
REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA**

Resumen

En este estudio se determinó la frecuencia del gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en los diferentes servicios del Hospital Regional Docente de Cajamarca (HRC). La presencia del gen *mecA* codifica para la proteína PBP2a la cual sustituye a las proteínas PBP de la pared bacteriana otorgándole resistencia a la meticilina y a todos los demás antibióticos betalactámicos al tener baja afinidad por ellos. La colección de aislamientos se realizó por un periodo de 6 meses en los diferentes servicios del HRC obteniéndose un total de 71 aislamientos que fueron confirmados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca; también se colectó información clínica de los pacientes en una ficha de recolección de datos. La presencia del gen *mecA* en los aislamientos de *S. aureus* se estableció preliminarmente mediante una prueba de tamizaje con discos antimicrobianos de Oxacilina (1 ug) y cefoxitina (30 ug), siguiendo procedimientos microbiológicos estándar, y se confirmó mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos. Por último, se realizó una electroforesis en gel para la verificación de la presencia del gen de interés. Los resultados obtenidos muestran que 40/71 (56 %) aislamientos fueron portadoras del gen *mecA*, el cual sería responsable de la resistencia a los β lactámicos. 61 % de aislamientos (19/31) de los servicios de UCIs y 67 % (29/43) de aislamientos de muestras tipo secreción bronquial fueron las que presentaron las mayores frecuencias de *S. aureus* con el gen *mecA*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *mecA*, resistencia a meticilina, farmacorresistencia.

Abstract

In this study, the frequency of the *mecA* gene in *S. aureus* isolates from patients treated in the different services of the Cajamarca Regional Teaching Hospital (HRC) was determined. The presence of the *mecA* gene codes for the PBP2a protein, which replaces the PBP proteins of the bacterial wall, giving it resistance to methicillin and the rest of the beta-lactam antibiotics as it has low affinity for them. The collection of isolates was carried out for a period of 6 months in the different services of the HRC, obtaining a total of 71 isolates that were confirmed in the Microbiology laboratory of the National University of Cajamarca; clinical information from the patients was also collected on a data collection form. The presence of the *mecA* gene in the *S. aureus* isolates was preliminarily established by a screening test with Oxacillin (1 ug) and cefoxitin (30 ug) antimicrobial discs, following standard microbiological procedures, and confirmed by Chain Reaction. Polymerase (PCR) using specific oligonucleotides. Finally, gel electrophoresis was performed to verify the presence of the gene of interest. The results obtained show that 40/71 (56%) of the isolates carried the *mecA* gene, which would be responsible for resistance to β -lactams. 61% of the isolates (19/31) from the ICU services and 67% (29/43) of the isolates from the bronchial secretion samples were those that presented the highest frequencies of *S. aureus* with the *mecA* gene.

Key words: *S. aureus*, *mecA*, methicillin resistance, drug resistance.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena oportunista que con frecuencia se presenta en el cuerpo humano de forma asintomática, es la principal especie de su género, responsable de infecciones diversas, tanto de origen comunitario como hospitalario y está ampliamente diseminado a nivel mundial (1). Esta bacteria tiene la capacidad de adquirir un gen que le otorga resistencia a meticilina (gen *mecA*) y a todos los demás antibióticos betalactámicos. Esto representa un problema de salud pública que incrementa los costos hospitalarios de los pacientes, debido a que prolonga las estadías hospitalarias, incrementa en el uso de antibiótico y aumenta la tasa de mortalidad.

Estados Unidos de América, Japón y algunas regiones de Europa y de Latinoamérica reportan hasta un 40 % de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), lo cual habla del importante problema que se tiene a nivel mundial, debido a que no habría tratamiento efectivo frente a estas bacterias, ocasionando infecciones con riesgos muy altos en la salud pública (2). Frente a este problema, la principal tarea para un tratamiento clínico exitoso, depende del conocimiento de las características y perfil de susceptibilidad a antibióticos que tienen estas bacterias, tanto si provienen del ámbito hospitalario o comunitarios. Con el presente trabajo de investigación se ha generado parte de este conocimiento, ya que se determinó la frecuencia del gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes de los diferentes servicios del Hospital Regional Docente de Cajamarca, evidenciando que la resistencia de esta bacteria está camino a convertirse en un relevante

problema de salud pública en nuestra región, razón suficiente también para comunicar a la comunidad científica.

El mecanismo molecular de resistencia a la meticilina se da por diferentes genes y eventos metabólicos, entre ellos la presencia del gen *mecA*, originando resistencia que complica muchas veces las infecciones humanas principalmente aquellas generadas a nivel hospitalario. En este sentido, en esta investigación se abordó el estudio de este mecanismo de resistencia mediante la detección molecular del gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en el HRC.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

Tamariz J. (2010) determinó la frecuencia de cepas SARM adquiridos en la comunidad, en hospitales de Lima- Perú. La resistencia a meticilina se determinó por el método Oxacillin Agar Screen. El origen de cada aislamiento fue determinado mediante los criterios de los CDC; la leucocidina de Pantón Valentine (PVL) fue identificada por métodos moleculares. Se aislaron 276 cepas de *S. aureus*, 160 fueron resistentes a meticilina (58%), 9 de ellas fueron identificadas como adquiridas en la comunidad (5,6%), 129 a nivel hospitalario (80,6%) y 22 (13,8%) no se pudieron determinar por no cumplir con los requisitos necesarios (1).

Cáceres M. (2011) determinó la frecuencia de portadores nasales de SARM y el patrón de resistencia antimicrobiana de esos aislamientos obtenidos de 569 trabajadores de la salud de cuatro hospitales de Nicaragua. En este trabajo de investigación la identificación de *S. aureus* se realizó por métodos estándar, del mismo modo, para determinar el patrón de resistencia antimicrobiana se realizó mediante difusión en disco y para demostrar la presencia del gen *mecA* en aislamientos SARM, se utilizó la técnica de PCR. La frecuencia de portadores nasales de SARM osciló entre 6,7% y 11,6% en los distintos hospitales. El perfil de resistencia de SARM fue similar en los cuatro hospitales y todos los aislamientos fueron sensibles a vancomicina. Del total de SARM aisladas, 15% fueron multirresistentes (3).

Miranda M. (2011) evaluó la resistencia antimicrobiana del *S. aureus* en México, en aislamientos de ámbito hospitalario y comunitario, haciendo énfasis en que se debe realizar un adecuado uso de antibióticos para disminuir la resistencia de *S. aureus*. Los resultados de este trabajo indican que en los años 90 aparecieron los primeros casos en pacientes sin antecedentes de hospitalización portadores de SARM, por lo que estas cepas recibieron la denominación de cepas de adquisición en la comunidad. Debido al comportamiento descrito en los hospitales (incremento de resistencia de 2 a 64% en 30 años) y una elevada frecuencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (50-85%)(4).

Dorante y colaboradores (2013) evaluaron la frecuencia de cepas SARM, la resistencia a otros antibióticos y los factores de riesgo asociados a infección por SARM, en pacientes que asisten al laboratorio de microbiología de un hospital. El estudio comprendió 117 cultivos positivos de *S. aureus*, en quienes se determinó su resistencia frente a antimicrobianos mediante el método de Kirby-Bauer. La frecuencia de SARM fue de 24,8%, principalmente en aislamientos provenientes de infecciones de piel y tejidos blandos (65,52%). La resistencia frente a otras familias de antibióticos como eritromicina y fluoroquinolonas fue de 48,28%, y 31,03% respectivamente. Para complementar aún más el trabajo de investigación, este incluyó variables como la edad, el sexo y el tratamiento previo con antibióticos (1er grupo) las cuales no mostraron ser factores de riesgo para adquirir infección por SARM ($p>0,05$); sin embargo, la presencia de enfermedades pre-existentes (2do grupo), parece ser de alto riesgo para adquirir infección por SARM ($p<0,05$) (5).

Abente y colaboradores (2016) determinaron la frecuencia de SARM y del factor de virulencia PVL, así como el perfil de resistencia antimicrobiana acompañante a la meticilino resistencia en *S. aureus* aislados de infecciones de piel y partes blandas de pacientes ambulatorios de dos laboratorios de Asunción, Paraguay, entre octubre de 2012 a febrero de 2014. La identificación bacteriana se realizó mediante técnicas microbiológicas estándares y la susceptibilidad antimicrobiana por la prueba de difusión en disco. El gen *mecA* y PVL fueron detectados por la técnica de PCR. De los 70 aislados de *S. aureus* estudiados, el 54,3% (38/70) fue SARM tanto por método fenotípico como molecular. La frecuencia de PVL fue de 15,7% (11/70), siendo mayor en los SARM 21% (8/38) frente al 9,4% (3/32) de aislados no SARM. El 2,6% de los SARM presentó resistencia a ciprofloxacina, no se observó multirresistencia en ningún aislado. Se encontró alta frecuencia de SARM comparado con reportes previos en Paraguay. Este trabajo de investigación hace mucho énfasis en fortalecer estrategias de vigilancia, prevención y control de la resistencia bacteriana en ambientes hospitalarios y de la comunidad (6).

Panda y colaboradores (2016) compararon la eficacia de cuatro métodos fenotípicos convencionales para la detección de SARM, con los primers específicos para el gen *mecA*. Los aislamientos se realizaron de orina, pus, hisopos con muestra de heridas, fluidos corporales, etc. y se identificaron como *S. aureus* según procedimientos estándar. La resistencia a la meticilina se determinó en 200 aislamientos de *S. aureus* mediante difusión con disco de oxacilina, difusión con disco de ceftioxitina, agar de detección de resistencia a oxacilina y E-testen dando como resultado 53 (26,5%), 60 (30%), 59 (29,5%) y 61 (30,5%) aislamientos resistentes respectivamente. Para la detección del gen *mecA* se

realizó una PCR donde 62 (31%) de 200 aislamientos de *S. aureus* fueron positivos para el gen (7).

Ahmed y colaboradores (2017) determinaron la frecuencia de SARM aislado de personal de atención, de pacientes y del ambiente, en una clínica dental en Egipto. Se recolectaron 1300 muestras de seis salas diferentes, incluyendo muestras de superficies ambientales, muestras de manos y narinas. Según las propiedades bioquímicas, 112 aislamientos (8,6%) del total de muestras recolectadas fueron *S. aureus*. El cribado de cepas resistentes a la meticilina se realizó mediante el método de difusión en disco utilizando oxacilina (1 µg) y cefoxitina (30 µg) y posteriormente se verificó mediante PCR dirigida a los genes *mecA* y *mecC*. Entre los aislamientos de *S. aureus*, el 21,4% (24 / 112) fueron resistentes a ambos antibióticos, cuatro aislamientos mostraron un perfil sensible a oxacilina, pero resistente a cefoxitina, mientras que seis aislamientos eran intermedios con oxacilina, pero resistentes a la cefoxitina. Los 34 aislamientos fueron positivos para el gen *mecA*, mientras que *mecC* no fue identificado por la PCR, lo que les permitió establecer una prevalencia de SARM del 30,4% (34/112) entre todos los aislados de *S. aureus* recuperados (8).

Rocchetti y colaboradores (2018) evaluaron la resistencia a oxacilina codificada por el gen *mecA* en *S. aureus* y *Staphylococcus aureus* coagulasa negativo (CoNS) mediante una PCR múltiple a partir de 371 hemocultivos analizados, prueba en la que se incluyó la evaluación de los genes 16s rRNA y *Coa* para la diferenciación de especie de *Staphylococcus*. La identificación fenotípica determinó que 85 (23,0%) aislamientos eran *S. aureus* y 286 (77,0%) eran CoNS. Para detectar la resistencia a oxacilina se utilizó la

prueba de difusión con disco de oxacilina que reveló resistencia a oxacilina en 43 (50,6%) de los aislamientos de 85 *S. aureus* y en 236 (82,5%) de CoNS. Los resultados mostraron un 100% de concordancia entre la identificación fenotípica y la PCR multiplex (9).

