



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA

UNAN - MANAGUA

Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada”

Trabajo monográfico para optar al Título de: Licenciatura en Microbiología

Título:

Detección molecular del gen *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican Pantone Valentine Leukocidin (PVL), en *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA) en pacientes del Hospital Solidaridad de la Ciudad de Managua, Enero – Octubre 2017.

Autores:

Br. Álvaro Josué Obando Brizuela

Br. Carlos Eduardo Medrano Guido

Br. Carlos Antonio Solís Soza

Tutor:

Msc. Oscar Arbizú Medina
Microbiología Médica

Asesor Metodológico:

Msc. Benjamín Castillo López
Metodología de la Investigación

Managua, Febrero 2018

VALORACION DEL TUTOR.

Staphylococcus aureus, es un patógeno bacteriano de importancia médica principalmente por producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente, el SARM, deja pocas opciones terapéuticas aumentando el riesgo de mortalidad, también estos microorganismo aumenta la capacidad de patogénesis, he aquí la importancia del tema: Detección molecular del gen *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican Pantón Valentine Leukocidin(PVL), en *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA) en pacientes del Hospital Solidaridad de la Ciudad de Managua, de Enero a Octubre del año 2017. Este trabajo aporta evidencia científica para la toma de manejo terapéutico que es un problema generado por la evolución del mecanismo de sobrevivencia del microorganismo, esta investigación a mi punto de vista está lista para ser defendida y es un esfuerzo en conjunto del tutor, asesor y los autores, como también del departamento de Bionálisis clínico y Microbiología por el apoyo incondicional al aporte de la investigación.

Tutor.

Msc. Oscar Arbizú Medina.
Profesor BAC y Microbiología
IPS UNAN- MANAGUA.

VALORACIÓN DEL ASESOR METODOLÓGICO

Staphylococcus aureus es la principal especie patógena de su género, causa común de infecciones diversas, tanto de origen comunitario como hospitalario. El interés actual del estudio de este patógeno deriva, bien de su elevada frecuencia, o por representar, en el caso de cepas resistentes a meticilina (SARM) y la producción de toxinas, una de las principales causas de brotes de infección nosocomial en nuestro país. Por esta razón, en el Hospital Solidaridad surgió la necesidad de realizar un estudio “Detección molecular del gen *mecA* y las sub unidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican Pantón Valentine Leukocidin (PVL) en *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA) en pacientes del Hospital Solidaridad de la ciudad de Managua, Enero a Octubre 2017.

Como Asesor Metodológico considero que el trabajo, está apto para ser defendido por especialista. Desde mi punto de vista es de gran aporte a la comunidad científica y cumple con los estándares metodológicos necesarios para su disertación.

Asesor:

MsC. Benjamín Castillo Gómez
Lic. Bioanálisis Clínico
Hospital Solidaridad

DEDICATORIAS

En primer lugar a Dios por darme la vida, la salud, la sabiduría y por guiarme e iluminar el camino de mi vida. Después de mucho esfuerzo y sacrificio por fin llega la alegría de cumplir este gran sueño, culminar con éxito mi trabajo monográfico. Dedico este trabajo de manera muy especial a mis padres: Santana Obando Castellón y Antonia Brizuela Beluz que son mi inspiración, el motor de mis sueños y mis metas, por su amor incondicional y dedicación constante. A mis hermanos: Luis Santana Obando Brizuela, y Maryeli Scarleth Obando Brizuela que me han dado la fuerza y mi motivación, para seguir adelante todos los días. Además quiero compartir este trabajo con todos mis compañeros de clase y amigos que me acompañaron y fueron constantes durante toda mi carrera.

Álvaro Josué Obando Brizuela.

A Dios, nuestro padre, por regalarme su inmenso amor, bendecirme abundantemente, darme salud, sabiduría y fortaleza para cumplir mis sueños. A mis padres Axel Medrano Lazo y Sandra Liseth Guido Lazo porque con su amor incondicional me han guiado por el buen camino, por sus valores éticos, morales y espirituales; por su motivación constante, apoyarme en el trayecto de mi carrera y realizar este proyecto tan anhelado, el cual servirá para beneficio en el campo de la salud y la población. A mi familia quienes a través de estos años me han brindado su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos en el transcurso de mi preparación profesional.

