



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD EN CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* DE MUESTRAS NASOFARÍNGEAS EN
NIÑOS DE VARIAS PROVINCIAS DEL ECUADOR

AUTOR

Alexis Fabricio Guerra Navarrete

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD EN CEPAS DE
Staphylococcus aureus DE MUESTRAS NASOFARÍNGEAS EN NIÑOS DE
VARIAS PROVINCIAS DEL ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los
requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniero
en Biotecnología

Profesora Guía

Ismar Alejandra Rivera Olivero Esp. PhD(c)

Autor

Alexis Fabricio Guerra Navarrete

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación de patrones de susceptibilidad en cepas de *Staphylococcus aureus* de muestras nasofaríngeas en niños de varias provincias del Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante Alexis Fabricio Guerra Navarrete en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Ismar Alejandra Rivera Olivero

Especialista en Microbiología Clínica. PhD (c)

C.I. 141491666

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Identificación de patrones de susceptibilidad en cepas de *Staphylococcus aureus* de muestras nasofaríngeas en niños de varias provincias del Ecuador, del estudiante Alexis Fabricio Guerra Navarrete en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Carlos Andrés Bastidas Caldés

Máster en Microbiología Ambiental

C.I. 0201619806

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi propia autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”



Alexis Fabricio Guerra Navarrete

C.I. 1719344796

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Profa. Ismar Rivera por ser mi guía y apoyo durante el desarrollo del trabajo.

A la Universidad de las Américas por contribuir a nuestra formación profesional.

A la Dirección General de Investigación de la Universidad de las Américas por la ayuda brindada al realizar el trabajo.

DEDICATORIA

Para ser exitoso no tienes que hacer cosas extraordinarias. Haz cosas ordinarias, extraordinariamente bien.

Dedico este trabajo de investigación a Dios por guiar mi camino. A mis padres por su sacrificio al apoyarme durante todo el tiempo de mi carrera estudiantil. A mis hermanas por ser un modelo de crecimiento personal y profesional. Y a Karla Vizcaíno por su apoyo, por sus consejos, por su amor incondicional y por ser luz en mi oscuridad.

Alexis

RESUMEN

Staphylococcus aureus es el agente causal más frecuente en varias afecciones de la piel y de tejidos blandos. Mundialmente, las bacterias resistentes a los antibióticos son un problema de salud pública. En el año 2017 la Organización Mundial de la Salud, publicó la lista de patógenos que requieren atención prioritaria debido a su resistencia, así *S. aureus* resistente a la meticilina, se constituye en uno de los patógenos más peligrosos pues puede adquirir resistencia a otros tipos de antibióticos. La presente investigación se ha enfocado en esta bacteria. Por primera vez, se ha desarrollado un perfil de susceptibilidad del *S. aureus* en 80 niños portadores, provenientes de Pichincha, Guayas, Imbabura y Esmeraldas. Los resultados de esta investigación arrojaron que el 34% (27/80) de los aislados, eran resistentes a al menos un antibiótico, además, se evidenció que la provincia de Guayas posee la mayor frecuencia de resistencia con un 63% (17/27). De manera fenotípica, se encontró en un 14% (11/80) la presencia de SARM y, por métodos moleculares, un 100% (11/11) de presencia del gen *mecA*. Por otra parte, a través del uso de las pruebas *D-Test*, se halló resistencia a MLSB en un 23% (18/80) en los aislados de *S. aureus*. Adicionalmente, los resultados mostraron que el fenotipo de resistencia con mayor frecuencia era el iMLSB con 55% (10/18), siendo el 22% (4/10) de estos últimos, correspondientes al SARM. Por otra parte, se encontró la presencia del gen *ermC* en solo un aislado de *S. aureus* confirmado fenotípicamente con resistencia a MLSB. Finalmente, en este esfuerzo investigativo, se evidenció la presencia de multiresistencia en el 18% (14/80) de aislados incluyendo SARM, resistencia a MLSB y a otros antibióticos.

Palabras claves: Sensibilidad antibiótica, multiresistencia, SARM, Fenotipo MLSB, niños de comunidad.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most frequent causative agent in various skin and soft tissue conditions. Worldwide, antibiotic resistant bacteria are a public health problem. In 2017 the World Health Organization published the list of pathogens that require priority attention due to their resistance, so *S. aureus*, resistant to methicillin, is one of the most dangerous pathogens because it can acquire resistance, In addition, to other types of antibiotics. The present investigation has focused on this bacterium. For the first time, a susceptibility profile of *S. aureus* has been developed in 80 carrier children, from Pichincha, Guayas, Imbabura and Esmeraldas. The results of this investigation showed that 34% (27/80) of the isolates were resistant to at least one antibiotic, in addition, it was shown that the province of Guayas has the highest frequency of resistance with 63% (17/27). Phenotypically, the presence of MRSA was found in 14% (11/80) and, by molecular methods, 100% (11/11) of the presence of the *mecA* gene. On the other hand, through the use of D-Test tests, resistance to MLSB was found in 23% (18/80) in *S. aureus* isolates. Additionally, the results showed that the most frequent resistance phenotype was the iMLSB with 55% (10/18), 22% (4/10) of the latter being corresponding to MRSA. On the other hand, the presence of the *ermC* gene was found in only one phenotypically confirmed *S. aureus* isolate with resistance to MLSB. Finally, in this research effort, the presence of multiresistance was evident in 18% (14/80) of isolates including MRSA, resistance to MLSB and other antibiotics.

Keywords: Antibiotic sensitivity, multiresistance, MRSA, MLSB Phenotype community children.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Justificación del trabajo.	6
2 CAPÍTULO II. MARCO TEORICO.	7
2.1 Características Generales <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.1.1 Características Microbiológicas	7
2.1.2 Diagnóstico Microbiológico de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.1.3 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por medios bioquímicos	9
2.2 Factores de Virulencia.....	9
2.2.1 Nucleasa	11
2.2.2 Leucocidina Pantón Valentine (LPV)	11
2.3 Mecanismos de resistencia	12
2.3.1 Transferencia horizontal de genes.....	12
2.3.2 Alteración del sitio diana del antibiótico	13
2.3.3 Alteración de la ruta metabólica inhibida por el medicamento.....	13
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	13
2.4.1 Diagnóstico microbiológico de SARM	15
2.4.2 Tipos de SARM	15
2.4.3 Mecanismo de transmisión de SARM	16

2.5	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a macrólidos	16
3	CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS	18
3.1	Diseño Experimental.....	18
3.2	Población y muestra	19
3.2.1	Población.....	19
3.2.2	Muestra	19
3.3	Reactivación de las cepas.....	20
3.3.1	Medio Agar cerebro corazón.....	20
3.3.2	Agar Manitol Salado	20
3.3.3	Agar ADNasa.....	21
3.3.4	Prueba catalasa y coagulasa	21
3.4	Determinación de Susceptibilidad	22
3.4.1	Prueba de sensibilidad para la detección de SARM.....	23
3.4.2	Prueba de susceptibilidad para la detección de <i>S. aureus</i> resistente a Macrólidos, Lincosamidas y Streptograminas B	23
3.5	Detección molecular de genes de resistencia	24
3.5.1	Extracción de ADN	24
3.5.1.1	Preparación de las soluciones de trabajo	24
3.5.1.2	Lisis celular y unión de ADN	25
3.6	Amplificación por PCR.....	26
3.6.1	Técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para SARM y factores de virulencia.....	26
3.6.2	PCR para resistencia a macrólidos.....	28
3.7	Análisis estadístico.....	31
4.	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31

4.1	Portadores de <i>S. aureus</i> en la población total.....	31
4.2	Características demográficas de la población de estudio.....	32
4.3	Susceptibilidad antibiótica de <i>S. aureus</i>	34
4.4	Susceptibilidad de <i>S. aureus</i> a Ciprofloxacina, Gentamicina, Tetraciclina y Trimetropima/Sulfametoxazol	36
4.5	Susceptibilidad a Meticilina en <i>S. aureus</i> de niños portadores	37
4.6	Resistencia a Macrólidos en niños portadores de <i>S. aureus</i> ..	41
4.7	Resistencia combinada a meticilina y macrólidos en niños portadores	43
4.8	Multiresistencia de las cepas de <i>S. aureus</i> de niños portadores	45
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1	Conclusiones	48
5.2	Recomendaciones.....	48
	REFERENCIAS.	50

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes

Staphylococcus aureus es un microorganismo que forma parte de la microbiota de la piel, nariz, faringe, nasofaringe, tracto gastrointestinal y genito-urinario del ser humano. La colonización de estas zonas es generalmente un proceso asintomático, siendo la zona más frecuente de colonización la mucosa nasal, pudiendo ser detectado hasta en 50% de individuos sanos (Lozano et al, 2011).

Sin embargo, *S. aureus* no solo es un miembro de la microbiota habitual del ser humano también es uno de los patógenos bacterianos oportunistas más importantes, que tiene la capacidad de causar infecciones tanto de baja como de alta gravedad, desde afecciones de la piel e intoxicaciones alimentarias hasta padecimientos con alta mortalidad como infecciones asociadas a la atención sanitaria, neumonía necrosante, osteomielitis y sepsis. Debido al uso indebido de medicamentos antimicrobianos este microorganismo ha desarrollado resistencia a múltiples antibióticos. Los mecanismos más habituales de resistencia residen en; transferencia horizontal de genes, la alteración del sitio diana del antibiótico y alteración de la ruta metabólica de la bacteria que inhibe el antibiótico (Guillén et al., 2016; Rocha, Reynolds, & Simons, 2015).

La OMS ha reconocido que la resistencia antimicrobiana es una de las amenazas más grandes para el ser humano. La estrategia para combatir la resistencia ha sido desarrollar modificaciones sintéticas de antibióticos ya existentes para recuperar su eficacia. Sin embargo, las bacterias han seguido adaptándose a las nuevas presiones selectivas, por lo que su eficacia se limita cada vez más (Rocha et al., 2015).

Existen varias familias de antibióticos una de estas son los β -lactámicos que bien podrían ser de origen natural o semisintético, poseen un anillo β -lactámico que forma parte de su estructura y esta; formado por un anillo heterocíclico de cuatro átomos. Son un tipo de antibiótico que posee capacidad bactericida parcial, ya que solo actúa en la última fase de crecimiento celular y el mecanismo de acción que consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.

Los antibióticos β -lactámicos tienen un espectro de actividad antimicrobiana que se enfoca a cocos Gram positivos, con excepción del *S. aureus* ya que este posee la capacidad de producir clones resistentes a dichos antibióticos (Gómez, García-Vázquez, & Hernández-Torres, 2015).

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1940, *S. aureus* ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia a muchos de los antibióticos actualmente disponibles. La introducción de la meticilina en 1959 una penicilina semisintética perteneciente a la familia de los β -lactámicos supuso un avance en el tratamiento de las infecciones ocasionadas por esta bacteria, pero no tardó en desarrollar resistencia a la meticilina y a todos los antibióticos β -lactámicos dando lugar a las cepas SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). En los años 1961 Jevons, en Londres, informó sobre la presencia de *S. aureus* metilino resistente (SAMR), reportándolo como la causa de infecciones nosocomiales en Europa (Vargas, 2016). Estos microorganismos poseen múltiples patrones de resistencia, por lo cual es crucial encontrar tratamientos para combatir las afecciones causadas por este tipo de bacterias. Por lo general, la gran mayoría de los SAMR presentan una resistencia asociada a otros antibióticos como eritromicina, tetraciclina, estreptomina y clindamicina (Villar et al., 2013).

Desde el punto de vista microbiológico, la capacidad de desarrollar tal resistencia a antibióticos es de gran preocupación para los hospitales, clínicas e incluso para la comunidad debido a que tienen que optar por otros tratamientos. La literatura

reporta que existe una mayor incidencia de pacientes enfermos en poblaciones que se encuentran en ambientes hospitalarios y en personas que se encuentran inmunodeprimidas (Gerald Mandell, 2006). Cuando este microorganismo es resistente a la meticilina (SARM) produce una proteína alterada alojada en la membrana denominada (*PBP2a*) que le confiere resistencia tanto a las penicilinas (incluida la meticilina) como a las cefalosporinas. “Esta proteína es codificada por el gen *mecA*. Todas las cepas de SARM que son completamente resistentes a la meticilina contienen el gen *mecA* y producen *PBP2a*” (Aguayo-Reyes et al., 2018).

El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es el responsable de múltiples infecciones hospitalarias. Para entender la epidemiología de la infección es necesaria la identificación molecular de la resistencia la cual es conferida por el complejo SCCmec. Este complejo del gen *mec* posee diferentes alotipos que abarcan genes *mec* que pueden compartir un porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos mayor o igual a 70%. Los tipos se denominan *mecA*, *mecB*, *mecC*, etc., estos genes se reflejan en el orden cronológico de su descubrimiento. Además, los genes *mecB* y *mecC* codifican en un 64% para la producción de *PBP2a*. Estos genes derivados de *mec* pueden encontrarse en un casete cromosómico de *Staphylococcus* (SCC), identificado como un intercambiador de genes. Dichos genes son los encargados de acoplar y agrupar a otros genes que posean una resistencia similar (Ito et al., 2012).