Cikman y colaboradores (2019) tuvieron como objetivo investigar los genes *mecC* y *mecA* en SARM aisladas de diferentes regiones geográficas de Turquía. La muestra del estudio consistió en 494 aislados de SARM provenientes de muestras clínicas de diferentes hospitales de siete regiones geográficas entre 2013 y 2016. Para determinar la resistencia a meticilina se utilizó el método de difusión en disco de Kirby Bauer con un disco de cefoxitina 30 g y el método de dilución en agar con oxacilina de acuerdo con el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y para la detección de los genes *mecC* y *mecA*, se empleó una PCR. La frecuencia del gen *mecA* fue del 63,8% en un total de 315 aislamientos, sin embargo, no se detectó el gen *mecC*. Se resalta que el 47,9% de SARM se aislaron en unidades de cuidados intensivos (10).

Bastidas y colaboradores (2020) realizaron una tipificación del casete SCCmec en SARM aislados de centros de salud del Estado Aragua-Venezuela; las muestras fueron tomadas de tejidos blandos, piel, catéteres, secreciones auriculares, oculares y respiratorias, entre otras infecciones. La resistencia a la meticilina se evaluó con el método de Kirby-Bauer con discos de oxacilina (1 µg) y cefoxitina (30 µg) y los genes *mecA* y SCCmec se analizaron mediante la técnica de PCR múltiple. Se analizaron un total de 404 cultivos, 324 (80,2%) fueron *S. aureus* y de estos 81 (25%) fueron SARM. La PCR mostró que de los 81 aislados de SARM, 55 (67,9%) amplificaron el gen *mecA*, y de estos solo 24 (43,6%) amplificaron algún tipo de SCCmec (11).

Tanveer y colaboradores (2021) determinaron la diversidad y el papel de las mutaciones sin sentido de PBP2a en el mecanismo de resistencia a los antibióticos y la frecuencia de SARM ocasionada por estos factores. Se identificó un total de 33 aislamientos de *S. aureus* de muestras clínicas, las cuales fueron sometidas a pruebas fenotípicas y genotípicas para detectar la frecuencia de SARM, evaluando la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos por el método de difusión con discos de cefoxitina de 30 µg y confirmando con la prueba molecular PCR mediante la detección del gen *mecA*. De los 33 *S. aureus*, se encontró que 30 aislamientos eran resistentes a cefoxitina y positivos al gen *mecA*, obteniendo una frecuencia del 60% (n=18) en muestras de heridas, 23% (n = 7) en muestras de sangre, 10% (n = 3) en hisopos nasales y 7% (n = 2) en hisopos de oído (12).

Cabrejos y colaboradores (2021) realizaron un estudio descriptivo durante el 2017 en pacientes atendidos en el Hospital Cayetano Heredia (HCH) en Lima, Perú. Se recolectaron todos los aislamientos de *S. aureus* reportados en sangre, líquido o secreción corporal por el laboratorio de microbiología del hospital, para luego ser trasladadas al Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt para su identificación según los procedimientos diagnósticos convencionales. La susceptibilidad antimicrobiana se realizó a través del método de Kirby Bauer y para la identificación de la resistencia a la metilina mediante la identificación del gen *mecA*, se realizó por PCR múltiple. De los 115 aislamientos positivos para *S. aureus*, el 46,1% fueron identificados como SARM. Los aislamientos fueron tomados en su mayoría de secreciones no especificadas (21,7%), seguido de sangre (20,0%), secreciones tranqueo-bronquiales (14,8%) y piel (14,8%) (13).

2.2. Bases Teóricas (Marco Teórico y Conceptual)

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus constituye un género de bacterias Gram positivas con forma esférica (cocos), con diámetros que van de 0.5 a 1.5 μm ; no tienen movilidad, no forman esporas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una capa de polisacárido. Son anaerobias facultativas, además poseen la capacidad de crecer en una variedad de condiciones aeróbica y anaeróbicamente en presencia de una elevada concentración de sal (p. ej., cloruro sódico al 10%) y a temperaturas de 18-40°C (14). La prueba de catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre) evalúa una enzima propia del género *Staphylococcus* que permite diferenciarlos de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos(15).

El género *Staphylococcus* contiene 45 especies y 24 subespecies de las cuales, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo entre la microbiota de otros mamíferos y aves (14,16). Por lo general, cada especie tiende a colonizar una zona anatómica específica en el hospedero. Algunas de estas especies son oportunistas y se vuelven patógenas cuando las condiciones del sistema inmune del hospedero resultan disminuidas (14). Los estafilococos tienen una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio, es por ello que, y gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos de transmisión humano-animales y viceversa (zoonosis). Entre las especies que colonizan al humano, las de mayor importancia clínica son: *S. aureus* y *S. lugdunensis*; en tanto que en animales se encuentra *S. aureus* a *S. intermedius*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* (15).

S. aureus fue descubierta en 1880 por el cirujano Alexander Ogston, en la ciudad escocesa de Aberdeen. Es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo (16,17). Es considerado un microorganismo con capacidad para causar diversas infecciones en el humano y en los animales y la especie más virulenta de su género, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. Se sabe que *S. aureus* forma parte de la microbiota normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo por su diseminación ya que éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente (18). Pero el mayor problema generado por *S. aureus* en la salud, es la resistencia múltiple que algunas cepas poseen frente a los antimicrobianos, sobre todo a la meticilina, que pueden ocasionar que las tasas de morbilidad y mortalidad sigan incrementando considerablemente en todos los hospitales del mundo (19).

Durante su identificación, como primer paso se realiza una tinción Gram y diversas pruebas bioquímicas como las pruebas de catalasa y la fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta la glucosa. De todas las pruebas antes mencionadas, la prueba estándar para la diferenciación de *S. aureus* de las demás especies es la prueba de la coagulasa y eso se debe a que es la única especie que tiene la facultad para producir una enzima extracelular que coagula el plasma. La coagulasa permite clasificar a *S. aureus* como coagulasa positivo y diferenciarlo de las demás especies de estafilococos a los cuales se les denomina coagulasa negativos (20). Otras pruebas

opcionales son la prueba de la DNAsa termoestable en la que se identifica fácilmente al estafilococo dorado en un medio que contiene ADN y verde de malaquita; además se puede evaluar la fermentación del manitol y la producción de la fosfatasa alcalina en otras pruebas adicionales (21).

S. aureus también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizando primers específicos de especie. Sin embargo, estas técnicas son caras y laboriosas, por lo cual se pueden emplear técnicas fenotípicas y genotípicas en ocasiones donde se requiere identificar cepas o grupos de cepas con fines epidemiológicos (15,22).

2.2.2. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

La resistencia a los antimicrobianos es la facultad que poseen muchas veces los microorganismos que les permite crecer en presencia de antimicrobianos. Si bien cualquier tipo de microorganismo puede desarrollar esta capacidad, la problemática es más grave en las bacterias. Ante la variedad de antimicrobianos disponibles, los microorganismos pueden ser resistentes a uno, varios, la mayoría o a todos ellos (23). *S. aureus* posee o adquiere uno o varios mecanismos para sobrevivir frente a las drogas, como son la hiperproducción de enzimas, cambios en los sitios de inserción del antibiótico o lo que en este trabajo se evaluó, la presencia del gen *mecA* (24).

El mecanismo que confiere la resistencia a meticilina, es complejo, ya que la bacteria ha generado una variación genética, que se encuentra codificada en el gen *mecA*, el cual está ubicado dentro de un elemento cromosomal móvil heterogéneo conocido como cassette

cromosómico estafilocócico (del inglés *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, SCCmec) (25). El producto de expresión de este gen es una proteína de unión a la penicilina de 78 kDa con baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, llamada PBP2a, lo que impide que la meticilina pueda adherirse al lugar donde va a ejercer la acción de bloquear la enzima transpeptidasa, manteniendo de esta manera la integridad de la pared celular durante el crecimiento y la división celular cuando las enzimas habituales son inhibidas por los antibióticos β -lactámicos (25,26).

Este mecanismo confiere al *S. aureus* resistencia absoluta contra las penicilinas semi-sintéticas (oxacilina) y Cefalosporinas de primera y segunda generación, a todos los β -lactámicos, incluyendo Cefalosporinas de tercera, cuarta generación y los Carbapenems (Imipenem, Meropenem). La resistencia otorgada por este gen se extiende a otras familias de antibióticas, como las quinolonas y lincosamidas, lo que limita grandemente el armamentario terapéutico (27).

Este casete es un fragmento de ADN cromosomal adicional de 30 a 50 kb, que posee al *mecRI* y *mecI* como elementos regulatorios, los cuales van a controlar la transcripción del gen *mecA* (26). En ausencia de un antibiótico β -lactámico, *mecI* reprime la transcripción del gen *mecA*. Sin embargo, en presencia de un antibiótico β -lactámicos, la metaloproteasa, ubicada en la parte citoplásmica de *mecRI*, se activa, la misma que va a separar a *mecI*, que está unida a la región del operador *mecA*, permitiendo la transcripción de *mecA* y la producción subsiguiente de PBP2a (28).

Estudios experimentales muestran que las cepas sensibles a meticilina carecen de PBP2a (29) . Sin embargo se han descrito también otras modalidades de resistencia en las que no se demuestra la presencia del gen *mecA* ni de la PBP2a, como son la denominada *borderline*, con niveles de resistencia bajos por hiperproducción de β -lactamasas, a éste grupo se le ha catalogado como Estafilococo dorado con Resistencia limite a oxacilina (BORSA, lo que en ingles se describe como “*borderline oxacillin-resistant S. aureus*”) y la resistencia modificada (MODSA) por alteración de las PBPs 1,3 y 4, de peso molecular normal pero con baja afinidad por antibióticos β -lactámicos (30).

2.2.3. Resistencia bacteriana

Es la capacidad de una bacteria de reducir la acción de un antibiótico, ocasionando que el antimicrobiano no cumpla su propósito, es decir, no pueda inhibir el crecimiento del microorganismo; la resistencia se debe a cambios o mutaciones a nivel cromosómico que hacen que los antibióticos que se usan para tratar las infecciones bacterianas dejen de ser eficaces (19). La resistencia puede ser activa solamente frente a un solo tipo de antibióticos, como la que poseen la mayoría de microorganismos, sin embargo, también existe la posibilidad de encontrar microorganismos con multiresistencia, que es la capacidad de resistencia frente a dosis de tres o más antibióticos de diferentes clases o tipos. Comúnmente se suele decir resistencia antimicrobiana para hacer referencia a la resistencia bacteriana; sin embargo, esta engloba a muchos más microorganismos como parásitos, hongos y virus que también poseen la capacidad de adquirir resistencia (31).

La capacidad de resistencia es propia de cada microorganismo y suele manifestarse cuando su crecimiento y capacidad de reproducción son amenazados; en este sentido, se conoce que hay una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si estas carecen de diana para un antibiótico, y también existe la resistencia adquirida que puede deberse a

variaciones de la carga genética del microorganismo, por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. De ambos tipos la resistencia adquirida es la más importante, porque puede ir de una bacteria a otra a través de transposones, integrones o plásmidos como ocurre en *S. aureus* (32).

La interpretación del resultado ya sea sensible o resistente depende de diferentes factores como la localización de la infección, la dosis aplicada y las vías de administración del antimicrobiano (19). Esta problemática ha ido incrementando de tal modo que la multiresistencia de las bacterias a los antibióticos ya sea de uso sin receta médica o aquellos de uso restringido, han dejado de ser un fenómeno casual para convertirse en un problema que se ve a diario, en las áreas hospitalarias de UCIs, de hospitalización y emergencia; además de ver casos a nivel comunitario (32).

A lo largo de los años, los microorganismos que han sido expuestos a variadas concentraciones de medicamentos eventualmente desarrollan resistencia a prácticamente todos los antibióticos de uso. Otra situación que está empeorando aún más esta problemática es el mal uso de antibióticos en la ganadería y en la agricultura, donde enormes cantidades de antibióticos liberadas hacia el medio ambiente, incrementan la presión selectiva a favor de los microorganismos resistentes (32). En las granjas, varios medicamentos son parte de la dieta programada para el engorde y mejoramiento de los animales, sin ninguna o poca restricción condicionando la transferencia de microorganismos resistentes hacia los seres humanos; este uso inadecuado de las drogas con el fin de mejores ganancias está contribuyendo a una crisis de gran magnitud (32).