Carlos Eduardo Medrano Guido

A Dios por brindarme sabiduría, fe y fortaleza para así seguir adelante y lograr traspasar los obstáculos, de esa manera alcanzar mis metas propuestas. A mis padres Reyna Isabel Soza y Carlos Mercedes Solís, por darme su amor, confianza y apoyo incondicional para que lograra culminar mis estudios. A mis familiares por darme ánimos para poder salir adelante y de una u otra forma brindarme su apoyo. A mi madrina Maura del Socorro García Jiménez, por brindarme su apoyo y su comprensión.

Carlos Antonio Solís Soza

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos sabiduría, fe y fortaleza para seguir adelante y lograr traspasar los obstáculos, de esa manera alcanzar nuestras metas propuestas.

A nuestro tutor Msc. Oscar Arbizu Medina y Asesor técnico Msc. Benjamín Castillo, por dedicarnos su tiempo y darnos sus conocimientos.

Al Hospital Solidaridad y Al laboratorio, por permitirnos elaborar la monografía en este centro.

Al personal del laboratorio del Hospital Solidaridad, especialmente a Lic. Magaly Ruiz y Lic. Adolfo Contreras por su apoyo incondicional para la realización de este estudio.

A Lic. Kenia Lizeth García Rosales, por toda la ayuda que nos brindó en el transcurso de este estudio.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CIP: Ciprofloxacina

DA: Clindamicina

E: Eritromicina

FOX: Cefoxitina

F: Nitrofurantoina

G: Gentamicina

HGT: Transferencia Horizontal de Genes

LEV: Levofloxacino

LIZ: Linezolid

Luk-F: Leucocidina F

Luk-S: Leucocidina S

MOX: Moxifloxacina

nuc: Nucleasas

ORSA: *Staphylococcus aureus* Resistente Oxacilina

OXA: Oxacilina

PBP2: Proteína Ligadora de Penicilina 2

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PG: Penicilina G

PMN: Polimorfonucleares

PVL: Pantón Valentine Leukocidin

QDA: Quinupristina/Dalfopristina

RA: Rifampicina

SARM AC: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirida en la comunidad

SARM AH: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirida en el hospital

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a Meticilina

SSCmec: Staphylococcal Chromosomal Cassette mec

SXT: Trimetoprim Sulfametoxazol

TBE: Tris Borato EDTA

TETRA: Tetraciclina,

TGC: Tigeciclina

VA: Vancomicina

RESUMEN

En el presente estudio descriptivo de corte transversal, se analizaron 24 aislamientos de *Staphylococcus aureus* que presentaron resistencia a Oxacilina (ORSA), provenientes de pacientes atendidos en el Hospital Solidaridad de la ciudad de Managua, de Enero a Octubre del año 2017. La identificación de las cepas ORSA se realizó a través del sistema automatizado VITEK 2 Compact; así mismo mediante la técnica de PCR punto final se detectó la presencia del gen *mecA* que confiere resistencia a toda la familia de β -lactámicos, y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F*, que codifican la producción de Pantone-Valentine Leukocidin (PVL), responsables de necrosis tisular y destrucción de leucocitos en los pacientes infectados.

La resistencia a Oxacilina codificada por el gen *mecA*, se demostró en 23 aislamientos con una frecuencia del 96%; la subunidad *Luk-S* se encontró en 15 cepas para una frecuencia de 63% y la subunidad *Luk-F* en 22 para un 92%. Las principales muestras clínicas de donde se aislaron cepas ORSA portadores de estos genes fueron: secreciones, heridas, orina, sangre y abscesos; así mismo, las salas con mayor número de aislamiento fueron: consulta externa, medicina de varones y UCI.