Asimismo, otro grupo importante de antibióticos son los denominados macrólidos que ejercen su acción mediante la capacidad de inhibir la síntesis proteica en los ribosomas bacterianos. En este grupo el antibiótico más representativo es la eritromicina debido a que según Tidwell y Lewis (2002, p. 72-78) se puede usar como sustituto de la penicilina. Además, posee una gran difusión tisular (específicamente en el pulmón), es muy usado en pacientes que padecen de infecciones pulmonares (Barbero et al., 2018).

El estado de portador nasal de *S. aureus* juega un papel importante en la epidemiología y patogenia de infecciones. Una investigación en el Hospital General de las Fuerzas Armadas de Ecuador, donde se analizaron a 100 pacientes con afecciones respiratorias causadas por microorganismos patógenos, encontrando una prevalencia del 12% de *S. aureus* y 1% de SARM, además de identificar varios factores de riesgo que influyeron en la prevalencia, como pacientes mayores a 60 años, personas que padecían de diabetes mellitus y cambiarse el mandil una sola vez por semana (Cimera et al., 2010).

1.2 Planteamiento del problema.

El uso sobredimensionado de antibióticos y sin prescripción médica es una de las causas del desarrollo de la resistencia a varios tipos de agentes antimicrobianos. Microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos han desarrollado un mecanismo de resistencia a antibióticos de tercera e inclusive cuarta generación, de tal modo que se ha convertido en un inconveniente de salud a nivel nacional y mundial (Todar, 2015). Después del desarrollo y la comercialización de antibióticos, las bacterias en especial las patógenas y ambientales, estos desde el siglo pasado han avanzado en cuanto a resistencia de los antibióticos, “de modo que la infección causada por organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) podría ser considerada como una infección emergente” (Rocha et al., 2015).

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) es un importante patógeno nosocomial y comunitario, que se asocia frecuentemente con infecciones humanas. Además, puede producir afecciones que van desde procesos inflamatorios supurativos leves que se expresan en cualquier parte del organismo hasta procesos inflamatorios de alta morbilidad y mortalidad (Guillén et al., 2016). En el país, la información recabada sobre la resistencia de *S. aureus*

a antibióticos y especialmente la resistencia a meticilina se encuentra mayoritariamente en ambientes hospitalarios y en una edad ya adulta, dado que no existe este tipo de información en niños, no ha sido posible determinar la prevalencia del microorganismo con certeza y por lo tanto no se ha logrado tratar de manera eficiente las complicaciones causados por la bacteria en este grupo vulnerable. Además, se entiende que las prácticas inadecuadas de prevención de infecciones en el hospital, el uso indiscriminado de antibióticos, el cateterismo intravascular, la hospitalización en la unidad de cuidados intensivos, etc. contribuyen a la aparición del SARM.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Identificar el perfil de susceptibilidad en las cepas de *Staphylococcus aureus* de muestras nasofaríngeas de niños de 0 a 5 años en las provincias de Esmeraldas, Imbabura, Guayas y Pichincha

1.3.2 Objetivos específicos.

- Determinar el patrón de susceptibilidad a β -lactámicos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas y aminoglicósidos a través de pruebas fenotípicas
- Determinar la resistencia a macrólidos en *S aureus* y la presencia de β -lactamasas a través de pruebas fenotípicas
- Identificar los genes asociados a la resistencia a meticilina y a macrólidos en *S. aureus* mediante pruebas moleculares

1.4 Justificación del trabajo.

La información en el Ecuador acerca de la resistencia de *S. aureus* a los antibióticos se enfoca en personas que se encuentran en un entorno hospitalario, ya sean pacientes o personal médico. Este estudio ayudaría a determinar la prevalencia de la resistencia a los antibióticos en aislamientos de *S. aureus* en niños de comunidades y también para estudiar su asociación con SARM. Tener información de este problema en niños portadores de *S. aureus* provenientes de comunidades, ayudaría a comprender la resistencia y virulencia de esta bacteria presente en los niños de estas comunidades. Por último, este proyecto permitirá establecer una línea de base sobre la prevalencia de la colonización nasofaríngea de *S. aureus* y los patrones de resistencia presentes en grupo poblacional vulnerable como son los niños lo cual permitirá establecer medidas de prevención y vigilancia de las posibles enfermedades causadas por este patógeno.

2 CAPÍTULO II. MARCO TEORICO.

2.1 Características Generales *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Características Microbiológicas

El microorganismo bacteriano *S. aureus* pertenece al género *Staphylococcus* correspondiente a la familia Micrococcaceae. Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo y no tiene la capacidad de formar esporas. El nombre es conferido por Ogston en el año 1882 el cual deriva de la palabra griega “*staphyle*” que significa racimo y “*coccus*” que significa de forma redonda u ovalada en forma de baya o grano (Alberto, 2017).

La pigmentación dorada de las colonias es debida a la producción de carotenoides durante la fase de crecimiento. Tiene una alta tasa de crecimiento en medios no selectivos, es catalasa y coagulasa positivo, y también tiene la capacidad de fermentar manitol. Estas son las características que lo diferencia de otras especies de *Staphylococcus*.

Dentro del género se han descrito alrededor de 40 especies, de las cuales solo tres tienen gran importancia clínica: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. El primero de estos es considerado como la especie más virulenta y frecuentemente vinculada a varias afecciones humanas (Cervantes et al., 2014).

S. aureus con frecuencia se encuentra alojado de manera saprófita en la piel y en mucosas. Alrededor del 20 al 50% de las personas consideradas sanas pueden ser colonizadas de forma persistente o de manera transitoria por el *S.*

aureus, debido a esto, se considera que la porción nasal es el sitio más frecuente de colonización (Cimera Proaño et al., 2010).

2.1.2 Diagnóstico Microbiológico de *Staphylococcus aureus*

Para el cultivo de *S. aureus* se utiliza comúnmente medios como; agar sangre, agar cerebro corazón y agar chocolate. Como medio selectivo para el microorganismo se usa agar manitol salado con un 10% de NaCl, de esta manera inhibe el crecimiento de otras bacterias diferentes. Se incuba a un rango de temperatura de entre 35° a 37°C en aerobiosis o también en incubadoras de dióxido de carbono por el transcurso de 24 horas. Al finalizar dicho tiempo se identifica el *S. aureus* como colonias lisas, redondas de color amarillo dorado y brillantes (Murray et al., 2014).

La tinción Gram de *S. aureus* muestra cocos Gram positivos principalmente agrupados en racimos, no poseen flagelos ni son capaces de producir esporas. Para la identificación se realizan pruebas de catalasa y coagulasa para confirmar que es positivo. Además, se realizan tanto como pruebas oxidación-fermentación de azúcares para determinar la especie (Sejas Claros, et al., 2016).

La capacidad de metabolizar ácidos nucleicos por parte de *S. aureus* es debido a la producción de enzimas degradadoras de ADN, por lo que es considerado positivo para pruebas de ADNasa. Esto permite detectar las enzimas desoxirribonucleasas y diferenciar teóricamente a *S. aureus* de otras especies de *Staphylococcus* (Daum, 2008).

2.1.3 Identificación de *Staphylococcus aureus* por medios bioquímicos

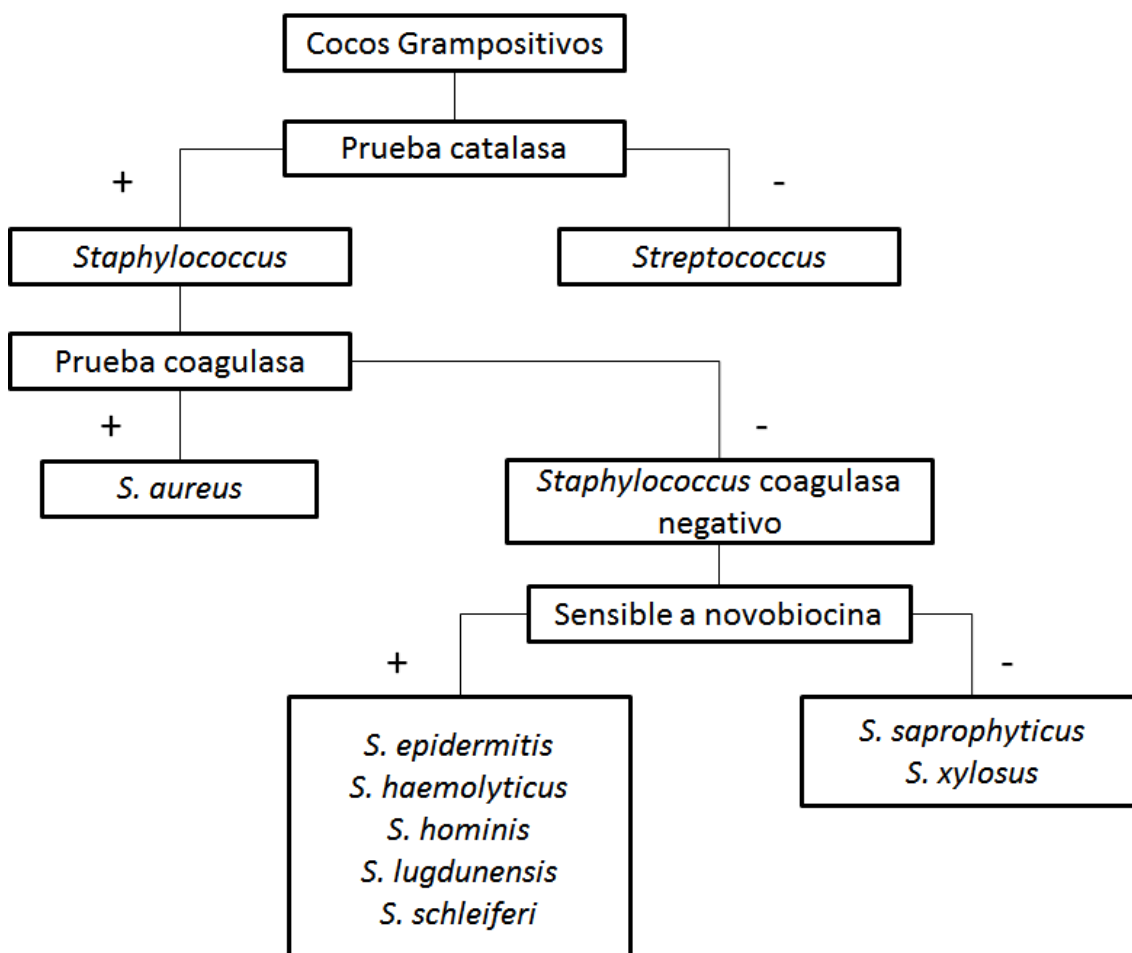


Figura 1. Clasificación de cocos Gram positivos

Adaptado de (Dan L. Longo, et al , 2018)

2.2 Factores de Virulencia

El microorganismo *S. aureus* posee la capacidad de producir una serie de enzimas, proteínas, cápsulas, péptidoglicano y ácido teicoico que intervienen en el mecanismo de infección. Estos son denominados factores de virulencia, existen más de 10 enzimas asociadas a este microorganismo las cuales se puede observar en la Tabla 1 que algunas son:

Tabla 1.

Enzimas asociadas a *S. aureus* como factores de virulencia

Enzima	Acción enzimática
Coagulasa	Coagula el plasma sanguíneo y ayuda a la fagocitosis
Hialuronidasa	Degrada el ácido hialurónico del tejido conectivo, induce a la propagación del microorganismo
Lipasa	Degrada un cierto tipo de grasas
Penicilinasas	Enzima responsable de la resistencia a la penicilina en un 85% de cepas de <i>S. aureus</i>
Hemolisinas α y β	Lesiona membranas celulares y sensibiliza a los eritrocitos a la lisis.
Leucocidina	Lítica para los granulocitos e inhiben la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos humanos
Enterotoxinas	Produce afecciones gástricas
Exfoliativas	Altera la capacidad de adherencia celular provocando descamación de la piel.
Toxinas de shock tóxico	Daña órganos
Proteína A	Rompe las plaquetas

Adaptado de (Cisterna Cáncer & Torres, 2018; Camussone & Calvinho, 2013).

Algunas de estas enzimas más estudiadas son; la catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno y la coagulasa como prueba de diferenciación de *S. aureus* del resto de género de *Staphylococcus*. Además, *S. aureus* puede producir una gran variedad de exoenzimas que cumplen diversas funciones en la patogenia. (Fariña, 2013)

2.2.1 Nucleasa

El gen *nuc* es el responsable de codificar el factor de virulencia nucleasa, que está involucrada en la invasión y penetración a tejidos del hospedero. Además, es capaz de hidrolizar ácidos nucleicos y estafiloquinasas. Las cepas que posean la capacidad de producir estas enzimas tienen un peligro elevado en humanos, debido a que puede inactivar antibióticos β -lactámicos ya que las enzimas *nuc* 1 hidrolizan el anillo β -lactámico. Además, tienen la acción de penetrar tejidos del hospedero y producir una destrucción de tejido. El gen de la nucleasa termoestable (*nuc*) es específica del *S. aureus* y tiene un tamaño de 279 pb (Cervantes et al., 2014).