La escasez de nuevos antibióticos ha aumentado en los últimos años disminuyendo la capacidad para afrontar rebrotes de infecciones. Por consiguiente, es importante hacer énfasis en este tema tan delicado como es resistencia, para tener un uso apropiado de los medicamentos tanto en el área de la salud, ganadería, agricultura, etc.

Los centros hospitalarios son áreas donde la resistencia antimicrobiana se manifiesta al máximo, ya que en habitaciones relativamente pequeña se encuentran agrupados un importante número de pacientes que reciben antimicrobianos, lo que conlleva una presión positiva en las bacterias ocasionando mecanismos de resistencia y su transmisión en el ambiente hospitalario. No obstante, a pesar de que en la comunidad el porcentaje de infecciones resistentes es mucho más baja, debe tomarse en cuenta que el número de personas es mucho mayor comparado con los pacientes que se encuentran en un centro de salud, lo que implica una elevada cantidad de personas que poseen microorganismos con capacidad de generar diversas infecciones y que posiblemente sean resistentes a algún tipo de medicamento (33).

2.2.4. Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia se pueden dar a través de transducción que es la transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta bacterias); transposición que es el movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular y a través de conjugación que consiste en el intercambio de material genético

entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una hebra sexual o contacto físico entre ambas (33,34).

2.2.4.1. Inactivación por enzimas

Este mecanismo de resistencia es el más frecuente presentado en las bacterias y está influenciado en su mayoría por la producción de enzimas que hidrolizan al antibiótico. Dentro de las enzimas más importantes están las β -lactamasas y muchas especies de bacterias tienen la capacidad de producirlas. Las enzimas son obtenidas como parte del metabolismo propio de la bacteria o a través de la obtención de genes específicos mediante plásmidos, transposones, conjugación, etc. Así mismo existen enzimas como las Carbapenemasas que hidrolizan los antibióticos carbapenémicos que son reservados para 13 infecciones severas, así como también existen enzimas modificantes de aminoglucósidos, y enzimas que inactivan tetraciclinas, macrólidos y cloranfenicol (23,24).

2.2.4.2. Modificaciones bacterianas para evitar el contacto del antibiótico al punto diana

Las bacterias generan resistencia debido a mutaciones en genes que codifican para sus porinas, disminuyendo la permeabilidad de la pared bacteriana; puntualmente puede reducirse el diámetro de estas estructuras o el número de porinas, impidiendo la entrada del antimicrobiano al interior del microorganismo; esta es la forma más común de resistencia natural. Además, pueden ocasionar una expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora o de salida que se encuentran en la membrana externa de la célula para la excreción de productos residuales de metabolitos, detergentes o

tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. Para esto, utilizan un mecanismo de contra-transporte iónico o la hidrólisis de ATP como sustrato energético. Estas bombas de expulsión pueden ser específicas si son codificadas en plásmidos o inespecíficas por expresión a nivel cromosómica de la propia bacteria (24).

2.2.4.3. Modificación del punto diana

Las diversas mutaciones generadas en las bacterias, pueden generar cambios a nivel estructural, modificando el sitio de acción del antibiótico, disminuyendo así su afinidad. Estas mutaciones se pueden dar a nivel de los ribosomas ocasionando una variación del sitio diana a nivel intracelular como sucede con la resistencia a macrólidos y clindamicina; donde se agrega grupos metilo a la unidad 50s del ribosoma impidiendo de esta manera la acción de los medicamentos. Sin embargo, la modificación del sitio diana también se puede dar a nivel extracelular como sucede en la resistencia de *S. aureus*, que, por la presencia del gen *mecA*, que codifica para la proteína PBP2a, encargada de sustituir a las proteínas formadoras de la pared bacteriana de los *S. aureus* ocasiona la resistencia de esta bacteria a la meticilina y esto debido a que esta proteína no tiene afinidad con el antibiótico, dificultando así su función (12,21,27).

2.2.5. Método de tamizaje con los discos de oxacilina y cefoxitina para la detección de resistencia en *S. aureus*

La cefoxitina y la oxacilina son antimicrobianos que van a actuar a nivel de la pared celular, por lo que la resistencia a estos antibióticos sería sospecha de la presencia del gen *mecA* el cual se encarga de otorgar la resistencia frente a los β lactámicos.

Por tanto, la utilización del disco de cefoxitina es especialmente útil ya que este es un inductor importante para la activación del gen *mecA*, el cual se encargará de la producción de la proteína PBP2a, con baja afinidad por los antibióticos β lactámicos, pero con la función intacta de conservar la pared celular. Además, el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, por sus siglas en inglés) y el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) dan como disco preferido para detectar SARM, por poseer una mayor estabilidad frente a las penicilinasas (35–37).

Sin embargo, en estudios recientes se han notificado aislamientos portadores del gen *mecA* fenotípicamente sensibles a oxacilina, denominadas oxacilino susceptibles (OS-MRSA), que muchas veces no se conoce el grado de homogeneidad de resistencia que poseen estos aislamientos a los antibióticos, por lo que podrían ser considerados de manera equívoca como *S. aureus* susceptible a la meticilina (MSSA) corriendo el riesgo de dar una mala interpretación en los resultados (38). Por otro lado, también se han encontrado aislamientos resistentes a oxacilina y cefoxitina, pero no han encontrado el gen *mecA*, por lo que las pruebas moleculares siguen siendo las más específicas para detectar la presencia de genes homólogos generadores de resistencia frente a los antimicrobianos (39).

En cuanto a la técnica, este método requiere de un cultivo fresco de 18 a 24 horas de incubación, del cual se tomarán 4 a 5 colonias para depositarlas en tubo de vidrio con solución salina estéril ajustando al 0,5 del nefelómetro de McFarland, después de haber

realizado este procedimiento se procede a sembrar con la ayuda de un hisopo estéril sobre la placa de agar Muller Hinton el cual se debe incubar a una temperatura de 37° por un periodo de 24 horas; después de concluido este tiempo se procede a realizar la lectura de los halos para dar a conocer la resistencia o sensibilidad de las muestras a los discos evaluados. Se considera que *S. aureus* es resistente a cefoxitina cuando el halo de inhibición es \leq a 21 mm y se considera que *S. aureus* es resistente a oxacilina cuando el halo de inhibición es \leq a 10 mm (22,40).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Material de estudio

71 aislamientos de *S. aureus*, provenientes de pacientes atendidos en los diferentes servicios del Hospital Regional Docente de Cajamarca.

Marco muestral

Los aislamientos registrados e identificados parcial o completamente como *S. aureus* en el laboratorio de Microbiología del Hospital Regional Docente de Cajamarca durante los meses de agosto del 2019 a febrero del 2020.

Unidad de estudio

Cada uno de los aislamientos de *S. aureus* recolectadas de los diferentes servicios del Hospital Regional Docente de Cajamarca.

3.2. Recolección de los aislamientos

Los aislamientos fueron recolectados del laboratorio de Microbiología del Hospital Regional Docente de Cajamarca previamente identificados como *S. aureus*, y fueron transportados en cadena de frío al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.3.1. Descripción clínica de los aislamientos

Para describir los aislamientos de *S. aureus* elaboramos una ficha de recolección de datos, la cual contuvo la siguiente información: código, fecha de cultivo, origen (hospitalario o comunitario), servicio hospitalario, tipo de muestra clínica (p.ej. orina, sangre, hisopados, etc.), sexo de la persona y edad de la persona (Apéndice 1).

3.3.2. Reactivación de los aislamientos de *S. aureus*

Se sembró en agar sangre y se incubó a una temperatura de 37 °C por 24 horas, luego se evaluó la pureza del cultivo mediante coloración de Gram, las características de las colonias por crecimiento en agar Baird Parker y se comprobó la especie mediante la prueba de coagulasa en tubo (Apéndice 2), según lo descrito por Koneman et al (41).

3.3.3. Detección fenotípica de la resistencia a cefoxitina y oxacilina (Cepas de referencia de *S. aureus*: ATCC 29213 y ATCC 33592)(22,40)

Todos los aislamientos se sometieron a una prueba de tamizaje mediante la técnica de difusión en disco con cefoxitina de 30 µg, la cual se realizó en agar Mueller Hinton, con una suspensión de colonias equivalente a 0,5 del nefelómetro de McFarland e incubación de 18 horas a 37°C. Se consideró que *S. aureus* fue resistente a cefoxitina cuando el halo de inhibición tuvo un diámetro menor o igual a 21 mm.

Todos los aislamientos se sometieron también a tamizaje con el disco oxacilina de 1 µg, la cual se realizó en agar Mueller Hinton, con una suspensión de colonias equivalente a

0,5 de nefelómetro de McFarland e incubación de 24 horas a 35°C. Se consideró que *S. aureus* fue resistente a oxacilina cuando el halo de inhibición tuvo un diámetro menor o igual a 10 mm.

3.3.4. Extracción de ADN por shock térmico (42,43)

Para este procedimiento se tomaron tres colonias de cultivo de 18 h de crecimiento de *S. aureus*, y se suspendieron completamente hasta obtener una suspensión homogénea, en un eppendorf (codificado previamente) con 150 uL de agua grado molecular, este procedimiento se repitió para cada muestra. Se realizó un vórtex de 5 segundos para asegurar la homogenización de las muestras antes del shock térmico que consistió en colocar los tubos en baño María a 80 °C por 10 minutos y luego, por 10 minutos en congeladora a -20 °C. Este paso se repitió por única vez para realizar la ruptura de la pared celular bacteriana, luego se esperó 5 minutos para que descongele la suspensión antes de ser llevadas a centrifugación por 8 minutos a 10000 rpm. El ADN por ser menos denso se encontró en el sobrenadante por lo cual se tomó 60 uL del mismo para continuar con la evaluación molecular.

3.3.5. Evaluación de la calidad del ADN extraído (42)

La evaluación de la calidad del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro de micro-volúmenes, Nanodrop 2000. Para esto se utilizó 1 µL de agua grado molecular como blanco, que se colocó en el capilar del equipo para su valoración, acto seguido se limpió el capilar con papel absorbente antes de dar inicio a la medición de cada muestra de ADN.

Las muestras de ADN se evaluaron una por una y antes de la lectura de cada una de ellas se realizó una homogenización brevemente mediante un vortex para luego tomar 1 μL y colocarla en el capilar del Nanodrop, luego se cerró la tapa y se seleccionó el botón “measure”. Para cada muestra, se tomaron los datos de concentración y de pureza, es decir, los datos de OD260, OD280, ratio OD260: OD280 y la concentración de ADN en nanogramos / μL . Los valores leídos se almacenaron en una hoja de datos con el código de la muestra, los valores de las lecturas y la fecha. Luego de analizar todas las muestras, se procedió a limpiar el capilar colocando 1 μL de agua grado molecular y secando con papel absorbente (Apéndice 3).

3.3.6. PCR (Cepa de referencia de *S. aureus*: ATCC 29213 y ATCC 33592) (44,45)

La PCR se realizó con un volumen total de 50 μL siguiendo lo descrito por el fabricante del kit KOD Hot Start ADN Polymerase (Novagen, Toyobo, Merck Millipore). Cada mezcla de PCR contuvo 1 μL de ADN bacteriano, 5 μL de buffer 10x, 5 μL de dNTP's, 1 μL de Kod Polimerasa, 32 μL de agua grado molecular, 1.5 μL de cada oligonucleótido y 3 μL de mM MgSO_4 . Las condiciones para la PCR fueron de 35 ciclos con activación de la polimerasa a 95 °C por 2 min, desnaturalización inicial a 95 °C por 20 segundos, alineación a 57 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min, y una extensión final a 70 °C por 15 segundos. Los oligonucleótidos para el gen *mecA* (533 pb) fueron los empleados por Cotaquispe et al., siendo el Forward *mec1*-5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC'3 y el Reverse *mec 2* -5 'AGTTCTGGCACTACCGGATTTGC'3 (46).

3.3.7. Electroforesis en gel de agarosa (47,48)

Preparación de gel de agarosa al 1.5%

Se pesó en la balanza analítica 0.75 g de agarosa, luego se vació lo pesado en un matraz de vidrio y se agregó 50 mL de solución buffer TBE 0.5X, a continuación, se llevó al microondas por 90 segundos a máxima temperatura para disolver la agarosa completamente. A este volumen se agregó 5 μ L de SYBR safe (Invitrogen™), se mezcló bien la solución y se colocó el contenido en el molde para gel de electroforesis evitando que se formen burbujas, luego se colocó los peines adecuados y se esperó a que solidifique.

