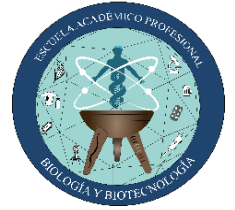




UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

E.A.P DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

Perfil de resistencia y genes de virulencia en aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud-Cajamarca, durante el año 2022

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

PRESENTADO POR:

BACH. COLLANTES MONTENEGRO CHRISTIAN JHOAN

ASESOR:

Dr. RIVERA JACINTO MARCO ANTONIO

CO-ASESOR:

Dr. LLONTOP CORNEJO VÍCTOR JAVIER

CAJAMARCA – PERÚ

2024

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Christian Jhoan Collantes Montenegro**
DNI: **73267882**

Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**

2. Asesor: **Dr. Mblgo. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO**
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

3. Grado académico o título profesional

Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor

4. Tipo de Investigación:

Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico

5. Título de Trabajo de Investigación: **Perfil de resistencia y genes de virulencia en aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud-Cajamarca, durante el año 2022**

6. Fecha de evaluación del Software antiplagio: **4/9/2024**

7. Software antiplagio: **TURNITIN** **URKUND (ORIGINAL) (*)**

8. Porcentaje de Informe de Similitud: **17%**

9. Código Documento: **oid:3117:378387419**

10. Resultado de la Evaluación de Similitud:

APROBADO **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 6 de setiembre del 2024



Dra. MARTHA VICENTA ABANTO VILLAR
DIRECTORA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN FCS-UNC
DNI: 26673990

* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright©

Christian Jhoan Collantes Montenegro

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Collantes, C. 2024. **Perfil de resistencia y genes de virulencia en aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud-Cajamarca, durante el año 2022/** Christian Jhoan Collantes Montenegro.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Dr. Víctor Javier Llontop Cornejo

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC –
2024

Perfil de resistencia y genes de virulencia en aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud-Cajamarca, durante el año 2022

AUTOR: Bach. Christian Jhoan Collantes Montenegro

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESOR: Dr. Víctor Javier Llontop Cornejo

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

Dr. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos



.....
SECRETARIA (O)

Dr. Carmen Eddy Medina Rodríguez



.....
VOCAL

Dr. Luis Gilberto García Izquierdo

Cajamarca, 2024 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 9:00 am del 03 de septiembre del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente I.I-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Perfil de resistencia y genes de virulencia en aislamientos de Staphylococcus aureus provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud - Cajamarca, durante el año 2022

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Christian Thuan Collantes Montenegro

Siendo las 9:40 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: Aprobado, con el calificativo de: 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra Apto para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Rodolfo Orejuela Chirinos), Secretario(a) (Carmen E. Medina Rodríguez), Vocal (Luis E. García Izquierdo), Accesitaria, Asesor (a) (Marco Rivera Jacinto), and Co Asesor (a) (Victor Javier Montop Cornejo).

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)

REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Mis padres, Lucía Montenegro Aliaga y Noel Collantes Camacho y a mi hermano, Jhiban Collantes Montenegro, por su apoyo, sacrificio y amor incondicional que me permiten seguir creciendo, aprendiendo y alcanzando mis metas, por ser guías en mi formación académica y personal, por brindarme la herencia más noble y valiosa que todos anhelan “la educación”

Agradecimiento

A Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para superar los obstáculos y seguir avanzando en la vida; a mis padres y hermanos, porque este trabajo es resultado de su apoyo constante, por su esfuerzo, dedicación y por estar siempre a mi lado.

A mi asesor, el Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto, por creer en mí y en la capacidad para llevar a cabo este proyecto, por contribuir con su experiencia y guiarme durante todo el proceso de formación académica e investigación.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, por el apoyo, motivación y alegría durante todo el proceso; al personal de salud del laboratorio de Microbiología del Hospital II EsSalud-Cajamarca: Blga. Gabriela Cacho Gutiérrez, Blgo. Ángel Fuentes Medina, Tec. Lab Gaby Lizeth Rojas, por su ayuda incondicional durante todo el trayecto de ejecución de esta investigación.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes de la Investigación	3
2.2 Bases teóricas	9
2.2.1 Características de <i>Staphylococcus</i>	9
2.2.2 Patogenia y factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	10
2.2.3 Identificación de <i>S. aureus</i>	11
2.2.4 Resistencia antimicrobiana en <i>S. aureus</i>	12
2.2.5 Tipos de resistencia	13
2.2.6 Mecanismos de resistencia	14
2.2.6.1 Expulsión del antibiótico activo del interior de la célula bacteriana	14
2.2.6.2 Inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas	14
2.2.6.3 Bloqueo de la entrada del antibiótico por modificación del sitio activo	15
2.2.6.4 Limitación o disminución de la permeabilidad de la membrana	16
2.2.7 Resistencia de <i>S. aureus</i> a antibióticos betalactámicos	16
2.2.8 Resistencia de <i>S. aureus</i> a antibióticos no betalactámicos	17
2.2.8.1 Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	17

2.2.8.2	Resistencia a aminoglucósidos	18
2.2.8.3	Resistencia a fenicoles	18
2.2.8.4	Resistencia a tetraciclinas	19
2.2.8.5	Resistencia a oxazolidinonas	19
2.2.8.6	Resistencia a glucopéptidos	19
2.2.8.7	Resistencia a fluoroquinolonas	20
2.2.9	Método de tamizaje de susceptibilidad antimicrobiana de <i>S. aureus</i> mediante el método de disco de difusión	20
2.2.10	Genes de resistencia y virulencia de <i>S. aureus</i>	22
2.2.10.1	Genes de resistencia de <i>S. aureus</i>	22
2.2.10.2	Genes de virulencia de <i>S. aureus</i>	24
2.2.11	Determinación de la presencia de genes de resistencia y virulencia.....	26
CAPÍTULO III		27
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....		27
3.1	Nivel de Investigación	27
3.2	Tipo y Diseño de investigación.....	27
3.3	Diseño metodológico	27
3.3.1	Material Biológico.....	27
3.3.2	Recolección y transporte de los aislamientos	27
3.3.3	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	28
3.3.3.1	Descripción de los aislamientos	28
3.3.4	Reactivación de los aislamientos	28

3.3.5 Evaluación de las características de <i>S. aureus</i>	28
3.3.6 Prueba de la Coagulasa	29
3.3.7 Preparación de los inóculos bacterianos	29
3.3.8 Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana.....	29
3.3.8.1 Determinación de la producción de betalactamasa	31
3.3.8.2 Detección de <i>S. aureus</i> con resistencia inducible a la clindamicina	31
3.3.9 Extracción de ADN por shock térmico	31
3.3.10 Evaluación de la calidad del ADN extraído	32
3.3.11 Reacción en Cadena Polimerasa Múltiple	32
3.3.12 Electroforesis en gel de agarosa	34
3.3.13 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	35
CAPITULO IV.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 Resultados	36
4.1.1 Características de origen de los aislamientos.....	36
4.1.2 Susceptibilidad antimicrobiana.....	36
4.1.3 Evaluación de la producción de betalactamasa mediante disco de penicilina...	38
4.1.4 Detección de la resistencia a la clindamicina inducida por la eritromicina	39
4.1.5 Perfiles de resistencia de los aislamientos de <i>S. aureus</i>	39
4.1.6 Genes de virulencia y resistencia en aislamientos de <i>S. aureus</i>	41
4.1.7 Perfiles genéticos de aislamientos de <i>S. aureus</i>	43

4.1.8 Frecuencia de aislamientos MRSA	44
4.1.9 Características asociadas con la presencia de aislamientos MRSA	44
4.1.10 Frecuencia de <i>S. aureus</i> resistentes según el tipo de muestra.	45
4.1.11 Aislamientos con genes de virulencia-resistencia según tipo de muestra.....	46
4.2 Discusión	48
CAPITULO V	58
5.1 Conclusiones	58
5.2 Recomendaciones	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
APÉNDICES	79

LISTA DE ILUSTRACIONES

Índice de figuras

- Figura 1.** Screening de producción de betalactamasa mediante disco de difusión de la penicilina. 38
- Figura 2.** Detección de la resistencia a la clindamicina inducida por la eritromicina D-test positivo, halo en forma de D. 39
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR múltiplex para los genes *tsst*, *etb* y *eta*. 42
- Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR múltiplex para los genes *blaZ*, *PVL*, *mecA* y *mecC*. 42

Índice de gráficos

- Gráfico 1.** Frecuencia de aislamientos de *S. aureus* según genes de virulencia y resistencia evaluados en este estudio 41
- Gráfico 2.** Porcentaje de aislamientos de *S. aureus* resistentes por tipo de antimicrobiano según tipo de muestra 46
- Gráfico 3.** Frecuencia de aislamientos de *S. aureus* por tipo de genes de virulencia-resistencia en diversas muestras clínicas 47

Índice de tablas

Tabla 1. Clases de enzimas betalactamasas	15
Tabla 2. Genes que confieren resistencia a antibióticos	23
Tabla 3. Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	24
Tabla 4. Lista de antimicrobianos que se utilizaron y criterios de susceptibilidad.	30
Tabla 5. Características de los primers que se utilizaron para la amplificación por PCR múltiple.....	34
Tabla 6. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>S. aureus</i> evaluado con el método del disco de difusión	37
Tabla 7. Perfiles de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de <i>S. aureus</i>	40
Tabla 8. Perfiles genéticos de <i>S. aureus</i> determinado mediante PCRs Múltiple.....	43
Tabla 9. Características de origen asociadas a los aislamientos MRSA y MSSA.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CLSI: Instituto de Normas Clínicas de Laboratorio.

EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos.

MDR: Multidrogorresistencia.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PBP: Proteína fijadora de penicilinas.

rpm: Revoluciones por minuto.

TBE: Tampón tris-ácido bórico-EDTA.

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

uL: Microlitros.

GLOSARIO

blaZ: gen que codifica la producción de betalactamasas, la misma que es responsable de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a los betalactámicos como la penicilina (1).

eta: gen que codifica para la toxina exfoliativa de tipo A, de origen profago y encontrado en un cromosoma. Uno de los principales causantes para desarrollo del impétigo ampolloso (2).

etb: gen que codifica para la toxina exfoliativa de tipo B, se encuentra en un plásmido, Reportado con menos frecuencia, pero junto a la toxina exfoliativa de tipo A es causante síndrome de piel escaldada por estafilococos (2).

iMLS_B: fenotipo de resistencia de *S. aureus* a macrólidos (eritromicina) y sensibilidad a lincosamidas (clindamicina), pero son un achatamiento del halo de la clindamicina próximo de la eritromicina (D-test positivo), es decir resistencia inducible a la clindamicina (3).

mecA: gen que codifica la PBP-2a, proteína que sustituye a las PBPs nativas de la pared celular bacteriana, confiriéndole resistencia a la meticilina y a betalactámicos (4).

PCR múltiplex: reacción que busca la amplificación simultánea en un solo tubo de múltiples secuencias específicas o fragmentos de ADN (5).

PVL: gen que codifica a la exotoxina Leucocidina Pantón-Valentine, la misma que se asocia con la destrucción de leucocitos (6).

Shock térmico: procedimiento físico que requiere de calor y frío para el rompimiento de la pared bacteriana a fin de obtener la molécula de ADN (7).

tsst: gen que codifica para la exotoxina TSST-1 (Toxina del Síndrome del Shock Tóxico 1), la cual puede desencadenar una respuesta inmune exagerada, causando fiebre, disfunción de múltiples órganos, hipotensión, etc. (8).

Mutaciones cromosómicas: alteraciones que afectan a cromosomas completos o a un segmento del cromosoma (genes completos en lugar de nucleótidos individuales), y ocurren porque se pierden fragmentos (delección), se duplican, o cambian de lugar dentro del mismo cromosoma (inversión) o hacia otro (translocación) (9).

Bombas de flujo: transportadores de membrana que mueven activamente iones, solutos o múltiples antibióticos desde el interior hacia el exterior de las células bacterianas (10).

Elementos transponibles: fragmentos de ADN que se mueven de un lugar a otro dentro del genoma, existen elementos transponibles silenciosos los cuales no causan efecto fenotípico alguno, pero los demás si pueden contribuir a mutaciones (11).

Identificación fenotípica: crecimiento y morfología de la colonia bacteriana en varios medios y análisis de reacciones bioquímicas dando referencia de las características variables observadas en miembros de la misma especie (12).

Marcador molecular: fragmentos de ADN ubicados en lugares específicos que se pueden identificar dentro del genoma completo. Se utilizan para “marcar” la posición de un gen de interés, indicando la presencia de la característica deseada (13).

Perfil de resistencia y genes de virulencia en aislamientos de
Staphylococcus aureus provenientes de pacientes atendidos en el Hospital
II EsSalud-Cajamarca, durante el año 2022

Resumen´

La resistencia antimicrobiana (RAM) de *Staphylococcus aureus* actualmente representa un grave problema para la salud pública mundial, debido a sus características genéticas que complican el tratamiento de enfermedades causadas por esta bacteria. **Objetivo:** El objetivo principal de este estudio fue determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana y los genes de virulencia y resistencia de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud-Cajamarca, durante el año 2022. **Materiales y Métodos:** El presente estudio se realizó en 105 aislamientos de *S. aureus*. Los perfiles de resistencia se determinaron mediante el método de disco en difusión y la presencia de los genes de resistencia y genes de virulencia se determinó utilizando una doble PCR múltiplex. **Resultados:** Del total, se identificaron 42 perfiles de resistencia antimicrobiana diferentes, de los cuales el perfil más frecuente fue el de resistencia simultánea a penicilina, cefoxitina, oxacilina, clindamicina, eritromicina, gentamicina y levofloxacin. Entre los genes de resistencia, el gen *blaZ* fue el más frecuente (74,3 %), seguido por el gen *mecA* (42,9 %) y el gen *mecC* (16,1 %). En cuanto a los genes de virulencia, el gen *tsst* estuvo en el 34,3 % de los aislamientos, seguido por los genes *eta*, *etb* y *PVL* que se encontraron en el 6,7 %, 2,9 % y 2,9 % de los aislamientos, respectivamente. Además, el 56,2 % de los aislamientos fueron MRSA, de los cuáles la mayoría provino de muestras bronquiales. **Conclusiones:** El presente estudio concluye determinando que la resistencia antimicrobiana es más frecuente hacia antibióticos del grupo de los betalactámicos, macrólidos y lincosamidas, además, los genes más concurrentes se asocian a la resistencia a la penicilina, metilina y al síndrome de Shock Tóxico.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, MRSA, genes de resistencia, genes de virulencia, resistencia antimicrobiana.

Abstract

Antimicrobial resistance (RAM) of *Staphylococcus aureus* currently represents a serious problem for global public health, due to its genetic characteristics that complicate the treatment of diseases caused by this bacteria. **Objective:** The main objective of this study was to determine the antimicrobial resistance profiles and the virulence and resistance genes of *S. aureus* from patients treated at Hospital II EsSalud-Cajamarca, during the year 2022. **Materials and Methods:** The present study was carried out in 105 *S. aureus* isolates. Resistance profiles were determined by the disk diffusion method and the presence of resistance genes and virulence genes was determined using double multiplex PCR. **Results:** Of the total, 42 different antimicrobial resistance profiles were identified, of which the most frequent profile was simultaneous resistance to penicilin, cefoxitin, oxacilin, clindamycin, erythromycin, gentamicin and levofloxacin. Among the resistance genes, the *blaZ* gene was the most frequent (74,3 %), followed by the *mecA* gene (42,9 %) and the *mecC* gene (16,1 %), Regarding virulence genes, the *tsst* gene was in 34,3 % of the isolates, followed by the *eta*, *etb* and *PVL* genes that were found in 6,7 %, 2,9 %, and 2,9 % of the isolates, respectively. Furthermore, 56,2 % of the isolates were MRSA, of which the majority came from bronchial samples. **Conclusions:** The present study concludes by determining that antimicrobial resistance is more frequent towards antibiotics from the group of betalactams, macrolides and lincosamides, in addition, the most concurrent genes are associated with resistance to penicilin, methicillin and Toxic Shock syndrome.

Key words: *Staphylococcus aureus*, MRSA, resistance genes, virulence genes, antimicrobial resistance

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) representa una grave amenaza para la salud pública mundial. Según una revisión publicada el 2016, se estima que, si no se toman medidas al respecto, las muertes debido a RAM podrían aumentar a 10 millones de personas por año para el 2050 (14). Este pronóstico es respaldado por el proyecto de Investigación Global sobre Resistencia Antimicrobiana, el cual informó que en el 2019 se produjeron aproximadamente 4,95 millones de muertes asociadas a la RAM, incluyendo 1,27 millones atribuidos directamente a ella; dentro de estas cifras *Staphylococcus aureus* causó más de 100 000 muertes (15). *S. aureus* causa el 54,9 % de la mortalidad infecciosa a nivel global, contribuyendo con más de 1 millón de muertes en 135 países (16). En Perú, uno de los pocos estudios realizados reportó aislamientos de *S. aureus* con diversos perfiles de multidrogorresistencia (MDR), destacando la resistencia a penicilina (95,3 %), oxacilina (90,6 %) y sulfametoxazol-trimetoprima (81,3 %) (17).

S. aureus es un microorganismo oportunista causante de múltiples infecciones ya que tiene la capacidad de colonizar a cerca del 30 % en la nariz de los humanos, y frecuentemente varios sitios del cuerpo como la piel, garganta e intestinos, con el potencial de provocar lesiones o alteraciones en estas áreas corporales (18). Además, esta bacteria puede adquirir resistencia antibiótica como resultado del uso inapropiado, excesivo y generalizado de drogas a nivel hospitalario, lo cual implica que la próxima vez que se requiera un antibiótico para tratar esta bacteria, su eficacia se verá reducida o incluso será nula, lo que puede resultar en aumento de los costos hospitalarios del paciente, una prolongación del tiempo de estadía y un aumento en tasa de mortalidad.

La escasa disponibilidad de información sobre el perfil de resistencia de *S. aureus* en los establecimientos hospitalarios del país constituye un desafío significativo en el control de este tipo de enfermedades. La mayoría de estudios se centran en investigar los reservorios de la bacteria y la resistencia a meticilina (MRSA), lo cual genera un sesgo que limita la comprensión total del problema. Además, en las infecciones producidas por esta bacteria están involucradas diversas proteínas extracelulares y toxinas codificadas por complejos de genes, que confieren resistencia y virulencia al microorganismo. Los genes de resistencia y los factores de virulencia se presentan con diferente frecuencia, si bien, no siempre coexisten en los elementos genéticos de la bacteria, la expresión génica se ve influenciada y por ende la determinación de la resistencia bacteriana (19).

Basado en lo descrito previamente, el objetivo de esta investigación ha sido determinar el perfil de resistencia y la presencia de genes de resistencia y virulencia en aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud de Cajamarca, durante el año 2022. Para ello se emplearon procedimientos microbiológicos convencionales para determinar la susceptibilidad a 15 antimicrobianos y técnicas moleculares como PCR múltiple para determinar la presencia de 3 genes de resistencia y 4 genes de virulencia. Los hallazgos revelan que los perfiles de resistencia y la presencia de genes muestran un problema relevante para la salud pública en Cajamarca, motivo suficiente para alertar a las autoridades sanitarias, con el fin de establecer tratamientos y programas de vigilancia adecuados frente la aparición y propagación de nuevas cepas bacterianas MDR que puedan generar complicaciones.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

Liang y colaboradores (2018), con el objetivo de determinar la prevalencia, resistencia a antimicrobianos y los principales genes de virulencia de 187 aislamientos de *S. aureus* provenientes de diferentes fuentes clínicas en el Sur de China, analizaron el perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de Kirby Bauer y detectaron la presencia de genes (*sea*, *seb*, *sec*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *tsst* y *PVL*) mediante PCR múltiple. Encontraron que el 66,2 % de los aislamientos eran MDR, el 64,1 % resistente a eritromicina, el 48,5 % a clindamicina, 36,9 % a gentamicina y 33,9 % a ciprofloxacina. También revelaron que el 94,2 % de aislamientos de MRSA albergaban genes de virulencia, resaltando con 86,4 % el gen *hla*, con un 27,2 % el gen *PVL* y con un 3,9 % el gen *tsst*. Concluyen sugiriendo que gentamicina y ciprofloxacina deben ser utilizados con mucha precaución para evitar la propagación de bacterias MDR (20).

Nakadomari y colaboradores (2019), desarrollaron un sistema de PCR múltiple en Brasil, con el fin de optimizar las condiciones y concentraciones de los componentes de la PCR para determinar simultáneamente la presencia de los genes *blaZ*, *PVL*, *mecA* y *mecC*. De 46 aislamientos de *Staphylococcus* spp. encontraron que el 21,7 % de los aislamientos presentaron la coexistencia de los genes *mecA* y *blaZ*, el 2,17 % presentó los genes *mecA* y *mecC*, el 32,6 % presentaron solo el gen *blaZ* y ninguno presentó el gen *PVL*. Concluyen afirmando que la PCR múltiple es una herramienta útil, para un diagnóstico molecular rápido y preciso de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos betalactámicos en *Staphylococcus* (21).