2.2.2 Leucocidina Panton Valentine (LPV)

La citotóxica LPV es una toxina producida por *S. aureus* que posee la capacidad de destruir leucocitos formando poros en su propia membrana, y produce necrosis en los tejidos a los que infecta. LPV es codificada por dos genes adyacentes *LukS* y *LukF* formando las dos subunidades correspondientes a *LuKF-PV* y *LuKS-PV*. Solo un porcentaje bajo de las cepas de *S. aureus* son portadores de dichos genes. Sin embargo, se suelen encontrar los genes de LPV en cepas que son resistentes a meticilina asociadas a la comunidad. No obstante, la producción de LPV también está asociada a afecciones de la piel, tejidos blancos y neumonía necrosante (Chaves, 2013)

2.3 Mecanismos de resistencia

Existe una importante amenaza para la salud pública que está actualmente afectando a los seres humanos en todo el mundo y es el surgimiento de resistencia entre los patógenos bacterianos más importantes. Existen diferentes mecanismos y vías por los cuales *S. aureus* puede adquirir una resistencia hacia los antibióticos, los más estudiados son:

2.3.1 Transferencia horizontal de genes

El desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos con frecuencia se debe a la adquisición de material de ADN extraño a través de transferencia horizontal de genes, además de ser uno de los impulsores más importantes de la evolución bacteriana. Las bacterias que comparten el medio ambiente con agentes antimicrobianos hospedan determinantes genéticos de resistencia, lo que sugiere que este intercambio genético se ha implicado en la diseminación de la resistencia a muchos antibióticos de uso frecuente. Finalmente, según José M. Munita (2006, p. 1-45) existe evidencia de que el "resistoma ambiental" es una amplia fuente para la adquisición de genes de resistencia a antibióticos en bacterias que son clínicamente importantes (Pinilla et al., 2017).

Las bacterias pueden adquirir material genético externo por medio de tres principales estrategias, a) transformación, b) transducción, c) conjugación. Es posible que la transformación sea el tipo más simple de transferencia horizontal de genes, sin embargo, solo pocas especies bacterianas que son clínicamente relevantes pueden ser capaces de incorporar de forma "natural" el ADN desnudo para desarrollar la resistencia. En el entorno hospitalario la aparición de resistencia a menudo se relaciona con la conjugación, ésta implica la transferencia de genes mediante el contacto de célula a célula y es probable que

ocurra a altas tasas en el tracto gastrointestinal de los seres humanos bajo tratamiento con antibióticos (Munita, JM. Arias, 2016).

2.3.2 Alteración del sitio diana del antibiótico

Varios de los antibióticos que se utilizan en la práctica clínica tienen dianas bacterianas ubicadas en la membrana citoplasmática (bacterias gramnegativas) o intracelulares. Por lo que el compuesto debe ingresar a la membrana citoplasmática o externa dependiendo el caso para poder ejercer su efecto antimicrobiano. Disminuyendo la absorción de la molécula microbiana es como las bacterias han logrado desarrollar mecanismos para evitar que el antibiótico alcance su objetivo (Lambert, 2005).

2.3.3 Alteración de la ruta metabólica inhibida por el medicamento

Una de las más exitosas estrategias bacterianas para combatir la presencia de antibióticos es producir enzimas que inactivan el medicamento, agregando restos químicos específicos al compuesto a su vez que podrían destruir la molécula, dando como resultado que el antibiótico ni pueda interactuar con su objetivo (Gardner et al., 2018).

2.4 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

A principios de los años 1940, el antibiótico de elección de los médicos para tratar infecciones provocadas por *S. aureus* era la penicilina; sin embargo, en 1945 se documentaron las primeras cepas de *S. aureus* que eran productoras de β -lactamasas. Años más tarde la penicilina semi-sintética denominada

“meticilina”, surgió como un fármaco viable para combatir las cepas de este microorganismo que ya eran resistentes; no obstante, en 1961 Barber confirmó el primer caso de una cepa de *S. aureus* que era resistente a la meticilina (SARM) en el Reino Unido. En la actualidad se encuentran casos del SARM por todo el mundo (Callisaya H, 2007).

Se entiende que la prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina varía según el área geográfica en el que se encuentra. Según datos de la Organización Mundial de la Salud Ecuador se encuentra descrito como prevalencia moderada de SARM con el 25%. Además, se informa que pacientes que padezcan de afecciones producidas por este microorganismo tienen un 64% de probabilidad de morir (OMS, 2018).

Las cepas resistentes a la meticilina de *S. aureus* producen una proteína fijadora de una penicilina alterada denominada *PBP2a*, esta proteína se encarga de la síntesis de la pared bacteriana cuando otras *PBPs* están siendo inactivadas por el anillo β -lactámico. De igual manera, se tiene entendido que algunas cepas se pueden mostrar resistentes a otros tipos de antibióticos (Sáinz et al., 2019).

La resistencia del *S. aureus* es otorgada por la presencia del gen-*mecA* el cual se encarga de producir la proteína fijadora conocida como penicilina alterada y esta se une a la *PBP2a*. Este suceso provoca la resistencia de la bacteria a los antibióticos β -lactámicos, inclusive si estos se asocian con inhibidores de β -lactamasas, debido a que tiene el mecanismo de alterar el sitio diana en el que los fármacos pueden actuar. Estas cepas tienen la capacidad en simultáneo de adquirir genes de patogenicidad, provocando afecciones graves. Además, se ha determinado que las cepas de SARM poseen capacidad de patogenicidad como el casete de cromosomas de *Staphylococcus* (SCC *mec*) y la Leucocidina Pantón-Valentine (PVL).

2.4.1 Diagnóstico microbiológico de SARM

La determinación de que una cepa de *S. aureus* es resistente a la meticilina se realiza mediante la utilización del antibiograma por el método de difusión de disco o mejor conocido como Kirby – Bauer, el cual se requiere un medio agar Mueller Hinton y según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) se usa el disco de cefoxitina 30 µg debido a que esta prueba tiene una mayor sensibilidad para detectar cepas de SARM. Se define como resistente a meticilina si halo formado por el disco de antibiótico es menor o igual a 21 milímetros y sensible si es mayor o igual a 22 milímetros (Oquendo, 2017; Patel et al., 2019).

Las cepas que muestran resistencia a la cefoxitina indican que no se pueden realizar tratamientos usando β-lactámicos, sin embargo, si se podría emplear carbapenemes y antibióticos inhibidores de β-lactamasas. Actualmente, la vancomicina constituye el fármaco de elección para el tratamiento de afecciones que son causadas por el SARM, sin embargo, existen casos de cepas que son resistentes a este antibiótico. Por otro lado, ya se realizan pruebas de nuevos antibióticos para tratar el SARM (Cimera Proaño et al., 2010). Por otro lado, linezolid es un antibiótico sintético representante de las oxazilidionas, es de amplio espectro y es usado contra organismos Gram-positivos y actualmente en el tratamiento del SARM, no obstante, se ha registrado resistencia a este antibiótico, aunque en baja proporción (Velázquez, 2010)

2.4.2 Tipos de SARM

Se han identificado dos cepas de SARM: aquellas que son adquiridas en un ambiente hospitalario (SARM-AH) y las que son adquiridas en la comunidad (SARM-AC); se describen con características moleculares y epidemiológicas diferentes (Zurita et al., 2016).

Las cepas SARM de ambiente hospitalario fueron descritas en pacientes que padecían de enfermedades como: fascitis necrotizante, neumonía, bacteriemia entre otras. Por otro lado, las cepas de SARM que fueron adquiridas en la comunidad poseen el gen que codifica para la Leucocidina Pantón Valentine y fueron descritas en pacientes con infecciones de la piel, también con afecciones severas como neumonía necrosante y piomiositis (Rocha et al., 2015).

Actualmente en el Ecuador la propagación de clones pandémicos de *S. aureus* resistente a la meticilina se mantiene bajo vigilancia. Estudios en el país indican que se encuentran en gran mayoría el clon de SARM latinoamericano (USA300-LV), seguido con el clon brasileño (ST239-MRSAIII,-PVL) (Zurita et al., 2016).

2.4.3 Mecanismo de transmisión de SARM

Existen dos mecanismos comunes en la transmisión de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina los cuales son:

- Por contacto directo: Paso del microorganismo de una persona a otra.
- Por contacto indirecto: Paso del microorganismo de una persona a un intermediario (persona u objeto).

2.5 *Staphylococcus aureus* resistente a macrólidos

Los antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas con las siglas MLS_B son compuestos que comparte mecanismos de acción similares; estos fármacos inhiben la reacción peptidil transferasa. Los macrólidos se han empleado en el tratamiento de afecciones agudas del tracto respiratorio,

infecciones pulmonares crónicas e infecciones de la piel. La eritromicina fue el primer antibiótico macrólido descubierto en 1952 y fue de elección en tratamiento contra enfermedades infecciosas provocadas por *S. aureus*. Sin embargo, al igual que con la meticilina este microorganismo desarrollo mecanismos de resistencia para este antibiótico. Existen tres mecanismos responsables de la resistencia a macrólidos los cuales son: bombas de eflujo activas el cual es codificado por el gen *msrA* (gen que codifica para la resistencia de MLS por la presencia de bombas de eflujo), inactivación enzimática y modificación del objetivo ribosómico por medio de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*. El ultimo mecanismo es el principal que se ha encontrado en la resistencia a macrólidos (Liu et al., 2017).

Mediante el método de difusión en disco (D-test), con los antibióticos eritromicina y clindamicina se pueden observar los siguientes fenotipos;

- 1) Fenotipo cMLS_B: resistencia a eritromicina y clindamicina, esta resistencia es constitutiva
- 2) Fenotipo iMLS_B: resistencia a eritromicina, pero sensibilidad a clindamicina (achataamiento del halo cerca de eritromicina); una resistencia inducible
- 3) Fenotipo MS_B: resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina (sin achatamiento), resistencia a eritromicina mediante la bomba de expulsión activa (Ardanuy, et al., 2012).

3 CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Diseño experimental

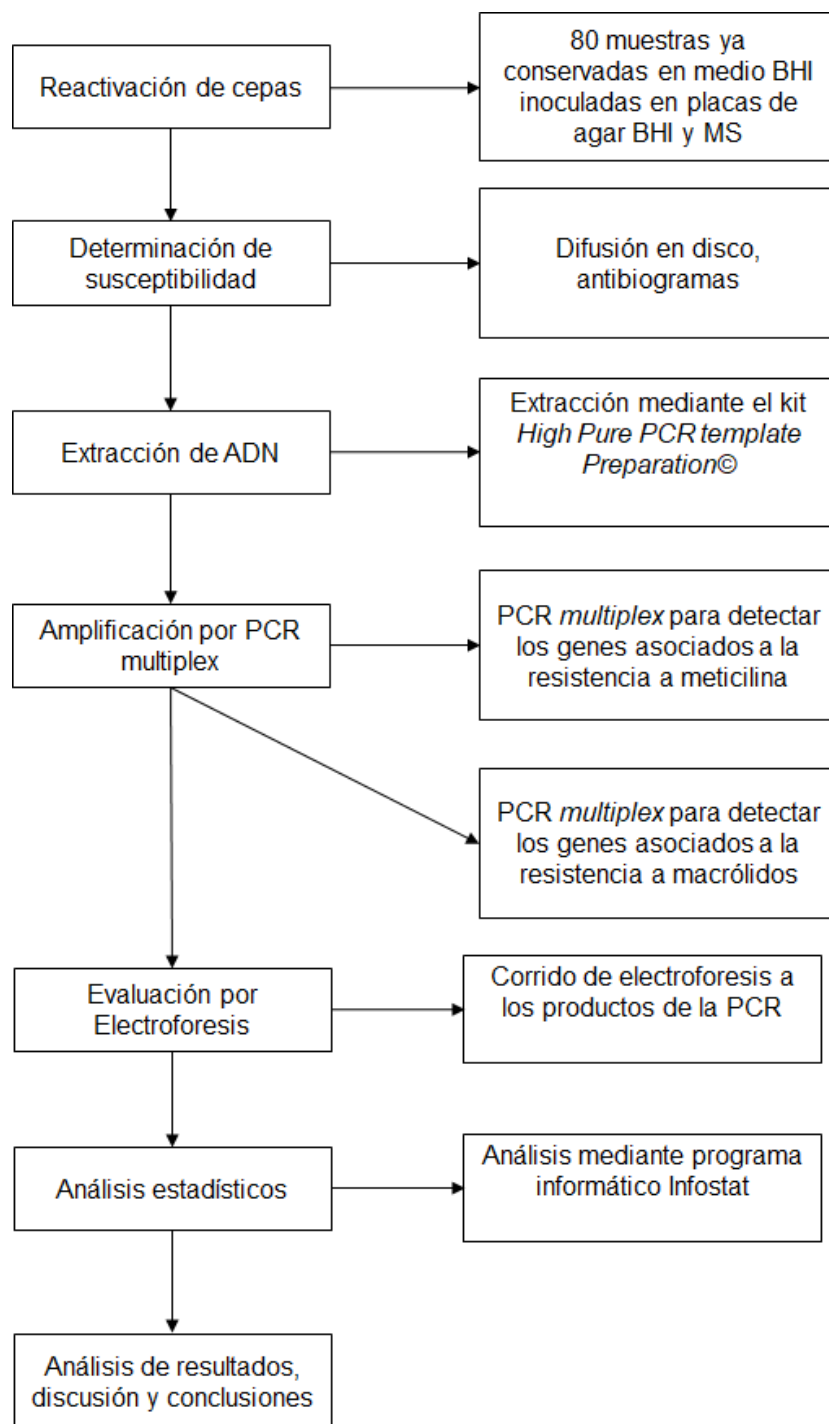


Figura 2. Cuadro del diseño experimental

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Se partió de una población de 428 hisopados nasofaríngeos de niños con una edad media de 5 años los cuales provienen de las siguientes provincias: 75 niños de la provincia de Pichincha ciudad Quito internados en un centro de salud con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad, 156 niños sanos de la provincia del Guayas ciudad Guayaquil, además, 100 de una comunidad Kichwa ubicada en Cotacachi en la provincia de Imbabura y 97 niños de la parroquia rural Viche, provincia de Esmeraldas. De toda esta población de 428 niños se pudo aislar y confirmar la presencia de *Staphylococcus aureus* en 80 niños.