El perfil de resistencia a los antimicrobianos se realizó mediante Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) a través del sistema Vitek 2 Compact. Se demostró que las cepas presentaron mayor resistencia a las fluoroquinolonas: Ciprofloxacina 15 (63%), Levofloxacino 9 (38%) y Moxifloxacina 4 (17%) resistentes; para macrólidos y lincosamidas: Eritromicina: 16 (67%), Clindamicina: 9 (38%) resistentes. Los aminoglucósidos (Gentamicina) y Trimetoprim Sulfametoxazol: 2 (8%) resistentes; Tetraciclina: 8 (33%) y Rifampicina: 1 (4%) resistente. El 100% de las cepas presentaron sensibilidad a Estreptograminas, Nitrofurantoina, Tigeciclina, Linezolid y Vancomicina.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
V. PREGUNTAS DIRECTRICES.....	6
VI. OBJETIVOS	7
VII. MARCO TEÓRICO.....	8
7.1 Características microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
7.2 Patogenia e inmunidad	9
7.3 Patología	10
7.4 El genoma de <i>S. aureus</i> : estructura y elementos que lo conforman	11
7.4.1. Gen <i>mecA</i>	12
7.4.1.1. Regulación de la expresión gen <i>mecA</i> en los Betalactámicos	14
7.4.2. Panton Valentine Leukocidin (PVL).....	15
7.4.2.1. Historia	15
7.4.2.2. Mecanismos de acción	15
7.4.3. Subunidades <i>Luk-S</i> y <i>Luk-F</i>	16
7.4.3.1. Funcionamiento de las subunidades <i>Luk-S</i> y <i>Luk-F</i>	17
7.5. Factores de virulencia.....	18
7.6. Factores y población de riesgo.....	19
7.7 Manifestaciones clínicas	20
7.8. Epidemiología.....	21
7.9. Métodos diagnósticos.....	22
7.10. Farmacorresistencia	23
7.10.1. Resistencia a Meticilina	24
7.10.2. Betalactámicos	24
7.10.3 Otros antibióticos con resistencias	25
7.11. Tratamiento.....	27
7.12. Medidas de Prevención.....	28
VIII. DISEÑO METODOLÓGICO	29

IX. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADO	37
X. CONCLUSIONES	52
XI. RECOMENDACIONES.....	53
XII. BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	62

I. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus, es uno de los principales agentes causantes de infecciones en el ser humano, tanto a nivel comunitario como en el ambiente hospitalario. Esta bacteria coloniza la piel y/o fosas nasales de las personas sanas, debido a su capacidad patogénica, este microorganismo es capaz de producir un amplio espectro de manifestaciones que van desde una leve infección de piel hasta causar la muerte. (Pérez, 2012)

Actualmente, su interés se debe a su elevada frecuencia de aislamiento en las unidades de salud y a la aparición de cepas resistentes a Oxacilina, esta resistencia es conferida por una proteína de unión a penicilina conocida como PBP2a, codificada por el gen *mecA*, el cual forma parte de un complejo móvil que reside dentro de una isla genómica, denominado Cassete Cromosómico Estafilocócico (SCCmec), que comprende siete tipos de mec y están distribuidos a nivel hospitalario (I, II, III) y comunitario (IV, V, VI y VII). Estos tipos cassette, le confiere resistencia a todos los β talactámicos y a otras familias de antibióticos, dejando al personal médico con pocas opciones terapéuticas que conducen el riesgo de mortalidad. (Bordes, 2015)

Aunque la resistencia a ORSA ha sido asociada principalmente con infecciones nosocomiales, cepas adquiridas en hospitales (ORSA-AH), en la actualidad estos microorganismos han emergido como una importante causa de infecciones asociada a la comunidad (ORSA-AC), con características genéticas diferentes expresadas en la producción de una toxina llamada Pantón Valentine Leukocidin (PVL). Esta toxina codificada por las subunidades: *Luk-S* y *Luk-F*, que son transportados en un prófago, causa destrucción leucocitaria y necrosis tisular, ambas en conjunto pueden producir infecciones en la piel y en partes blandas; donde los casos más graves están asociados a neumonías necrotizantes y sepsis. (Sanchez, 2016)

En el presente trabajo se estudiaron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes Oxacilina aislados de pacientes con diferentes procesos infecciosos atendidos en el hospital Solidaridad, los genes *mecA* y las subunidades fueron detectados mediante la técnica de PCR convencional.

II. ANTECEDENTES

Marta Barrios en la Universidad Complutense de Madrid España, realizó un estudio en 202 aislamientos de *S. aureus* adquiridos en la comunidad de pacientes pediátricos, encontró que 21 (10,4 %) aislamientos fueron resistentes a Meticilina. Mediante la técnica de PCR, se logró demostrar la presencia del gen *mecA* en 21/21 (100%) de los aislamientos y las subunidades *Luk S/F* que codifican para la producción de PVL se encontró en 14/21 (67 %) aislamientos. (Barrios, 2012)

Otro estudio realizado por Carmen Gómez en la misma Universidad Complutense, analizo a través de PCR, 525 aislamientos de *S. aureus* en la población pediátrica de cuatro hospitales de diversas áreas geográficas de la ciudad, encontró que de los 525 aislamientos de *S. aureus* estudiados, 46 (8,8%) fueron resistentes a Meticilina portadores del gen *mecA* y 22 de los 46 aislamientos de SARM (47,8%) eran portadores de la toxina PVL. (Gómez, 2013)