Luego de unos minutos que esté solidificado el gel, se retiró los peines con mucho cuidado evitando de esta manera la ruptura del gel, luego el molde con el gel fue colocado en la cuba de electroforesis y se agregó TBE 0.5 X necesario para cubrir el gel; se colocó el marcador de peso molecular (5 μ L) en el primer carril del gel, el marcador que se utilizó fue el ADN Ladder 100pb (Life Technologies, Invitrogen™).

Cada una de las muestras (ADN amplificado) se mezcló con buffer de carga de la siguiente manera; 5 μ L de ADN amplificado y 1 μ L de BlueJuice Gel Loading Buffer (ThermoFisher™) mezclando con mucho cuidado para no hacer burbujas, a continuación, se sembró las muestras en distintos carriles del gel (tanto las muestras amplificadas como los controles positivos y negativos) con una punta nueva cada vez.

Terminando el sembrado se tapó la cuba y se conectó a la fuente de poder PowerPac Basic Power Supply de (Bio Rad™) y se corrió a 100 voltios por 30 minutos. Finalizada la corrida se retiró el molde con el gel y se transfirió el gel al transiluminador con luz UV

Visi-Blue transiluminador para observar y fotodocumentar las bandas correspondientes al gen.

3.4. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el paquete estadístico R v3.0 (Apéndice 4). La asociación entre los grupos formados (presencia del gen *mecA* y servicio, tipo de muestra, sexo, edad de los pacientes, resistencia a oxacilina y resistencia a cefoxitina) fue establecida mediante la prueba del Chi cuadrado y/o el test exacto de Fisher. La significancia estadística se estableció con un $p \leq 0.05$ considerando un nivel de confianza del 95% y error de 5%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

De los 71 aislamientos de *S. aureus* incluidos en el presente estudio, 31 provienen de pacientes de las unidades de cuidados intermedios e intensivos, 34 de consultorios externos y 6 de emergencia; en cuanto al tipo de muestra clínica, los aislamientos se obtuvieron de muestras clínicas como secreción bronquial, líquido pleural, secreción faríngea, catéteres, orina entre otros. Del total de aislamientos 40 fueron positivos a la presencia del gen *mecA*, lo cual representa el 56% de positividad, como se ve en el gráfico 1.

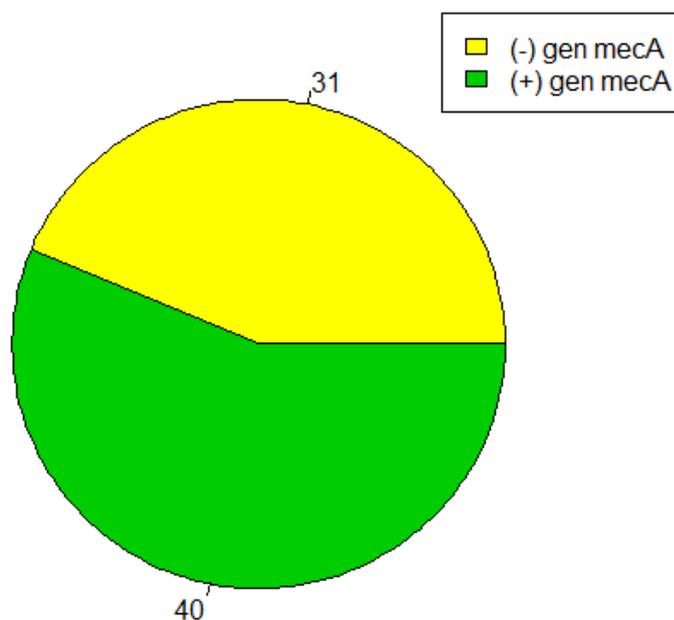


Gráfico 1. Frecuencia del gen *mecA* del total de aislamientos de los diferentes servicios del HRC.

Al disgregar los datos por servicios hospitalarios se encontró que de los aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes ubicados en las salas de UCIs 19 de 31 fueron positivos al gen *mecA* (61 %), 19 de 34 (56%) provinieron de consultorios externos y 2 de 6 (34 %) de emergencias (p-valor = 0.4487, Apéndice 4) (gráfico 2).

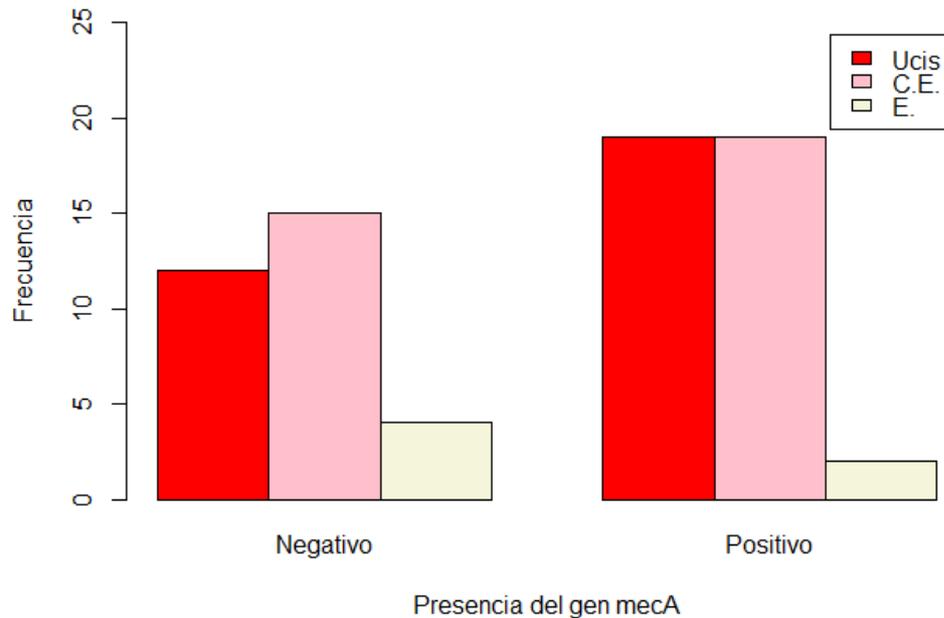


Gráfico 2. Frecuencia del gen *mecA* según las áreas hospitalarias del HRC. Ucis: salas de UCIs; C.E.: Consultorio externos; E: Emergencias.

Del mismo modo se encontró que la frecuencia de los aislamientos de *S. aureus* positivos al gen *mecA* fue de 29/43 (72 %) en secreción bronquial, 4/10 (10 %) en hemocultivos y 7/18 (16 %) en otro tipo de muestras como esputo, orina y secreción faríngea (p-valor = 0.06494, Apéndice 4) (gráfico 3). Por otro lado, se encontró que la frecuencia de aislamientos de *S. aureus* positivos al gen *mecA* fue de 25/42 (62%) en hombres y 15/29 (38%) en mujeres, (p-valor = 0.5148, Apéndice 4).

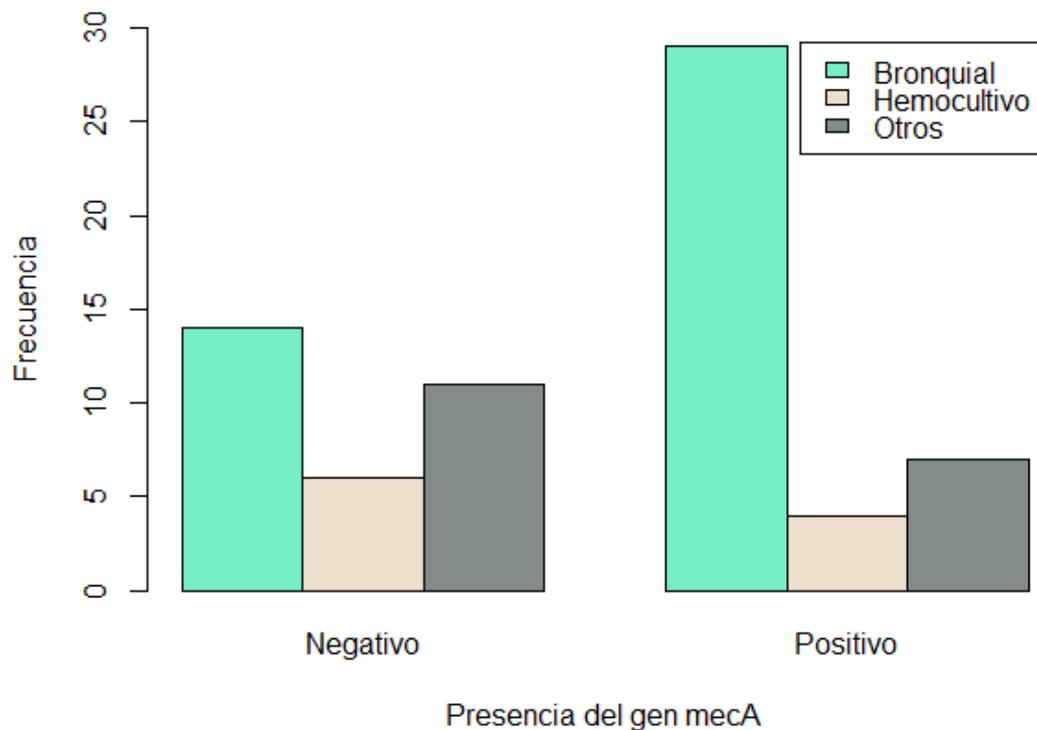


Gráfico 3. Frecuencia del gen *mecA* según el tipo muestra clínica obtenida de pacientes en el HRC.

Con la prueba de tamizaje se pudo observar que 49 de 71 aislamientos (69%) presentaron resistencia a la oxacilina y 43 de 71 (60%) a cefoxitina (figura 1 y 2), además se encontró que la frecuencia de los aislamientos de *S. aureus* positivos al gen *mecA* resistentes a oxacilina y cefoxitina fue del 80% (39/49) y 86% (37/43) respectivamente, mientras que los aislamientos positivos al gen *mecA* pero sensibles a oxacilina y cefoxitina presentaron frecuencias del 0.04% (1/22) y 10% (3/28) respectivamente (gráficos 4 y 5).



Figura 1. Prueba de tamizaje realizado con los discos oxacilina (1 μ g) y cefoxitina (30 μ g) donde se muestran los halos de inhibición que demuestran la sensibilidad de este aislamiento a los antimicrobianos y la ausencia del gen *mecA*.



Figura 2. Prueba de tamizaje realizado con los discos oxacilina (1 μ g) y cefoxitina (30 μ g) donde se muestra la ausencia de halos de inhibición lo que demuestra la resistencia de este aislamiento a los antimicrobianos y la posible presencia del gen *mecA*.

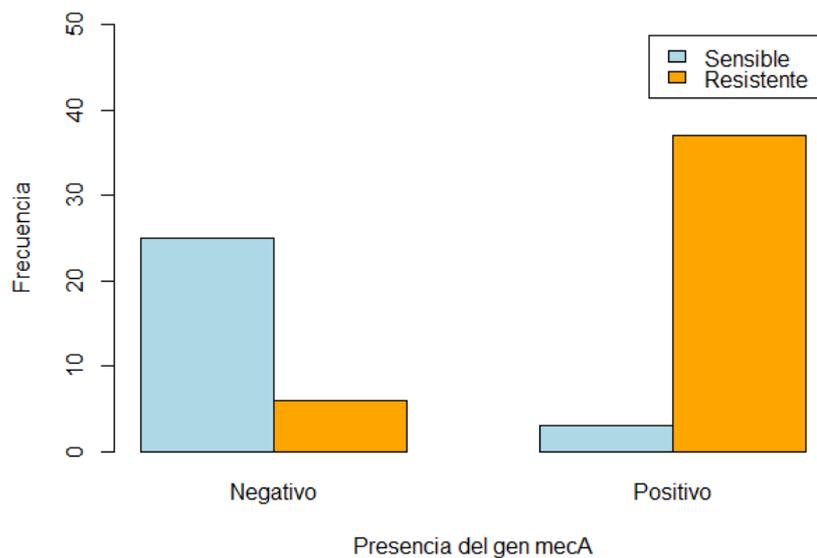


Gráfico 4. Resistencia y sensibilidad antimicrobiana a cefoxitina, relacionada con la presencia del gen *mecA*.