Bastidas y colaboradores (2019), con el propósito de determinar el perfil de susceptibilidad y la prevalencia de colonización de *S. aureus* en estudiantes de la Universidad de las Américas en Ecuador, analizaron 322 hisopados nasales y faríngeos mediante procedimientos microbiológicos tradicionales; además, detectaron la presencia de los genes *mecA* y *lukS-PV/lukF-PV* mediante PCR múltiple. Determinaron que *S. aureus* estuvo presente en un 57,8 % de los hisopados, los cuales fueron resistentes a penicilina en 93,5 %, oxacilina en 79,6 %, azitromicina en 61,8 %, eritromicina en 52,7 % y clindamicina en 39,2 %. La frecuencia del gen *mecA* en aislamientos de MRSA fue de 6,1 % y la frecuencia de los genes *lukS-PV/lukF-PV* fue del 3,2 % en *S. aureus*, de estos 2,7 % eran MRSA (22).

Martínez y colaboradores (2020), en su estudio prospectivo transversal analizaron la epidemiología molecular de *S. aureus* en un hospital de México. Identificaron 66 aislamientos de *S. aureus* mediante procedimientos microbiológicos convencionales y determinaron su perfil de susceptibilidad utilizando el sistema automatizado Vitek[®], encontrando que 25,7 % presentaba resistencia a meticilina. Además, mediante PCR determinaron la presencia de 8 genes involucrados en la virulencia (*clfA*, *ebpS*, *fnbA*, *clfB*, *bbp*, *fnbB*, *cna*, *PVL*) con una frecuencia del 100 %, 100 %, 84,6 %, 84,8 %, 78,8 %, 63,3 %, 53,0 % y 3,0 % respectivamente. Concluyen proporcionando nuevos datos de epidemiología regional y nacional de *S. aureus*, contribuyendo a mejorar su control y vigilancia (23).

Houri y colaboradores (2020), con el objetivo de analizar la RAM en 80 aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en un hospital de Teherán, en el que utilizaron el método de Kirby Bauer para determinar la susceptibilidad antimicrobiana. Encontraron que la tasa de resistencia para la penicilina, eritromicina, tetraciclina y clindamicina fue del 96,2 %, 85,0 %, 60,0 %, 43,7 % respectivamente, también encontraron que el 51,2 % de los aislamientos eran resistentes a tres o más antimicrobianos, por lo que se los consideró como MDR. Así mismo para determinar la presencia de diversos genes que codifican exotoxinas, diseñaron conjuntos múltiple de PCR, encontrando la presencia de los genes *sea*, *sec*, *seb*, *tsst*, *eta* y *etb* en un 51,2 %, 23,7 %, 15,0 %, 33,7 %, 3,7 % y 0 % respectivamente. En el 63,7 % de los aislados que se confirmó que fenotípicamente eran MRSA, estuvo presente el gen *mecA* (24).

Ackers-Johnson y colaboradores (2021), determinaron el perfil de resistencia antimicrobiana de *S. aureus* asociada a enfermedades en un Hospital de Uganda. El perfil de 41 aislamientos se evaluó mediante el método de difusión en disco, obteniendo como resultado que el 73,0 % de aislamientos fue resistente a uno o más antibióticos, de ellos 32,0 % fue resistentes a un antibiótico, 41,0 % fue resistente a dos antibióticos y 24,0 % presentó resistencia a mínimo tres clases de antibiótico por lo que se consideraron como aislamientos MDR. Concluyeron que los hallazgos obtenidos fueron muy similares a los descritos en otras investigaciones, resaltando la necesidad de una vigilancia epidemiológica continua que genere conocimientos que sirvan para plantear estrategias de control eficaces (25).

Cabrejos y colaboradores (2021), con el fin de determinar la frecuencia de aislamientos de MRSA, el patrón y genotipo de RAM, recolectaron 115 aislamientos de *S. aureus* de pacientes atendidos en el Hospital Cayetano Heredia de Lima, Perú, los cuales fueron trasladados al Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humboldt” para su identificación por procedimientos microbiológicos convencionales. La técnica de Kirby Bauer fue utilizada para determinar el perfil de susceptibilidad, mientras que la PCR múltiple fue empleada para detectar los genes *PVL* y *mecA*. Los aislamientos positivos fueron obtenidos de secreciones no específicas, de sangre, secreciones traqueobronquiales, y piel en un 21,7 %, 20,0 %, 14,8 % y 14,8 % respectivamente. Concluyen determinando que el 41,6 % de los aislamientos portaba el gen *mecA*, por lo tanto fueron identificados como MRSA, de los cuales más del 75,0 % demostró ser resistente a eritromicina, gentamicina, clindamicina y ciprofloxacina. La frecuencia del gen *PVL* fue de 8,7 % (26).

Tasneem y colaboradores (2022), identificaron genes de virulencia, el patrón de susceptibilidad antimicrobiana y su correlación con el gen *mecA* de *S. aureus* provenientes de muestras clínicas en Pakistán. Para ello recolectaron 62 muestras, determinaron la susceptibilidad antimicrobiana siguiendo las pautas del CLSI y buscaron los genes de virulencia mediante PCR. Se encontró resistencia a penicilina en 100 %, eritromicina en 83,9 %, ciprofloxacino en 70,9 %, tetraciclina en 20,0 %, clindamicina en 30,6 % y linezolid en 3,2 % de los aislamientos. El gen *mecA* se presentó con una frecuencia de 69,4 % y los genes de virulencia *sea*, *seb*, *sed* y *tsst* en un 53,2 %, 30,6 %, 3,2 % y 24,2 %, respectivamente. Finalizan informando la presencia de aislamientos MDR, atribuyéndolos a fallas en los tratamientos (27).

Bustamante y colaboradores (2023), determinaron que tan frecuente es el gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus* provenientes del Hospital Regional Docente de Cajamarca, Perú. Evaluó 71 aislamientos mediante procedimientos microbiológicos convencionales, para la susceptibilidad antimicrobiana utilizó la técnica de difusión en disco con cefoxitina y oxacilina, y determinó la frecuencia del gen *mecA* mediante PCR. Encontró que del total de aislamientos el 69,0% fueron resistentes a oxacilina y el 60,6 % a cefoxitina y la frecuencia del gen *mecA* fue de 56,3 %, los cuales fueron encontrados con mayor frecuencia en salas de UCIs y consultorios externos, con 19 aislamientos cada uno. Concluye recomendando que se deben realizar más estudios con el fin de determinar los diferentes mecanismos de resistencia que posee esta bacteria, y que permita evaluar la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en Cajamarca (28). En este estudio se aprecia la limitación para determinar la presencia de otros genes de resistencia, por lo que se busca profundizar e incorporar nuevos datos mediante la presente investigación.

Ismael y colaboradores (2023), con el propósito de detectar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana y genes de virulencia en *S. aureus* en la ciudad de Salah Al-Din en Irak, obtuvieron 98 aislamientos de un hospital, a los cuales se les realizó la prueba de difusión en disco, demostrando que la resistencia hacia la vancomicina y amoxicilina fue de un 100 %. Así mismo, la presencia de MRSA fue del 100 %, por lo que la frecuencia del gen *mecA* dada por PCR multiplex también fue del 100 %, el gen *sea* también estuvo presente en un 100 %; sin embargo, genes como el *seb*, *sec* y *tsst* no estuvieron presentes. Concluyen el estudio resaltando las altas tasas de RAM, y, por otro lado, asumen que la ausencia de los otros genes de virulencia se debe a que existen diversos rasgos genéticos asociados a los síntomas de las enfermedades generados por esta bacteria (29).

Agbo y colaboradores (2024), con el objetivo de estimar la distribución de marcadores de resistencia en aislamientos de *S. aureus* en Nsukka, sur-este de Nigeria durante el 2021, trabajaron con 154 aislamientos clínicos, obtenidos de 15 hospitales. Para ello, utilizaron técnicas de cultivo convencionales, por medio de las cuales fenotípicamente determinaron alto grado de resistencia frente a oxacilina, eritromicina, meticilina y vancomicina, con frecuencias de 91,7 %, 81,6 %, 75,5 % y 47,3 % respectivamente, a su vez encontraron que en la mayoría de bacterias hubo coexistencia de resistencia hasta de diez antibióticos. La presencia de marcadores fue determinada mediante PCR, y encontraron que el gen *mecA* estuvo en 32,1 % de los aislamientos, mientras que los genes *ermB* y *ermC*, cada uno estuvo en 10,7 % de los aislamientos (30). Este estudio buscó apoyar la generación de evidencias para tomar medidas y decisiones sobre el uso de los medicamentos en los establecimientos hospitalarios, y es lo que con este trabajo también se busca, ya que hay muchos sesgos y dificultades para abordar este problema.

Llasha S. (2024), determinó el perfil de resistencia de 96 aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en un Hospital de Cajamarca-Perú. Utilizando el disco de cefoxitina (30 ug) determinó que 64,0 % de los aislamientos fueron MRSA, de los cuales el 88,0 % provenían de muestras de origen respiratorio. También encontró que los aislamientos presentaron mayor resistencia a la clindamicina y a la eritromicina con una prevalencia del 66,6 % y 65,3 % respectivamente. Por otro lado, reportó el predominio del perfil de resistencia en el cual los aislamientos fueron resistentes a cefoxitina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina y gentamicina con una prevalencia del 82,6 %. Concluye afirmando la multirresistencia de los aislamientos por lo que recomienda implementar la vigilancia epidemiológica en los Hospitales de la ciudad (31).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Características de *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* está conformado por un grupo heterogéneo de bacterias; este grupo posee en común la ausencia de endosporas, su reacción a la tinción Gram ya que son Gram positivas, su forma esférica y su diámetro de 0.5 a 1.5 μm . Son bacterias anaerobias facultativas que pueden crecer a una concentración de sal de hasta el 10 % y a una temperatura de 18 - 40 °C, son inmóviles, sin cápsula, excepto algunas que poseen una capa de polisacárido (32). Se caracterizan por agruparse como células únicas, en pares, tétradas, cadenas o formando racimos en forma de uva y por tener una gran capacidad de adaptación, por lo que afectan a todas las especies de mamíferos, incluyendo el ser humano. Debido a su fácil adaptación es que pueden propagarse con mucha facilidad de una especie a otra (33).

El género *Staphylococcus* comprende 52 especies, de las cuales solo 17 han sido encontradas en muestras biológicas de humanos. Estas especies también se pueden agrupar en dos subgrupos mediante una sencilla prueba de coagulasa: *Staphylococcus* coagulasa positivos, cuyo representante es *S. aureus* y el grupo de los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) (34). Este género bacteriano conforma un grupo importante de patógenos del ser humano y origina un amplio espectro de enfermedades que pueden poner en peligro su vida. Las especies asociadas a complicaciones clínicas en humanos son *S. aureus* (el más conocido y virulento del género), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, y *Staphylococcus saprophyticus* (32).

S. aureus fue encontrado por primera vez en el pus de una herida quirúrgica, por Alexander Ogston en 1880, dos años después recibe el nombre de *Staphylococcus* gracias a la forma en la que aparecen en la coloración Gram (33). Es un microorganismo aerobio facultativo, coagulasa positiva, catalasa positiva, oxidasa negativa, tolera altas concentraciones de sal y, en Agar Sangre, se presenta en forma de colonias amarilladoras gracias a los carotenoides producido por la bacteria y donde a menudo es beta-hemolítico debido a la producción de las hemolisinas. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal de los humanos, encontrándose principalmente en la piel y en las mucosas; sin embargo, causa infecciones en diversas zonas del cuerpo. (33,35).

2.2.2 Patogenia y factores de virulencia de *S. aureus*

Las infecciones causadas por *S. aureus* están entre las más comunes en humanos. Incluyen bacteriemia, infecciones a la piel, endocarditis infecciosa, infección de tejidos blandos, infecciones pulmonares, infecciones del tracto urinario, etc., y según las cepas involucradas y el sitio de acción pueden causar enfermedades invasivas o mediadas por toxinas (36). La bacteria evade la respuesta inmunitaria del hospedero mediante mecanismos como: la producción de una cápsula antifagocítica, el secuestro de anticuerpos por medio de la proteína A, la formación de biopelículas, la supervivencia en el interior de la célula y el bloqueo de la acción leucocitaria (37). Entre los superantígenos estafilocócicos está la TSST-1 o toxina 1 del síndrome de shock tóxico, un factor de virulencia asociado a la endocarditis infecciosa y a la sepsis. También se encuentran las infecciones de neumonía, las cuales están asociadas a la producción de PVL (*Panton-Valentine leukocidin*), de proteína A y de alfa- hemolisina (38).

Los factores de virulencia favorecen el éxito de la bacteria como agente causal de diversas enfermedades humanas, debido a que ayudan a que la bacteria se adhiera a la célula hospedera, rompiendo el escudo inmunológico del individuo, causando invasión de tejidos y provocando algunos síndromes mediados por toxinas (35). Entre los factores de virulencia más comunes encontramos a las proteínas de unión a fibronectina A y B, la proteína de unión a colágeno y el factor de aglomeración A y B, los cuales ayudan en la unión de las proteínas de la superficie celular bacteriana con las moléculas del hospedero, como el colágeno, fibronectina y el fibrinógeno (39).

También están aquellas que evaden la inmunidad del hospedero, aquí se encuentran la microcápsula de polisacárido, que resiste a la fagocitosis y a la muerte por fagocitos polimorfonucleares. La proteína A, que se une a la porción Fc, funciona como superantígeno de la inmunoglobulina evitando la opsonización. La PVL, consta de dos componentes proteicos *LukS-PV* y *LukF-PV* y actúan formando porinas en la membrana celular hospedera, lo que provoca la fuga del contenido celular y la muerte celular. La alfa toxina ocasiona formación de poros en la membrana celular, conllevando a la muerte de las células. La beta, gama y delta toxina son hemolisinas que provocan lisis eritrocitaria (35,39,40).

2.2.3 Identificación de *S. aureus*

Para la identificación de *S. aureus*, se realiza la coloración Gram y diversas pruebas bioquímicas como la catalasa y la fermentación de glucosa, debido a que nos ayudan a diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también es catalasa positivo, pero no fermenta la glucosa.

Por otro lado, para confirmar si efectivamente es *S. aureus* se realiza la prueba de coagulasa, en la cual dicha enzima y el factor de aglomeración le permiten a la bacteria formar un coagulo a partir de proteínas plasmáticas empleadas como reactivo revelador, diferenciándola de los demás estafilococos a los que se les denomina SCN. Su capacidad de crecer a concentraciones elevadas de sal es aprovechada para el aislamiento de *S. aureus* en medio salinos, por ejemplo, en Agar Manitol, el cual es un medio selectivo, el cual inhibe el crecimiento de otros microorganismos (41). La identificación molecular de *S. aureus* implica pruebas que se basen en el análisis del material genético por PCR de genes específicos de la especie, como el gen de la nucleasa (*nuc*), coagulasa (*coa*), factor de aglomeración (*clfA*) y de la proteína A (*spa*) (42).

2.2.4 Resistencia antimicrobiana en *S. aureus*

La RAM es la capacidad que tienen los microorganismos para tolerar un fármaco o grupo de fármacos y crecer sin sufrir alteración alguna de su proceso de desarrollo. Es importante considerar la RAM de *S. aureus* en enfermedades infecciosas, ya que constituyen uno de los aspectos más relevantes en pediatría, en pacientes inmunocomprometidos, dentro del ámbito hospitalarios y cada vez más frecuente en el ámbito comunitario (43). La RAM es considerada una amenaza mundial para la salud pública en todos los sistemas de salud alrededor del mundo (44). Las organizaciones de salud y los sistemas de vigilancia de todo el mundo afirman que la RAM es un problema global primordial, debido a que las poblaciones de humanos y animales pueden expandirla fácilmente, debido al comercio internacional, la globalización, el aumento de alimentos para animales y el fácil acceso a los antimicrobianos en los países de escasos recursos y los desarrollados (45).

La RAM puede darse frente a un antimicrobiano, como ocurre en la mayoría de los casos; sin embargo, hay microorganismos capaces de tener resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos, los cuales se denominan MDR (46). Este fenómeno es un proceso natural; sin embargo, el uso excesivo de los antimicrobianos, sumado a factores asociados a la bacteria, al paciente, médico y entorno, contribuyen a acelerar parte del proceso de resistencia (47). La explicación a este problema también deriva en los genes de resistencia involucrados junto a otros factores externos (48). Sea cual sea la forma, la RAM ocurre cuando el gen se expresa y como resultado se originarán mutaciones al azar en los genes de los plásmidos o cromosomas (49).

2.2.5 Tipos de resistencia

La RAM puede variar mucho dentro de los diferentes grupos bacterianos relacionados, su origen puede ser natural y adquirida o transmitida (50). La resistencia natural, puede ser intrínseca o constitutiva (siempre se expresa), por lo que se considera un rasgo universal natural entre especies bacterianas, ya que es independiente de los antibióticos y tampoco se relaciona con la transferencia horizontal de genes (THG), o inducida donde los genes están presentes en la bacteria, pero se expresan luego de que la bacteria es expuesta a antibióticos (51). La resistencia adquirida se refiere a la capacidad de las bacterias para adquirir material genético que les confiera resistencia. Esta capacidad la pueden adquirir mediante mecanismos como: transformación, transposición y conjugación, que son las principales vías mediante las cuales las bacterias pueden incorporar material genético externo, esta adquisición de nuevos genes es mediada principalmente por plásmidos, la cual puede ser permanente o temporal (52).

2.2.6 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de RAM mediados por las bacterias se dividen en cuatro principales categorías: Inactivar el antibiótico, modificar el objetivo de un antibiótico, limitar la absorción de un antibiótico y expulsar el antibiótico activo. En la resistencia intrínseca puede estar presente la inactivación del antibiótico, la limitación de la capacidad de absorción y la expulsión del antibiótico, en cambio en la resistencia adquirida se utilizan mecanismos como la inactivación del antibiótico, la modificación del objetivo del antibiótico y la expulsión del antibiótico. En el caso de las bacterias Gram negativas utilizan los cuatro mecanismos, mientras que las Gram positivas como *S. aureus* utilizan con poca frecuencia la limitación de la absorción del antibiótico debido a que no poseen la membrana externa de lipopolisacárido (53).

2.2.6.1 Expulsión del antibiótico activo del interior de la célula bacteriana

Intervienen bombas de flujo dependiente de la energía en el interior de la célula bacteriana, transportando el antibiótico hacia el exterior sin modificaciones ni acciones antimicrobianas (54,55). El flujo de los antibióticos es mediado por proteínas transmembranales, por ello se asocia a las bombas de flujo como causantes principales de la resistencia en Gram positivas y en Gram negativas. Es considerado un mecanismo que confiere resistencia a quinolonas, cloranfenicol, betalactámicos y tetraciclina (56).

2.2.6.2 Inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas

La RAM mediada por destrucción o modificación del antibiótico, se caracteriza por la participación de enzimas hidrofílicas, las cuales hidrolizan el antimicrobiano. Es el mecanismo más común de resistencia adquirida y un claro ejemplo representa la acción de las betalactamasas (tabla 1), que actúan hidrolizando el anillo betalactámico de los

antibióticos betalactámicos. Otra enzima es la eritromicina esterasa que destruye el anillo lactona de antibióticos como los macrólidos. Entre las enzimas que modifican la estructura están el cloranfenicol acetiltransferasa y también aquella que modifica los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (56).

Tabla 1. Clases de enzimas betalactamasas

CLASES DE BETALACTAMASAS	
Clase A	Penicilinasas
Clase B	Betalactamasas
Clase C	Cefalosporinas
Clase D	Oxacilinas

2.2.6.3 Bloqueo de la entrada del antibiótico por modificación del sitio activo

Esto se debe a una pérdida de afinidad entre el antibiótico y su sitio de acción (pared celular, membrana celular, subunidad 30S o 50S ribosomas, etc.) impidiendo ejercer su acción. La modificación del aminoácido genera un sitio diana incompatible con el antimicrobiano. Aquí encontramos dos tipos de modificaciones (57).

- Modificación de PBP, la cual permite la síntesis de peptidoglicano en Gram positivas, si se produce una modificación y/o mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos se va a producir la resistencia (56). Además, los MRSA, generan PBP-2a. transpeptidasa de clase B, la cual toma el control de la función biosintética por sobre las PBPs nativas, ya que éstas últimas se inactivan al unirse a los antimicrobianos. Por lo tanto, los *S. aureus* con esta característica son resistentes a meticilina y se consideran resistentes a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, y cefalosporinas (excepto ceftarolina)(4).

- Modificación ribosomal, en la subunidad 30S como 50S, los cuales son sitios de acción de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas. Si en *S. aureus* se dan metilaciones del ARN ribosoma de la subunidad 50S se genera resistencia frente a tetraciclina, cloranfenicol y macrólidos. Lo mismo pasa con la subunidad 30S, generándose resistencia contra gentamicina, tobramicina y amikacina (56).