3.2.2 Muestra

Las 80 muestras son provenientes de varias provincias del Ecuador tomado de la nasofaringe de niños sanos y niños con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad. De las cuales corresponden a: 10 muestras tomadas de niños con neumonía adquirida en la comunidad de la provincia de Pichincha, 35 muestras de niños tomadas en centros educativos de la ciudad de Guayaquil, 18 de niños de centros educativos de Viche provincia de Esmeraldas y 28 muestras de niños de la comunidad Kichwa.

Los aislamientos de *S. aureus* se encontraban conservados en medio infusión cerebro corazón + 10% de glicerol a -80°C

3.3 Reactivación de las cepas

Los aislamientos se reactivaron inoculando en placas de agar cerebro corazón y agar manitol salado e incubando en aerobiosis a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se confirma la identificación bioquímica (prueba de catalasa, Prueba de ADNasa, fermentación del manitol y coagulasa) como *Staphylococcus aureus* volviéndose a crioconservar otra alícuota en infusión cerebro corazón + 10% de glicerol a -80°C.

3.3.1 Medio agar cerebro corazón

Medio de uso general rico en nutrientes que permite el crecimiento de cualquier microorganismo en este caso *S. aureus*.

Procedimiento: El inóculo se realizó desde el vial de la muestra crioconservada con un asa de anillo estéril usando estriado por agotamiento para obtener colonias separadas. Se incubó aerobiosis, a temperatura de 38°C durante 24 h.

Además, se inoculó en 2 tubos de 1,5ml, uno con un medio con 500 uL infusión cerebro corazón + 10% de glicerol para conservar y otro con 200 uL de Tris EDTA (TE) en pH 8 para extracción de ADN.

3.3.2 Agar manitol salado

Medio selectivo y diferencial para *S. aureus* debido a su concentración elevada de sal, así mismo, puede modificar el pH del medio cambiando la tonalidad roja del agar en un color amarillo.

Procedimiento: El inóculo se realizó desde el vial de la muestra crioconservada con un asa de anillo estéril usando estriado por agotamiento para obtener colonias separadas. Se incubó aerobiosis, a temperatura de 38°C durante 24 h.

3.3.3 Agar ADNasa

Es un medio de cultivo usado para detectar enzimas desoxirribonucleasas. Y se usa para diferenciar especies de *Staphylococcus*. En la fase de crecimiento celular se agrega ácido clorhídrico en la placa, Un resultado positivo se evidencia por un halo transparente alrededor de la bacteria y un resultado negativo si el medio con una tonalidad opaco.

Procedimiento: El inóculo se realizó a partir de la muestra pura crioconservada con un asa de anillo estéril usando estriado para obtener colonias separadas. Se incubó aerobiosis, a temperatura de 38°C durante 24 h.

3.3.4 Prueba catalasa y coagulasa

La prueba catalasa permite diferenciar las especies *Streptococcus* y *Staphylococcus*, siendo estos catalasa negativa y positiva. Por otro lado, la prueba coagulasa permite determinar si la bacteria puede coagular el plasma sanguíneo produciendo la enzima coagulasa.

Procedimiento: Se coloca una colonia en un portaobjetos y se coloca una gota de peróxido de hidrogeno para que se formen burbujas si este es positivo. Se

coloca 0.5 ml de la bacteria y 0.5 de plasma en un tubo y se incuba por 30 minutos a 37°C para observar los resultados.

3.4 Determinación de susceptibilidad

Se tomó una colonia de *S. aureus* que creció en el medio agar cerebro corazón y se colocó en solución salina para medir su turbidez por medio de los estándares de McFarland el cual corresponde a 0.5. Con un hisopo se humedeció y se inoculó en una placa de agar Mueller-Hinton. Se incubó en aerobiosis a una temperatura de 37°C por 24 h. siguiendo el método de Kirby-Bauer.

Según lo recomendado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* se colocaron los siguientes discos de antibiótico: Trimetoprima/Sulfametoxazol, Cefoxitina, Clindamicina, Eritromicina, Gentamicina, Tetraciclina y Ciprofloxacina en la superficie del agar.

Después de 24 horas se observó los halos de inhibición alrededor de los discos, los cuales fueron medidos en milímetros. se interpretaron los halos de inhibición para cada antibiótico determinando si son sensibles (S), resistentes (R) e intermedios (I). (Patel et al., 2019)

Tabla 2.

Antibióticos usados en el antibiograma del proyecto

Antibiótico	Concentración	Diámetro de Disco		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	10 µg	≥ 22 mm	13-14 mm	≤ 15 mm

Tetraciclina	30 µg	≥ 19 mm	15-18 mm	≤ 14 mm
Ciprofloxacina	5 µg	≥ 21 mm	16-20 mm	≤ 15 mm
Trimetropima/ Sulfametoxazol	23.75 µg	≥ 16 mm	11-15 mm	≤ 10 mm

3.4.1 Prueba de sensibilidad para la detección de SARM

Según la guía del CLSI de este año se aconseja usar el disco de cefoxitina para la identificación de la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*. Se utilizó el disco de cefoxitina de 30 µg en todas las cepas de *S. aureus* con la siguiente guía:

Tabla 3.

Antibiótico usado en el antibiograma de resistencia a meticilina

Antibiótico	Concentración	Diámetro de Disco		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Cefoxitina	30 µg	≥ 21 mm	-	≤ 22 mm

3.4.2 Prueba de susceptibilidad para la detección de *S. aureus* resistente a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B

Prueba D-test: Mediante esta prueba se puede diferenciar la resistencia inducible que tiene *S. aureus* a la clindamicina. Se basa en colocar un disco de eritromicina y clindamicina a una distancia de 15mm aproximadamente. Las cepas de *S. aureus* que determinen una resistencia inducible a clindamicina obtienen la

forma de la letra D en el halo de inhibición alrededor del disco de clindamicina que se encuentra frente al disco de Eritromicina (Adhikari et al., 2017).

Según la guía de CLSI se recomienda usar el disco de eritromicina y clindamicina para identificar la resistencia a macrólidos que puede ser mediada por alguno de estos genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermT* y *ermY*. Se usó el disco de eritromicina 15 µg en cepas de *S. aureus* con la interpretación siguiente:

Tabla 4.

Antibióticos usados en el antibiograma de la resistencia a macrólidos

Antibiótico	Concentración	Diámetro de Disco		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Eritromicina	15 µg	≥ 21 mm	14-22 mm	≤ 13 mm
Clindamicina	2 µg	≥ 21 mm	15-20 mm	≤ 14 mm

3.5 Detección molecular de genes de resistencia

3.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante un estuche *High Pure PCR template Preparation*® de la casa comercial Roche. Adicionalmente a los reactivos proporcionados por el estuche se necesitó etanol absoluto, isopropanol absoluto y Lisozima.

3.5.1.1 Preparación de las soluciones de trabajo

Proteinasa K: se disolvió la proteinasa en 4.5 ml de agua doble destilada, y se preservó a una temperatura de -15°C

Inhibitor Removal Buffer: se añadió 20 ml de etanol absoluto al buffer.

Wash Buffer: se añadió 80 ml de etanol absoluto al wash buffer.

3.5.1.2 Lisis celular y unión de ADN

A partir de los 200 uL de muestra en TE se añadió 5 uL de lisozima (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 15 minutos. Pasado este tiempo se añadió 200 uL de Binding Buffer y 40 uL de proteinasa K, se prosiguió a mezclar en vortex e incubarlos a 70°C por 10 minutos. Después de este tiempo se añadió 100 uL de isopropanol y se mezcló en vortex. Se montó los tubos de colección con las columnas de extracción, se pipeteó el líquido de muestra en las columnas de extracción, se centrifugo por un minuto a 8000 x g. Se removió el tubo de colección y se colocó en otro, se añadió 500 uL de Inhibitor Removal Buffer en las columnas de extracción y se centrifugo por un minuto a 8000 x g. Se removió el tubo de colección y se colocó en otro, se añadió 500 uL de Wash Buffer en las columnas de extracción y se centrifugo por un minuto a 8000 x g (Este proceso se repitió 2 veces). Se colocaron las columnas de extracción en tubos de 1.5 mL, se añadió 200 uL de Buffer de elusión (caliente) y se centrifugó por un minuto a 8000 x g.

Por último, se midió la concentración de AND extraído en el equipo *Nanodrop 8000 Thermo Scientific*.

3.6 Amplificación por PCR

3.6.1 Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para SARM y factores de virulencia

La técnica de PCR permitió la detección de la presencia del gen *mecA*, reportado como uno de los responsables de codificar la resistencia a la meticilina. Además, también se determinó factores de virulencia como *nuc* y *luck-PV* en *S. aureus*. La amplificación se realizó utilizando la enzima *Go Taq® Green Master Mix*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). En la tabla 5 se detallan las concentraciones de los componentes para una reacción. Se utilizaron los cebadores detallados en la tabla 6.

Tabla 5.

Concentraciones correspondientes a la PCR para la determinación de SARM y factores de virulencia

Mezcla	16S	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>	<i>luck-PV</i>
<i>Go taq®</i>	12.5 ul	12.5 ul	12.5 ul	12.5 ul
<i>Master mix</i>				
<i>Green</i>				
MgCl ₂ 50mM	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
Cebadores	2 ul Staph 756F (16S rRNA Forward) (5 µM)	1.5 ul <i>nuc</i> Fw (5 uM)	2.5 ul <i>mecA</i> -Fw (5uM)	2.5 ul <i>luck-PV</i> Fw (5uM)
	2 ul of Staph 756R (16S rRNA Reverse) (5 µM)	1.5 ul <i>nuc</i> Rv (5 uM)	2.5 ul <i>mecA</i> -Rv (5uM)	

				2.5 ul
				<i>luck</i> -PV
				Rw (5uM)
Agua	6.5 uL	7.5 uL	5.5 uL	5.5 uL
ADN 10 ng/ul	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
Volumen final	25 ul	25 ul	25ul	25ul

Cebadores

Tabla 6.

Cebadores usados para la determinación de resistencia a meticilina y factores de virulencia.

Cebadores	Tamaño	Secuencia	
		Delantero 5'-3'	Reverso 5'-3'
<i>16S</i> <i>Staph756 F</i> / <i>Staph750</i> R	756 pb	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA	CCACCTTCCTCCGGTTTGTACC
<i>mecA</i> 147 F / 147 R	147 pb	GTGAAGATATACCAAGTGATT	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT
<i>Luk PV</i> – 1 / 2	433 pb	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATC CA	GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAA GC
<i>Nuc</i> 1 / 2	279 pb	GCGATTGATGGTGATACGGTT	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC

Los cebadores de *nuc*, *luk PV* y *mecA* fueron reportados s por Zhang, et al. (Zhang, McClure, Elsayed, Louie, & Conly, 2008)

Las muestras se colocaron en el Termociclador marca BIORAD bajo las siguientes condiciones de ciclado: 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58.2°C por 45 segundos y finalmente 72°C por un minuto.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en genes de agarosa al 1%. Se utilizó tampón TBE 1X y 5 ul de visualizador *Syber Green 6x TriTrack DNA Loading Dye*®. Para analizar el tamaño de los amplicones se utilizaron en el gel 3 ul de Marcador de peso molecular *GeneRuler Ladder*™ de 1000 pares de bases (bp) de tamaño. Se colocaron 7 ul de producto de PCR por carril con 3ul de Buffer de carga *Blue/Orange Loading Dye 6X* (Invitrogen) y se corrió a 100V por 30 minutos utilizando una fuente de poder *Hersteller Nr. EC1000XL2*® marca *Thermo Scientific*.