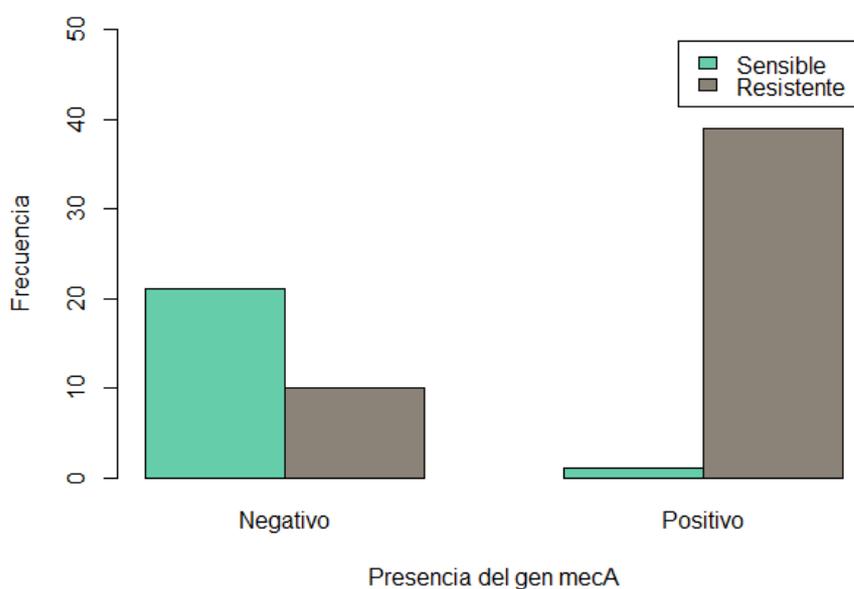


Gráfico 5. Resistencia y sensibilidad antimicrobiana a oxacilina, relacionada con la presencia del gen *mecA*.

Del total de aislamientos evaluados, 40/71 (56 %) presentaron el gen *mecA*, el cual se verificó mediante una electroforesis en el gel de agarosa al 1.5 % (Figura 1).

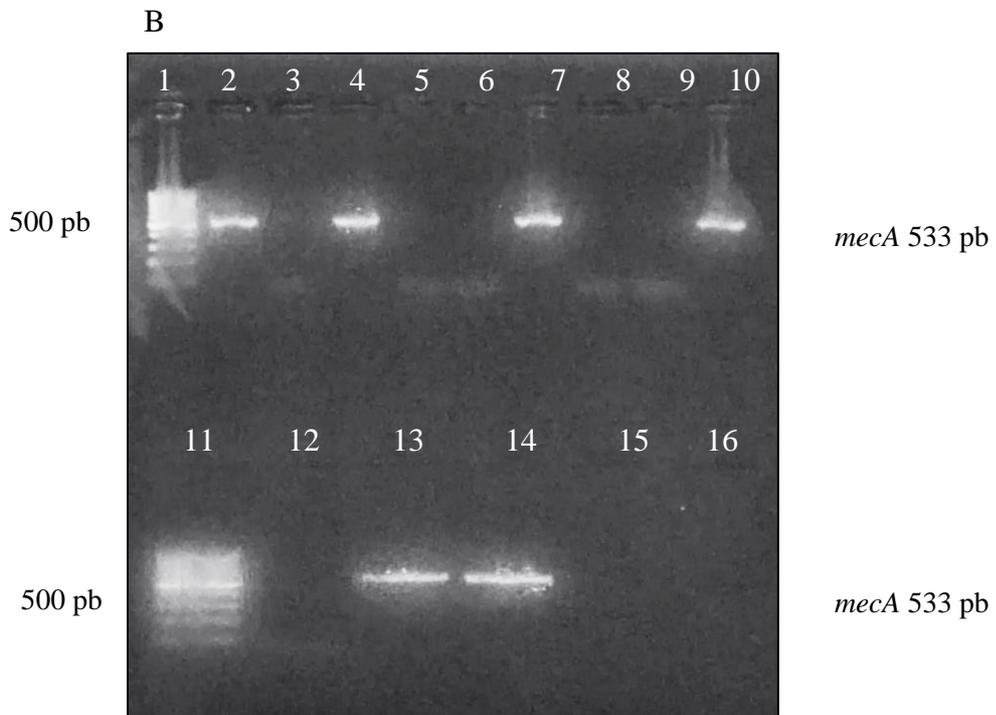
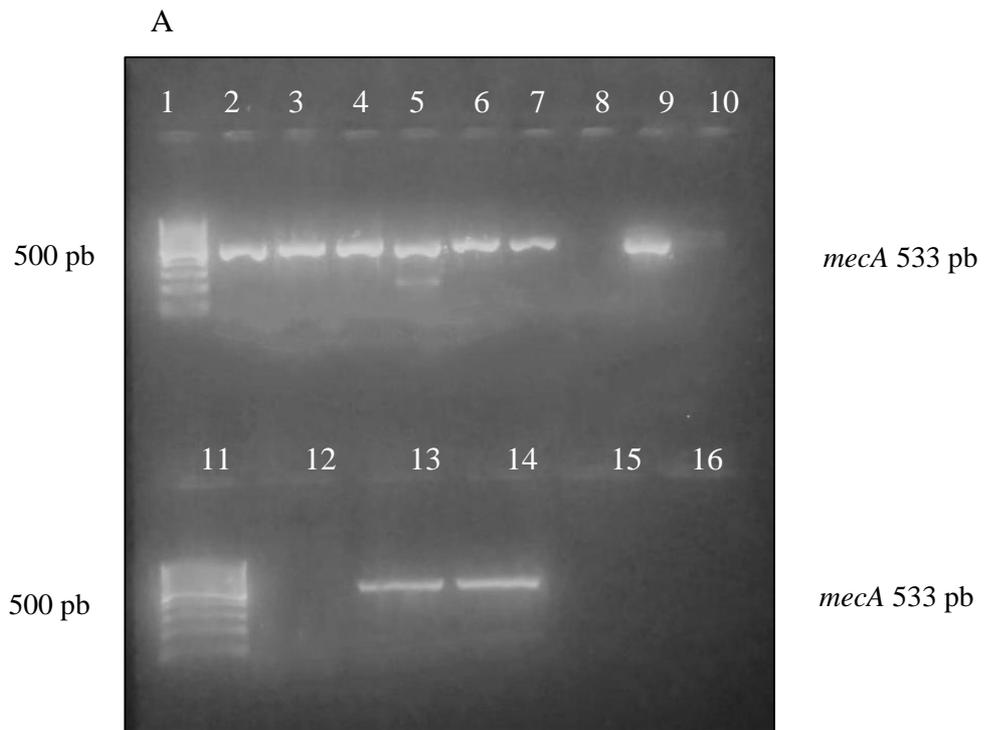


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa del gen *mecA* en 28 aislamientos. (A) Carriles 1 y 11: marcador de peso molecular 100pb; carriles 2-7, 13, 14: aislamientos positivos para el gen *mecA*; carriles 8, 10, 12, 15: aislamientos negativos; Carriles 9 y 16: controles + y -. (B) Carriles 1 y 11: marcador de peso molecular 100pb; carriles 2,4,7,13 y 14: aislamientos positivos para el gen *mecA*; carriles 3,5,6,8,9,12, 15: aislamientos negativos. Carriles 10 y 16: controles + y -.

4.2 Discusión

El método fenotípico utilizado para la detección de posibles SARM en este trabajo de investigación fue un tamizaje con los discos de oxacilina y cefoxitina, debido a que estos discos inducen la producción bacteriana de la proteína PBP2a la cual reemplaza a la proteína original en la pared celular pero no funciona como receptor del antibiótico betalactámico, generando de esta manera resistencia en la bacteria. La expresión de esta proteína puede ser homogénea o heterogénea y muchas veces puede ser influenciada por las condiciones de cultivo, por la afinidad de la proteína PBP2a con el antibiótico y por el gen que codifica para esta proteína, por lo que es necesario contar con métodos confirmatorios como es la prueba molecular de PCR que amplifica específicamente el gen o genes asociados a este mecanismo de resistencia; esta técnica es considerada el método de referencia (36).

Este es el primer estudio realizado en Cajamarca-Perú, donde se determina la frecuencia del gen *mecA* en aislamientos provenientes de muestras de pacientes del Hospital Regional Docente de Cajamarca (gráfico 1), donde el 56 % (40/71) de cultivos puros de *S. aureus* presentaron el gen de interés, mostrando una similitud con Abente y colaboradores (2016) donde la frecuencia de SARM fue 54,3% (38/70) en muestras de abscesos, forúnculos y lesiones supurativas por hisopado (6), así como también con Cikman y colaboradores (2019) que encontraron una frecuencia del gen *mecA* del 63,8% en un total de 315 aislamientos procedentes de UCIs (10). Es muy importante hacer énfasis en estos resultados, ya que un buen porcentaje de aislamientos provienen de diferentes tipos de secreciones tomadas de pacientes de las UCIs del HRC; debido a que infecciones con SARM complican aún más la estadía de los pacientes, puesto que estarán

lidiando contra microorganismos resistentes en un estado de salud muy debilitado. Por otra parte, estos resultados nos señalan una presencia de falsos positivos de resistencia a oxacilina, la cual podría estar mediada por otros mecanismos, ya sea a nivel molecular como la presencia de otros genes de resistencia homólogos al *mecA*.

Ahmed y colaboradores (2017) en cambio, determinaron una prevalencia de SARM del 30,4% (34/112) entre todos los aislados de *S. aureus* (8), Panda y colaboradores (2016) una frecuencia del 31% (62/200) de aislamientos de *S. aureus* positivos para el gen *mecA* (7) y Bastidas y colaboradores (2020) una frecuencia del 25% (81/324) en aislamientos de *S. aureus*, en todos los casos frecuencias mucho más bajas en comparación con lo hallado en este estudio, pese a que los aislamientos fueron obtenidos de muestras similares como secreciones respiratorias, catéteres entre otras (11). Esto puede ser indicativo de que no se está llevando adecuadamente la vigilancia de SARM en nuestros hospitales, y quizá haya deficiencia y falta de planificación en la prevención y control de este tipo de infecciones a nivel hospitalario. Estas diferencias en los resultados muestran la variabilidad de la frecuencia comparada con las distintas muestras y áreas evaluadas y que podrían ser motivo de interés para siguientes estudios. Estos resultados coinciden en su mayoría con las características de los SARM cuyo rango de invasión va desde infecciones locales como abscesos o forúnculos, hasta cuadros sistémicos severos y esto va relacionado directamente con la estancia prolongada y la instrumentalización de apoyo que utiliza el personal de salud, que muchas veces no recibe el grado de desinfección y esterilización necesarias (46).

Si observamos el interior hospitalario, un alto porcentaje (gráfico 2) de aislamientos que poseen el gen *mecA*, han sido encontrados en los ambientes con mayor riesgo de morbilidad y mortalidad como lo son las áreas UCIs. Los porcentajes encontrados tanto en las áreas de UCIs (61%) y consultorios externos (54%), son altos, con p-valor mayor a 0.05, lo cual señala una elevada frecuencia de resistencia antimicrobiana no solo a nivel hospitalario sino también comunitario, lo que conlleva a un mayor riesgo de mortalidad si es que estas personas por alguna causa infecciosa fueran internadas en UCI, área donde se presenta la mayor frecuencia de aislamientos con resistencia antimicrobiana. Estos resultados también muestran evidencia de la mala práctica a nivel comunitario de automedicarse y también nos muestra la vulnerabilidad de las personas en los ambientes hospitalarios al encontrarse en riesgo de mortalidad si adquieren infecciones por patógenos resistentes a antimicrobianos como los SARM.

En lo que refiere al tipo de muestra, se encontró un 72% de SARM en secreciones bronquiales, existiendo una diferencia considerable comparado con el estudio realizado por Cabrejos et al (2021) donde el porcentaje de SARM encontrado fue del 14,8% (13). Sin embargo, cabe recalcar que en este estudio la variedad de muestras de donde se aislaron los *S. aureus* fue menor al estudio comparado, de allí que en el momento de evaluar el porcentaje y comparar los resultados existió una diferencia.