2.2.6.4 Limitación o disminución de la permeabilidad de la membrana

Cuando se generan cambios en receptores específicos o proteínas como las porinas que permiten el paso de sustancias por la membrana se genera la disminución de la permeabilidad, de esta manera pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria, generando que el antimicrobiano no pueda ingresar al interior de la célula y no pueda alcanzar el núcleo celular. Este es un mecanismo frecuente en la resistencia natural y en Gram negativas, ya que poseen canales conocidos como porinas (53,57).

2.2.7 Resistencia de *S. aureus* a antibióticos betalactámicos

En la década de 1940, cuando en EE. UU se reportaron informes de tasa mortalidad de 82 % causadas por esta bacteria, se introdujo la penicilina; sin embargo, 10 años después, los aislamientos de esta bacteria se mostraban resistentes en altos niveles, debido a la presencia del gen *blaZ* (1), un gen plasmídico que codifica para la producción de betalactamasas, enzimas responsables de la resistencia a penicilina. Fue ahí cuando se introdujo la meticilina, la cual parecía que resolvería el problema; sin embargo, pocos años después se descubre los primeros aislamientos MRSA (58,59). De ahí se reporta que la resistencia a penicilina y a meticilina se debe a la ausencia o baja afinidad de la PBP-2a, la cual tiene como función catalizar reacciones de transpeptidación del peptidoglicado durante la formación de la pared bacteriana (60,61).

S. aureus produce naturalmente cuatro PBPs (PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4) que normalmente son inhibidas por los betalactámicos, incluyendo la meticilina. Sin embargo, los aislamientos MRSA sintetizan una PBP adicional, conocida como PBP-2a que, en presencia de la meticilina, continúan con la formación de la pared bacteriana aun cuando las demás PBPs hayan sido inhibidas, debido a que esta molécula adicional bloquea la unión de cualquier betalactámico a su sitio activo. Esta PBP-2a está codificada por el gen *mecA*, dentro del cromosoma de MRSA, formando parte de la isla genómica móvil *SCCmec* (4,59). Es gracias al mecanismo mencionado, que *S. aureus* puede presentar resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas semi-sintéticas como la oxacilina y cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta e incluso quinta generación como la ceftarolina.

2.2.8 Resistencia de *S. aureus* a antibióticos no betalactámicos

2.2.8.1 Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

Los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas tipo B (MLS_B), son antibióticos que habitualmente son utilizados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas, los tres son químicamente distintos, pero poseen un mecanismo de acción parecido, el cual consiste en inhibir la síntesis proteica de la bacteria, debido a que se unen al sitio P de la subunidad ribosomal 50S. La resistencia a estos antibióticos se genera por medio de dos mecanismos: bombas de expulsión activa y modificación del sitio blanco. Todo el mecanismo de resistencia se debe el gen *erm*, el mismo que codifica a una enzima metilasa, que actúa sobre la subunidad ribosomal 23S, ocasionando resistencia cruzada entre los tres antibióticos. La resistencia MLS_B, puede ser constitutiva (cMLS_B) o inducible (iMLS_B), este último en el caso de la resistencia inducible de clindamicina por eritromicina (62,63).

Para determinar el fenotipo iMLS_B se utiliza el método de disco de difusión (D-test), el cual es un método aceptado por la especificidad cercana al 100 % comparado con estudios de genotipificación, por lo que constituye un método estándar para identificar aislamientos que presentan resistencia a clindamicina inducida por la eritromicina (D-test positivos), en el que se forma un halo en forma de D en el disco de clindamicina, inducido por el disco de eritromicina. Los fenotipos D-test negativos pueden darse, de modo que exista resistencia a la eritromicina y la sensibilidad a la clindamicina, pero sin formación del halo en forma de D (64).

2.2.8.2 Resistencia a aminoglucósidos

Aquí se encuentran antibióticos como la kanamicina, gentamicina estreptomicina y tobramicina, actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse de forma irreversible a la subunidad ribosomas 30S. Pueden impedir la elongación de aminoácidos para la formación proteica o generar traducciones erróneas de ARNm, lo que conlleva a alteraciones ribosomales generando pérdida de afinidad por parte de los antibióticos. Esta resistencia suele estar codificada por genes como los mostrados en la tabla 2.

2.2.8.3 Resistencia a fenicoles

El cloranfenicol pertenece a este grupo, el mismo que se une a la subunidad ribosomal 50S, y al igual que los aminoglucósidos bloquea la síntesis proteica, con la diferencia que el cloranfenicol inhibe la enzima peptidil transferasa. La resistencia se genera por modificaciones en el sitio blanco, ya sea por enzimas o por modificación de la permeabilidad bacteriana. Esta resistencia esta codificada por genes mostrados en la tabla 2 (65).

2.2.8.4 Resistencia a tetraciclinas

Estos antibióticos también inhiben la síntesis proteica gracias a que se unen a la subunidad ribosomal 30S. La resistencia de *S. aureus* se basa en los genes que alberga la bacteria. Los genes *tet(K)* y *tet(L)* ayudan en la expulsión del antibiótico, mientras que los genes *tet(M)* y *tet(O)* favorecen la modificación del sitio blanco. Si se estudia estos genes en *S. aureus*, el más frecuente es el *tet (K)* (66).

2.2.8.5 Resistencia a oxazolidinonas

El linezolid es una oxazolidinona de última línea, utilizado para terapia en infecciones causadas por MRSA y por MSSA (67). Actúa a nivel del ARNr 23S, bloqueando la síntesis de proteínas. El efecto que el linezolid tiene sobre la expresión de proteínas es que conlleva a una expresión reducida de toxinas y cantidades reducidas de proteínas asociadas a la patogenia de la bacteria. Lo que probablemente contribuye a la eficacia clínica del antibiótico (68). La resistencia hacia este antibiótico se asocia a mutaciones en el sitio diana, en proteínas ribosómicas y a la adquisición de genes (tabla 2).

2.2.8.6 Resistencia a glucopéptidos

El máximo representante es la vancomicina, antibiótico que interrumpe la correcta síntesis de la pared bacteriana. Esta forma enlaces de hidrógeno, uniéndose a los restos terminales de D-alanil-D-alanina (d-Ala-d-Ala) del lípido precursor II, de modo que esta unión altera la incorporación del precursor (N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina) a la cadena de peptidoglicano, conduciendo a la descomposición bacteriana (69). Actualmente, el aumento de reportes de esta resistencia va en aumento, lo que implica la presencia de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) y *S. aureus* con resistencia completa a vancomicina (VRSA). La resistencia a este antibiótico esta mediado por al menos 11 genes, algunos de ellos se describen en la tabla 2 (70).

2.2.8.7 Resistencia a fluoroquinolonas

En este grupo de antimicrobianos sintéticos, destaca la levofloxacin y la ciprofloxacina. Estos actúan inactivando la ADN-girasa y la ADN-topoisomerasa IV, de modo que inhiben la replicación del ADN y por ende la multiplicación bacteriana. *S aureus* desarrolla resistencia a este grupo de antimicrobianos, mediante mutaciones conferidas por diversos genes, algunos están listados en la tabla 2. Esta resistencia también se asocia a la sobreexpresión de las bombas de flujo y a cambios en el tipo de aminoácidos en las enzimas bacterianas (71).

2.2.9 Método de tamizaje de susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus*

mediante el método de disco de difusión

El método de disco de difusión, también conocido como Kirby Bauer, es un método estandarizado muy utilizado en los laboratorios para pruebas de susceptibilidad de antimicrobianos. Este método es principalmente cualitativo y clasifica a los aislados bacterianos como sensible, resistente o intermedio, en función a la inhibición del crecimiento del aislado alrededor del disco que contiene el antimicrobiano. Consiste en depositar discos de papel impregnados con los diferentes antimicrobianos en una placa con agar, que por lo general es agar Mueller Hinton, que contenga el inóculo del microorganismo de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL.

La concentración aproximada de la suspensión (en UFC/mL) se obtiene comparando la turbidez de la suspensión con el tubo 0.5 de la escala de McFarland. Las placas se incuban de 16-24 horas a 37 °C y al final se comprueba las zonas de crecimiento, observando las zonas de inhibición y midiendo el diámetro, para luego comparar con criterios estándar (72). Los datos se interpretan en base al CLSI (73) o al EUCAST (74), de dónde se concluye que la bacteria puede ser sensible, intermedio, sensible dosis dependiente o resistente. Las definiciones de estas categorías son las siguientes:

- Sensible: Indica que la infección asociada al aislamiento para el que se ha determinado su respectivo halo de inhibición, se puede tratar de forma adecuada empleando dosis habituales del antimicrobiano (75).
- Intermedio: Nos indica que el halo de inhibición está entre sensible y dosis dependiente, se asocia a un efecto terapéutico incierto. *In vivo* implica que la bacteria puede ser inhibida o destruida si se administra el antibiótico en una dosis más elevada a la probada *in vitro* (73).
- Sensible dosis dependiente: Esta respuesta en el antibiograma surge en función de la concentración del disco del antibiótico. A medida que la concentración aumenta, la respuesta del microorganismo disminuye (73).
- Resistente: Resultado en dónde la bacteria no es inhibida por las concentraciones habitualmente usadas del antimicrobiano, esto posiblemente se deba a la existencia de mecanismos de resistencia específicos para el agente estudiado, por lo cual no habrá una respuesta clínica exitosa (75).

2.2.10 Genes de resistencia y virulencia de *S. aureus*

2.2.10.1 Genes de resistencia de *S. aureus*

S. aureus presenta genes que le confieren resistencia a los antibióticos, desde los inicios, luego del descubrimiento de la penicilina y con la aparición de la resistencia a dicho antibiótico, el cual estaba mediado por betalactamasas codificadas por el gen *blaZ* que hidrolizan el anillo de la penicilina; este gen transporta elementos transponibles que también pueden portar resistencia a la eritromicina y la gentamicina (76). La diversidad genética de la resistencia es muy variada, tenemos genes alojados en los cromosomas tales como: *mecA*, *mecC*, *ant(6)-Ia*, *aph(3')*, *ant(6)*, *aac(6')*, *aph(2'')*, *dfrG*, *aadD*, *tet(M)*, *spc*, *erm(A)*. También están aquellos que se encuentran en plásmidos: *blaZ*, *spc*, *erm(A)*, *erm(C)*, *tet(K)*, *msr(A)*, *llamA*, *ejem (C)*, *mphC*, entre otros (77).

Cuando en *S. aureus* ocurren mutaciones a nivel de los genes diana, la bacteria adquiere resistencia; por ejemplo, mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* permiten que la bacteria adquiera resistencia a fluoroquinolonas, similar pasa con la resistencia a la daptomicina ya que en la bacteria se generan mutaciones de diferentes proteínas que dan como resultado la unión reducida del antibiótico con su sitio diana (76). También se ha visto que la resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptogramina se debe a tres mecanismos principales: modificación del sitio diana, reflujo activo e inactivación antibiótica enzimática, entre las cuales, la modificación diana ribosomal esta mediada por los genes *ermA*, *ermB*, *ermC* y *ermF* (78). En general, pueden existir mutaciones de genes preexistentes o adquisición de nuevos genes; en la tabla 2 se hace referencia a genes que confieren resistencia a diferentes antibióticos (43).

Tabla 2. Genes que confieren resistencia a antibióticos (43)

GENES DE RESISTENCIA	LOCALIZACIÓN	PRODUCTO DEL GEN	MECANISMO DE RESISTENCIA	ANTIBIÓTICO
<i>blaZ</i>	Plásmido Tn552	B-lactamasa	Hidrolisis enzimática del núcleo B-lactámico	Penicilina
<i>mecA, mecC</i>	Cromosoma SSCmec: Tn4291	PBP2a	Afinidad reducida al antibiótico	Betalactámicos
<i>aacA-aphD, aadA, aadD, aphA, aphC, spc</i>	Cromosoma, plásmidos: Tn4001, Tn5404, Tn5405	Acetiltransferasa, Fosfotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación	Aminoglucósidos
<i>ermA, ermB, ermC, msrA</i>	Plásmidos: Tn554	Metilasa	Metilación del rRNA 23S	Macrólidos-lincosamidas
<i>msrA, vha, vat, vatB</i>	Plásmidos	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bombas de expulsión. Modificación por acetilación	Macrólidos-estreptogramina
<i>tetK, tetL, tetM</i>	Plásmidos: Tn916	Sistemas clase K, L y M	Bombas de expulsión. Protección ribosomal	Tetraciclinas
<i>Rif</i>	Cromosoma	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad beta del RNA polimerasa	Rifampicinas
<i>fusA, fusB</i>	Plásmidos	Factor de elongación G	Alteración del factor de elongación G	Ácido fucsidico
<i>gyrA, gyrB o parC</i>	Cromosoma	Componentes ParC de la topoisomerasa IV. Componentes <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i> de la girasa	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV	Quinolonas
<i>mupA</i>	Plásmidos	Isoleucil tRNA sintetasa	Producción de una isoleucil tRNA sintetasa modificada	Mupirocina
<i>dfrA, sulA</i>	Cromosoma Cromosoma: Tn 1546	Dehidrofolato reductasa (DHFR) Dehidropteroato sintasa	Afinidad reducida de la DHFR Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico	Trimetoprima-sulfametoxazol
<i>van</i>	Cromosoma: Plásmidos: Tn1546	Peptidoglicano alterado D-Ala-D-Lac	Se atrapa la vancomicina en la pared celular. Síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad de la vancomicina	Glicopéptidos
<i>Rrn</i>	Cromosomas	rRNA 23S	Mutación en el dominio V del rRNA 23S interfiere con la unión ribosomal	Oxazolidinonas
<i>Q: ermA, ermB, ermC, D: vat, vatB</i>	Cromosoma: plásmido Plásmidos	Metilasa ribosomal Acetiltransferasa	Reduce la afinidad a la subunidad ribosomas 23S Modificación enzimática de la dalfopristina	Quinupristina-dalfopristina
<i>cat</i>	Plásmidos	rRNA 50s	Modificación por acetiltransferasa	Cloranfenicol
<i>fosB</i>	Plásmidos	Glutación-S-Transferasa	Modificación en la síntesis de N-acetil murámico	Fosfomicina

2.2.10.2 Genes de virulencia de *S. aureus*

Los factores de virulencia de *S. aureus* se han clasificado en tres categorías: los involucrados en la adherencia a la célula hospedera, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; los que evaden las defensas del hospedero, como las enterotoxinas estafilocócicas, la TSST-1, la PVL, proteína A y polisacáridos capsulares; y los involucrados en la invasión de la célula y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ (43).

La expresión de muchos factores de virulencia esta mediado por genes, como los de unión al fibrinógeno (*clfA*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*), unión de fibronectina (*fnbA* y *fnbB*), unión de elastina (*ebpS*), adhesión intercelular (*ica*), así como también algunas toxinas como hemolisina (*hla*, *hly*, *hld*, y *hlg*), que destruyen las membranas de los eritrocitos. También están los genes que codifican para las enterotoxinas (*seA*, *seB*, *seC*, *seD*, *seE*, *seK*, *seL*, *seP*, *seM* y *seO*), leucocidina (*lukS-PV/lukF-PV*) y la del síndrome del shock tóxico (*tsst*), las mismas que actúan como superantígenos (79). A continuación, en la tabla 3 se precisa los principales factores de virulencia de *S. aureus* (43).

Tabla 3. Principales factores de virulencia de *S. aureus*

Estructurales	Enzimas	Toxinas
– Peptidoglicano	– Catalasa	– Alfa hemolisina
– Proteína A	– Hialuronidasa	– beta hemolisina
– Factores de Adhesión	– Lipasas	– Delta hemolisina
	– Coagulasa	– Gama hemolisina
– Ácidos teicoicos	– Nucleasas	– Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL)
– Polisacáridos capsulares	– Proteasas	– Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
	– Estafilocinasa	– Toxina 1 del síndrome del shock tóxico
	– Colagenasa	– Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

La acción de la toxina 1 del síndrome del shock tóxico de *S. aureus* es suprimir la quimiotaxis de neutrófilos, induciendo la función supresora de los linfocitos T y bloqueando el sistema retículo endotelial. La PVL ocurre con poca frecuencia en cepas de *S. aureus*, sin embargo, elimina células, tales como; los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del ser humano, debido a que forma aberturas en la membrana plasmática de las células humanas, lo que conlleva a un aumento en la permeabilidad y consecuentemente genera muerte celular (lisis) (40).

La alfa-toxina o alfa-hemolisina, es considerada como el molde de las citotoxinas formadoras de poros, su efecto final es causar dificultades para respirar. Esta toxina causa lesiones necróticas en la piel y también es neurotóxica. La hemolisina beta actúa como fosfolipasa c, la misma que es específica para la esfingomielina y liso-fosfatidilcolina. Por otro lado, la hemolisina gama daña a neutrófilos y a gran variedad de glóbulos blancos, a diferencia de la hemolisina delta que generalmente puede causar daño en la membrana de la mayoría de células que infecta. Se debe tener en consideración a la delta-toxina, ya que el 97 % de las cepas de *S. aureus* produce hemolisina delta capaz de hidrolizar eritrocitos, además de su actividad de ocasionar necrosis en varias partes de la piel (43).

2.2.11 Determinación de la presencia de genes de resistencia y virulencia por PCR

Es el método más común para detección genotípica de marcadores genéticos de RAM, se da mediante la amplificación de los marcadores moleculares preseleccionados, lo cual implica la amplificación del gen objetivo (resistencia o virulencia) del organismo, mediante la utilización de primers o cebadores específicos. En *S. aureus*, la PCR se emplea con frecuencia para detectar genes de resistencia como el *mecA* en cepas MRSA y genes como el *blaZ*, *spc*, *erm(A)*, *erm(C)*, *tet(K)*, *msr(A)*, *llamA*, *ejem (C)*, *mphC*, entre otros (80).

Lo mismo ocurre con los genes de virulencia, ya que son genes específicos que cuentan con un marcador específico y se encuentran en lugares específicos, indicando la presencia de la virulencia. En la determinación de genes de virulencia en *S. aureus* se busca detectar la presencia de genes como *clfA*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*, *fnbA* y *fnbB*, y otros más, como *ebpS*, *hla*, *hly*, *hld*, y *hlg*, *lukS-PV/lukF-PV* y *tsst*. La presencia de los genes de interés se verifica mediante electroforesis en gel de agarosa (79).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1 Nivel de Investigación

Descriptivo.

3.2 Tipo y Diseño de investigación

El presente estudio es de tipo básico, observacional con diseño transversal.

3.3 Diseño metodológico

3.3.1 Material Biológico

105 aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en los diferentes servicios del Hospital II EsSalud de Cajamarca durante el año 2022.

Marco muestral

Todos los aislamientos registrados, identificados y conservados como *S. aureus* en el laboratorio de Microbiología del Hospital II EsSalud de Cajamarca, durante el año 2022.

Unidad de estudio

Cada uno de los aislamientos registrados, identificados y conservados como *S. aureus*, provenientes de pacientes atendidos en los diferentes servicios del Hospital II EsSalud de Cajamarca, durante el año 2022.

3.3.2 Recolección y transporte de los aislamientos

Todos los aislamientos previamente identificados como *S. aureus* y recolectados en el laboratorio de Microbiología del Hospital-II EsSalud de Cajamarca, fueron transportados en cadena de frío al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca para su procesamiento.

3.3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.3.1 Descripción de los aislamientos

La información que describe los aislamientos fue tomada de los informes y archivos clínicos del laboratorio de Microbiología en relación a los pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud de Cajamarca durante el año 2022. La información fue recolectada utilizando una ficha de recolección de datos elaborada por el investigador (Apéndice 1).

3.3.4 Reactivación de los aislamientos

La reactivación de los aislamientos se llevó a cabo inoculando de 2-4 colonias en un tubo de ensayo tapa rosca 13x100 mm que contenía 5 mL de caldo BHI previamente preparado, luego se incubó a 37 °C por 24 h. Pasado este tiempo se evaluó la pureza de cultivos mediante coloración Gram (apéndice 2, A), antes de sembrar en los diferentes medios de cultivo (81,82).

3.3.5 Evaluación de las características de *S. aureus*

Los aislamientos reactivados se sembraron en Agar Sangre y Agar Manitol Salado, y se incubaron a 37 °C por 24 h con el fin de caracterizar las colonias. En Agar Sangre se evaluó la capacidad hemolítica de la colonia (β -hemolisis) y las características morfológicas: colonia grandes, opacas, cremosas con borde circular y elevación convexa de colocación blanca o dorada, con un diámetro entre 1-3 mm a las 24 h (83) (apéndice 2, B). Por otro lado, en Agar Manitol Salado se observó el crecimiento de colonias de color amarillo, rodeadas por un halo del mismo tono, en concordancia con el medio de cultivo, debido a la fermentación del Manitol (apéndice 2, C) (82,84).