Palombarani realizó un estudio en Buenos Aires Argentina, en el Hospital Interzonal General de Agudos “Eva Perón”, en donde se analizaron 39 aislamientos de SARM-AC, entre mayo de 2005 y junio de 2006. La resistencia a Meticilina se confirmó mediante la detección del gen *mecA*, además se investigó la presencia de los genes que codifican dos factores de virulencia (PVL y g-hemolisina) y el tipo de cassette *mec* mediante PCR. En los 39 aislamientos (100%), se pudo comprobar la presencia del gen *mecA*, siendo el cassette cromosómico SCCmec de tipo IV el más frecuente. Además, todos los aislamientos resultaron portadores de los genes que codifican para PVL y para g-hemolisina. (Palombarani, 2007)

Adriana Reyes en un estudio realizado en Sangolqui, Ecuador, recolecto 55 muestras de dos hospitales de la ciudad de Quito y Zurita, luego procedio a la detección genotípica mediante PCR. De las 55, 24 presentaban *mecA* y PVL que serian un 43%. Después se determino los componentes *Luk-S* y *Luk-F*, observando que de las 24 muestras negativas para el gen PVL, 5 de estas poseian el componente *Luk-S* y 12 poseian *Luk-F*. Estableciendo que la subunidad mas dominante fue *Luk-F*. (Reyes, 2009)

Tamariz y cols, en Lima, Perú, realizaron un estudio en tres hospitales, en donde analizaron 276 cepas de *Staphylococcus aureus* adquiridas en la comunidad, 160 fueron resistentes a Meticilina (58%), el gen PVL fue identificado en 11 cepas SARM, de las cuales 4 fueron SARM comunitario, 7 fueron SARM hospitalario. La resistencia a Meticilina se determinó por el método Oxacillin Agar Screen y el origen de la cepa fue determinado mediante los criterios de los CDC pero la PVL fue identificada mediante PCR. (Tamariz, et.al., 2010)

Sánchez y cols, en la Universidad Cooperativa de Colombia, realizaron una investigación en pacientes de la ciudad de Villavicencio en donde se aislaron 46 cepas de SARM-AC obtenidos de diversos procesos infecciosos, de las 46 muestras analizadas, el 100 % resultaron positivas para *S. aureus*, de éstas 46 (100 %) fueron positivas para el gen *mecA* y 44 (95,6 %) presentaron el gen PVL. Mediante PCR se detectaron los genes *nuc*, *mecA* y *Luk-S* relacionados con la identificación y virulencia de esta especie. (Sanchez, et. al., 2016)

Abente y cols, en junio del 2012 en la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay, estudiaron 41 aislados de *S.aureus* resistentes a Meticilina, lográndose evidenciar mediante PCR múltiple, la presencia del gen *mecA* en 13 (31,7%), aislados y el gen PVL en 2 (4,9%) aislados de *S. aureus*. (Abente, et.al., 2016)

Lara, en Nicaragua, realizó un estudio en el año 2003 en pacientes hospitalizados del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello (HEODRA), UNAN-LEON, se encontró un 29 % de las cepas de *S.aureus* aisladas eran resistentes a Meticilina. Además mediante PCR, se demostró la presencia del gen *mecA* en 93% de las cepas ORSA. (Lara, 2003)

Arbizú, en el 2010, en un estudio realizado en 208 trabajadores de la salud de todos los servicios del HEODRA, 356 pacientes y 234 muestras clínicas, reportó 51 aislamientos ORSA positivo y mediante PCR encontró que un 44% de estas cepas presentaban el gen *mecA*. (Arbizu, 2010)

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo *Staphylococcus aureus* una de las especies más comúnmente implicadas. En las últimas décadas, se ha observado un progresivo aumento en la incidencia de las infecciones causadas por este microorganismo en los hospitales y en la comunidad, donde el mayor impacto ha sido su elevada capacidad de generar resistencia a los antimicrobianos y a la aparición de cepas resistentes a la Oxacilina (ORSA), tradicionalmente limitadas al ámbito hospitalario.

En los últimos años, han emergido infecciones adquiridas en la comunidad; estas cepas se caracterizan por la producción de Pantón Valentine Leukocidín (PVL), codificada por dos subunidades conocidas como *Luk-S* y *Luk-F*, lo cual actúan en conjunto y causan destrucción de leucocitos y necrosis tisular; así mismo, se asocia a las afectaciones de la piel y partes blandas; en casos más graves puede ocasionar neumonías necrotizantes y sepsis.