El tamaño esperado de bandas es el de: *16S*: 756 pb; *nuc*: 279 pb; *mecA*:147 pb; *luck-PV*: 433pb

3.6.2 PCR para resistencia a macrólidos

La técnica de PCR permitió la detección de la presencia de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermT* y *ermY*, que se han reportado como unos de los responsables de la resistencia a macrólidos. La amplificación se realizó utilizando la enzima *Go Taq*® *Green Master Mix*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). En la tabla 7 se detallan las concentraciones de los componentes para una reacción. Se utilizaron los cebadores detallados en la tabla 8.

Tabla 7.

Concentraciones correspondientes a la PCR para la determinación de resistencia a macrólidos.

Mezcla	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermT</i>	<i>ermY</i>
Go <i>taq</i> ®	12.5 ul	12.5 ul	12.5 ul	12.5 ul	12.5 ul
Master mix					
Green					
MgCl ₂	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
50mM					
Cebadores	0.75 ul <i>ermA</i> <i>Fwd</i> (10µM)	0.75 ul <i>ermB</i> <i>Fwd</i> (10µM)	0.75 ul <i>ermC</i> <i>Fwd</i> (10 µM)	0.75 ul <i>ermT</i> <i>Fwd</i> (10 µM)	0.75 ul <i>ermY</i> <i>Fwd</i> (10 µM)
	0.75 ul <i>ermA</i> <i>RV</i> (10 µM)	0.75 ul <i>ermB</i> <i>RV</i> (10 µM)	0.75 ul <i>ermC</i> <i>RV</i> (10 µM)	0.75 ul <i>ermT</i> <i>RV</i> (10 µM)	0.75 ul <i>ermY</i> <i>RV</i> (10 µM)
Agua	6 uL	6 uL	6 uL	6 uL	6 uL
ADN	10 1 ul	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
ng/ul					
Volumen	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul
final					

Tabla 8.

Cebadores usados para la identificación de resistencia a macrólidos

Cebadore	Tamaño	Secuencia
s	esperad	Delantero 5'-3'
o		Reverso 5'-3'

<i>ermA</i> 1 / 2	421 pb	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	CTTCGATAGTTTATTAATATTAG
<i>ermB</i> 1 / 2	359 pb	GAAAAGTACTCAACCAAATA	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA
<i>ermC</i> 1 / 2	572 pb	TCAAAACATAATATAGATAAA	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT
<i>ermT</i> 1 / 2	478 pb	CCGCCATTGAAATAGATCCT	TTCTGTAGCTGTGCTTTCAAAAA
<i>ermY</i> 1 / 2	725 pb	AGGCCCTTTTAAAGACGAAGGC A	GGCGCGATTGTTTCATTTTAAGGCC C

Los cebadores para la determinación de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermT* y *ermY* para la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas según lo menciona Adhikari. (Adhikari et al., 2017)

Las muestras se colocaron en el Termociclador marca BIORAD bajo las siguientes condiciones de ciclado para los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*: 94°C por 10 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por un minuto y una extensión final 72°C por 10 minutos.

Para el gen *ermT* se usaron las siguientes condiciones: 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos y finalmente 72°C por un minuto

Para el gen *ermY* se usaron las siguientes condiciones: 96°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y finalmente 72°C por dos minutos

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en genes de agarosa al 1%. Se utilizó tampón TBE 1X y 5 ul de visualizador *Syber Green 6x TriTrack DNA Loading Dye*®. Para analizar el tamaño de los amplicones se

utilizaron en el gel 3 ul de Marcador de peso molecular *GeneRuler Ladder*® de 100 pares de bases (bp) de tamaño. Se colocaron 7 ul de producto de PCR por carril con 3ul de Buffer de carga *Blue/Orange Loading Dye 6X* (Invitrogen) y se corrió a 100V por 30 minutos utilizando una fuente de poder *Hersteller Nr. EC1000XL2*® marca *Thermo Scientific*.

El tamaño esperado de bandas es el de: *ermA*: 421 pb, *ermB*: 359 pb, *ermC*: 572 pb.

El tamaño esperado de bandas es el de: *ermT*: 478 pb

El tamaño esperado de bandas es el de: *ermY*: 725 pb

3.7 Análisis estadístico

Con el uso de la herramienta estadística infostat, se calculó el porcentaje de *S. aureus* presente en la población respecto a cada provincia que se tomó la muestra, además se calculó las medidas de resumen de las muestras incluyendo edad y sexo.

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Portadores de *S. aureus* en la población total

De las 428 muestras recolectadas de la nasofaringe de niños, 80 muestras resultaron positivas para *S. aureus*, por ende, se define a estos niños como

portadores de *S. aureus*. La figura 3 permite observar de manera gráfica la prevalencia de *S. aureus* en la población general.

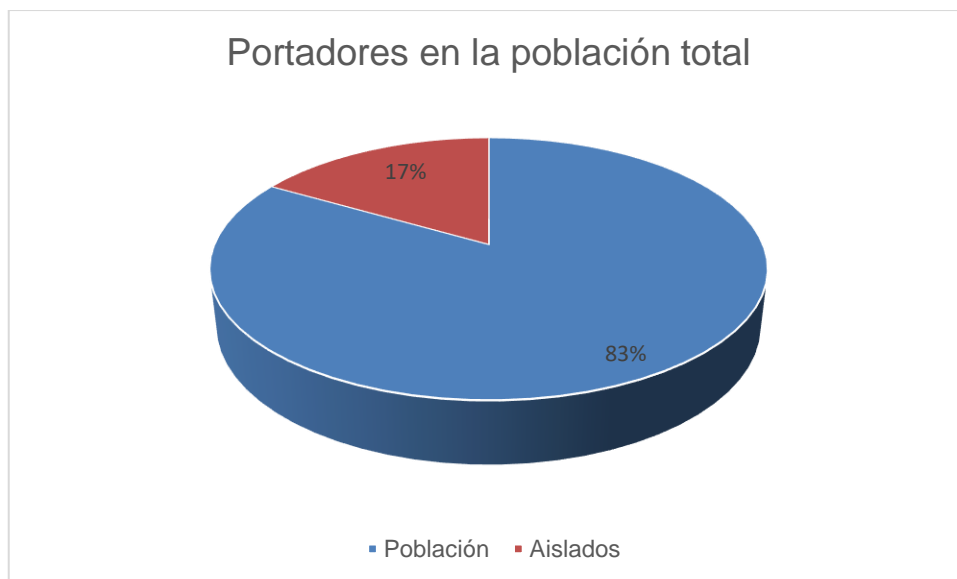


Figura 3. Porcentaje de portadores de *S. aureus* en la población total

4.2 Características demográficas de la población de estudio

Se determinó que el mayor porcentaje de portadores de *S. aureus* corresponden a Guayaquil con el 44% (35/80), y la provincia de Pichincha tiene el porcentaje más bajo de portadores con un 13% (10/80).

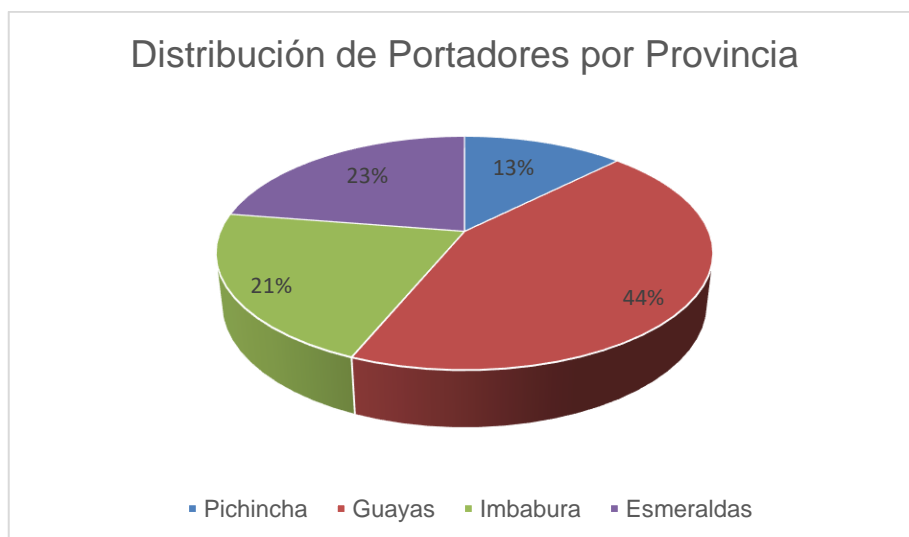


Figura 4. Distribución de portadores de *S. aureus* según la provincia de muestreo

De los 80 niños se observó que el 56% corresponden al sexo masculino. Además, el promedio de edad en los niños portadores de *S. aureus* corresponde a 4 años, sin embargo, solo se tenía información de edades en el 84% de los niños, con una media estimada correspondiente a 4 años de edad. Tabla 9

Tabla 9.

Características demográficas de los 80 niños confirmados con presencia de *S. aureus*, en el Ecuador, 2019.

	Característica demográfica	Frecuencia	Porcentaje
Sexo	Masculino	45	56%
	Femenino	35	44%
	Total	80	100%
Edad	0 - 1 año	4	5%
	1 - 3 años	28	35%
	3 - 5 años	24	30%
	5 o más años	11	14%
	Total	67	84%

4.3 Susceptibilidad antibiótica de *S. aureus*

A las 80 muestras se evaluaron 7 discos de antibióticos para determinar su sensibilidad antimicrobiana. En la tabla 10 se observa que el 99% de cepas de *S. aureus* fueron sensibles a Ciprofloxacina siendo este el mayor porcentaje. Por otro lado, con el menor porcentaje corresponde a Eritromicina con el 76% de cepas sensibles.

Tabla 10.

Sensibilidad microbiana de *S. aureus* de los antibióticos usados en este estudio.

Antibiótico	Sensible	Intermedia	Resistente
Cefoxitina	91%	0%	9%
Eritromicina	76%	0%	24%
Clindamicina	96%	4%	0%
Gentamicina	93%	0%	8%
Ciprofloxacina	99%	1%	0%
Trimetropim/Sulfametoxazol	94%	6%	0%
Tetraciclina	91%	1%	8%

De los 80 niños portadores 27 cepas de *S. aureus* son resistentes a al menos un antibiótico 34% (27/80), en figura 5 se puede observar los porcentajes de resistencia que corresponden a cada provincia de muestreo. En la provincia de Guayas se evidencio el porcentaje de resistencia antibiótica más alta con un 63% (17/27). Sin embargo, en los niños de la comunidad Kichwa de la provincia de Imbabura de los 17 niños portadores, solo un niño portaba una cepa resistente.

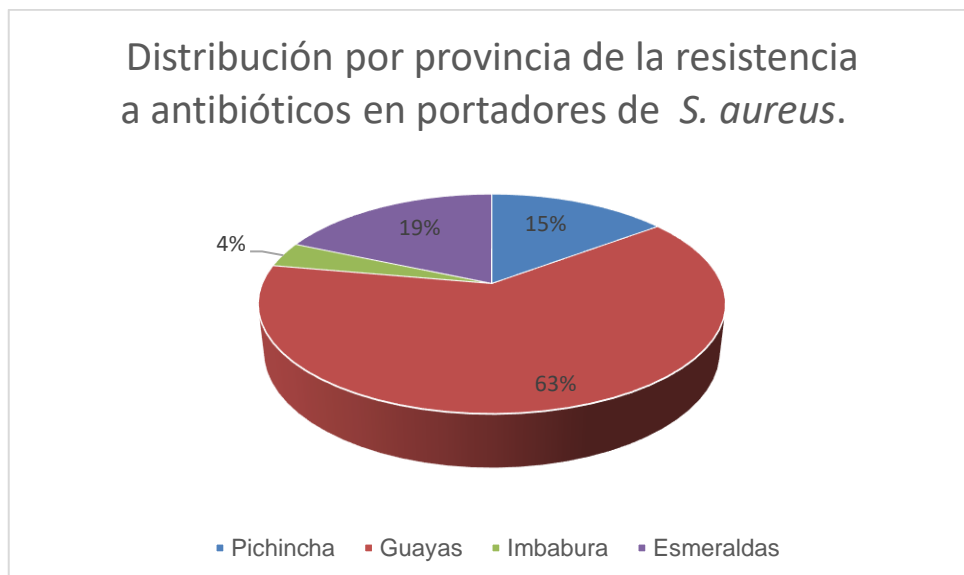


Figura 5. Distribución por provincia de la resistencia a antibióticos en portadores de *S. aureus*.