3.3.6 Prueba de la Coagulasa

Para realizar la prueba confirmativa de coagulasa, se seleccionaron colonias aisladas del Agar Manitol Salado, las cuales fueron inoculadas en BHI y posteriormente incubadas a 37 °C por 24 h. Transcurrido este periodo se extrajo 0.5 mL del cultivo de BHI y se combinó con 0,5 mL de plasma citratado en tubo de ensayo de 13x100 mm. La suspensión resultante fue homogeneizada suavemente y luego se dejó incubar a 37 °C, realizando observaciones periódicas a las 2, 4 y 18 h, momentos en los que se evidenció la formación del coagulo (81,85) (apéndice 2, D).

3.3.7 Preparación de los inóculos bacterianos

Se sembró en placas de Agar Nutritivo y se incubaron durante 20 h a 37 °C (apéndice 2, E). Posteriormente utilizando un asa bacteriológica se tomaron de 3 a 5 colonias, las cuales fueron resuspendidas en 3 mL de solución salina fisiológica estéril (SSFE) hasta alcanzar una concentración equivalente a 0.5 del estándar de turbidez de McFarland en el nefelómetro (concentración 1.5×10^8 UFC/mL) (73).

3.3.8 Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana

Todos los aislamientos fueron sometidos a una prueba de tamizaje mediante la técnica de difusión en disco con cada antibiótico que se utilizó. Para ello, se preparó agar Mueller Hinton según las instrucciones del fabricante, se vertió en placas Petri asegurando que la profundidad sea de 4 mm, luego utilizando un hisopo estéril se inoculó la suspensión de los inóculos bacterianos en tres direcciones diferentes, cubriendo toda la superficie del medio. Posteriormente se procedió a cerrar la placa y dejar secar a temperatura ambiente durante 3 min.

Una vez transcurrido el tiempo y utilizando agujas estériles, se dispusieron los discos correspondientes a cada antibiótico en las placas de agar, distribuyéndolos de manera

equidistante y asegurando que estuvieran separados entre sí por una distancia no menor a 25 mm, con excepción de los discos de eritromicina y clindamicina, los cuales deberían estar separados entre 16 – 24 mm de borde a borde. En cada placa se colocaron 5 discos, posteriormente fueron incubadas a 35 °C entre 16 y 18 h (apéndice 2, F). La evaluación de los puntos de cohorte y la presencia o ausencia del halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos se interpretó mediante los criterios establecidos por el CLSI (73), los cuales se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de antimicrobianos que se utilizaron y criterios de susceptibilidad.

Antimicrobiano	Concentración	S	SDD	I	R
Cefoxitina	30 µg	≥ 22	–	–	≤ 21
Oxacilina	1 µg	≥ 11	–	–	≤ 10
Ceftarolina	30 µg	≥ 25	20-24	–	≤ 19
Penicilina G	10 unidades	≥ 29	–	–	≤ 28
Vancomicina	30 µg	H. P	–	–	H. A
Gentamicina	10 µg	≥ 15	–	13-14	≤ 12
Eritromicina	15 µg	≥ 23	–	14-22	≤ 13
Tetraciclina	30 µg	≥ 19	–	15-18	≤ 14
Levofloxacina	5 µg	≥ 19	–	16-18	≤ 15
Nitrofurantoina	300 µg	≥ 17	–	15-16	≤ 14
Clindamicina	2 µg	≥ 21	–	15-20	≤ 14
Trimetoprima- sulfametoxazol	1.25/23.75	≥ 16	–	11-15	≤ 10
Linezolid	30 µg	≥ 26	–	23-25	≤ 22
Cloranfenicol	30 µg	≥ 18	–	13-17	≤ 12
Rifampicina	5 µg	≥ 20	–	17-19	≤ 16

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente, SDD: Sensible dosis dependiente, ≥: Diámetro de halo de inhibición mayor o igual, ≤ Diámetro de halo de inhibición menor o igual, –: No aplica para el antimicrobiano, H.P: Halo presente, H.A: Halo ausente

3.3.8.1 Determinación de la producción de betalactamasa

Para determinar si los aislamientos fueron productores de betalactamasa se utilizó el disco de la penicilina G; en el análisis se consideró dos condiciones recomendadas por el CLSI, aquellos aislamientos que no presentaron halo o que presentaron halo en forma de acantilado fueron considerados como productores de betalactamasa; por el contrario, los aislamientos que presentaron halo en forma de playa se consideraron negativos para la producción de betalactamasas (73).

3.3.8.2 Detección de *S. aureus* con resistencia inducible a la clindamicina

En las placas de Mueller Hinton se colocaron un disco de eritromicina y uno de clindamicina a una distancia entre 16-24 mm y se incubaron por 16-18 h. Fueron considerados aislamientos con resistencia inducible a clindamicina aquellos que formaron un halo de inhibición en forma de la letra “D” alrededor del disco de la clindamicina y hacia el lado frontal del disco de la eritromicina (73).

3.3.9 Extracción de ADN por shock térmico

Para obtener el ADN genómico *S. aureus* fue cultivado en Agar Nutritivo por 20 h. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 150 µL de agua grado molecular y se incorporaron entre 3-6 colonias del cultivo bacteriano, las cuáles fueron homogeneizadas hasta obtener una ligera turbidez del agua. Luego se pasó al vórtex por 5 segundos, con el objetivo de asegurar la homogenización completa. Procedimiento que fue repetido para cada una de las muestras. Para el proceso de shock térmico, se colocaron cada uno de los tubos con la suspensión bacteriana en agua hirviendo durante 10 min, posteriormente fueron congelados a -20 °C durante 10 min a fin de que se genere la ruptura de la pared celular bacteriana y se libere el ADN. Se esperó 5 min hasta que se descongeló la suspensión y se centrifugó durante 8 min a 10000 rpm. Pasado ese tiempo se retiró con

cuidado los tubos, se tomó 50 μL del sobrenadante conteniendo el ADN por ser menos denso, el mismo que permitió continuar con la evaluación molecular correspondiente (7,86).

3.3.10 Evaluación de la calidad del ADN extraído

La calidad del ADN extraído fue evaluada utilizando un Espectrofotómetro NanodropTM Lite Thermo Scientific. Para esto se utilizó 1 μL de agua de grado molecular como blanco, el cual se colocó en el capilar del equipo para su valoración y se presionó el botón “blank”, este proceso se repitió dos veces, seguidamente se levantó la tapa y se limpió el capilar con papel absorbente.

Cada una de las muestras de ADN fue homogeneizada durante 3 s utilizando vórtex, seguidamente se tomó 1 μL del ADN y se lo colocó en el capilar del Nanodrop, se cerró la tapa y se seleccionó el botón “measure”, una vez que nos indicó los resultados se limpió el capilar colocando con agua de grado molecular. Para determinar la pureza y concentración del ADN, se tomaron los datos de absorbancia a 260 nm y 280 nm, y la concentración del ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$. La calidad aceptada de ADN fue de aquellas muestras que presentaron un ratio 260/280 aproximado a 1.8 (87,88).

3.3.11 Reacción en Cadena Polimerasa Múltiplex

Para la amplificación de los genes seleccionados (de virulencia estafilocócica y resistencia a los antimicrobianos), se prepararon dos conjuntos de PCR múltiplex: múltiplex A y multiplex B. El conjunto de PCR múltiplex A contuvo a los genes de importancia en la resistencia antimicrobiana: genes *mecA*, *mecC* y *blaZ* y el gen de virulencia *PVL*. Así mismo el conjunto múltiplex B estuvo conformado por genes con

influencia en la virulencia de la bacteria (*eta*, *etb*, *tsst*). La temperatura de hibridación y el tamaño de los amplicones obtenidos de cada gen se enumeran en la tabla 5.

Cada reacción de PCR se realizó siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante del kit KOD Hot Star ADN Polymerase (Novagen, Toyobo, Merc Millipore). La composición de cada MasterMix fue de 2.5 μ L de Buffer 10 X, 2.5 μ L de dNTPs, 0.5 μ L de KOD Polimerasa, 1.5 μ L de mM MgSO₄, 0.4 μ L de los primers Forward y Reverse 10 μ M, para el conjunto múltiplex A (los genes *mecA*, *mecC*, *blaZ* y *PVL*). La misma Master Mix con 0.3 μ L de los primers Forward y Reverse 10 μ M de los genes *etb* y *tsst* y 0.5 μ L de los primers Forward y Reverse 10 μ M del gen *eta* se constituyó en el conjunto multiplex B. Finalmente, se agregó a cada conjunto 0.7 μ L de ADN bacteriano y agua grado molecular para completar 25 μ L de volumen de reacción (21,24,89).

La amplificación de los genes se llevó a cabo utilizando un termociclador S1000™ BioRad, utilizando las siguientes condiciones de reacción: para el conjunto de PCR multiplex A se inició con la activación de la polimerasa a 95 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización del ADN a 95 °C durante 20 s, hibridación de los primers a 54 °C durante 15 s, extensión a 70 °C por 10 s y un ciclo de extensión final a 70 °C durante 5 min. Para el conjunto de PCR múltiplex B, la activación inicial de la polimerasa fue a 95 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 20 s, hibridación a 57 °C durante 15 s, extensión a 70 °C durante 10 s y un ciclo de extensión final a 70 °C durante 5 min (90).

Tabla 5. Características de los primers que se utilizaron para la amplificación por PCR múltiplex.

Gen diana	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicón (pb)	T ° de Annealing	Set de PCR múltiplex
<i>mecA-F</i>	GATGATACCTTCGTTCCAC	313	54	A
<i>mecA-R</i>	GTATGTGCGATTGTATTGC			
<i>mecC-F</i>	TTACACCGATTCCCAAATCT	139	54	A
<i>mecC-R</i>	GATTTAAAGTAGTAGACGGC			
<i>blaZ-F</i>	AGAGATTTGCCTATGCTTC	516	54	A
<i>blaZ-R</i>	CTTGACCACTTTTATCAGC			
<i>PVL-F</i>	ATGTTGCAGTTGTTTTGTAC	408	54	A
<i>PVL-R</i>	ACCCCATTAGTACACAGT			
<i>eta-F</i>	GCAGGTGTTGATTTAGCATT	93	57	B
<i>eta-R</i>	AGATGTCCCTATTTTTGCTG			
<i>etb-F</i>	ACAAGCAAAAGAATACAGCG	226	57	B
<i>etb-R</i>	GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG			
<i>tsst-F</i>	ACCCCTGTTCCCTTATCATC	326	57	B
<i>tsst-R</i>	TTTTCAGTATTTGTAACGCC			

3.3.12 Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa a dos concentraciones diferentes: al 2 % y al 1.5 % para el conjunto de PCR múltiplex A y para el conjunto de PCR múltiplex B, respectivamente. En un matraz de vidrio se midió 40 mL de Buffer TBE 0.5 X, se agregó 0.8 g de agarosa para la PCR múltiplex A y 0.6 g para la PCR múltiplex B y se hirvió hasta disolver la agarosa por completo, a este volumen se agregó 0.4 uL (1%) de SYBR Safe (Invitrogen™) para colorear el gen de interés. La mezcla fue colocada en el molde de electroforesis y se esperó que se solidifique.

Pasado un tiempo se colocó el molde junto al gel en la cubeta de electroforesis horizontal (EasyCast™, Thermo Scientific), se retiraron los peines del gel con mucho cuidado y se agregó Buffer TBE 0.5 X en la cubeta hasta cubrir completamente todo el gel. En el primer o último carril del gel se agregó 10 uL del marcador de peso molecular (ADN Ladder 100 pb, Life Technologies – Invitrogen™), luego se colocó cada uno de los productos de la PCR en el carril correspondiente del gel, para lo cual se mezcló 5 uL del producto con 1 uL de Buffer de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer, Thermo Fisher™). Se conectó a la fuente de energía de electroforesis (PowerPac Basic Power Supply (BIO-RAD)) y se corrió a 100 voltios durante 30 min para el conjunto de PCR múltiplex A y a 90 voltios por 40 min para el conjunto de PCR múltiplex B. Se utilizó el transiluminador de luz UV para observar y fotodocumentar las bandas presentes en las dos PCR múltiplex (91).

3.3.13 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

La información recolectada mediante la ficha de recolección de datos fue almacenada en una base de datos del programa Excel 2019 y al finalizar la investigación se analizaron todos los datos empleando el software SPSS versión 25. La información descriptiva fue presentada en tablas y gráficos. La asociación entre los grupos formados (presencia de genes, resistencia antimicrobiana, tipo de muestra, área, servicio hospitalario y sexo) fue establecida mediante la prueba Chi cuadrado y/o el test exacto de Fisher, (significancia estadística: $p \leq 0.01$). Se consideró un nivel de confianza del 99 % y error de 1 %. También se utilizó la prueba de V de Cramer (C), siempre y cuando el p valor fuese significativo, la cual se utilizó para establecer el “grado” de asociación entre las variables analizadas, (C=0.0-0.1, no hay asociación; C=0.1-0.3 baja asociación; C=0.3-0.5 asociación moderada; C=0.5-1.0, alto grado de asociación).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Características de origen de los aislamientos.

De los 105 aislamientos de *S. aureus* analizados en el presente estudio, 56 (53,3 %) provienen de pacientes atendidos en consulta externa, 26 (24,8 %) de hospitalización y 23 (21,9 %) de emergencia. Con respecto al servicio hospitalario, 36 (34,3 %) provienen de otorrinolaringología, 38 (36,2 %) de medicina y 31 (29,5 %) de otros servicios. Respecto a las muestras biológicas obtenidas, 47 (44,8 %) corresponden a secreciones faríngeas, 29 (27,6 %) a aspirados bronquiales, 15 (14,3 %) a muestras urogenitales (orina y secreciones vaginales), y 14 (13,3 %) a otro tipo de muestras (hemocultivo, tejido, líquido de diálisis, etc.). Por otro lado, los aislados se obtuvieron de pacientes que tenían una edad media de 52 años, de los cuales 56 (53,3 %) fueron mayores de 60 años, 42 (40,0 %) tenían entre 18 y 50 años de edad y solo 7 (6,7 %) fueron menores de 18 años. En relación al género, 56 (53,3 %) fueron mujeres y 49 (46,7 %) fueron varones.

4.1.2 Susceptibilidad antimicrobiana

En cuanto a la respuesta de los 105 aislamientos frente a los antimicrobianos, utilizando el método del disco de difusión, se observó que el 87,6 % presentaron resistencia al menos a un antimicrobiano y el 12,4 % mostraron sensibilidad a todos los antimicrobianos. Dentro de las frecuencias más altas de resistencia encontradas 80,0 % mostraron resistencia a la penicilina, 60,0 % a la eritromicina, 58,1 % a la oxacilina y 50,5 % a la cefoxitina. Frecuencias de resistencia por debajo del 50 % a otros antimicrobianos se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *S. aureus* evaluado con el método del disco de difusión ¹.

Antimicrobiano	Categorías interpretativas			
	Resistente	Sensible	Intermedio	SDD
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Penicilina	84 (80,0)	21 (20,0)	N.A	N.A
Oxacilina	61 (58,1)	44 (41,9)	N.A	N.A
Cefoxitina	53 (50,5)	52 (49,5)	N.A	N.A
Eritromicina	48 (45,7)	42 (40,0)	15 (14,3)	N.A
Clindamicina	36 (34,3)	63 (60,0)	6 (5,7)	N.A
Gentamicina	36 (34,3)	65 (61,9)	4 (3,8)	N.A
Levofloxacina	31 (29,5)	72 (68,6)	2 (1,9)	N.A
Linezolid	16 (15,2)	74 (70,5)	15 (14,3)	N.A
Tetraciclina	13 (12,4)	92 (87,6)	0 (0,0)	N.A
Rifampicina	11 (10,5)	94 (89,5)	0 (0,0)	N.A
SXT	10 (9,5)	95 (90,5)	0 (0,0)	N.A
Vancomicina	8 (7,6)	97 (92,4)	N.A	N.A
Ceftarolina	9 (8,6)	85 (80,9)	N.A	11 (10,5)
Cloranfenicol	7 (6,7)	98 (93,3)	0 (0,0)	N.A
Nitrofurantoina	2 (1,9)	102 (97,1)	1 (1,0)	N.A

¹ Puntos de corte basados en el CLSI M100™ "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition"; n, recuento de aislamientos; %, frecuencia de aislamientos SDD, Sensible dosis dependiente; SXT, Trimetoprima-sulfametoxazol; N.A, Categoría que no se aplica para el disco.

4.1.3 Evaluación de la producción de betalactamasa utilizando el disco de penicilina

Analizando la respuesta de los aislamientos frente al disco de penicilina como indicador de producción de betalactamasa se encontró que, 84 aislamientos (80,0 %) fueron productores de la enzima, de los cuales 57 (67,9 %) presentaron un halo en forma de acantilado (A) y 27 (32,1 %) no presentaron halo (B). Los 21 (20,0 %) aislamientos restantes, no produjeron betalactamasa, presentando un halo en forma de playa (C) (Figura 1 y Apéndice 4).

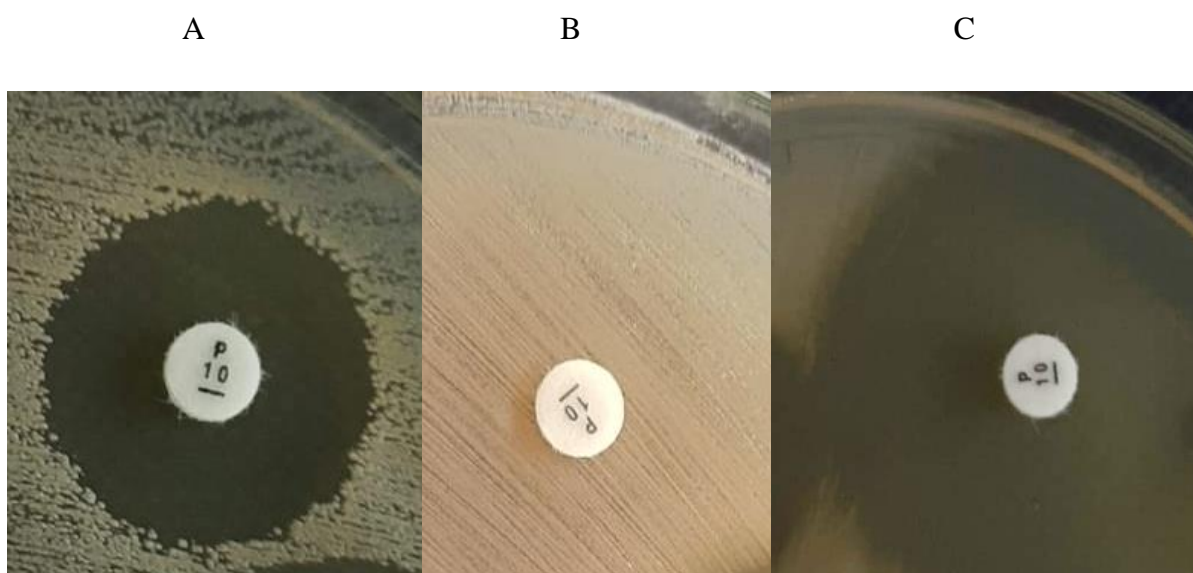


Figura 1. Screening de producción de betalactamasa mediante disco de difusión de la penicilina. (A) Aislamiento productor de betalactamasa, borde de halo del disco de penicilina en forma de acantilado. (B) Aislamiento productor de betalactamasa, ausencia de halo del disco de la penicilina. (C). Aislamiento negativo para la producción de betalactamasa, borde de halo en forma de playa.

4.1.4 Detección de la resistencia a la clindamicina inducida por la eritromicina

Al evaluar el test-D, se observó que 11 aislamientos (10,5 %) dieron como resultado un aplanamiento en la zona de inhibición de la clindamicina justo al lado del disco de la eritromicina, formando un halo en forma de D (Figura 2). De estos 11 aislamientos el 63,6 % estuvieron presentes en aislamientos MRSA y solo 36,4 % en aislamientos MSSA.

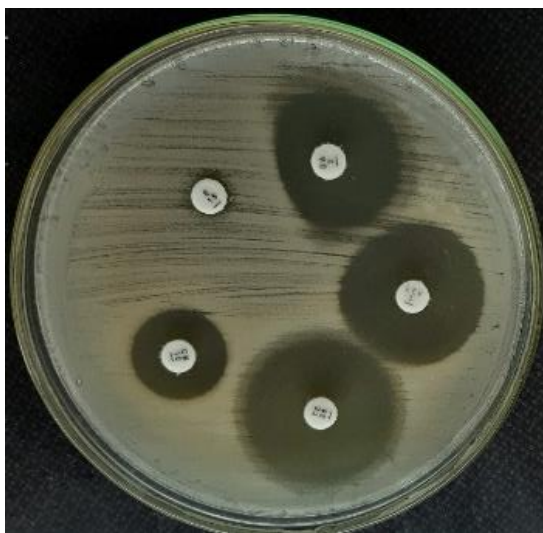


Figura 2. Detección de la resistencia a la clindamicina inducida por la eritromicina D-test positivo, halo en forma de D.