En este trabajo se encontró dos aislamientos con resistencia a oxacilina, sensibilidad a cefoxitina y con la presencia del gen *mecA*, por lo que podríamos estar en frente de aislamientos con resistencia heterogénea, la cual se manifiestan *in vitro* cuando *S. aureus* aparece como resistentes a oxacilina, pero sensibles frente a otros antibióticos beta-

lactámicos; este tipo de resistencia ha sido discutida por distintos grupos de investigación entre ellos la de Morosini y colaboradores (2011) donde han realizado pruebas fenotípicas y han encontrado aislamientos heteroresistentes sensibles a cefoxitina, por lo que descartan la presencia del gen *mecA* sin la necesidad de una prueba molecular confirmatoria (40).

Sin embargo Torres y Cercenado (2010) en su estudio aclaran que por presentarse una resistencia cruzada con otros β lactámicos, estos aislamientos deben considerarse e informarse como resistentes a todos ellos debido a que se ha demostrado que es posible la transformación de una expresión heterogénea en una expresión homogénea de la resistencia a meticilina, fenómeno que se asocia a la selección de mutaciones cromosómicas y de reorganizaciones genéticas o a un incremento en la producción de la PBP2a (36). Coincidiendo con los resultados de este trabajo de investigación. Ahmed y colaboradores (2017) en comparación con este trabajo determinaron una prevalencia de SARM del 30,4% (34/112) donde 24 aislamientos fueron resistentes a ambos antibióticos, cuatro aislamientos mostraron un perfil sensible a oxacilina, pero resistente a cefoxitina, mientras que seis aislamientos eran intermedios con oxacilina, pero resistentes a cefoxitina, mostrando una mayor sensibilidad frente al disco de oxacilina a diferencia con este trabajo donde existió una mayor resistencia frente a oxacilina; en estos casos, debido a la presencia del gen *mecA* en todos los aislamientos, la irregularidad de la sensibilidad frente a oxacilina nos coloca en frente de aislamientos denominados *Staphylococcus aureus* portador del gen *mecA* sensible a oxacilina (OS-MRSA) según el estudio realizado en Uruguay por Barbagelata y colaboradores (2018) (8,39). Todos estos resultados se podrían denominar de manera errónea como sensibles a meticilina por métodos de

tamizaje utilizando discos de antibióticos, sin embargo, debido a la presencia del gen *mecA* lo convierten en aislamientos SARM.

En este estudio también se encontró 6 aislamientos resistentes a oxacilina y a cefoxitina y sin la presencia del gen *mecA*, resultado que podríamos asociar a cambios a nivel cromosómico, reorganizaciones genéticas o a un incremento en la producción de la PBP2a mediada por el gen *mecC*, donde se ha detectado que tiene una mayor afinidad relativa para oxacilina que para cefoxitina comparada con su homóloga *mecA*, por lo que da lugar a niveles más altos de resistencia a cefoxitina que a oxacilina (27). Además, se encontró 4 aislamientos resistentes a oxacilina, sensibles a cefoxitina y sin la presencia del gen *mecA*, por lo que podríamos asociarlos a aislamientos de *S. aureus* con resistencia de bajo nivel o resistencia borderline a la oxacilina (BORSA), hiperproducción de β -lactamasa estafilocócica o a la modificación de las PBP 1, 2 o 4 de *S. aureus* (30).

Según la Organización Mundial de la Salud y el Foro Económico Mundial, la resistencia a los antibióticos es uno de los grandes problemas de salud pública mundial porque impide nuestra capacidad de controlar las enfermedades infecciosas aumentando la morbi-mortalidad y amenazándonos con volver a la era pre-antibiótica debido a la alta resistencia de los microorganismos a los diferentes tipos de antimicrobianos, generando de esta manera un aumento de costos por el tiempo que requiere tratar una enfermedad ocasionada por este tipo de microorganismos e inestabilidad poniendo el riesgo la economía y el comercio. Quizá sean los anticuerpos y no los antibióticos en un tiempo no muy lejano los que con su extraordinaria especificidad lleguen a ofrecer soluciones concretas (33).

La resistencia frente a los antibióticos no es un problema reciente, es un problema que nos aqueja desde mucho tiempo atrás, y una de las causas que la habría generado es la automedicación (49). Perú tiene un gran problema relacionado al desarrollo de resistencia a los antibióticos, ya que es un país donde la venta de muchos antimicrobianos se realiza sin receta médica y muchas veces sin saber la dosis necesaria que se necesita para lidiar con el microorganismo infeccioso. Al no cumplir con las dosis necesarias para combatir una infección ocasionada por el patógeno, condiciona una posible reinfección por el mismo patógeno donde el antibiótico utilizado anteriormente, no tendría el mismo efecto en la bacteria debido a la generación de resistencia.(3).

Los microorganismos portadores de genes de resistencia no hacen más que poner en riesgo tanto al personal de salud como a los pacientes alojados en el hospital. Además, se advierte también de *S. aureus* resistentes a meticilina mediada por otros mecanismos ya mencionados anteriormente que, al ser tratados con los mismos antibióticos, podríamos seguir generando resistencia y podría volverse crónico más aún si la infección es producida por microorganismos multirresistentes poniéndose en riesgo muchas veces a la misma persona que se automedica, al personal de salud asintomático que es portador de SARM y a personas de la comunidad que muchas veces van a un establecimiento de salud por casos leves y al final pueden contaminarse con algún patógeno oportunista que es portador de genes de resistencia que terminan complicando su enfermedad, alargando su estadía en el hospital y aumentando de manera significativa los costos de atención. Por lo tanto, conocer la frecuencia del gen *mecA* encontrada en este estudio es muy importante para el personal de salud que trata infecciones por estas cepas bacterianas, que son causa importante de infecciones intrahospitalarias (4,49).

Con este trabajo de investigación se logró estandarizar de forma eficiente la extracción de ADN de *S. aureus* sin la necesidad de utilizar kits de extracción costosos, obteniendo como resultados ADN de buena calidad y con concentraciones que nos permitieron detectar el gen *mecA* sin ningún problema como se muestran en nuestros resultados.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los resultados del presente estudio, permiten concluir que de 71 aislamientos de *S. aureus* provenientes de muestras clínicas, el 56% (40) fueron positivos a la presencia del gen *mecA* mediante PCR.

En la prueba de tamizaje con los discos de oxacilina y cefoxitina, se determinó que del total de aislamientos (71) de *S. aureus* el 69% (49) presentaron resistencia a oxacilina y el 60% (43) a cefoxitina.

Los aislamientos de *S. aureus* positivos al gen *mecA* fueron obtenidos con mayor frecuencia de los servicios hospitalarios de las salas de UCIs y consultorios externos, con 19 aislamientos cada servicio.

El tipo de muestra nombrado como secreción bronquial fue de donde se obtuvo el mayor número de aislamientos positivos al gen *mecA* (72%).

5.2. Recomendaciones

Se debe realizar estudios más profundos de los diferentes tipos de mecanismos de resistencia que posee *S. aureus* frente a los antibióticos como son los genes *mec* y su origen, hiperproducción de β -lactamasas o OS-SARM. También se debe evaluar la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en Cajamarca, que permita monitorear los cambios en las poblaciones microbianas, detectar de forma temprana los SARM para facilitar la pronta notificación e investigación de brotes.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Tamariz J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, Zerpa R, et al. Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Rev Medica Hered. 2011;21(1):3–4.
2. Moreno E. Eficacia antibacteriana in vitro de la superficie de cobre sobre Staphylococcus aureus meticilino resistente en comparacion con acero inoxidable. 2017;(54):8.
3. Cáceres M. Frecuencia de portadores nasales de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en personal de salud de hospitales de Nicaragua. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal. 2011;30(6):610–4.
4. Guadalupe N. Resistencia antimicrobiana del Staphylococcus aureus en México. Bol Med Hosp Infant Mex. 2011;68(4):262–70.
5. Dorante V, Hurtado E, Bastidas B, Méndez M. Frecuencia de staphylococcus aureus meticilino resistente en pacientes que asisten al laboratorio de microbiologia del hospital “Los Samanes” estado Aragua. ODOUS Cient. 2013;14(1):31–2.
6. Abente S, Carpinelli L, Guillén R, Rodríguez F, Fariña N. Frecuencia de Staphylococcus aureus meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción. Inst Investig en Ciencias la Salud Univ Nac Asunción Paraguay. 2016;14(2):8–16.
7. Panda RK, Mahapatra A, Mallick B, Chayani N. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for detection of methicillin resistant staphylococcus aureus in a tertiary care hospital of eastern odisha. J Clin Diagnostic Res. 2016;10(2):DC19–21.
8. Khairalla A, Wasfi R, Ashour HM. Carriage frequency, phenotypic, and genotypic characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from dental

- health-care personnel, patients, and environment. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–16.
Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07713-8>
9. Rocchetti TT, Martins KB, Martins PYF, Oliveira RA de, Mondelli AL, Fortaleza CMCB, et al. Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2018;22(2):99–105. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.006>
 10. Cikman A, Aydin M, Gulhan B, Karakecili F, Kurtoglu MG, Yuksekkaya S, et al. Absence of the *mecC* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical samples: The first multi-centered study in Turkey. *J Infect Public Health* [Internet]. 2019;12(4):528–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.01.063>
 11. Bastidas B, Méndez M V., Vásquez Y, Requena D. Tipification de Staphylococcal chromosome cassette of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the state of Aragua, Venezuela. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2020;37(2):239–45.
 12. Ali T, Basit A, Karim AM, Lee JH, Jeon JH, Rehman SU, et al. Mutation-based antibiotic resistance mechanism in methicillin-resistant staphylococcus aureus clinical isolates. *Pharmaceuticals*. 2021;14(5):1–11.
 13. Cabrejos L, Vives J, Astocondor L, Hinostroza C. Frequency of community acquired methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital in Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021;38(2):313–7.
 14. Murray P. *Microbiologia medica*. 7ma ed. Medical Microbiology, editor. España; 2013. 176 p.
 15. Zendejas Manzo GS, Avalos Flores H, Soto Padilla MY. *Microbiología general de Staphylococcus aureus* : Generalidades , patogenicidad y métodos de identificación.

- Rev Biomed. 2014;25(3):129–43.
16. Pasachova Garzón J, Ramirez Martinez S, Muñoz Molina L. Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Nova. 2019;17(32):25–38.
 17. Воропаева НМ, Немченко УМ, Иванова ЕИ, Кунгурцева ЕА, Туник ТВ. Características de la sensibilidad a bacteriófagos de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de la microbiocenosis de la orofaringe en niños de Irkutsk. España; 2012. p. 1–4.
 18. Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del Staphylococcus aureus. Rev Latinoam Patol Clínica. 2014;61(1):28–40.
 19. Jorge G, Ciro M, Flor de María P. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. Acta Médica Peru. 2019;36(2):145–51.
 20. Galarce N, Muñoz L, Jara MA, Lubí P, Sepúlveda A. Detección del gen mecA en cepas de Staphylococcus coagulasa positiva aisladas desde gatos. Rev Chil Infectol. 2016;33(4):1–9.
 21. Cervantes E, García R, Salazar PM. Importancia de Staphylococcus aureus meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. Rev Latinoam Patol Clínica y Med Lab [Internet]. 2014;61(4):196–204. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=99003006&lang=es&site=ehost-live>
 22. Castellano G, Perozo M, Vivas V. Detección fenotípica y molecular de resistencia a meticilina en *S. aureus*. K asmera. 2008;36(1):28–38.
 23. Cano HJP, Atzín Contreras R. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Rev Médica MD. 2013;4(04):186–91.
 24. Gastelo R, Maguiña C. Mecanismos de resistencia bacteriana. Diagnóstico.