Es probable que la resistencia antibiótica de *S. aureus* en especial en los niños provenientes de la provincia del Guayas, que presentan el mayor porcentaje de resistencia sea causada por el mal uso de los antibióticos.

En el Ecuador, la Agencia Nacional De Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria menciona que: “se ejerce un control y vigilancia de productos de antibióticos ejecutando un plan de acción nacional para combatir la resistencia antibiótica”. Desarrollando el mecanismo de control de expendio y dispensación de antibióticos solo con la presencia de receta médica (Arcsa, 2019).

Todo esto siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud que advierte que “mientras no se apliquen medidas correctoras se podría llegar a una era post-antibiótica”, esto provocaría que enfermedades consideradas comunes no sean capaces de curar (OMS, 2018).

Según el “Dr. Gabriel Levy Hara” a través de la Organización Panamericana de Salud se realizaron estudios en varios países de Latinoamérica y se pudo determinar que entre el 14 y 60% fármacos comprados son antibióticos. En el caso del país vecino Perú, los antibióticos fueron el 60% de drogas médicas compradas en farmacias. Datos que se relacionaron con la automedicación, los resultados fueron variables, no obstante, determinaron que la compra de antibióticos sin prescripción médica está del 30 al 40% en países latinoamericanos (C. Serrano., 2007).

América Latina según menciona “Claudio Rocha” representa una de las zonas con una de las tasas más altas de prevalencia de SARM y resistencia a B-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias. Mundialmente se ha incrementado la vigilancia en organismos resistentes a antibióticos, no obstante, la información es limitada especialmente en países en vías de desarrollo (Rocha et al., 2015).

Como menciona “Carmen Pesantez” jefa del laboratorio de infectología del Instituto Nacional de Higiene en Guayaquil, en los médicos recae también la responsabilidad de administrar antibióticos de manera correcta ya que se considera cuando una infección requiera un antibiótico y en caso de ser necesario se esperar a los resultados de antibiograma (Arcsa, 2019).

4.4 Susceptibilidad de *S. aureus* a Ciprofloxacina, Gentamicina, Tetraciclina y Trimetropima/Sulfametoxazol

Un 18.7% (15/80) de los niños portadores presenta resistencia a antibióticos como; trimetropima/sulfametoxazol, ciprofloxacina, gentamicina o tetraciclina. La figura 6 se evidencia en la población de Guayas con la proporción más alta de resistencia a estos antibióticos con un 47%, no obstante, en la provincia de

Pichincha no se observó niños portadores de *S. aureus* que posean resistencia a alguno de los antibióticos mencionados.

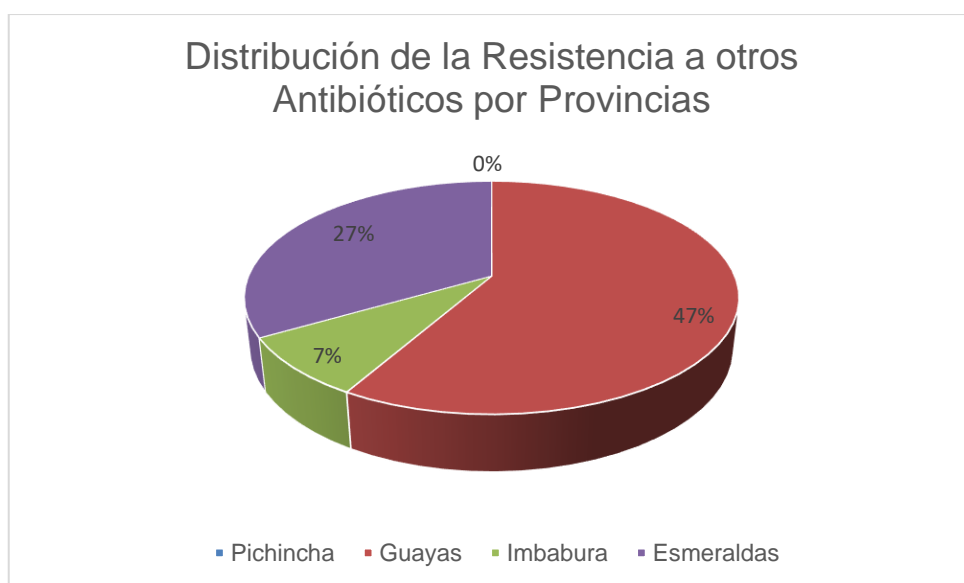


Figura 6. Distribución por provincia de *S. aureus* resistentes a trimetoprima/sulfametoxazol, ciprofloxacina, gentamicina y tetraciclina

Un estudio en adultos en un hospital en la ciudad de Orinoquia, Colombia. Hallaron 976 aislamientos de *S. aureus* de estos 19.6% (484/976) fueron resistentes a meticilina, además, reportaron resistencia a eritromicina 31% (31/976), gentamicina 2,9% (30/976), ciprofloxacina 2.5% (24/976) y trimetopim/sulfametoxazol 12% 11(976), siendo la primera la que posee mayor grado de resistencia y la última con menor grado de resistencia. Por otro lado, estos resultados son diferentes a lo que se encontró en este estudio donde el antibiótico con mayor grado de resistencia es la Tetraciclina con 47% (7/15) y el antibiótico que se reportó como menor grado fue la ciprofloxacina con 7% (1/15).

4.5 Susceptibilidad a Meticilina en *S. aureus* de niños portadores

Se evidenció la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un 14% (11/80) de la población. Se pudo determinar dicha resistencia mediante pruebas fenotípicas (antibiograma mediante disco de Cefoxitina 30 µg) y pruebas moleculares (pruebas moleculares analizando el gen-*mecA*). Las muestras que presentaron un fenotipo de resistencia a meticilina por medio de antibiograma; se les realizó pruebas moleculares de resistencia a meticilina mediante la amplificación del gen *mecA* obteniendo como resultado la presencia de *mecA* en el 100% de las cepas ensayadas. Confirmándose la presencia de SARM por métodos fenotípicos y moleculares.

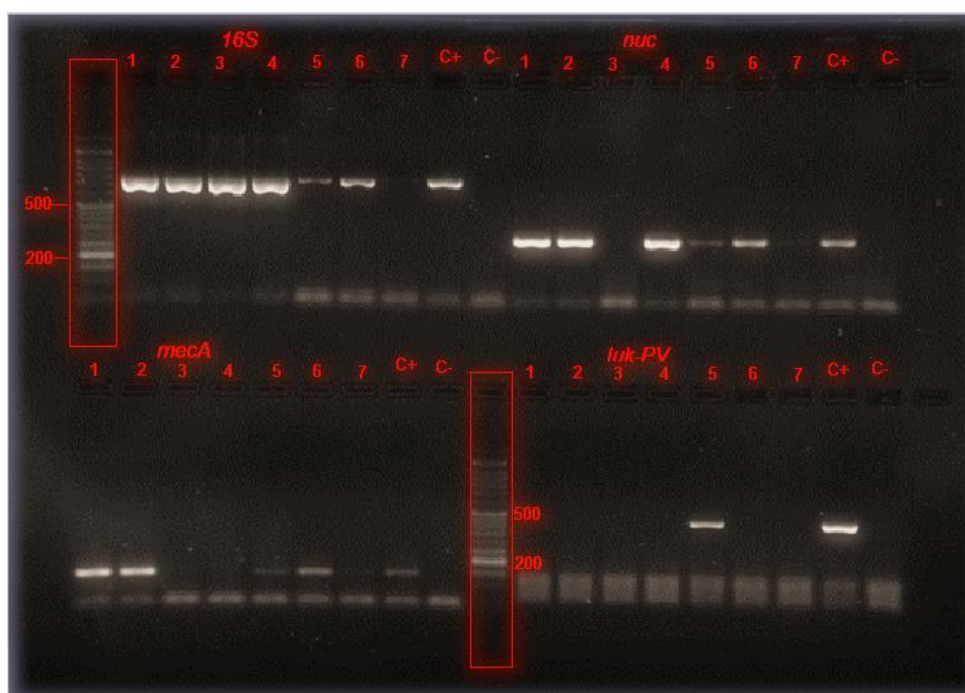


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de los genes 16S, *mecA*, *nuc* y *luk-PV* en los aislados de *S. aureus*.

En cuanto a la distribución de la resistencia a meticilina por provincia. Se puede observar en la figura 8 el 91% resistente a meticilina corresponde a 10 individuos de la provincia de Guayas en una población de 11 portadores de *S. aureus* resistente a meticilina. En cuanto a las muestras provenientes de las provincias de Esmeraldas e Imbabura no se encontró resistencia a meticilina.

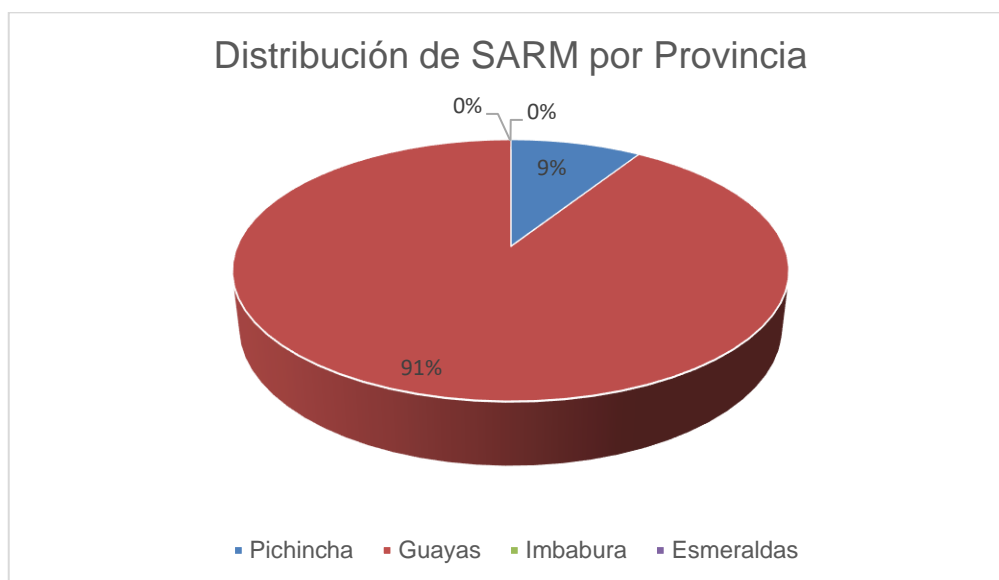


Figura 8. Distribución de *S. aureus* resistente a meticilina en niños portadores según su provincia.

Dentro del país se han realizado estudios de *S. aureus* portadores en personas de distintos grupos etarios, pero principalmente adultos. Diana Cabrera en Cuenca, Ecuador en el año 2015 realizó un estudio donde se analizaron 104 estudiantes de medicina de la Universidad de Cuenca de los cuales resultaron que el 25% (26/104) de estos eran portadores de *S. aureus*. Además, reportó que dentro de este porcentaje el 1.92% correspondía a SARM (Cabrera, Priscila, & Cando Sánchez, 2015).

Otro estudio en el Hospital Enrique Garcés en la ciudad de Quito determinó 24 aislamientos de *S. aureus* de 79 pacientes adultos y con una proporción de 30,40% de SARM. Por lo que respecta a las edades, se reportó que la edad con mayor frecuencia corresponde a pacientes entre 60-80 años (Vinuesa et al., 2015).

Los resultados en este estudio mostraron que de 80 niños portadores de *S. aureus* un 14% (11/80) corresponde a SARM mediados por la presencia del gen *mecA*. Además, se identificaron los genes, *nuc* y *luk-PV* en 94% (75/80) y 13% (10/80) respectivamente de la población de portadores de *S. aureus*.

Así mismo, se identificaron los genes *luk-PV* y *nuc* en un 64% (7/11) y un 82% (9/11) en aislados SARM. La edad media de los niños portadores de SARM se encuentra en 4 años.

El factor de virulencia leucocidina Pantón-Valentine es el responsable de algunas infecciones clínicas causadas por el SARM-CA, por esta razón se ha usado como un gen marcador (Acuña Ávila, 2015). En los últimos años se ha visto que *S. aureus* produce la toxina LPV la cual le confiere una fuerte capacidad de virulencia, produciendo infecciones en niños y jóvenes (Frick et al., 2010).

Un estudio en Paraguay desarrollado en varias clínicas pediátricas reportó que de 123 muestras de niños portadores de *S. aureus*, 76% provienen infecciones de la piel y 20% de pacientes con bacteriemias el 18.7%(23/123) de muestras se identificó un SARM. Por otro lado, identificaron el gen *mecA* en 9.8% de los aislados, una variante de este gen en 1.6% y *luk-PV* con 39%. El 43% (10/23) de aislados de SARM se demostró la presencia del gen *luk-PV*. (Guillén et al., 2016). Estos resultados son diferentes a los resultados de este estudio donde se identificó en un 100% (11/11) la presencia del gen *mecA* y la presencia de *luk-PV* con 64% (7/11) de los SARM.