4.1.5 Perfiles de resistencia de los aislamientos de *S. aureus*

Se encontró 42 perfiles de resistencia diferentes, de los cuales se presentó con mayor frecuencia el PR15 (resistencia múltiple a P-FOX-OX-DA-E-CN-LEV) con 13 aislamientos (12,4 %), seguido del PR42 con 12 aislamientos (11,4 %), el PR40 con 7 aislamientos (6,7 %), el PR22 con 5 aislamientos (4,8 %), entre otros perfiles cuya frecuencia se muestra en la Tabla 7. Por otro lado, del total de aislamientos 56 (53,3 %) fueron MDR, 21 (20,0 %) fueron resistentes solo a dos grupos de antimicrobianos, 15 (14,3 %) solo fueron resistentes a un grupo de antimicrobianos, mientras que 13 (12,4 %) presentaron sensibilidad total.

Tabla 7. Perfiles de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *S. aureus*.

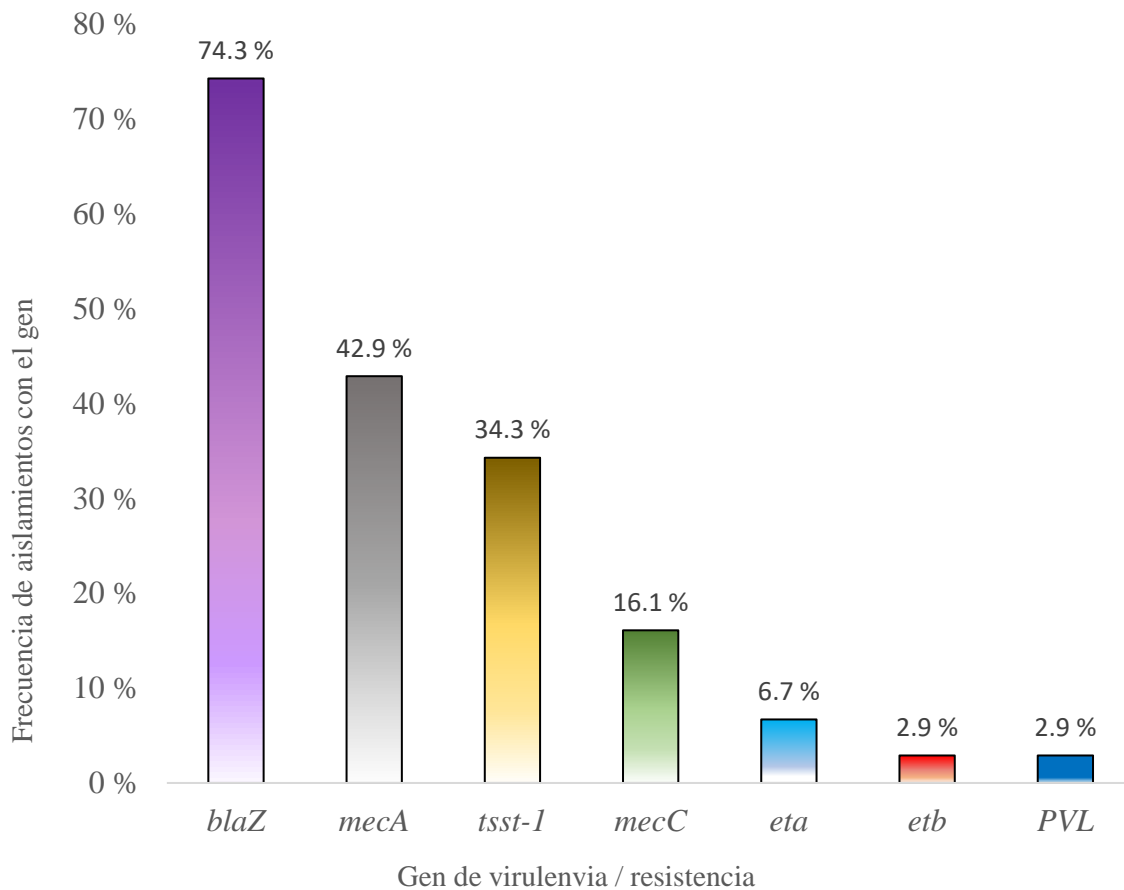
Código	Perfil de Resistencia	n	(%)	Código	Perfil de resistencia	n	(%)
PR1*	P-FOX-OX-CPT-DA-E-CN-TE-LEV-F-SXT-LZD-C-RD-VA	1	0,95	PR23*	FOX-OX-TE-LEV	1	0,95
PR2*	P-FOX-OX-CPT-DA-E-CN-TE-LEV-SXT-LZD-C-RD	2	1,90	PR24*	P-FOX-OX-DA-E	1	0,95
PR3*	P-OX-CPT-DA-E-TE-LEV-SXT-LZD-RD	1	0,95	PR25*	P-FOX-E-LZD-C	1	0,95
PR4*	P-FOX-OX-CPT-DA-E-CN-TE-LZD-RD	2	1,90	PR26	P-FOX-OX-LZD	2	1,90
PR5*	P-DA-E-CN-TE-LEV-SXT-LZD-RD-VA	1	0,95	PR27*	P-OX-DA-E-CN	2	1,90
PR6*	P-FOX-OX-CPT-DA-E-CN-LEV-SXT-C	1	0,95	PR28	P-FOX-OX-CN	1	0,95
PR7*	P-FOX-OX-DA-CN-TE-LEV-C-RD-VA	1	0,95	PR29*	P-CPT-E-TE-F	1	0,95
PR8*	P-FOX-OX-CPT-DA-E-CN-LEV-LZD	3	2,86	PR30*	LEV-LZD-VA	1	0,95
PR9*	P-FOX-OX-CPT-DA-E-CN-LEV-SXT	2	1,90	PR31	FOX-OX-LZD	1	0,95
PR10*	P-FOX-CPT-DA-E-CN-TE-LZD-RD	1	0,95	PR32*	P-E-LZD-VA	1	0,95
PR11*	P-FOX-OX-DA-E-CN-LZD-RD-VA	1	0,95	PR33	P-FOX-OX-E	4	3,81
PR12*	P-FOX-OX-DA-E-F-LZD-RD-VA	1	0,95	PR34*	OX-E-LZD	1	0,95
PR13*	P-FOX-OX-CPT-DA-E-CN-LEV	4	3,81	PR35	P-OX-SXT	1	0,95
PR14*	P-OX-CPT-DA-E-CN-LZD-RD	1	0,95	PR36*	P-CN-TE	1	0,95
PR15*	P-FOX-OX-DA-E-CN-LEV	13	12,38	PR37	P-OX-E	2	1,90
PR16*	P-DA-CN-TE-LEV-LZD	1	0,95	PR38	P-LZD	2	1,90
PR17*	P-FOX-OX-DA-E-LZD	1	0,95	PR39	DA-E	1	0,95
PR18*	P-FOX-DA-E-CN-LEV	1	0,95	PR40	P-E	7	6,67
PR19*	P-FOX-OX-E-CN-LEV	1	0,95	PR41	OX	3	2,86
PR20*	P-FOX-OX-CPT-LZD	1	0,95	PR42	P	12	11,43
PR21*	P-FOX-OX-SXT-LZD	1	0,95				
PR22*	P-FOX-OX-E-LZD	5	4,76		TOTAL	92	87,62

n, recuento del perfil de resistencia; %, frecuencia del perfil de resistencia; *, aislamientos con perfiles MDR

4.1.6 Genes de virulencia y resistencia en aislamientos de *S. aureus*

Con respecto a la frecuencia de los aislamientos que presentaron genes de virulencia y resistencia, las PCRs multiplex (Figura 3 y Figura 4) revelaron que 78 aislamientos (74,3 %) presentaron el gen *blaZ*, seguido de 45 aislamientos (42,9 %) con el gen *mecA*, 36 (34,3 %) con el gen *tsst* y 19 (18,1 %) con el gen *mecC*. Los otros genes fueron menos frecuentes entre los aislamientos restantes, las frecuencias se muestran en el Gráfico 1.

Gráfico 1. Frecuencia de aislamientos de *S. aureus* según genes de virulencia y resistencia evaluados en este estudio



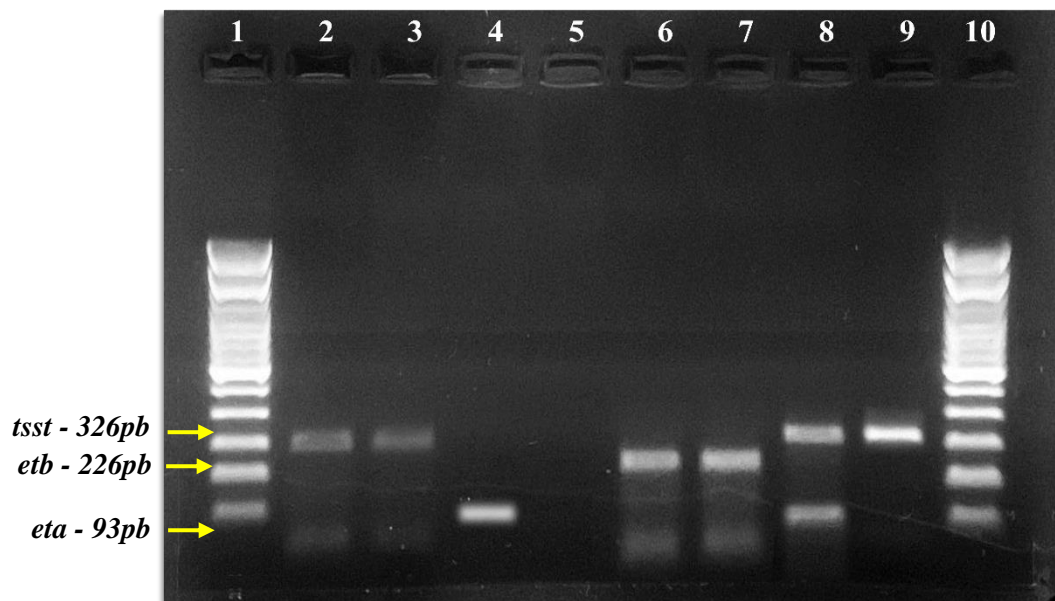


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR múltiplex para los genes *tsst*, *etb* y *eta*. Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular 100 pb; carriles 2, 3 y 9: aislamientos positivos para el gen *tsst*; carril 4: aislamiento positivo para el gen *eta*; carril 5: control negativo; carril 6 y 7: aislamientos positivos para el gen *etb*; carril 8: aislamientos positivos para los genes *tsst* y *eta*.

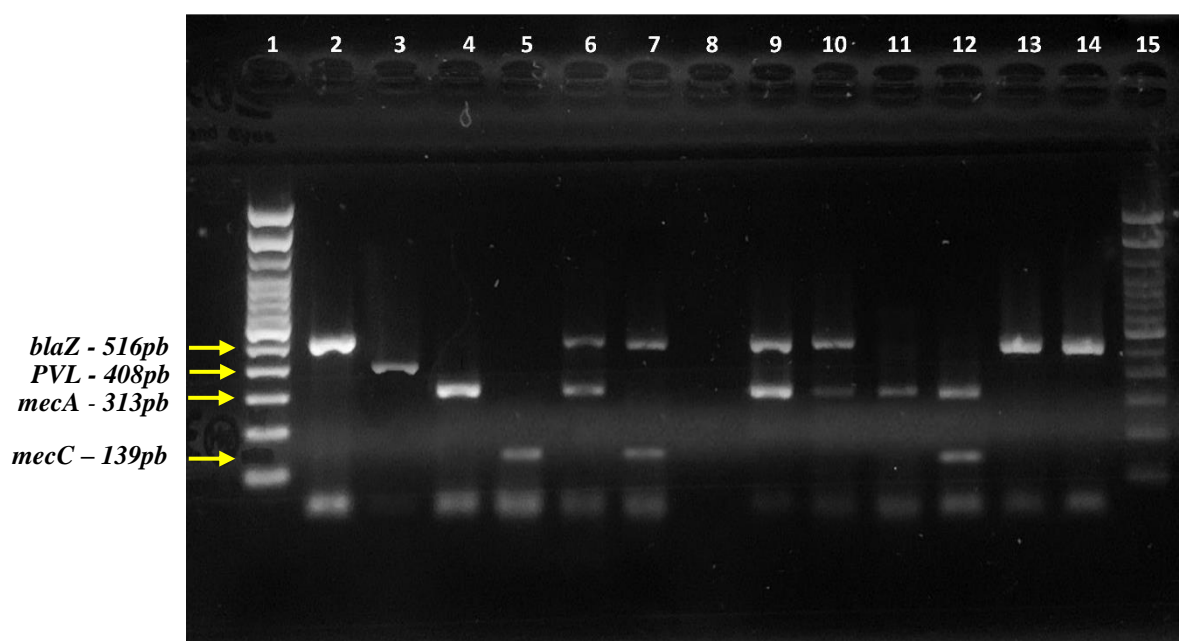


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR múltiplex para los genes *blaZ*, *PVL*, *mecA* y *mecC*. Carriles 1 y 15: marcador de peso molecular 100 pb; carriles 2, 13 y 14: aislamientos positivos para el gen *blaZ*; carril 3: aislamiento positivo para el gen *PVL*; carril 4 y 11: aislamientos positivos para el gen *mecA*; carril 5: aislamiento positivo para el gen *mecC*; carril 6, 9 y 10: aislamientos positivos para los genes *blaZ* y *mecA*; carril 7: aislamiento positivo para los genes *blaZ* y *mecC*; carril 8: control negativo; carril 12: aislamiento positivo para los genes *mecA* y *mecC*.

4.1.7 Perfiles genéticos de aislamientos de *S. aureus*

De los 105 aislamientos, 92 presentaron al menos uno de los genes evaluados (87,6 %). Evaluando la frecuencia de los perfiles genéticos, se encontró 19 perfiles distintos, entre los cuales los perfiles con el gen *blaZ* (codificante para penicilinas) fueron los más frecuentes, sobresaliendo con 21 aislamientos el perfil que contenía solo el gen *blaZ* y el perfil que presentaba los genes *tsst-blaZ-mecA* (20,0 % para ambos perfiles). Seguido a estos dos, se encontró el perfil en el que 9 aislamientos presentaron los genes *blaZ-mecA* (8,6 %) y 7 aislamientos que contenían los genes *blaZ-mecC* (6,7 %). Los demás perfiles genéticos se describen en la tabla 8, y los productos génicos se han listado en la tabla 2.

Tabla 8. Perfiles genéticos de *S. aureus* determinado mediante PCRs Múltiplex.

Perfil genético	n	%
<i>tsst-blaZ-mecA</i>	21	20,0
<i>eta-blaZ-mecA</i>	3	2,9
<i>etb-blaZ-mecA</i>	3	2,9
<i>tsst-blaZ-mecC</i>	3	2,9
<i>tsst-mecA-mecC</i>	3	2,9
<i>eta- blaZ-mecA</i>	1	0,9
<i>eta-tsst-blaZ</i>	2	1,9
<i>mecA-mecC</i>	3	2,9
<i>blaZ-mecA</i>	9	8,6
<i>blaZ-mecC</i>	7	6,7
<i>tsst-mecA</i>	1	0,9
<i>tsst-blaZ</i>	6	5,7
<i>eta-blaZ</i>	1	0,9
<i>tsst-PVL</i>	1	0,9
<i>blaZ</i>	21	20,0
<i>mecA</i>	2	1,9
<i>mecC</i>	2	1,9
<i>PVL</i>	2	1,9
<i>tsst</i>	1	0,9
Total	92	87,6

n, recuento de perfiles genéticos; %, frecuencia de perfiles genéticos

4.1.8 Frecuencia de aislamientos MRSA

De los 105 aislamientos, 59 (56,2 %) fueron MRSA, en función a la presencia de los genes *mecA*, *mecC* y/o la resistencia a la cefoxitina. Del total de MRSA se observó que 45 aislamientos (42,9 %) presentaron el gen *mecA*, 19 (18,1 %) el gen *mecC* y 53 aislamientos (50,5 %) fueron resistencia a la cefoxitina (Tabla 9). Analizando con más detalle, entre los aislamientos que presentaron el gen *mecA*, el gen *mecC* y los que fueron resistentes a la cefoxitina se determinó la coexistencia de las tres características en 6 aislamientos (5,7 %), así mismo, la resistencia a la cefoxitina coexistió con el gen *mecA* en 42 aislamientos (84,9 %) y con el gen *mecC* en 16 aislamientos (35,9 %). Además, se encontró la presencia simultánea del gen *mecA* y *mecC* en 3 aislamientos (2,9 %); de la misma manera, 3 aislamientos (2,9 %) solo presentaron el gen *mecA* y 3 aislamientos (2,9 %) solo el gen *mecC*. Por otro lado, todos de los aislamientos que se presentaron como resistentes a cefoxitina presentaron al menos uno de los genes *mec*.

4.1.9 Características asociadas con la presencia de aislamientos MRSA

La presencia de MRSA mostró asociación estadística altamente significativa (p -valor < 0,01) con el género, el área de procedencia, el tipo de muestra, la resistencia a FOX, la presencia del gen *mecA* o del gen *mecC*, con un 99 % de confianza. Según el índice V de Cramer, se encontró que la asociación con el género ($C= 0,287$) y con el área de procedencia ($C= 0,298$) fue baja; siendo moderada con el tipo de muestra ($C= 0,418$) y la presencia del gen *mecC* ($C = 0,415$). Sin embargo, la asociación con la resistencia a FOX ($C = 0,891$) y la presencia del gen *mecA* ($C = 0,765$) fue alta (Tabla 9).

Tabla 9. Características de origen asociadas a los aislamientos MRSA y MSSA

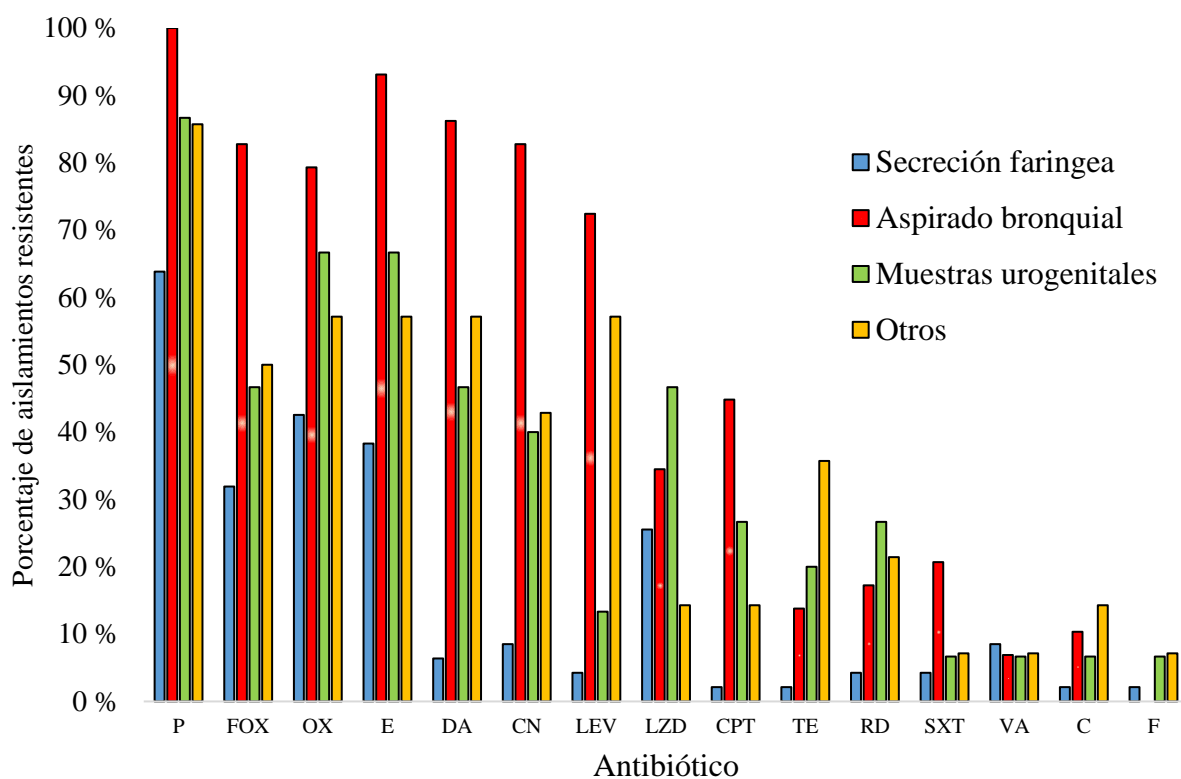
Características	MRSA (n=59)		MSSA (n=46)		p valor	V de Cramer	
	n	%	n	%			
Género	Masculino	35	59,3	14	30,4	0,003	0,287
	Femenino	24	40,7	32	69,6		
Área	Consulta externa	24	40,7	32	69,6	0,009	0,298
	Hospitalización	20	33,9	6	13,0		
	Emergencia	15	25,4	8	17,4		
Servicio	Otorrinolaringología	15	25,4	21	45,7	0,066	0,228
	Medicina general	26	44,1	12	26,1		
	Otros	18	30,5	13	28,3		
Tipo de muestra	Secreción faríngea	17	28,8	30	65,2	0,000	0,418
	Aspirado bronquial	25	42,4	4	8,7		
	Muestras urogenitales	9	15,3	6	13,0		
	Otros	8	13,6	6	13,0		
FOX	Resistente	53	89,8	0	0,0	0,000	0,891
	Sensible	6	10,2	46	100,0		
mecA	Positivo	45	76,3	0	0,0	0,000	0,765
	Negativo	14	23,7	46	100,0		
mecC	Positivo	19	32,2	0	0,0	0,000	0,415
	Negativo	40	67,8	46	100,0		

Se utilizan valores de $p < 0,01$ e intervalos de confianza al 99 %, valores del índice V de Cramer ($C=0.0-0.1$, no hay asociación; $C=0.1-0.3$ baja asociación; $C=0.3-0.5$ asociación moderada; $C=0.5-1.0$, alto grado de asociación), **MRSA**, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; **MSSA**, *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina; **FOX**, ceftioxitina.