- 2018;57(2):82–6.
25. Sanchez M, Hernández O, Velasquez LA, Rivas D, Marín A, González LA, et al. Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. *Infectio*. 2013;17(2):66–72.
 26. Vegas S. Detección del gen *mec A* en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes atendidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná, estado Sucre. *Rev la Soc Venez Microbiol*. 2017;37(2):44–9.
 27. Cano M, Monteagudo I, Mellado P, Ortega C. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in a patient with a wound infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(4):287–8.
 28. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The Molecular Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2009;13(3):5–10.
 29. Monica Gil DDM. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev Chil Infectol*. 2000;17(2):145–52.
 30. Echevarria J, Iglesias D. Estafilococo Meticilino resistente , un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos . *Rev Medica Hered*. 2003;14(4):198–200.
 31. Edwards F, MacGowan A, Macnaughton E. Antibiotic resistance. *Med (United Kingdom)* [Internet]. 2021;49(10):632–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.07.006>
 32. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2021;27:101–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
 33. Calderón G, Aguilar L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y

- antibióticos con menor actividad. Rev médica Costa Rica y Centroamérica [Internet]. 2016;LXXIII(621):757–63. Available from: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>
34. Asenjo A, Oteo-Iglesias J, Alós J-I. What's new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin? *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)* [Internet]. 2021;39(6):291–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.02.017>
35. García-Caballero A, de Dios Caballero J, Maruri A, Serrano-Tomás MI, del Campo R, Morosini MI, et al. Evaluation of different phenotypic methods to detect methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022;102(1).
36. Torres C, Cercenado E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(8):541–53.
37. Skov R, Varga A, Matuschek E, Åhman J, Bemis D, Bengtsson B, et al. EUCAST disc diffusion criteria for the detection of *mecA*-Mediated β -lactam resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*: oxacillin versus cefoxitin. Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection*. 2020. p. 122.e1-122.e6.
38. Duarte F, Danelli T, Tavares E, Morguette A, Kerbaux G, Grion C, et al. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil. *J Infect Chemother*. 2019;25(4):293–7.
39. Guillermina M, Barbagelata G, Casaretto LP, Inés M, Ciganda M, Correa CG, et al. *Staphylococcus aureus* portador del gen *mecA* sensible a oxacilina (OS-MRSA): otro desafío para los laboratorios de microbiología. *Rev Medica Del Uruguay*. 2018;34(4):242–5.
40. Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos

- de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(6):325–32.
41. Koneman, Winn, Woods, Allen, Janda, Koneman, et al. *Microbiological Diagnosis*. Lippincott Williams & Wilkins. 2006;6:1–1696.
42. Patricia L, Velázquez A, Aragón C, Romero AC. Extracción y purificación de ADN. 2008;14.
43. Wright MH, Adelskov J, Greene AC. Bacterial DNA Extraction Using Individual Enzymes and Phenol/Chloroform Separation. *J Microbiol y Biol Educ*. 2017;18(2):82–4.
44. López Vázquez M, Martínez Castañeda J, Talavera Rojas M, Alarcónb JV, Ordóñez VV. Detección de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México. *Arch med vet*. 2015;249:245–9.
45. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3223–5.
46. Cotaquispe R, Sarmiento R, Lovón S, Rodríguez J. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp with resistance to methicillin in commercial chickens. *Rev Investig Vet del Peru*. 2021;32(3):1–12.
47. Fierro FF. *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología*. 2013. p. 50–2.
48. Alicia C, Peña P, Dapena JD, Martínez E, Antonio J, Ruiz B, et al. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Córdoba; 2014.
49. Fajardo Á, Méndez F, Hernández J, Molina L, Tarazona A, Nossa C, et al. La automedicación de antibióticos: Un problema de salud pública. *Salud Uninorte*. 2013;29(2):226–35.

APÉNDICES

Apéndice 1. Descripción clínica de los aislamientos

Ficha 1. Descripción clínica de los aislamientos.

Código del aislamiento:

Fecha de cultivo: / /

Edad:

Sexo :

M

F

Origen :

Hospitalario

Extrahospitalario

Servicio hospitalario :

Tipo de muestra clínica:

Apéndice 2. Reactivación de los aislamientos de *S. aureus*

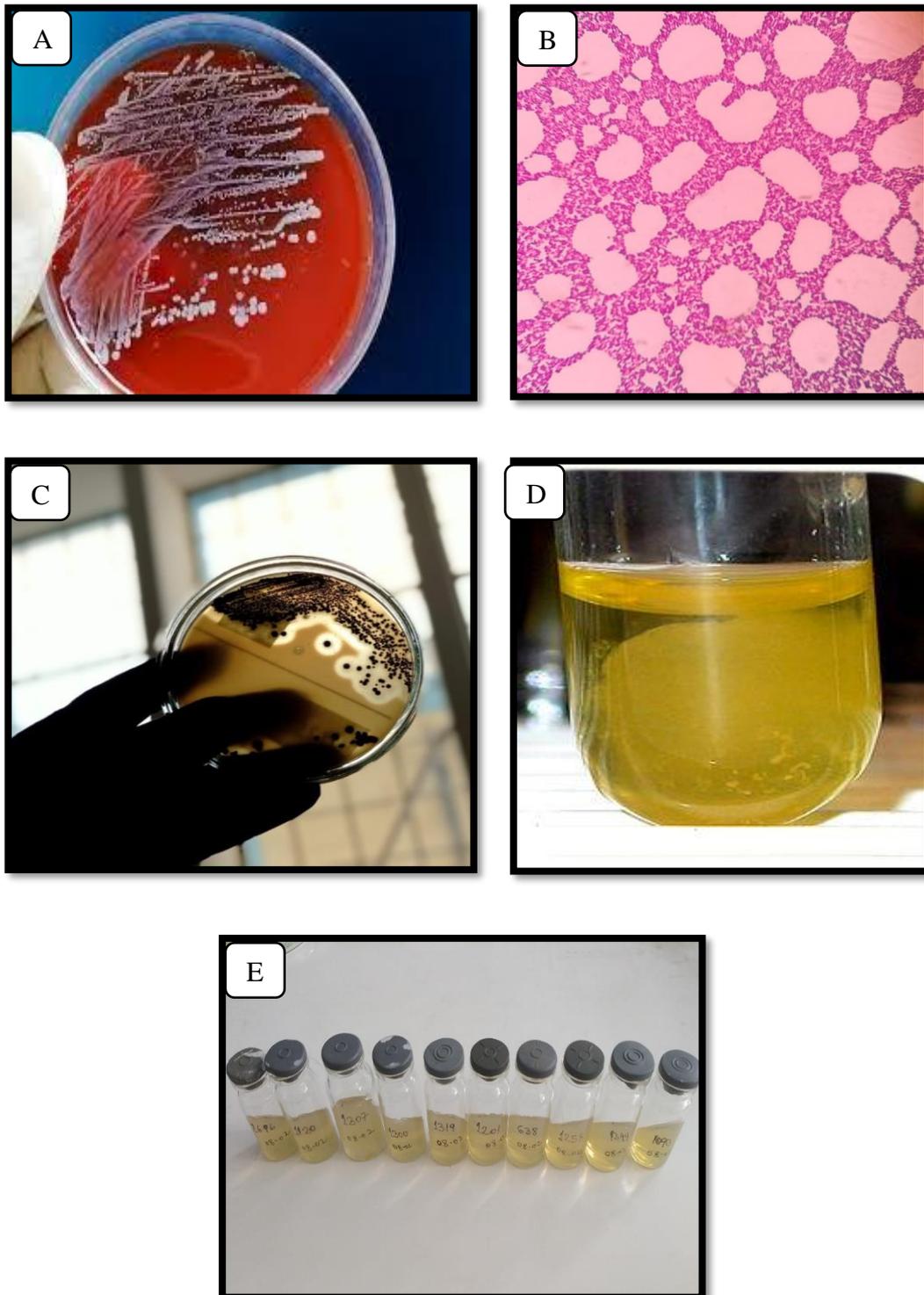


Figura 2. Reactivación de los aislamientos de *S. aureus*. Cultivo de *S. aureus* en Agar sangre (A), Coloración Gram (B), Colonias aisladas de *S. aureus* en Agar Baird Parker (C), Prueba de coagulasa (D) y Viales con cultivos puros (E).

Apéndice 3. Evaluación de la calidad del ADN extraído

Tabla 1. Código de los aislamientos de *S. aureus* y concentración del ADN.

| MUESTRA | CONCENTRACIÓN DE ADN ng/ul | 260/280 | 260/230 |
|---------|----------------------------|---------|---------|
| MB1026 | 1075,2 | 2,23 | 1,17 |
| MB2644 | 1553,7 | 2,29 | 1,58 |
| MB1088 | 1669,2 | 2,26 | 1,12 |
| MB528 | 129,1 | 2,21 | 1,51 |
| MB727 | 196,7 | 2,45 | 1,6 |
| MB1059 | 904,2 | 2,22 | 1,23 |
| MB1098 | 1716,7 | 1,92 | 0,86 |
| MB1082 | 1238,6 | 2,25 | 1,34 |
| MB546 | 2138,1 | 2,1 | 1,33 |
| MB1381 | 2299,5 | 2,2 | 1,13 |
| MB1120 | 1407,7 | 2,19 | 1,25 |
| MB1307 | 1240,5 | 2,21 | 1,4 |
| MB638 | 1005,9 | 2,19 | 1,46 |
| MB1157 | 226,7 | 2,35 | 1,57 |
| MB1108 | 265,5 | 2,11 | 1,7 |
| MB529 | 251,1 | 2,29 | 1,26 |
| MB1201 | 145,5 | 2,45 | 1,47 |
| MB1273 | 631,5 | 2,19 | 1,59 |
| MB1090 | 830,9 | 2,11 | 1,32 |
| MB2696 | 689,8 | 2,17 | 1,29 |
| MB1244 | 921,9 | 2,15 | 1,46 |
| MB1125 | 409,8 | 2,27 | 1,32 |
| MB1319 | 966,5 | 2,14 | 1,44 |
| MB1258 | 311,8 | 2,3 | 1,29 |
| MB1257 | 712,6 | 2,16 | 1,38 |
| MB1169 | 441,3 | 2,21 | 1,28 |
| MB1153 | 386,8 | 2,01 | 1,28 |
| MB1046 | 404 | 2,55 | 1,81 |
| MB1315 | 645,9 | 2,19 | 1,37 |
| MB1417 | 890,2 | 2,3 | 1,35 |
| MB1025 | 602,3 | 2,23 | 1,22 |
| MB622 | 561,3 | 2,31 | 1,27 |
| MB1017 | 735,4 | 2,29 | 1,21 |
| MB1310 | 636 | 2,19 | 1,43 |
| MB1598 | 990,9 | 2,34 | 1,43 |
| MB1890 | 2431 | 2,22 | 1,37 |
| MB1780 | 3254,3 | 2,29 | 1,25 |

| | | | |
|---------------|--------|------|------|
| MB1416 | 969,6 | 2,32 | 1,32 |
| MB1394 | 3055,4 | 2,21 | 1,29 |
| MB0048 | 813,1 | 2,19 | 1,2 |
| MB1396 | 319,2 | 2,43 | 1,22 |
| MB1592 | 942,5 | 2,43 | 1,32 |
| MB1679 | 209,1 | 2,51 | 1,9 |
| MB1576 | 2036,4 | 2,13 | 1,39 |
| MB734 | 2814,1 | 2,18 | 1,3 |
| MB1566 | 3093,2 | 2,26 | 1,3 |
| MB1817 | 1411 | 2,25 | 1,19 |
| MB1407 | 945,5 | 2,07 | 1,37 |
| MB1300 | 1571 | 2,02 | 1,22 |
| MB1614 | 1983,8 | 2,19 | 1,26 |
| MB774 | 1567,5 | 2,29 | 1,38 |
| MB1593 | 1333,1 | 2,33 | 1,46 |
| MB1425 | 1147,9 | 2,22 | 1,21 |
| MB1141 | 3560,3 | 2,27 | 1,21 |
| MB1349 | 1116,2 | 2,28 | 1,43 |
| MB0032 | 882,3 | 2,12 | 1,15 |
| MB0040 | 1397,7 | 2,21 | 1,29 |
| MB1720 | 2796,9 | 2,2 | 1,26 |
| MB1390 | 2613,4 | 1,97 | 0,94 |
| MB1584 | 1888,5 | 2,29 | 1,34 |
| MB762 | 1582,4 | 2,26 | 1,38 |
| MB1737 | 316,6 | 2,33 | 1,46 |
| MB0074 | 638,3 | 1,83 | 0,69 |
| MB1934 | 761,5 | 2,44 | 1,63 |
| MB1556 | 380,3 | 2,29 | 1,4 |
| MB775 | 1084,9 | 2,29 | 1,4 |
| MB1841 | 176,1 | 2,54 | 2,08 |
| MB1735 | 388 | 2,31 | 1,4 |
| MB0042 | 462,7 | 2,27 | 1,42 |
| MB1545 | 312,1 | 2,32 | 1,31 |