Por otro lado, una investigación de SARM en niños sanos y relacionados con hospitales en Argentina, muestran 840 niños con infecciones por *S. aureus*, el 69% (582/840) fueron adquiridas en la comunidad, entre estas el 61% (356/582)

fueron SARM-C. De estas últimas el 25% (75/356) pertenece a SARM-RH (proveniente de niños comunitarios con enfermedad base o previamente internados en el hospital), y el 79% (281/356) pertenece a SARM-CO (proveniente de niños sanos con infecciones de la comunidad). La edad media registrada fue de 36 meses de edad. Por lo tanto, encontraron que los niños que portaban SARM relacionado a hospital presentaban una mayor tasa de resistencia a otros antibióticos (Paganini et al., 2009).

4.6 Resistencia a macrólidos en niños portadores de *S. aureus*

Se realizó pruebas fenotípicas y genotípicas para determinar la resistencia a macrólidos. Con la prueba de D- test se obtuvieron varios fenotipos de resistencia como MS, iMLSB y cMLSB. Además, se usaron los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermT* y *ermY* para determinar la resistencia usando técnicas moleculares como PCR., no obstante, Solo se encontró la presencia del gen de resistencia *ermC* en una cepa de las 18.

Tabla 11.

Frecuencia de fenotipos de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas con su frecuencia.

Fenotipo	Portadores	Frecuencia	Gen
iMLSB	10	13%	<i>ermC</i> 6% (1/18)
cMLSB	3	4%	
MS	5	6%	
Total, Portadores	80	23%	

La figura 9 muestra el 72% (13/18) de resistencia a MLSB se encuentra en niños portadores de *S. aureus* de la provincia de Guayas. Además, 4 de los 18 de los niños con neumonía adquirida en la comunidad en Pichincha tienen presencia

de este microorganismo con resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas. Por otro lado, existe solo un individuo con este tipo de resistencia en las 18 muestras obtenidas de niños de la Provincia de Esmeraldas.

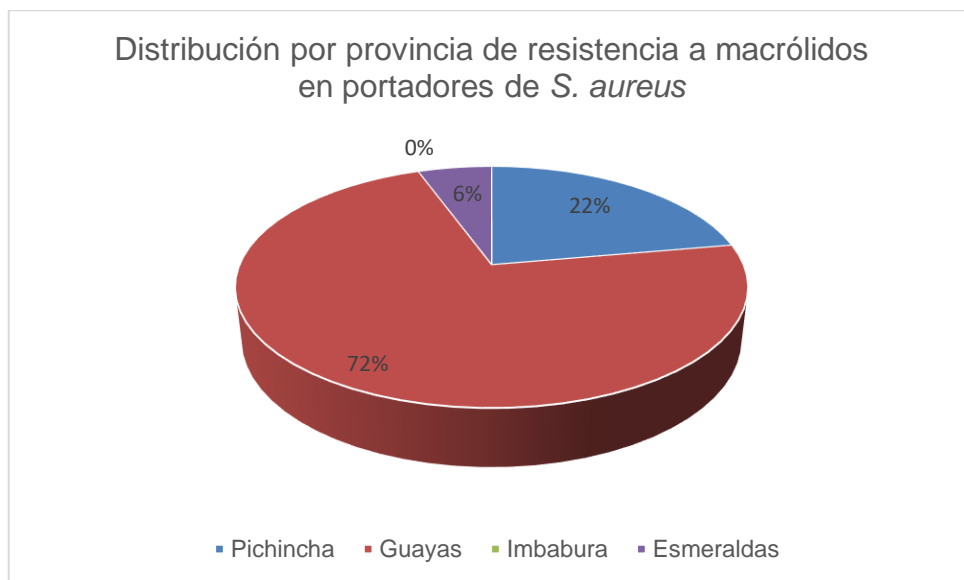


Figura 9. Distribución por provincia de resistencia a macrólidos en portadores de *S. aureus*

Un estudio en el hospital para niños de Willhelmina, New York mostró que en 65 pacientes con fibrosis quística el 35.4% (23/65) eran portadores de *S. aureus* y en 193 personas contactos intradomiciliarios de los pacientes, *S. aureus* se encontraba presente en el 26.9% (52/193). Los *S. aureus* en los niños con fibrosis quística presentaban un 69.6% (16/23) de resistencia a macrólidos, esto se debe a que los pacientes con esta enfermedad son tratados por largo tiempo con dosis profilácticas de azitromicina, este hecho puede favorecer la aparición de resistencia. En cuanto a los contactos intradomiciliarios se encontró un 9.6% (5/193) de resistencia a macrólidos. Además, determinaron la proporción de fenotipos de resistencia siendo estos 7% fenotipo MLSB constitutivo y 0.7% fenotipo MLSB inducible (Tramper-Stranders et al., 2007). Por otro lado, estos resultados mostraron gran diferencia a este estudio ya que no realizaron pruebas moleculares para encontrar asociación de los fenotipos de resistencia con los

genes *erm*. A diferencia en esta investigación se encontró que la frecuencia más alta corresponde al fenotipo de resistencia MLSB inducible con un 13%, además, se encontró el fenotipo MS con una frecuencia del 6%.

Otro estudio realizado en 100 empleados en hospitales de Khorramabad, Irán reportó que de estos se aislaron 50 *S. aureus*, el 53% (26/50) estos aislados tenían resistencia a macrólidos y a meticilina. Informaron también la asociación de la resistencia a macrólidos con los genes *erm*, las frecuencias obtenidas son de *ermA* 3%, *ermB* 5% y *ermC* 33% (Goudarzi, Tahmasbi, Anbari, & Ghafarzadeh, 2016). Un porcentaje de resistencia superior al encontrado en este estudio donde se encontró un 23% de resistencia a macrólidos en 80 portadores, asociándose el fenotipo de resistencia iMLSB con el gen *ermC* en 6% de los aislados. Tabla 11

4.7 Resistencia combinada a meticilina y macrólidos en niños portadores

Se encontró un total de 8 niños son portadores de SARM y resistentes a MLSB. En la figura 10 se observa 7 niños que corresponden a comunidades de la provincia del Guayas. Por otro lado, se encontró solo un niño portador de *S. aureus* con resistencia compartida entre meticilina y MLSB proveniente de un centro salud en Pichincha internado por neumonía adquirida en la comunidad.

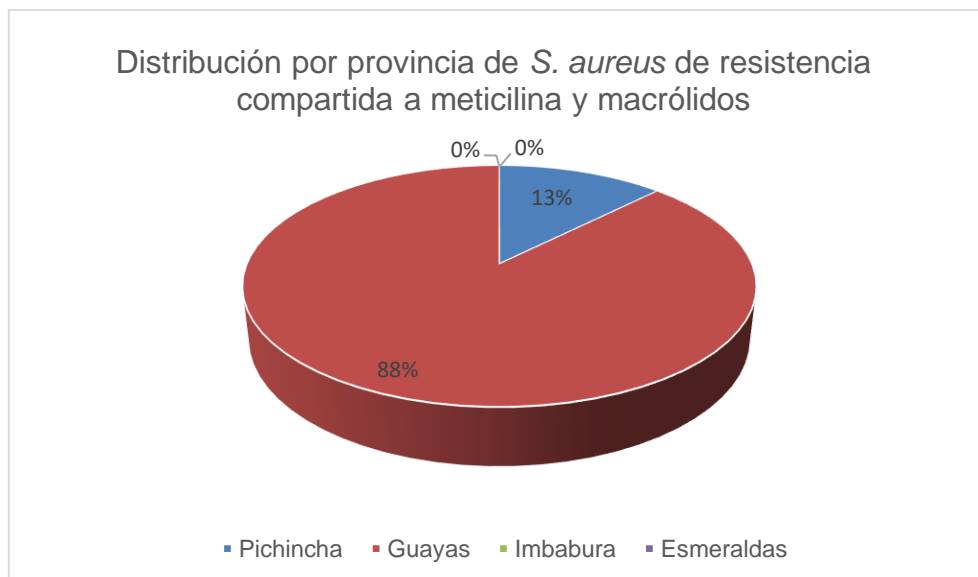


Figura 10. Distribución por provincia de *S. aureus* con resistencia compartida a meticilina y macrólidos.

Los estudios reportan que las cepas de SARM tienen la capacidad de desarrollar resistencia a más tipos de antibióticos. La resistencia a macrólidos en *Staphylococcus* es producida por diversos mecanismos uno de ellos es mediada por la metilasa ribosómica la cual es codificada por los genes *erm* (con fenotipo MLSB), estos pueden ser constitutivos o inducibles y otro mecanismo por bombas de eflujo codificada por los genes *msr* (con fenotipo MS). Se define iMLSB (inducible) cuando este es resistente a la eritromicina y esta posee una zona en forma de D junto a la clindamicina cuando el halo es ≥ 21 . Por otro lado, el fenotipo cMLSB (constitutivo) posee resistencia tanto a la eritromicina como a la clindamicina. Finalmente, el fenotipo MS produce resistencia a eritromicina pero es susceptible a la clindamicina sin formar una zona D (Ji, 2020, p.17).

La Tabla 12 muestra que en este estudio los portadores de *S. aureus* el mayor fenotipo encontrado es el iMLSB, que además presentan un 24% de resistencia a meticilina. No obstante, el fenotipo constitutivo está presente solo en dos portadores, estos representan al 12% de *S. aureus* resistente a meticilina. Estos datos son similares a una investigación realizada en una escuela en Udipi

Taluk, India, con niños con edades de 6 – 15 años donde reportaron que de 378 aislados de *S. aureus* hallaron 17 aislados SARM, además, que el 71% (12/17) de los casos de SARM tenían el fenotipo iMLSB (Govindan, Mohammed, & Bairy, 2014).

Un estudio realizado en el hospital de Valledupar, Colombia con una muestra de 50 aislados de *S. aureus* reportaron que el fenotipo con mayor prevalencia fue el que presento sensibilidad tanto a eritromicina como a clindamicina con 78% (39/50), seguido del fenotipo de resistencia a Eritromicina y clindamicina (cMLSB) con 16% (8/50) (Morales Gloria Inés Parra MsC, María Cecilia Yaneth Giovanetti MsC, 2016).

Tabla 12.

Fenotipos de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas en relación con la susceptibilidad a meticilina

Fenotipo	Portadores	SARM	SASM	Total
iMLSB	10	4 (24%)	6 (35%)	10 (59%)
cMLSB	2	2 (12%)	0 (0%)	2 (12%)
MS	5	2 (12%)	3 (17%)	5 (29%)

4.8 Multiresistencia de las cepas de *S. aureus* de niños portadores

La multiresistencia antibiótica se considera como la capacidad de los microorganismos para ser resistentes dos o más clases de antibióticos (Kumar & Khan, 2015). *S. aureus* resistente a meticilina tiene la capacidad resistir a otros tipos de antibióticos. En este estudio 14 niños presentan *S. aureus* con resistencia múltiple. Como se observa en la figura 11 el 86% (12/14) de muestras

correspondientes a la provincia de Guayas poseen multiresistencia, por otro lado, se observó que las muestras de la comunidad Kichwa de la provincia de Imbabura no hay tal multiresistencia. Por otro lado, se encontró que el 78% (11/14) son SARM multiresistentes. Se sugiere que parte de esta multiresistencia puede ser orquestada por el SARM ya que tiene gran capacidad de desarrollo de resistencia (M.J. López-Pueyo, F. Barcenilla-Gaite, 2011).

Tabla 13.

Multiresistencia a antibióticos de *S. aureus* en niños portadores

Patrones de resistencia	Número de Antibióticos	Antibióticos	Portadores	Frecuencia
1	3	E-CN-TE	1	7%
2	3	FOX-CN-TE	2	14%
3	3	FOX-E-DA	2	14%
4	2	FOX-E	4	29%
5	2	E-TE	2	14%
6	2	FOX-CN	1	7%
7	2	E-DA	1	7%
8	2	SXT-TE	1	7%



Figura 11. Distribución de cepas de *S. aureus* que poseen una resistencia a múltiples antibióticos

Otra posible causa de la multiresistencia pueden ser la presencia de sistemas de bomba de eflujo en *S. aureus*, dichos sistemas pueden ser específicos para un antibiótico como para más clases de antibióticos, dándole a la bacteria la capacidad de resistir a varios antibióticos extrayendo los compuestos antimicrobianos. En la actualidad existen descritas más de diez bombas de eflujo multiresistente para *S. aureus* (Costa, Viveiros, Amaral, & Couto, 2013).