4.1.10 Frecuencia de *S. aureus* resistentes según el tipo de muestra.

La resistencia a la penicilina fue la que se presentó con mayor frecuencia en los aislamientos provenientes de todos los tipos de muestra. De acuerdo a las categorías establecidas en este estudio para el tipo de muestra, se encontró que al menos un aislamiento de las categorías secreción faríngea, muestra urogenital y otros, presentó resistencia a todos los antibióticos probados; sin embargo, los aislamientos provenientes de aspirado bronquial no presentaron resistencia a la nitrofurantoina, pero fueron las que presentaron mayor resistencia hacia la P, FOX, OX, E, DA, entre otras (Gráfico 2).

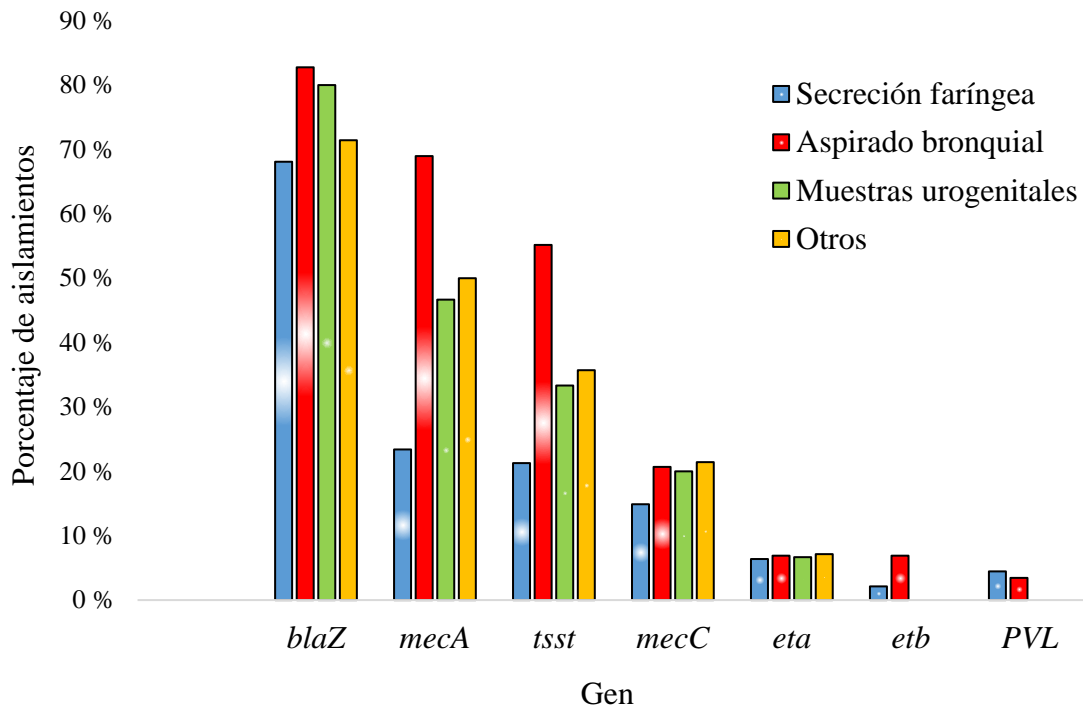
Gráfico 2. Porcentaje de aislamientos de *S. aureus* resistentes por tipo de antimicrobiano según tipo de muestra



4.1.11 Aislamientos con genes de virulencia-resistencia según tipo de muestra

Los aislamientos que presentaron el gen *blaZ* fueron los más frecuentes en las diferentes muestras clínicas analizadas. Así mismo, al menos un aislamiento proveniente de secreción faríngea o aspirado bronquial presentó alguno de los genes evaluados; sin embargo, ningún aislamiento proveniente de muestras urogenitales o de otro tipo de muestras presentó los genes *etb* y *PVL*. Entre los aislamientos de aspirado bronquial los genes *blaZ*, *mecA*, *tsst* y *etb* fueron los más frecuentes (82,8 %, 68,9 %, 55,2 % y 6,9 % respectivamente); por otro lado, los aislamientos de secreción faríngea presentaron con menos frecuencia los genes *blaZ*, *mecA*, *tsst*, *mecC*, *eta* y *etb* (Gráfico 3).

Gráfico 3. Frecuencia de aislamientos de *S. aureus* por tipo de genes de virulencia-resistencia en diversas muestras clínicas



4.2 Discusión

La importancia clínica que tiene la MDR de *S. aureus* a nivel mundial es preocupante, no obstante, en el Perú los estudios que buscan determinar la resistencia de *S. aureus* a diversos antimicrobianos son escasos. Este estudio representa uno de los pocos en el país y el primero en Cajamarca-Perú que buscó investigar el perfil de resistencia antimicrobiana y la presencia de los genes de virulencia/resistencia en aislamientos de *S. aureus* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital II EsSalud de Cajamarca. En esta investigación se emplearon procedimientos microbiólogos convencionales y la técnica molecular de PCR múltiple, para determinar la susceptibilidad antimicrobiana y establecer los perfiles genéticos relacionados con la virulencia y la resistencia.

De los 105 aislamientos analizados, 87,6 % presentó resistencia a al menos un antimicrobiano. En la Tabla 6 se evidencia que las resistencias más recurrentes fueron hacia la penicilina (80,0 %), la oxacilina (58,1 %) y la cefoxitina (50,5 %), hallazgos que concuerdan con una revisión sistemática realizada por Lago N. (2023), quién encontró que el perfil de resistencia más común de *S. aureus* se correspondía con la resistencia a betalactámicos (92); esto se explicaría por el hecho de que *S. aureus* presenta dos mecanismos de resistencia, el primero implica la producción de betalactamasas, enzimas que destruyen hidrolíticamente los betalactámicos (60), y el otro mecanismo es consecuencia de la expresión de la proteína PBP-2a, la cual continúa la síntesis de la pared bacteriana, incluso cuando las PBPs normales de *S. aureus* son inhibidas, bloqueando así la unión de betalactámicos a su sitio activo. El gen *mecA* codifica la PBP-2a y se encuentra en el cromosoma de MRSA, formando parte de la isla genómica móvil *SCCmec*. Ambos mecanismos, sumados al frecuente uso de estos antibióticos en la práctica clínica, hacen que este tipo de resistencia sea muy común y significativa (93).

Entre los betalactámicos utilizados en este estudio, lo más alarmante de todo es la resistencia a la penicilina (80,0 %), valor similar a lo encontrado en Lima-Perú por Aguirre y colaboradores (2022), quienes determinaron que 90,3 % de los aislamientos mostraron resistencia a la penicilina (94), cifra que se asemeja también a lo que encontraron Oviedo y colaboradores (2021), quienes indicaron que el 90,0 % de sus aislamientos presentaron esta resistencia (95). La resistencia a la penicilina se debe principalmente a la producción de penicilinasas-plasmídicas (betalactamasas) que hidrolizan el anillo betalactámico del antimicrobiano, volviéndolo inactivo. Este fenómeno no solo es producto del uso excesivo de la penicilina que favorece la aparición de mutantes capaces de producir betalactamasa, sino que también está mediado por la presencia del gen *blaZ*, un gen plasmídico que codifica la producción enzimática y puede ser transferido entre las bacterias por transducción bacteriana. Estos factores genéticos, sumados a la presión ejercida por el amplio uso de la penicilina contribuyen y seguirá contribuyendo a que los aislamientos de *S. aureus* productores de betalactamasa sean más constantes (1,60).

Mediante el disco de penicilina, también se observó que en aquellos aislamientos en los que estuvo ausente el halo de inhibición y en los que se presentó en forma de acantilado (figura 1 y apéndice 4), hubo producción de betalactamasas (80,0 %), confirmando que esta producción es la principal responsable de la resistencia a la penicilina. El CLSI recomienda utilizar el método de disco de penicilina gracias a su sensibilidad para detectar la producción de betalactamasas, debido a que, si pruebas como la nitrocefina da positiva, se reporta al aislamiento como productor de betalactamasa (o resistente a penicilina), sin embargo, si la prueba es negativa, se recomienda realizar la prueba de zona del borde con disco de penicilina, antes de informar si el aislamiento es sensible a la penicilina en caso de utilizarla como terapia (73).

En el presente estudio, se determinó que el 58,1 % y el 50,5 % de los aislamientos presentaron resistencia a la oxacilina y cefoxitina respectivamente. Estos hallazgos son comparables a los obtenidos en un estudio previo realizado en la misma región por Bustamante y colaboradores (2023), quienes reportaron que el 69,0 % y el 60,6 % de los aislamientos fueron resistentes a la oxacilina y a la cefoxitina, respectivamente (28); es importante destacar que las frecuencias de resistencia encontradas superan en 10,9 % y 9,5 % a los porcentajes obtenidos en el presente estudio. Diferencia que pueden tener implicancias en la situación epidemiológica del MRSA en Cajamarca. Las diferencias descritas podrían estar relacionadas con el origen de los aislamientos, ya que en el estudio de Bustamante el 43,7 % y el 47,9 % de los aislamientos fueron obtenidos de UCIs y de consulta externa, respectivamente, mientras que en este estudio el 53,3 %, el 24,8 % y el 21,9 % de aislamientos provenían de pacientes atendidos en consulta externa, hospitalización y emergencia, respectivamente.

En cuanto a la resistencia de los aislamientos hacia los diferentes antimicrobianos evaluados en la presente investigación resulta ser similar comparando con las cifras obtenidas por Liang y colaboradores (2019), quienes determinaron que todos los aislamientos MRSA eran resistentes a la penicilina y a la cefoxitina, mientras que todos fueron susceptibles a vancomicina (20). En cambio, en este estudio el 94,9 %, el 89,8 % y el 6,8 % de aislamientos MRSA fueron resistentes a penicilina, cefoxitina y vancomicina, respectivamente (Apéndice 3). Algunos de los antimicrobianos que ellos probaron mostraron un patrón de baja resistencia en aislamientos MRSA, para rifampicina, cloranfenicol y trimetoprima-sulfametoxazol, 18,5 %, 11,7 %, y 10,7 % respectivamente, muy parecido a lo encontrado en este estudio, 22,0 %, 10,2 % y 13,6 % de resistencia. Un reporte más reciente, de Cabrejos y colaboradores (2021), afirma que la resistencia hacia clindamicina, eritromicina y gentamicina entre los aislamientos de

MRSA fue superior al 75,0 % (26), valores superiores a los encontrados en este estudio (Apéndice 3).

En este estudio se determinó que, del total de aislamientos, el 15,2 % y el 7,6 % presentaron resistencia al linezolid y a la vancomicina, respectivamente (Tabla 6). Sin embargo, Franquis y colaboradores (2024), no reportaron aislamientos MRSA ni MSSA resistentes al linezolid ni a la vancomicina. Por otro lado, encontraron que el 25,6 %, el 12,8 % y el 8,7 % de aislamientos MRSA fueron resistentes a la levofloxacina, tetraciclina y rifampicina, respectivamente, muy por debajo de lo que se encontró en este estudio (49,2 %, 15,3 % y 22,0 % de resistencia) (96).

Analizando las diferencias y similitudes de las frecuencias de resistencia encontradas en este estudio con las investigaciones previas, lo más relevante por sobre los otros estudios es la resistencia de los aislamientos en general al linezolid (15,2 %), a la ceftarolina (8,6 %) y a la vancomicina (7,6 %) que son los tres antibióticos de última línea utilizados contra *S. aureus* MDR y MRSA. Con respecto a la ceftarolina, Figueredo y colaboradores (2016), reportaron que el 100 % de los aislamientos fueron susceptibles (97), dato que se respalda en gran parte de la literatura, debido a que la ceftarolina es una cefalosporina de quinta generación, que se utiliza para el tratamiento de MRSA como última alternativa junto a antibióticos como el linezolid y la vancomicina (98). Es por ello, que los *S. aureus* que fenotípicamente presentan resistencia a estos antibióticos plantean importantes retos en una terapéutica médica eficaz, ya que son alternativas que no se están considerando en los centros hospitalarios de la región debido al sesgo de información que se tiene sobre la susceptibilidad de este grupo de antibióticos. De modo que para estos fenotipos se recomienda la búsqueda molecular de los genes que confieren esta capacidad (99).

El 53,3 % de los aislamientos fueron determinados como MDR o resistentes a tres o más grupos de antimicrobianos, cercano a lo que encontrado por Liang y colaboradores en el año 2018 (20), y por Moges y colaboradores en el 2023 (100), quienes encontraron 66,2 % y 72,7 % de aislamientos MDR, respectivamente. A diferencia de lo señalado por Quispe y colaboradores en el 2023, quienes en su estudio sistemático determinaron que el 82,2 % de aislamientos de *S. aureus* fueron MDR (101), frecuencia mucho mayor a la encontrada en el presente estudio. Sin embargo, más allá de las diferencias, como se puede apreciar, la frecuencia de MDR de *S. aureus* supera el 50,0 %, dato que nos da una idea de lo peligroso y difícil que es combatir una bacteria de este tipo si no se tiene la información necesaria a la mano.

Del total de aislamientos evaluados, 10,5 % mostraron resistencia inducible a la clindamicina (fenotipo iMLS_B), y de este porcentaje, el 63,6 % fue MRSA (Figura 2). Estos datos son muy similares con los reportados por Silvagni y colaboradores (2019), quienes encontraron que 11,0 % de aislamientos presentaron el fenotipo iMLS_B (102); lo hallado está muy por debajo de lo que encontraron Marrero y colaboradores en el 2024, quienes reportaron que el 27,5 % de aislamientos con el fenotipo iMLS_B (103), y muy por encima de lo que González y colaboradores (2015) encontraron, estudio donde solo 1,4 % de aislamientos presentaron el mencionado fenotipo (64).

Los estudios previamente mencionados indican una notable variabilidad en la frecuencia de aislamientos clínicos de *S. aureus* con fenotipos iMLS_B en distintas zonas geográficas, destacando la importancia de abordar este tema con la máxima consideración en cada centro hospitalario del país, debido a que el creciente aumento de infecciones por MRSA representa un desafío en la elección del antibiótico adecuado, donde la clindamicina se posiciona como una opción inicial antes de los antimicrobianos de última línea. Aunque la clindamicina es considerada aceptable en pacientes con MRSA, la persistencia en su

uso sin la detección de fenotipos iMLSB en casos que aparentan sensibilidad a clindamicina podría llevar al fracaso total de la terapia clínica.

El gen *mecA* se considera un marcador molecular de MRSA porque codifica la proteína PBP-2a, que posee una baja afinidad por los antibióticos betalactámicos y permite la síntesis continua de la pared celular bacteriana en su presencia. Sin embargo, en el año 2016 Vindel y Cercenado describen un estudio previamente publicado, que revelaba la existencia de aislamientos fenotípicamente MRSA (resistente a cefoxitina), pero con ausencia del gen *mecA* y de la proteína PBP-2a. Genéticamente se reveló que un nuevo gen (gen *mecC*) estaba presente en dichos aislamientos, que compartía casi el 70 % de homología con el gen *mecA* y codificaba para una proteína que presentaba un 63 % de homología con los aminoácidos de la PBP-2a (104). Basado en estos nuevos hallazgos y en la literatura existente es que en este estudio se utiliza como marcador de MRSA, la resistencia a la cefoxitina y la presencia independiente del gen *mecA* y del gen *mecC*.

En la presente investigación se encontró que 56,2 % de los aislamientos fueron MRSA. Resultados similares a los de Bustamante y colaboradores (2023), quienes reportaron que el 56,3 % de aislamientos fueron MRSA portadores del gen *mecA* (28), mientras que, en este estudio solo 42,9 % presentaron el gen *mecA*. Si bien el screening de MRSA puede basarse en la presencia del gen *mecA*, en este estudio se contempló utilizar también la presencia del gen *mecC* y la resistencia de la cefoxitina, por lo que los aislamientos MRSA de este estudio mostraron asociación estadísticamente significativa con la resistencia a cefoxitina, presencia de los genes *mecA* y *mecC* (tabla 9).

En la tabla 9 se puede observar que tanto la resistencia a la cefoxitina como la presencia del gen *mecA*, son dos características asociadas ($p < 0,001$) a la condición MRSA, confirmando de esta manera que efectivamente son dos marcadores de MRSA debido a

que tienen alto grado de asociación ($C > 0,7$ para ambos), es decir, es siete veces más probable que un aislamiento sea MRSA si presenta resistencia a cefoxitina. Otra característica asociada es el tipo de muestra, de cuya moderada asociación ($C > 0,4$) se infiere que es cuatro veces más probable que los aislamientos MRSA provengan de muestras de aspirado bronquial. El área de procedencia y el género de los pacientes ($C > 0,2$ para ambos) tienen baja asociación y poca probabilidad de que los aislamientos sean MRSA.

Las tasas de aislamientos MRSA son muy variables según la zona geográfica y el origen que tengan los aislamientos. En Arabia Saudita, Alzalam y colaboradores (2023), reportaron que el 80,0 % de sus aislamientos fueron MRSA (105). En China, Liang y colaboradores (2019), identificaron que 55,1 % de los aislamientos de pacientes hospitalizados fueron MRSA (20). En Perú, Cabrejos y colaboradores (2021), identificaron que el 46,1 % de los aislamientos provenientes de un hospital fueron MRSA (26). Por otro lado, en España, Oliván y colaboradores (2024), a partir de aislamientos provenientes de pacientes pediátricos solo encontraron 15,4 % de MRSA, muy por debajo a lo encontrado en este estudio (106). Estas diferencias son indicativo y motivo de interés para realizar estudios más amplios en Cajamarca y en otras regiones del Perú, esto a fin de establecer las causas y factores asociados a la variabilidad en estas frecuencias.

El perfil de resistencia más común fue el PR15 (Tabla 7), en el cual los aislamientos fueron resistentes a la penicilina, cefoxitina, oxacilina, clindamicina, eritromicina, gentamicina y levofloxacin. En el estudio de Gamboa y colaboradores (2016), quienes utilizaron antibióticos similares, también se describió que el perfil más frecuente fue el de aislamientos resistentes a oxacilina, eritromicina y clindamicina (107). Además, lo encontrado concuerda con lo reportado por Lago N. (92), y por Andrzejczuk y colaboradores (108), donde los aislamientos de *S. aureus* son más resistentes a

antimicrobianos del grupo de los betalactámicos, seguido de los macrólidos (eritromicina) y lincosamidas (clindamicina). Estos resultados son relevantes en los centros médicos al momento de elegir el antibiótico contra esta bacteria.

Los gráficos 2 y 3, resumen que la resistencia antimicrobiana y la presencia de los genes respectivamente estuvo presente en su mayoría en aislamientos provenientes de muestras de aspirado bronquial. Esto debido a que *S. aureus* prospera principalmente en las mucosas nasales, en dónde la bacteria prolifera y desarrolla las distintas manifestaciones de expresión de su patogenicidad (38). En el gráfico 2 se observa que más del 80,0 % de aislamientos provenientes de aspirado bronquial albergaron el gen *mecA*, porcentaje que concuerda en cierta medida con lo reportado en la misma ciudad en el 2023, en dónde determinaron que el 72,0 % de aislamientos provenientes de aspirado bronquial presentaron el gen *mecA* (28). Muy similar a esto en la misma zona geográfica en el 2024 se reportó que el 87,5 % de aislamientos provenientes de vías respiratorias fueron identificados como aislamientos MRSA (31). Por otro lado, en este estudio, el perfil de resistencia (PR15) y el perfil genético (*blaZ*, *mecA* y *tsst*) fueron más frecuentes (Gráfico 1 y 2) en aislamientos de aspirado bronquial. Por lo tanto, el predominio que tiene esta bacteria, su resistencia y sus genes, en muestras respiratorias, es una clara señal que los hospitales deben optar por alternativas terapéuticas eficaces.