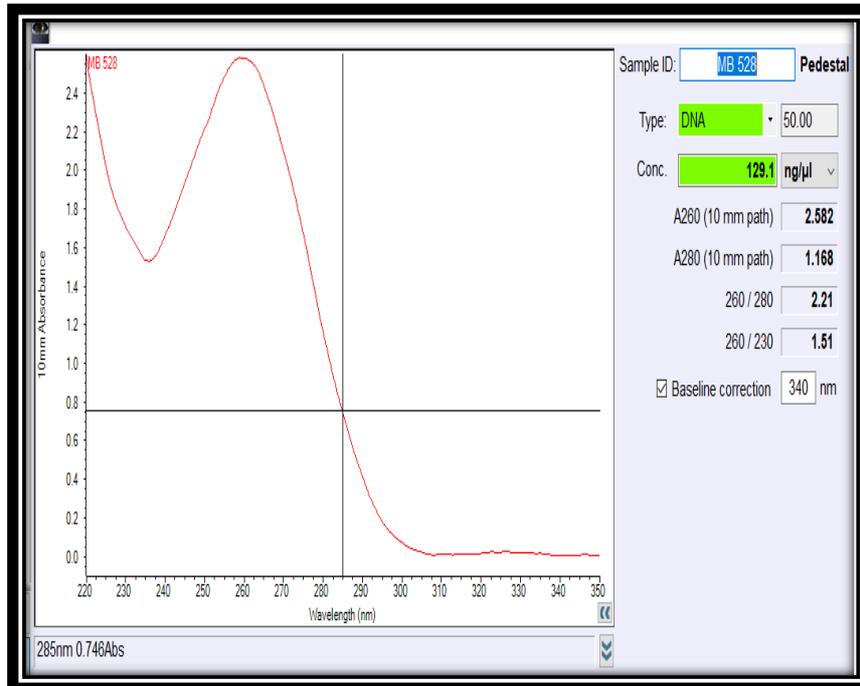
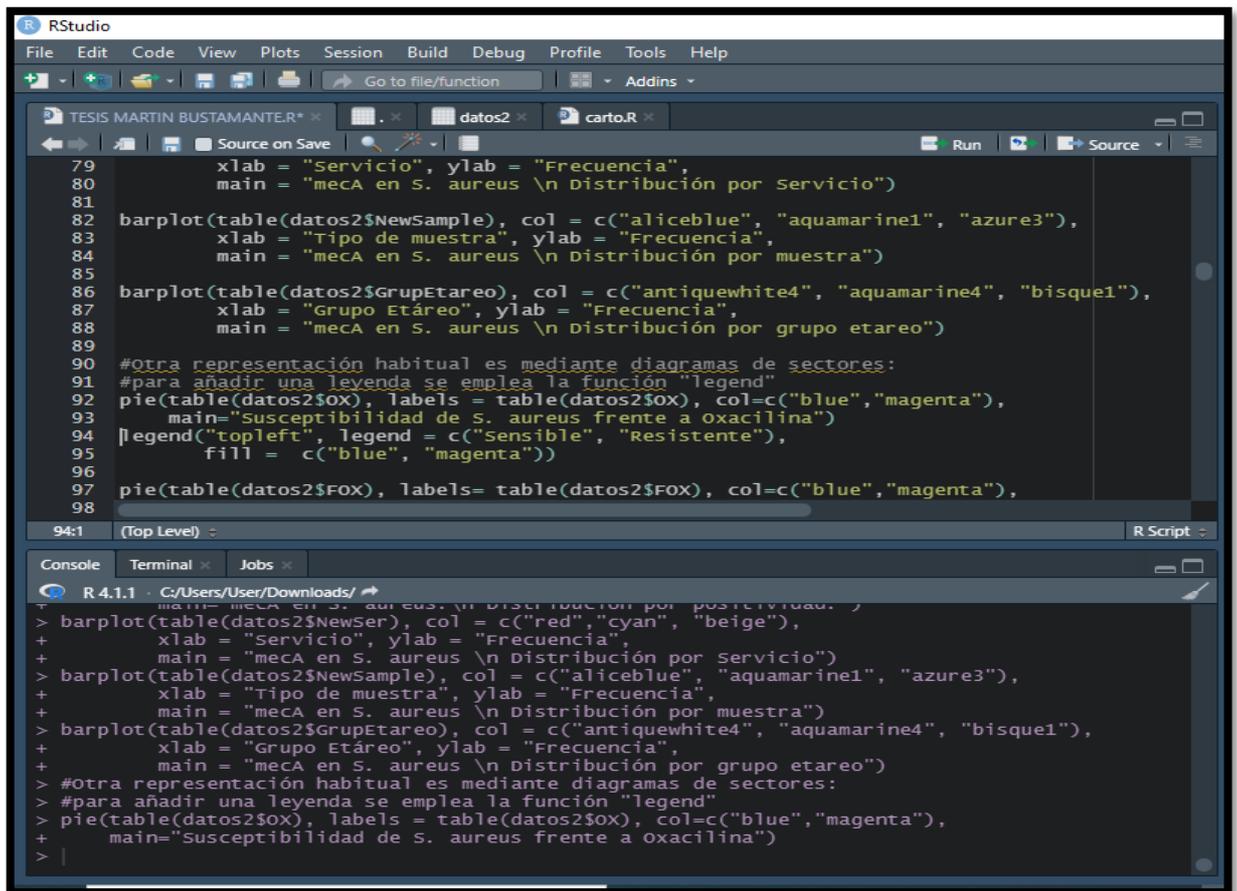


Figura 3. Forma típica de la curva del ADN evaluada en el Nanodrop.

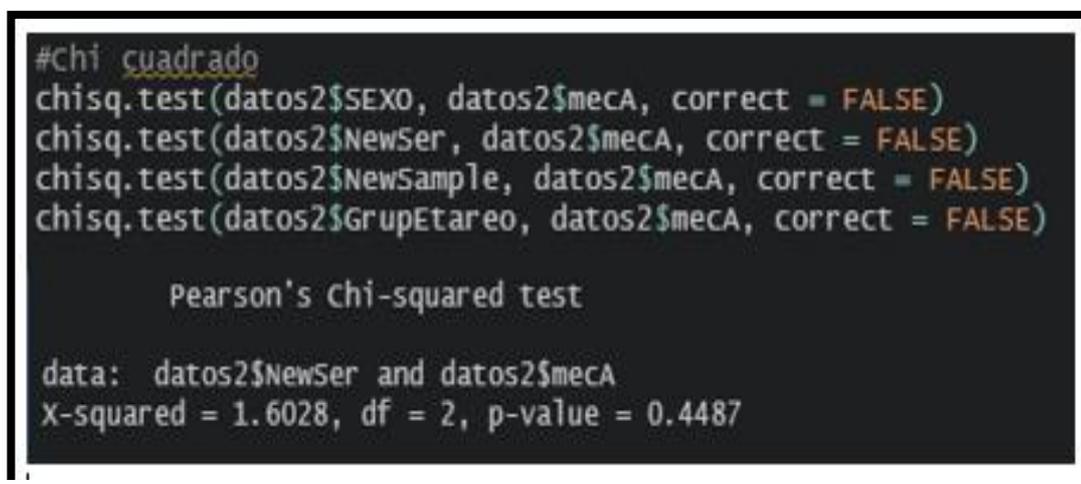
Apéndice 4. Análisis estadístico



```
79     xlab = "Servicio", ylab = "Frecuencia",
80     main = "meca en S. aureus \n Distribución por Servicio")
81
82     barplot(table(datos2$NewSample), col = c("aliceblue", "aquamarine1", "azure3"),
83           xlab = "Tipo de muestra", ylab = "Frecuencia",
84           main = "meca en S. aureus \n Distribución por muestra")
85
86     barplot(table(datos2$GrupEtareo), col = c("antiquewhite4", "aquamarine4", "bisque1"),
87           xlab = "Grupo Etéreo", ylab = "Frecuencia",
88           main = "meca en S. aureus \n Distribución por grupo etareo")
89
90     #Otra representación habitual es mediante diagramas de sectores:
91     #para añadir una leyenda se emplea la función "legend"
92     pie(table(datos2$OX), labels = table(datos2$OX), col=c("blue","magenta"),
93         main="Susceptibilidad de S. aureus frente a oxacilina")
94     legend("topleft", legend = c("sensible", "resistente"),
95           fill = c("blue", "magenta"))
96
97     pie(table(datos2$FOX), labels= table(datos2$FOX), col=c("blue","magenta"),
98         main="Susceptibilidad de S. aureus frente a oxacilina")
```

```
R 4.1.1 > C:/Users/User/Downloads/
+ main="meca en S. aureus \n Distribución por positividad."
+ barplot(table(datos2$NewSer), col = c("red","cyan", "beige"),
+         xlab = "Servicio", ylab = "Frecuencia",
+         main = "meca en S. aureus \n Distribución por Servicio")
+ barplot(table(datos2$NewSample), col = c("aliceblue", "aquamarine1", "azure3"),
+         xlab = "Tipo de muestra", ylab = "Frecuencia",
+         main = "meca en S. aureus \n Distribución por muestra")
+ barplot(table(datos2$GrupEtareo), col = c("antiquewhite4", "aquamarine4", "bisque1"),
+         xlab = "Grupo Etéreo", ylab = "Frecuencia",
+         main = "meca en S. aureus \n Distribución por grupo etareo")
+ #Otra representación habitual es mediante diagramas de sectores:
+ #para añadir una leyenda se emplea la función "legend"
+ pie(table(datos2$OX), labels = table(datos2$OX), col=c("blue","magenta"),
+     main="Susceptibilidad de S. aureus frente a oxacilina")
+ legend("topleft", legend = c("sensible", "resistente"),
+       fill = c("blue", "magenta"))
```

Figura 4. Recorte de la plataforma del Paquete estadístico R v3.0.



```
#chi cuadrado
chisq.test(datos2$SEXO, datos2$meca, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$NewSer, datos2$meca, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$NewSample, datos2$meca, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$GrupEtareo, datos2$meca, correct = FALSE)

Pearson's Chi-squared test

data: datos2$NewSer and datos2$meca
X-squared = 1.6028, df = 2, p-value = 0.4487
```

Figura 5. Evaluación del P-valor de los aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes ubicados en las salas de UCIs, consultorios externos y emergencias, mediante la prueba de chi-cuadrado.

```
#chi cuadrado
chisq.test(datos2$SEXO, datos2$mecA, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$NewSer, datos2$mecA, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$NewSample, datos2$mecA, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$GrupEtareo, datos2$mecA, correct = FALSE)

Pearson's Chi-squared test

data: datos2$SEXO and datos2$mecA
X-squared = 0.42426, df = 1, p-value = 0.5148
```

Figura 6. Evaluación del P-valor de los aislamientos de *S. aureus* positivos al gen *mecA* de acuerdo al tipo de muestra como secreción bronquial, hemocultivos y otro tipo de muestras como esputo, orina y secreción faríngea, mediante la prueba de chi-cuadrado.

```
#chi cuadrado
chisq.test(datos2$SEXO, datos2$mecA, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$NewSer, datos2$mecA, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$NewSample, datos2$mecA, correct = FALSE)
chisq.test(datos2$GrupEtareo, datos2$mecA, correct = FALSE)

Pearson's Chi-squared test

data: datos2$NewSample and datos2$mecA
X-squared = 5.4685, df = 2, p-value = 0.06494
```

Figura 7. Evaluación del P-valor de los aislamientos de *S. aureus* positivos al gen *mecA* en base al sexo, mediante la prueba de chi-cuadrado.