Un estudio en una clínica odontológica en la ciudad de Asunción, Paraguay. Se muestrearon 112 niños de entre 2 a 15 años de edad, el 31% (35/112) de niños mostraron ser portadores de *S. aureus* de los cuales el 23% (8/35) eran resistentes a dos o más antibióticos, reportaron también que solo el 2,9 % (1/35) poseía una multiresistencia a 7 antibióticos. Los antibióticos con mayor resistencia reportada fueron los β -lactámicos, por lo tanto, se encontró que estos niños eran portadores de SARM multiresistentes. Además, informaron que el rango de edad de 1 a 5 años poseía el mayor porcentaje de portación de *S. aureus* multiresistente (Cataldo et al, 2014). A diferencia de este estudio donde se halló que el 18% de portadores pose resistencia a 2 o más antibióticos, siendo cefoxitina y eritromicina la combinación con más frecuencia encontrada y por ende una de las más importantes ya que se refiere a la asociación de resistencia a la metilicina y macrólidos.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La portación de *S. aureus* es de un 17% en niños de las comunidades de las diferentes provincias analizadas en el estudio. Sin embargo, el 34% de estos *S. aureus* es resistente a varios antibióticos. La sensibilidad antibiótica más alta corresponde al antibiótico Ciprofloxacina con un 99%. Por otro lado, la sensibilidad más baja corresponde al antibiótico Eritromicina con un 76%.

Los niños portadores de *S. aureus* resistente a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas corresponden a un 23%. Además, se determinó que existe una resistencia compartida entre el SARM y la resistencia a MLSB en 10% de las muestras analizadas.

La prevalencia de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en niños que son portadores de este microorganismo fue del 14% (11/80) y el 91% de SARM corresponden a muestras de niños provenientes de comunidades en Guayaquil.

La multiresistencia de niños portadores de *S. aureus* se encuentra en un 18% de las muestras analizadas.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda un estudio de vigilancia para evaluar el cumplimiento en el país del control de distribución y consumo de antibióticos en virtud de los altos índices de resistencia a antibióticos encontrados en esta investigación. Además, de

estudios continuos para evaluar el desarrollo de la resistencia antibiótica en niños.

Ampliar el estudio en el resto de provincias para obtener un mayor número de muestras y estudiar algunos factores de riesgo y asociación entre las zonas geográficas en la prevalencia de *S. aureus* resistente a antibióticos.

REFERENCIAS

- Acuña Ávila, M. (2015). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC): comunicación de los primeros cuatro casos pediátricos descritos en Hospital de Niños Roberto del Río. *Rev chilena de infectología*. 32(3), 716-1018
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000400016>
- Adhikari, R. P., Shrestha, S., Barakoti, A., & Amatya, R. (2017). Inducible clindamycin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *BMC Infectious Diseases*. 17(1), 483. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2584-5>
- Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria. (2019) Recuperado de <https://www.controlsanitario.gob.ec/arcsa-recuerda-que-se-mantiene-prohibicion-de-venta-de-antibioticos-sin-receta-medica/>
- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., ... González-Rocha, G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev Chilena de Infectología*. 35(1), 7–14.
<https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>
- Ardanuy, C., María, E. C., Morosini, I., & Torres, C. (2012). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. *Rev Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 30(6), 325-332
<https://doi:10.1016/j.eimc.2011.09.009>
- Barbero, J. M., Arranz, A., Rebollar, A., Culebras, A., García, M., Agudo, R., Montero, E. (2018). Antipseudomonic effect of macrolides. Experience in a case of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* without response to antibiotic therapy. *Rev Española de Quimioterapia: Publicacion Oficial de La Sociedad*

Española de Quimioterapia. 31(1), 72–74. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29390604>

- Cabrera, D. I., Priscila, T., & Cando Sánchez, M. (2015). *Frecuencia de portadores nasales de staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM) y factores asociados a colonización en estudiantes de medicina de la universidad de cuenca en el año 2015.* (Tesis). Universidad de Cuenca.
- Callisaya, H., Sarmiento, Z. (2007). Prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en el personal de limpieza del Hospital Obrero. *BIOFARBO.* 15(1), 55-60 Recuperado de <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v15n1/v15n1a09.pdf>
- Camussone, C. M., & Calvinho, L. F. (2013). Virulence factors of *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infections in cows: Relevance and role as immunogens. *Rev Argentina de Microbiología.* 45(2), 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
- Cataldo Russomando, Karina; Jacquett Toledo, Ninfa ; Fariña, Norma; Pereira, Alicia; Rodríguez, Fátima; Guillen, Rosa María; Russomando, G. (2014). *Portación de Staphylococcus aureus multiresistentes a antimicrobianos en cavidad bucal de niños que concurren para un tratamiento en una clínica odontológica.* *Pediatría (Asunción).* 41(3), 201-203 Recuperado de <http://scielo.iics.una.py/pdf/ped/v41n3/v41n3a04.pdf>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & María Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoamericana Patología Clínica Medicina de Laboratorio.* 61(1), 28-40 Recuperado de www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
- Chaves, F. (2013). *Staphylococcus aureus en población pediátrica: epidemiología molecular y factores de virulencia.* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.

- Cimera Proaño, D., Pérez Pazmiño, F., & Gregorio Marañón, H. (2010). Prevalencia de portadores nasales asintomáticos de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente y su relación con factores de riesgo y protectores en el personal de salud del Hospital General de las Fuerzas Armadas. *Rev Mexicana Patología Clínica*. 57(4), 196-204
Recuperado por www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/patologiaclinica
- Cisterna Cáncer, R., & Torres, L. M. (2018). *Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por S. aureus. Patogenia de la infección por Staphylococcus aureus*. (1.ª ed.). [versión electrónica]
Recuperado de <https://esteve.org/wp-content/uploads/2018/01/136593.pdf>
- Costa, S. S., Viveiros, M., Amaral, L., & Couto, I. (2013). Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *The Open Microbiology Journal*. 7(1), 59-71.
<https://doi.org/10.2174/1874285801307010059>
- Dan L. Longo, Dennis L. Kasper, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, J. L. (2018). *Infecciones estafilocócicas Harrison. Principios de Medicina Interna*, (18.ª ed.) [versión electrónica]
Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1622§ionid=101833228>
- Daum, R. S. (2008). Removing the golden coat of *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine*. 359(1), 85-7
<https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0803278>
- Fariña González, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R. (2013). *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista Chilena de Infectología*. 30(5), 480–488.

<https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000500003>

- Frick, M. A., Moraga-Llop, F. A., Bartolom, R., Larrosa, N., Campins, M., Roman, Y., ... Figueras, C. (2010). Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad en niños. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28(10), 675–679
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.007>
- Gardner, S. G., Marshall, D. D., Daum, R. S., Powers, R., & Somerville, G. A. (2018). Metabolic mitigation of staphylococcus aureus vancomycin intermediate-level susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62(1), 1-17
<https://doi.org/10.1128/AAC.01608-17>
- Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev chilena de infectología*. 17(2), 145-152
Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v17n2/art10.pdf>
- Gómez, J., García-Vázquez, E., & Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Española Quimioter*. 28(1), 1-9
Recuperado de https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_1_gomez.pdf
- Goudarzi, G., Tahmasbi, F., Anbari, K., & Ghafarzadeh, M. (2016). Distribution of genes encoding resistance to macrolides among *staphylococci* isolated from the nasal cavity of hospital employees in Khorramabad, Iran. *Rev Iranian Red Crescent Medical Journal*. 18(2), 1-18
<https://doi.org/10.5812/ircmj.25701>
- Govindan, S., Mohammed, C. A., & Bairy, I. (2014). Inducible Clindamycin Resistance Among the *Staphylococcus aureus* Colonizing the Anterior Nares of School Children of Udupi Taluk. *Nepal Journal of Epidemiology*. 4(1), 337–340
<https://doi.org/10.3126/nje.v4i1.10136>

- Guillén, R., Carpinelli, L., Rodríguez, F., Castro, H., Quíñonez, B., Campuzano, A., Basualdo, W. (2016). *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos. *Rev Chilena de Infectología*. 33(6), 609–618 <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000600002>
- Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M. T. G., Buist, G. (2012). Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(10), 4997–4999 <https://doi.org/10.1128/AAC.01199-12>
- Ji, Y. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. In J. M. Walker (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. 2069(1), 113-124 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9849-4_9
- Todar, K. (2015). *Staphylococcus*. *Online textbook of bacteriology* Recuperado de <http://metabase.uaem.mx/handle/123456789/1239>
- Kumar, V. A., & Khan, S. (2015). Defining multidrug resistance in Gram-negative bacilli. *Indian Journal of Medical Research*. 141(4), 491–493 <https://doi.org/10.4103/0971-5916.159318>
- Lambert, P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(10), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>
- Liu, X., Deng, S., Huang, J., Huang, Y., Zhang, Y., Yan, Q., Jia, X. (2017). Dissemination of macrolides, fusidic acid and mupirocin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Oncotarget*. 8(35), 58086–58097 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19491>
- López-Pueyo M.J., Barcenilla-Gaite F. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina intensiva*. 35(1), 41-53 <https://doi.org/doi:10.1016/j.medin.2010.07.011>.
- Morales, G., Giovanetti, M., Hernández, A, (2016). Fenotipos de resistencia a meticilina, macrólidos y lincosamidas en *Staphylococcus aureus*

aislados de un hospital de Valledupar, Colombia. *Rev Ciencias de La Salud*. 14(2), 223-231
<https://doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.07>

Munita, JM. and Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance Mechanisms of Antibiotic Resistance. *The University of Oklahoma Health Sciences Center*. 23(5), 1–45
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Cossor, P., & Pfäuer, M. (2014). *Microbiología médica*. (7.^a ed.). [versión electrónica] Recuperado de https://www.academia.edu/28415243/Microbiolog%C3%ADa_M%C3%A9dica_-_Murray.

Organización Mundial de la Salud. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>

Oquendo, A., de Oca, R., Morales, R. (2017). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. *Rev MediSur*. 15(2), 210-216 Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2017000200010

Paganini, M. H., Della L., P., Muller O., B., Ezcurra, G., Uranga, M., Aguirre, C., ... Sarkis, C. (2009). Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. *Rev Chilena de Infectología*. 26(5). 406–412
<https://doi.org/10.4067/s0716-10182009000600002>

Patel, J. B., Eliopoulos, G. M., Jenkins, S. G., James Lewis II, F. S., Brandi Limbago, P., Nicolau, D. P., Pranita Tamma, Mms. D. (2019). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*

Suggested Citation. (28.^a ed.). [versión electrónica] Recuperado de https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf

Pinilla G., Bautista A., Cruz C. (2017). Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *Nova*. 15(27), 67-75 Recuperado de <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1959/2180>

Reynaga, A. (2017). *Prevalencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina CC398 en un área con una alta densidad de granjas*. (Tesis doctoral). Universidad autónoma de Barcelona.

Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1), 139-45 Recuperado de https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpmesp/v32n1/a20v32n1.pdf

Sáinz-Rodríguez, R., de Toro-Peinado, I., Valverde-Troya, M., Bermúdez Ruíz, M. P., & Palop-Borrás, B. (2019). Evaluation of a rapid assay for detection of PBP2a *Staphylococcus aureus*. *Rev Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 32(4), 370–374 Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31293115>

Sejas Claros, A., Iván Zurita Céspedes, B., Ximena Rodríguez Álvarez, M., Brian Espinoza Amurrio, J., & Magaly Sejas Revollo, D. (2016). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en portadores nasales del personal de enfermería-hospital Viedma. *Rev Cient Cienc Med*. 19(1), 29-33 Recuperado de http://www.scielo.org.bo/pdf/rccm/v19n1/v19n1_a06.pdf

Serrano, C. R. (2007). *Estudio de Consumo de Antibióticos en Paraguay*.

- OMS/OPS. Recuperado de https://www.paho.org/par/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-con-contrapartes&alias=62-estudio-de-consumo-de-antibioticos-en-paraguay&Itemid=253
- Tramper-Stranders, G. A., van der Ent, C. K., Gerritsen, S. A. M., Flear, A., Kimpen, J. L. L., & Wolfs, T. F. W. (2007). Macrolide-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in cystic fibrosis patients: is there transmission to household contacts?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 665–668 <https://doi.org/10.1093/jac/dkm235>
- Vargas, C. M. (2016). Infecciones nosocomiales. *Rev Acta Med Peru*, 33(3), 175-177 Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v33n3/a01v33n3.pdf>
- Velázquez N., Viguera J., Venegas G., (2015). Resistencia a linezolid en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y enterococos con elevada resistencia a aminoglucósidos en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Rev Bol Med Hosp Infant Mex*, 67(1), 19-26 Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462010000100003
- Vinueza Karina Valeria Tutor, H., & Oswaldo Trujillo Cruz Quito, F. (2015). *Prevalencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM)*. (Tesis) *Universidad Central del Ecuador*. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8242/1/T-UCE-0006-051.pdf>
- Zhang, K., McClure, J.-A., Elsayed, S., Louie, T., & Conly, J. M. (2008). Novel Multiplex PCR Assay for Simultaneous Identification of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains USA300 and USA400 and Detection of *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin Genes, with Discrimination of *Staphylococcus aureus* from

Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(3), 1118–1122 <https://doi.org/10.1128/JCM.01309-07>

Zurita Jeannete, Barba Pedro , Ortega-Paredes David, M. M. y R. S. (2016). Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 20(6), 525-533 Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S141386701630198>

2