En base a otros estudios, la detección de los genes de virulencia y de los genes de resistencia por PCR múltiple, se consideró el estándar para confirmar la patogenicidad y resistencia en los aislamientos estafilococos analizados. Además, el CLSI sugiere la detección de los genes para obtener resultados más específicos. Con respecto a los aislamientos que albergaron genes de resistencia, se presentaron con mayor frecuencia aquellos que fueron positivos para el *blaZ* y el *mecA* 74,3 % y 42,9 %, respectivamente; en menor frecuencia (18,1 %) estuvieron aquellos que con el gen *mecC*. Resultados

similares fueron obtenidos por Okiki y colaboradores (2020), donde el 65,0 % y el 54,5 % de los aislamientos presentaron el gen *blaZ* y el gen *mecA*, respectivamente (109). Sin embargo, difieren de los encontrados por Andrzejczuk y colaboradores (2023), quienes reportaron frecuencias más bajas, con prevalencias del 51,5 %, 13,2 % y el 1,6 % de aislamientos con el gen *blaZ*, *mecA* y *mecC*, respectivamente (108).

En la tabla 8 se resume la coexistencia de los genes de virulencia y de resistencia evaluados en este estudio. La combinación de genes muestra con mayor frecuencia a los genes *blaZ*, *mecA* y *tsst*. Aun cuando las frecuencias de la presencia de los genes varían, el orden porcentual de su presencia es el mismo, es decir en la mayoría de investigaciones es más frecuente encontrar la presencia del gen *blaZ* y menos frecuente encontrar el gen *mecC*. Si solo evaluaríamos genes de resistencia, vamos a encontrar que al gen *blaZ* y al gen *mecA*, están relacionados con la resistencia fenotípica a penicilina y cefoxitina, respectivamente. Sin embargo, en el perfil genético predominante se identificaron además del *blaZ* y *mecA*, el gen de virulencia *tsst*, gen que codifica la toxina TSST-1, causante de una respuesta inmune exagerada y no específica, que conduce a la presencia de síntomas sistémicos graves como hipotensión, erupción cutánea y fiebre alta. Por lo tanto, conocer la presencia del gen *tsst*, ayuda a tomar criterios clínicos para el tratamiento de este tipo de infecciones (24,110,111).

En todos los aislamientos se evaluó la presencia de cuatro genes de virulencia, *tsst*, *eta*, *etb* y *PVL* (Gráfico 1), el primero fue el más frecuente entre los aislamientos, 34,3 % del total. Estas cifras son similares a los encontrados por Hauri y colaboradores (2020), quienes encontraron que el 33,7 % de los aislamientos analizados en su estudio presentaron el gen *tsst*, y el 3,7 % presentaron el gen *eta*; sin embargo, ninguno presentó el gen *etb* (24). Cabrejos y colaboradores (2021), encontró que 8,7 % de los aislamientos fueron positivos para el gen *PVL* (26). Investigaciones como la de Ade (2023) y Amelia

(2024), revelaron frecuencias muy altas de los genes; Ade reportó que el gen *tsst* estuvo presente en 67,8 % del total de sus aislamientos (112), y Amelia encontró que el 91,0 % y el 60,3 % de sus aislamientos presentaron los genes *PVL* y *eta*, respectivamente (113). Estas diferencias entre los hallazgos de esta investigación y la de otros estudios se deben probablemente a que los factores de virulencia se expresan independientemente de la resistencia, por lo que Amelia sostiene que es muy probable que estos genes de virulencia se expresan con mayor frecuencia en *S. aureus* sensibles, sugiriendo que se estudie a profundidad la posible relación entre los genes de virulencia y las características de *S. aureus*.

CAPITULO V

5.1 Conclusiones

- Se identificaron 42 perfiles de resistencia antimicrobiana distintos en 105 aislamientos de *S. aureus* provenientes de muestras clínicas, de los cuales el perfil más frecuente fue el de resistencia simultánea a penicilina, cefoxitina, oxacilina, clindamicina, eritromicina, gentamicina y levofloxacina; además, se encontró que el 53,3 % de los aislamientos fueron MDR.
- Entre los genes de resistencia, el gen *blaZ* fue el más frecuente (74,3 %), seguido por el gen *mecA* (42,9 %) y el gen *mecC* (16,1 %). En cuanto a los genes de virulencia, el gen *tsst* estuvo en el 34,3 % de los aislamientos, seguido por los genes *eta*, *etb* y *PVL* que se encontraron en el 6,7 %, 2,9 % y 2,9 % de los aislamientos, respectivamente.
- El 56,2 % del total de aislamientos fueron MRSA, establecido a partir de la presencia de los genes *mecA*, *mecC* y/o la resistencia a cefoxitina. Además, el 42,4 % y el 63,6 % de MRSA provino de muestras de aspirado bronquial y presentaron resistencia inducible a clindamicina, respectivamente.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda profundizar en el estudio epidemiológico de *S. aureus* en los diversos establecimientos de salud de Cajamarca, con el objetivo de plantear estrategias adecuadas para enfrentar esta bacteria. La incorporación de pruebas moleculares para la detección rápida de MRSA o MDR, además de las pruebas microbiológicas comunes en los laboratorios hospitalarios, deben ser implementadas a fin de controlar la diseminación de este patógeno y plantear alternativas de solución frente a la RAM en nuestra Región.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castellano González MJ, Perozo-Mena AJ. Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Staphylococcus aureus*. Kasma [Internet]. 2010 [cited 2024 Jun 8];38(1):18–35. Available from: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003
2. Mohseni M, Rafiei F, Ghaemi EA. High frequency of exfoliative toxin genes among *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in the north of Iran: Alarm for the health of individuals under risk. Iran J Microbiol [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Jun 1];10(3):158. Available from: </pmc/articles/PMC6087700/?report=abstract>
3. Ardanuy C, María EC, Morosini I, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. Seimc. 2011;1–41.
4. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2024 May 29];46(1):8–20. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x>
5. Méndez-Álvarez S, Pérez-Roth E. La PCR múltiple en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2004 [cited 2024 May 30];22(3):183–92. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-pcr-multiple-microbiologia-clinica-13058027>
6. Castellazzi ML, Bosis S, Borzani I, Tagliabue C, Pinzani R, Marchisio P, et al. Pantón-valentine leukocidín *Staphylococcus aureus* severa infección en un niño:

- a case report and a review of the literature. *Ital J Pediatr* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Jul 22];47(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13052-021-01105-5>
7. Ulises González-De La Cruz J, Delfin-González H, De La Cruz-Leyva MC, Rojas-Herrera RA, Zamudio-Maya M. Protocolo para extracción de ADN Metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jun 1];14:875–83. Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000300015
 8. Guaca-González YM, Flórez-Restrepo GF, Moncayo-Ortíz JI, Santacruz-Ibarra J, Álvarez-Aldana A. Detección y expresión de superantígenos y de resistencia antimicrobiana en aislamientos obtenidos de mujeres portadoras de *Staphylococcus aureus* que cuidan y alimentan niños. *Biomedica*. 2018 Mar 15;38(1):96–104.
 9. Institutos Nacionales de Salud. Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. 2019 [cited 2023 Jan 22]. ¿Qué es una mutación genética y cómo ocurren las mutaciones?". Available from: <https://www.thoughtco.com/chromosome-mutation-373448>
 10. Nishino K, Yamasaki S, Nakashima R, Zwama M, Hayashi-Nishino M. Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Dec 3 [cited 2023 Jan 21];12:3390. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737288>

11. Kazazian HH. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* [Internet]. 2004 Mar 12 [cited 2023 Jan 21];303(5664):1626–32. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1089670>
12. Cloud JL, Harmsen D, Iwen PC, Dunn JJ, Hall G, LaSala PR, et al. Comparison of Traditional Phenotypic Identification Methods with Partial 5' 16S rRNA Gene Sequencing for Species-Level Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2023 Jan 21];48(4):1442–4. Available from: <https://doi.org/10.1128/jcm.00169-10>
13. Chávez-Vivas M. Avances en el estudio de marcadores moleculares en el diagnóstico y pronóstico de sepsis bacteriana en la ciudad de Cali. In 2020.
14. O'Neill J. Tackling drug-resistance infections globally: final report and recommendations. Review on antimicrobial resistance [Internet]. 2016 May [cited 2023 Jan 7];1–84. Available from: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
15. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* [Internet]. 2022 Feb [cited 2024 Apr 21];399(10325):629–55. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
16. Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, Gray AP, et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* [Internet]. 2022 Dec [cited 2024 Apr 21];400(10369):2221–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673622021857>

17. Usmán José SDA, Sebastian IO, Mario MM, Ruiz Gallo P, Juan XXIII C, de Ciencias Biológicas F, et al. Susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* de aislados nasales en estudiantes del norte de Perú. *Gaceta Médica Boliviana*. 2020;43(1):49–55.
18. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2023 Jun 27 [cited 2024 Apr 21];21(6):380–95. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
19. Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, Marusza W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jul 22 [cited 2024 Jul 21];23(15):8088. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>
20. Liang Y, Tu C, Tan C, El-Sayed Ahmed MAEG, Dai M, Xia Y, et al. Antimicrobial resistance, virulence genes profiling and molecular relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients in Guangdong Province, China. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2019 Feb [cited 2024 Jul 22];Volume 12:447–59. Available from: <https://doi.org/10.2147/IDR.S192611>
21. Nakadomari GH, Charalo AC, Pavan ACL, Vignoto VKC, Sfaciotte RAP, Wosiacki SR. Multiplex-PCR for detection of β -lactam resistance in *Staphylococcus* spp. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública* [Internet]. 2019 Aug 3 [cited 2024 Jul 21];6(2):262–75. Available from: <https://doi.org/10.4025/revcivet.v6i2.45050>
22. Bastidas CA, Villacrés-Granda I, Navarrete D, Monsalve M, Coral-Almeida M, Cifuentes SG. Antibiotic susceptibility profile and prevalence of *mecA* and *lukS*-

- PV/lukF-PV* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from nasal and pharyngeal sources of medical students in Ecuador. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2019 Aug [cited 2023 Jan 19];12:2553–60. Available from: <https://doi.org/10.2147/IDR.S219358>
23. Martínez-Medina RM, Montalvo-Sandoval FD, Magaña-Aquino M, Terán-Figueroa Y, Pérez-Urizar JT. Prevalence and genotypic characterization of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated in a mexican regional hospital. *Revista Chilena de Infectologia* [Internet]. 2020 Feb [cited 2023 Jan 18];37(1):37–44. Available from: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000100037>
 24. Hourri H, Samadpanah M, Tayebi Z, Norouzzadeh R, Malekabad ES, Dadashi AR. Investigating the toxin profiles and clinically relevant antibiotic resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolates using multiplex-PCR assay in Tehran, Iran. *Gene Rep* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 May 29];19:100660. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100660>
 25. Ackers-Johnson G, Kibombo D, Kusiima B, Nsubuga ML, Kigozi E, Kajumbula HM, et al. Antibiotic resistance profiles and population structure of disease-associated *Staphylococcus aureus* infecting patients in Fort Portal Regional Referral Hospital, Western Uganda. *Microbiology (N Y)* [Internet]. 2021 May 25 [cited 2024 Jul 22];167(5). Available from: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001000>
 26. Cabrejos-Hirashima L, Vives-Kufof C, Inga-Salazar J, Astocondor L, Hinostroza N, García C. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* metilicilinoresistente adquirido en la comunidad en un hospital de tercer nivel en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud*

- Publica [Internet]. 2021 Aug 30 [cited 2024 Jun 2];38(2):313–7. Available from: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.382.6867>
27. Tasneem U, Majid M, Mehmood K, Redaina, Ur Rehman F, Andleeb S, et al. Co-occurrence of antibiotic resistance and virulence Genes in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Pakistan. Afr Health Sci [Internet]. 2022 [cited 2023 Jan 19];22(1):486–95. Available from: <https://doi.org/10.4314/ahs.v22i1.57>
 28. Bustamante-Cabrera AM, Quiroz Ruiz HR, Vega Fernandez JA, Rivera Jacinto MA. Frecuencia del gen *mecA* en *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente en un hospital de tercer nivel en Perú. Gaceta Médica Boliviana [Internet]. 2023 Jun 19 [cited 2024 May 29];46(1):27–32. Available from: <https://doi.org/10.47993/gmb.v46i1.616>
 29. Ismael R, Alhameedawi A, Abbas R, Alsallameh SarahMS, Amer H, Firat M, et al. *Staphylococcus aureus* virulence genes and methicillin-resistant gene detection and antimicrobial resistance profiles isolated from different infection sites. Egyptian Pharmaceutical Journal. 2023 Apr 1;22(2):265.
 30. Agbo MC, Ezeonu IM, Onodagu BO, Ezech CC, Ozioko CA, Emencheta SC. Antimicrobial resistance markers distribution in *Staphylococcus aureus* from Nsukka, Nigeria. BMC Infect Dis [Internet]. 2024 Mar 15 [cited 2024 Jul 21];24(1):320. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09126-1>
 31. Llasha Sánchez JM. Perfil de resistencia antimicrobiana y tipificación del casete cromosómico estafilocócico *mec* en *Staphylococcus aureus* de origen clínico y de portadores comunitarios en Cajamarca. 2024.

32. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller. *Microbiología médica* 7.^a edición. Elsevier España. 2013 Jan 1;174–88.
33. Pasachova J, Ramirez S, Muñoz L. *Staphylococcus aureus*: generalities, mechanisms of pathogenicity and cell colonization. NOVA [Internet]. 2019 [cited 2023 Jan 20];17(32):25–38. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-25.pdf>
34. Rocchetti TT, Martins KB, Martins PYF, Oliveira RA de, Mondelli AL, Fortaleza CMCB, et al. Detection of the mec A gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Jan 20];22(2):99–105. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.006>
35. Gnanamani A, Hariharan P, Paul-Satyaseela M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. In: *Frontiers in Staphylococcus aureus* [Internet]. InTech; 2017 [cited 2024 Jul 21]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/frontiers-in-i-staphylococcus-aureus-i-/staphylococcus-aureus-overview-of-bacteriology-clinical-diseases-epidemiology-antibiotic-resistance->
36. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2015 Jul [cited 2023 Jan 20];28(3):603–61. Available from: <https://doi.org/10.1128/cmr.00134-14>

37. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2005 Dec [cited 2023 Jan 20];3(12):948–58. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1289>
38. Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus* Infection. *Encyclopedia of Food Safety, Second Edition, Volume 1-4* [Internet]. 2023 Jul 17 [cited 2024 Jul 22];1–4:V2-310-V2-318. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
39. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires* [Internet]. 2008 Dec [cited 2023 Jan 20];2008(407):61–9. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(08\)74868-8](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(08)74868-8)
40. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog* [Internet]. 2011 [cited 2023 Jan 20];2011:1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3335658/>
41. Chapman GH. The significance of sodium chloride in studies of *Staphylococcus*. *J Bacteriol* [Internet]. 1945 Aug [cited 2023 Jan 20];50(2):201–3. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.50.2.201-203.1945>
42. Vijayan J. Understanding the population genetic structure of bovine mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in New Zealand to identify potential vaccine candidates using reverse vaccinology. 2021.
43. Sanabria G. Evolución de la resistencia en el *Staphylococcus aureus*. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*. 2008;3(2):27–39.

44. Founou RC, Founou LL, Essack SY. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. Butaye P, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Dec 21 [cited 2023 Jan 19];12(12):e0189621. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>
45. 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 Dec 1 [cited 2023 Jan 19];27:101–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
46. Edwards F, MacGowan A, Macnaughton E. Antibiotic resistance [Internet]. Vol. 49, Medicine (United Kingdom). Elsevier Ltd; 2021 [cited 2023 Jan 19]. p. 632–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.07.006>
47. Tillotson GS, Zinner SH. Burden of antimicrobial resistance in an era of decreasing susceptibility. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]. 2017 Jul 3 [cited 2023 Jan 19];15(7):663–76. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1337508>
48. Mir S, Brett D, Adam de la B, Martha K. Antibiotics Overuse and Bacterial Resistance. Annals of Microbiology and Research [Internet]. 2019 Oct 26 [cited 2023 Jan 19];3(1). Available from: <https://scholars.direct/Articles/microbiology/amr-3-013.php?jid=microbiology>
49. Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? Arch Med Res [Internet]. 2005 Nov [cited 2024 Jul 21];36(6):697–705. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
50. Baene I. Resistencia bacteriana: principios fundamentales para la práctica quirúrgica. Revista Colombiana de Cirugía. 1998;13(3):174–80.

51. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2023 Jan 19];303(6–7):287–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
52. Coculescu BI. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *J Med Life* [Internet]. 2009 Apr 4 [cited 2023 Jan 19];2(2):114–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20108530>
53. Mahon Connie R, Lehman Donald C MG. *Textbook of diagnostic microbiology*. Vol. 15, American Speech. 2006. 310 p.
54. Cálderón Rojas G, Ulale Aguilar L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica De Costa Rica y Centroamérica LXXIII*. 2016;620:637–40.
55. Chávez-Jacobo VM, Ramírez-Díaz MI, Silva-Sánchez J, Cervantes C, Chávez-Jacobo VM, Ramírez-Díaz MI, et al. Resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos. *REB Revista de educación bioquímica* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jan 19];34(1):4–9. Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952015000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
56. Pérez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev Med (Puebla)* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jan 21];4(04):186–91. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
57. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y*

- cuello [Internet]. 2009 Aug [cited 2023 Jan 19];69(2):185–92. Available from: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
58. Elston DM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2024 Jun 4];56(1):1–16; quiz 17–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.04.018>
59. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three- year analysis. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 1999 [cited 2023 Jan 22];29(2):239–44. Available from: <https://doi.org/10.1086/520192>
60. Natalia T, Molina NB. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. *Microbiología y Parasitología*. 2022;1–9.
61. Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Vol. 38, *Colombia Medica*. Abril-Junio; 2007. p. 149–58.
62. Rafael Vignoli A, Dra Lorena Pardo A. Manual de Mecanismos de Resistencia a Antibióticos Macrólidos y Lincosaminas. EUCAST. 2016;1–14.
63. Merino-Díaz L, De La Casa AC, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2024 Jun 4];25(2):77–81. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-deteccion-resistencia-inducible-clindamicina-aislados-13098567>

64. González Maribel CJ, Mena Armindo PJ, Cubillán Mariheddy de MJ, Araujo Sinead del MC, Rodríguez Francisco PJ. Resistencia a la clindamicina inducida por eritromicina en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. *K asmera*. 2015 Jan;43(1):34–45.
65. Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fexA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant *Staphylococcus* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2006 Apr [cited 2024 Jun 4];50(4):1156. Available from: <https://doi.org/10.1128%2FAAC.50.4.1156-1163.2006>
66. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA problem. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2019 Apr 12 [cited 2024 Jun 4];7(2). Available from: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018>
67. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resistance Updates* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2024 Jun 4];17(1–2):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.04.002>
68. Leach KL, Swaney SM, Colca JR, McDonald WG, Blinn JR, Thomasco LMM, et al. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell* [Internet]. 2007 May 11 [cited 2024 Jun 4];26(3):393–402. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.005>
69. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Focus: Infectious Diseases: Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Jun 4];90(2):269. Available from: [/pmc/articles/PMC5482303/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3482303/)

70. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. J Adv Res [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Jun 4];21:169–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005>
71. Moreno-Flores A, Potel-Alvarellos C, Otero-Fernández S, Álvarez-Fernández M. Phenotypic and genetic characteristics of fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2024 Jun 4];36(7):403–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.06.006>
72. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices [Internet]. Vol. 49, Clinical Infectious Diseases. Oxford Academic; 2009 [cited 2023 Jan 20]. p. 1749–55. Available from: <https://doi.org/10.1086/647952>
73. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. 2024;34:1–416.
74. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Internet]. 2021 Jan [cited 2024 Jul 21]. Available from: <http://www.eucast.org>
75. García Rodríguez Rafael Cantón J Elías García Sánchez M^a Luisa Gómez-Lus Luis Martínez Martínez Carmen Rodríguez-Avial Jordi Vila JA. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2000;11:1–54.
76. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2020

- Mar 17 [cited 2023 Jan 20];10:107. Available from:
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
77. Pennone V, Prieto M, Álvarez-Ordóñez A, Cobo-Diaz JF. Antimicrobial resistance genes analysis of publicly available *Staphylococcus aureus* genomes. *Antibiotics* [Internet]. 2022 Nov 16 [cited 2023 Jan 20];11(11):1632. Available from:
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11111632>
78. Khodabandeh M, Mohammadi M, Abdolsalehi MR, Alvandimanesh A, Gholami M, Bibalan MH, et al. Analysis of Resistance to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Among *mecA* positive *Staphylococcus aureus* Isolates. *Osong Public Health Res Perspect* [Internet]. 2019 Feb [cited 2024 Jul 21];10(1):25–31. Available from: <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2019.10.1.06>
79. Samaniego Lucas GV, Choez Jaime KE, Lucas Parrales EN. *Staphylococcus aureus*: factores asociados a su hipervirulencia y adhesión y formación de biopelículas. *Polo del Conocimiento*. 2021;6(9):1826–60.
80. Pournajaf A, Ardebili A, Goudarzi L, Khodabandeh M, Narimani T, Abbaszadeh H. PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jan 20];4(Suppl 1):S293–7. Available from:
<https://doi.org/10.12980%2FAPJTB.4.2014C423>
81. Sacsquispe Contreras, Rosa Elena; Ventura Egusquiza G. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones Intrahospitalarias. Instituto Nacional de Salud. 2005;1–109.
82. Koneman, Winn, Allen, Janda, Procop, Schreckengerger. Diagnóstico microbiológico. Vol. 6. 2006. 1–1696 p.

83. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Agar Sangre. LABORCLIN. 2022 May;1–4.
84. Durán Vila LA, Zhurbenko IR, Diana L, Viera Oramas R. Propuesta de una modificación en la formulación del medio Agar Manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. *Revista Cubana MedicinaTropical*. 2004;56(3):172–7.
85. Becker K, Skov RL, Eiff C von. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. 2015 May 26 [cited 2024 Jul 21];354–82. Available from: <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch21>
86. Romero AC, Diaz AS, Aguilar BR, Munive MGR. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. 2014 [cited 2023 Jan 27]. Extracción y purificación de ADN. Available from: <https://docplayer.es/3572384-Extraccion-y-purificacion-de-adn.html>
87. García-Alegría AM, Anduro-Corona I, Pérez-Martínez CJ, Guadalupe Corella-Madueño MA, Rascón-Durán ML, Astiazaran-Garcia H. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. Abdel-Rehim M, editor. *Int J Anal Chem* [Internet]. 2020 Nov 29 [cited 2024 Apr 24];2020:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>
88. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop Lite User Guide. 2012;2–34.
89. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000 Mar [cited

- 2023 May 23];38(3):1032–5. Available from:
<https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1032-1035.2000>
90. Merck. Polymerase Chain Reaction (PCR) | Life Science Research | [Internet].
2024 [cited 2024 Jul 21]. Available from:
<https://www.merckmillipore.com/PE/es/life-science-research/genomic-analysis/dna-preparation-cloning/PCR/bnub.qB.gYQAAAFfomMF3Irw.nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>
91. Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Third, Cold Spring Harboc Laboratory. 2001; Third.
92. Lago NB. Evaluación de la multirresistencia antimicrobiana de la cepa *Staphylococcus aureus*. Jornada científica de residentes profesionales de Salud. 2023 May.
93. Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. Cellular and Molecular Life Sciences [Internet]. 2005 Nov 7 [cited 2024 May 25];62(22):2617–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5148-6>
94. Aguirre Castañeda PC, Li Valverde V. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en portadores nasales menores de 2 años en Lima, Perú. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022.
95. Márquez-Oviedo A, Romero-Coasaca AC, Requena-Mendizábal MF, Martínez-Cadillo E, Mongrut-Villegas U, Ayón-Haro ER, et al. Resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de la mucosa oral de una población joven peruana. International journal of odontostomatology [Internet]. 2021 Sep [cited 2024 May

- 29];15(3):634–8. Available from:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2021000300634&lng=es&nrm=iso&tlng=es
96. Franquis-Rodríguez RM, Castellano-González MJ, Perozo-Mena AJ, Sandoval-Castellano IV. Susceptibilidad a meticilina y vancomicina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Artículo Original Bacteriología Kasmera [Internet]. 2020;48(1):48128122019. Available from:
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3712378>
97. Figueredo CL, Campero D, Correa JG, Torres LC. Susceptibilidad a ceftarolina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Revista del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Ranger.” 2016 Jul 22;47:1–7.
98. Pérez Ramírez JE, Alcívar Zambrano ML, Idrovo Idrovo C del R, Latacela Bravo MC. Ceftarolina, la nueva línea de cefalosporina de quinta generación: estudio del mecanismo de acción frente a la respuesta microbiana. Salud Con Ciencia [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Jul 22];2(1):1–6. Available from:
<https://doi.org/10.55204/scc.v2i1.e9>
99. Rincón S, Panesso D, Díaz L, Carvajal LP, Reyes J, Munita JM, et al. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. Biomedica [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 1];34(01):191–202. Available from: <https://doi.org/10.1590%2FS0120-41572014000500022>
100. Moges F, Tamiru T, Amare A, Mengistu G, Eshetie S, Dagne M, et al. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Multidrug-Resistant Strains from Patients Attending the Referral Hospitals of Amhara Regional State,

- Ethiopia. *Int J Microbiol* [Internet]. 2023 [cited 2024 May 28];2023:2–6. Available from: <https://doi.org/10.1155/2023/3848073>
101. Quispe-Pari F, Kong-Paravicino C, Eguiluz M, Hurtado-Alegre J, Acosta J, Quispe-Pari F, et al. Prevalencia de bacterias multidrogoresistentes en un hospital público ubicado en la sierra del Perú. *Anales de la Facultad de Medicina* [Internet]. 2023 [cited 2024 May 28];84(2):177–85. Available from: <https://doi.org/10.15381/anales.v84i2.24951>
 102. Silvagni M, Guillén R, Rodríguez F, Espínola C, Grau L, Velázquez G, et al. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de pacientes pediátricos en Paraguay. *Revista chilena de infectología* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 May 28];36(4):455–60. Available from: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000400455>
 103. Marrero AC, Martínez MG, Gómez DG, Goicochea MCA, Sánchez YD, Choy TAO. *Staphylococcus aureus* y fenotipos de resistencia MLSb. *Medicentro Electrónica* [Internet]. 2024 Feb 22 [cited 2024 May 28];28(0):e4169. Available from: <https://medicentro.sld.cu/index.php/medicentro/article/view/4169>
 104. Vindel A, Cercenado E. *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina portadores del gen *mecC*: ¿un problema emergente? *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 May 29];34(5):277–9. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-staphylococcus-aureus-resistentes-meticilina-portadores-S0213005X16000513>
 105. Alsolami A, ALGhasab NS, Alharbi MSM, Bashir AI, Saleem M, Syed Khaja AS, et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in

- Hospitals: Age-Specificity and Potential Zoonotic–Zooanthroponotic Transmission Dynamics. *Diagnostics* 2023, Vol 13, Page 2089 [Internet]. 2023 Jun 16 [cited 2024 May 29];13(12):2089. Available from: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13122089>
106. Oliván PM, Monleón SF, Bretón-Martínez JR, Luna AP, Monleón IH, Latasa CF, et al. Prevalencia y factores de riesgo de infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en niños. *Revista Española de Quimioterapia* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 May 29];37(2):170–5. Available from: <https://doi.org/10.37201%2Ffreq%2F113.2023>
107. Gómez-Gamboa L, Nuñez-Chacín D, Perozo-Mena A, Bermúdez-González J, Marín Milagros. *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple a los antibióticos (MDR) en un Hospital de Maracaibo-Venezuela. *Kasmera*. 2016;44(1):53–65.
108. Andrzejczuk S, Cygan M, Dłuski D, Stępień-Pyśniak D, Kosikowska U. Staphylococcal Resistance Patterns, *blaZ* and *SCCmec* Cassette Genes in the Nasopharyngeal Microbiota of Pregnant Women. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2024 Jun 2];24(9):7980. Available from: <https://doi.org/10.3390%2Fijms24097980>
109. Okiki PA, Eromosele ES, Ade-Ojo P, Sobajo OA, Idris OO, Agbana RD. Occurrence of *mecA* and *blaZ* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with vaginitis among pregnant women in Ado-Ekiti, Nigeria. *New Microbes New Infect* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 Jun 2];38:100772. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100772>
110. Parsonnet J, Hansmann MA, Delaney ML, Modern PA, DuBois AM, Wieland-Alter W, et al. Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin 1-Producing

- Staphylococcus aureus* and the Presence of Antibodies to This Superantigen in Menstruating Women. J Clin Microbiol [Internet]. 2005 Sep [cited 2024 Jun 4];43(9):4628–34. Available from: <https://doi.org/10.1128%2FJCM.43.9.4628-4634.2005>
111. Gossack-Keenan KL, Kam AJ. Toxic Shock Syndrome: Still a Timely Diagnosis. Pediatr Emerg Care [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Jun 3];36(3):e163–5. Available from: <https://doi.org/10.1097/pec.0000000000001310>
112. Ade TI, Odewale G, Daji M, Ohirhian J, Ojedele RO. Association of TSST-1 gene with phenotypic antibiotic resistance among clinical *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary healthcare center. Microbes and Infectious Diseases [Internet]. 2023 May 1 [cited 2024 Jun 2];4(2):450–8. Available from: <https://doi.org/10.21608/mid.2022.150189.1348>
113. Amelia S, Kusumawati RL, Hasibuan M, Winda L, Balatif R, Ivander A. Prevalence of Pantone-Valentine leucocidin (*pvl*) and exfoliative toxin A (*eta*) gene within methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* in an urban tertiary hospital: A molecular epidemiology pilot study. F1000Res [Internet]. 2024 Jan 11 [cited 2024 Jun 2];12:1002. Available from: <https://doi.org/10.12688/f1000research.134641.2>

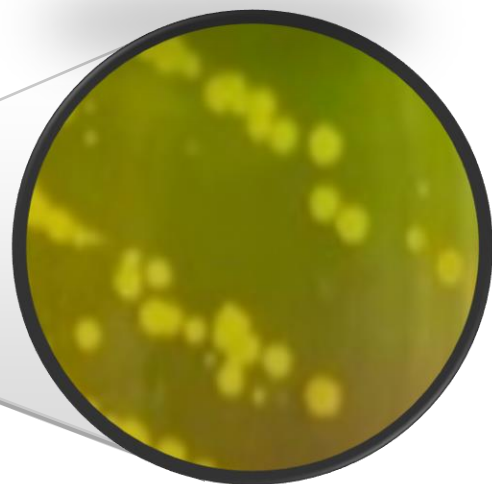
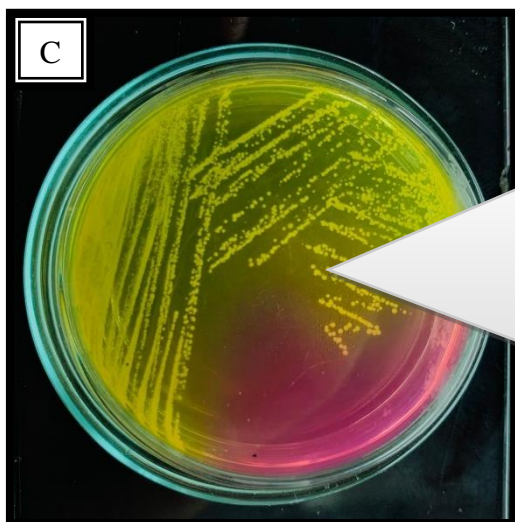
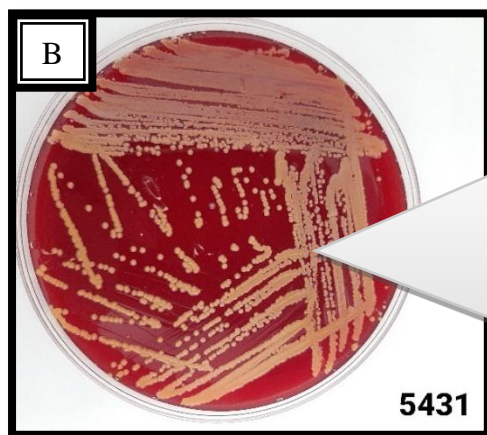
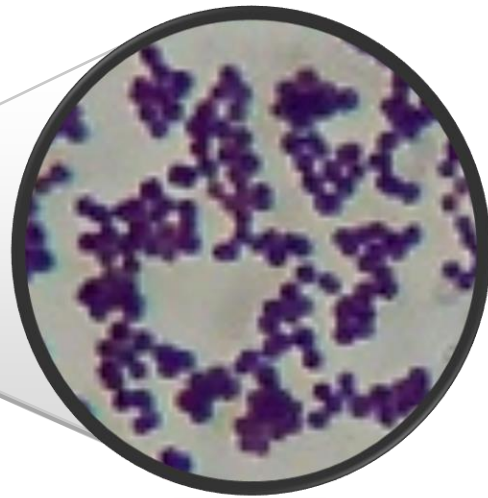
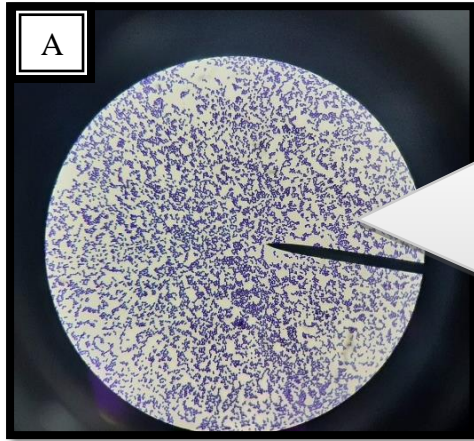
APÉNDICES

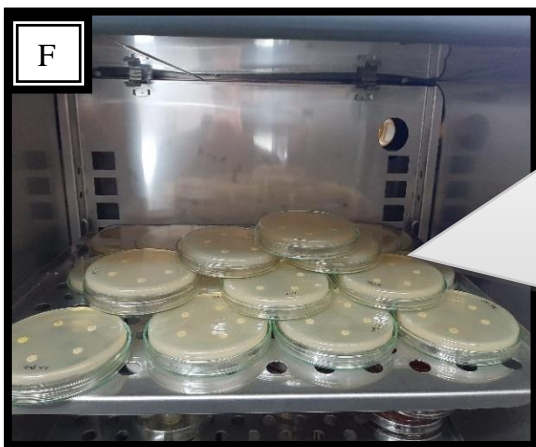
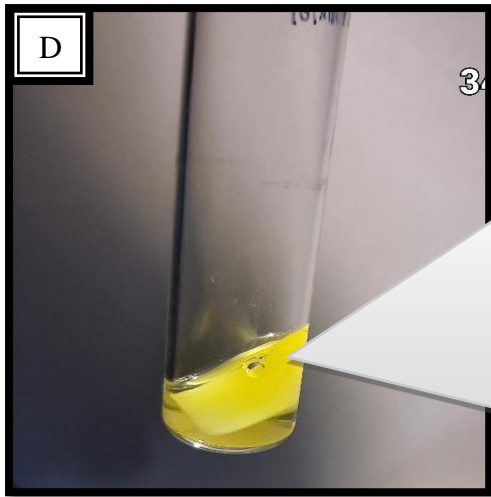
Apéndice 1. Ficha para descripción clínica de los aislamientos recolectados.

DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS AISLAMIENTOS	
<i>Código de aislamiento</i>
<i>Fecha de cultivo</i>/...../.....
<i>Muestra clínica</i>
<i>Edad</i>
<i>Sexo</i>
<i>Servicio Hospitalario</i>
<i>Área Hospitalaria</i>

N°
—

Apéndice 2: Coloración Gram (A), *S. aureus* en Agar Sangre (B), en Agar Manitol Salado (C), Prueba de coagulasa positiva (D), *S. aureus* reactivado en Agar Nutritivo (E), Antibiograma de *S. aureus* (F).





Apéndice 2. Ficha de recolección de datos (mediciones) de los resultados del antibiograma por antibiótico.

ANTIBIOGRAMA (*Staphylococcus aureus*)

INFORME DE RESULTADOS

CÓDIGO: _____

FECHA: _____

Nº	DISCO DE ANTIBIÓTICO	M1	M2	M3	P	X
1	Cefoxitina					
2	Oxacilina					
3	Penicilina					
4	Ceftarolina					
5	Vancomicina					
6	Clindamicina					
7	Eritromicina					
8	Gentamicina					
9	Tetraciclina					
10	Levofloxacin					
11	Nitrofurantoina					
12	Trimetropima - Sulfamethoxazol					
13	Linezolid					
14	Cloranfenicol					
15	Rifampicina					

M1 : Primera medición

M2 : Segunda medición

M3 : Tercera medición

P : Promedio

X : (S) Sensible/ (R) Resistente/ (I) Intermedio/ (SDD) Sensible Dosis Dependiente

Apéndice 3. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos MRSA y MSSA evaluado con el método del disco de difusión ¹.

Antibiótico	MRSA (n=59)				MSSA (n=46)				p valor	V de Cramer
	Categorías interpretativas				Categorías interpretativas					
	R	S	I	SDD	R	S	I	SDD		
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)			
Penicilina	56 (94,9)	3 (5,1)	N. A	N. A	28 (60,9)	18 (39,1)	N. A	N. A	0,000	0,422
Oxacilina	55 (93,2)	4 (6,8)	N. A	N. A	6 (13,0)	40 (87,0)	N. A	N. A	0,000	0,806
Cefoxitina	53 (89,8)	6 (10,2)	N. A	N. A	0 (0,0)	46 (100)	N. A	N. A	0,000	0,891
Eritromicina	40 (67,8)	10 (16,9)	9 (15,3)	N. A	8 (17,4)	32 (69,6)	6 (13,0)	N. A	0,000	0,555
Clindamicina	34 (57,6)	20 (33,9)	5 (8,5)	N. A	2 (4,3)	43 (93,5)	1 (2,2)	N. A	0,000	0,605
Gentamicina	35 (59,3)	22 (37,3)	2 (3,4)	N. A	1 (2,2)	43 (93,5)	2 (4,3)	N. A	0,000	0,601
Levofloxacina	29 (49,2)	29 (49,2)	1 (1,6)	N. A	2 (4,3)	43 (93,5)	1 (2,2)	N. A	0,000	0,488
Linezolid	14 (23,7)	34 (57,6)	11 (18,6)	N. A	2 (4,3)	40 (87,0)	4 (8,7)	N. A	0,003	0,328
Tetraciclina	9 (15,3)	50 (84,7)	0 (0,0)	N. A	4 (8,7)	42 (91,3)	0 (0,0)	N. A	0,381	0,099
Rifampicina	13 (22,0)	46 (78,0)	0 (0,0)	N. A	1 (2,2)	45 (97,8)	0 (0,0)	N. A	0,003	0,290
SXT	8 (13,6)	51 (86,4)	0 (0,0)	N. A	2 (4,3)	44 (95,7)	0 (0,0)	N. A	0,180	0,156
Vancomicina	4 (6,8)	55 (93,2)	N. A	N. A	4 (8,7)	42 (91,3)	N. A	N. A	0,727	0,036
Ceftarolina	8 (13,6)	40 (67,8)	N. A	11 (18,6)	1 (2,2)	45 (97,8)	N. A	0 (0,0)	0,000	0,383
Cloranfenicol	6 (10,2)	53 (89,8)	0 (0,0)	N. A	1 (2,2)	45 (97,8)	0 (0,0)	N. A	0,133	0,159
Nitrofurantoina	2 (3,4)	57 (96,8)	0 (0,0)	N. A	0 (0,0)	45 (97,8)	1 (2,2)	N. A	0,241	0,165

¹ Puntos de corte basados en el CLSI M100™ "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition"; n, recuento de aislamientos; %, frecuencia de aislamientos SDD, Sensible dosis dependiente; SXT, Trimetoprima-sulfametoxazol; N.A, Categoría que no se aplica para el disco.

Apéndice 4. Screening de la producción de betalactamasa en aislamientos MRSA y MSSA mediante disco de difusión de la penicilina.

Halo de la penicilina	Productor de betalactamasa	MRSA	MSSA	TOTAL
		n (%)	n (%)	n (%)
Acantilado		31 (54,5)	26 (56,5)	57 (54,3)
Sin halo	SI	25 (42,4)	2 (4,3)	27 (25,7)
Playa	NO	3 (5,1)	18 (39,1)	21 (20,0)
Total		59 (100)	46 (100)	105 (100)

n, recuento de aislamientos; %, frecuencia de aislamientos.

Apéndice 5. Frecuencia de aislamientos MRSA y MSSA según genes de virulencia y resistencia evaluados en este estudio.

GEN	PRESENTE	MRSA (n=59)	MSSA (n=49)	TOTAL
		n (%)	n (%)	n (%)
<i>mecA</i>	SI	45 (76,3)	0 (0,0)	45 (42,9)
	NO	14 (23,7)	46 (100)	60 (57,1)
<i>mecC</i>	SI	19 (32,2)	0 (0,0)	19 (18,1)
	NO	40 (67,8)	46 (100)	86 (81,9)
<i>blaZ</i>	SI	49 (83,1)	29 (63,0)	78 (74,3)
	NO	10 (16,9)	17 (37,0)	27 (25,7)
<i>tsst</i>	SI	27 (45,8)	9 (19,6)	36 (34,3)
	NO	32 (54,2)	37 (80,4)	69 (65,7)
<i>eta</i>	SI	4 (6,8)	3 (6,5)	7 (6,7)
	NO	55 (93,2)	43 (93,5)	98 (93,3)
<i>etb</i>	SI	3 (5,1)	0 (0,0)	3 (2,9)
	NO	56 (94,9)	46 (100)	102 (97,1)
<i>PVL</i>	SI	0 (0,0)	3 (6,5)	3 (2,9)
	NO	59 (100)	43 (93,5)	102 (97,1)

n, recuento de aislamientos; %, frecuencia de aislamientos

Apéndice 6. Evaluación de la calidad de ADN en el Nanodrop™ Lite Thermo Scientific.