En nuestro país, los estudios dirigidos a conocer las características moleculares de este patógeno son muy pocos. Por tales razones, se propuso a realizar este trabajo con el fin de detectar mediante el método de la PCR los genes *mecA*, responsable de la resistencia a Meticilina y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F*, codificadoras de Pantón Valentine Leukocidín (PVL) responsables de la lisis de los leucocitos y necrosis tisular en infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*. Dicho estudio será de mucha importancia, ya que aportará información valiosa al Hospital y a las instituciones de salud para que puedan mejorar el abordaje terapéutico idóneo y promover medidas preventivas. Igualmente, dicha investigación dará un aporte significativo a nuestra Universidad, ya que abre paso a nuevas investigaciones sobre el tema.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* se diseminan rápidamente, debido a sus características particulares de virulencia y resistencia contra los antibióticos, convirtiéndose en un grave problema de salud pública a nivel mundial. En Nicaragua, se ha evidenciado la resistencia de este microorganismo a los antibióticos, no solo en los hospitales, sino también en la comunidad, sin factores de riesgos aparentes.

Desde la aparición de la resistencia a Oxacilina (ORSA) estas cepas han jugado un papel importante en la morbilidad y mortalidad a nivel intrahospitalario; sin embargo, estas cepas han emergido en la comunidad con características genéticas diferentes expresadas en la producción de Pantón Valentine Leukocidín (PVL), toxina que incrementa la agresividad de las infecciones en los pacientes, originada por la acción conjunta de las subunidades *Luk-S* y *Luk-F*. Esta cepa multiresistente es producto de diversos factores, como mutaciones genéticas o la inadecuada aplicación de antibióticos lo que nos obliga a realizar investigaciones que nos permitan distinguir estos genes mutantes con el fin de llevar una satisfactoria opción terapéutica en los pacientes. De esta manera se plantea la siguiente interrogante:

¿Cuál es la frecuencia del gen *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican la toxina Pantón Valentine Leukocidín (PVL) en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA) aisladas de los pacientes atendidos en el Hospital Solidaridad de la Ciudad de Managua, Departamento Managua, Nicaragua en el período de Enero a Octubre del 2017?

V. PREGUNTAS DIRECTRICES

1. ¿Cuál es la frecuencia del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA)?
2. ¿Cuál es la frecuencia de las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican para Pantone Valentine Leukocidin (PVL), en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA)?
3. ¿Cuál es la frecuencia del gen *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* según los diferentes tipos de muestras?
4. ¿Cuál es la distribución del gen *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* por salas, en el Hospital Solidaridad?
5. ¿Cuáles son los perfiles de resistencias que poseen las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina (ORSA), en aislados de muestras biológicas de pacientes con diferentes procesos infecciosos atendidos en el Hospital Solidaridad?

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la frecuencia del gen *mecA* y subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican Pantón Valentine Leukocidín (PVL) en *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA) en pacientes del Hospital Solidaridad de la Ciudad de Managua en el período de Enero a Octubre del año 2017.

Objetivos Específicos

1. Detectar la presencia del gen *mecA*, en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA), utilizando la técnica molecular de PCR convencional.
2. Identificar las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican para Pantón Valentine Leukocidín (PVL), en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA).
3. Analizar la frecuencia del gen *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* según los diferentes tipos de muestras.
4. Describir la distribución del gen *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* por salas, en el Hospital Solidaridad.
5. Caracterizar los perfiles de resistencia de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina (ORSA), aisladas de muestras biológicas de pacientes con diferentes procesos infecciosos atendidos en el Hospital Solidaridad.

VII. MARCO TEÓRICO

7.1 Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

El nombre de *Staphylococcus* fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega *staphyle* (racimo de uvas) para describir las características de crecimiento en grupos semejantes a racimos de uvas. Sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares, en cadenas cortas y tétradas. Estas células esféricas inmóviles y no esporulados, miden alrededor de 0,5 a 1 μm de diámetro. Crecen mejor en condiciones aerobias, pero son anaerobios facultativos. (Móreno, 2010)

Los racimos irregulares son exclusivos de extendidos extraídos de cultivos en medios sólidos, mientras que en medios líquidos se observan cocos individuales, pares, tétradas y en cadenas. Al momento de teñir, Los cocos jóvenes son intensamente rojos; al envejecer, se vuelven de color azul. La cápsula o capa de baba incrementa la virulencia del microorganismo (Brooks, 2011).

Los *Staphylococcus* crecen con facilidad en la mayoría de los medios de cultivo y son activos metabólicamente, ya que fermentan muchos carbohidratos como la glucosa y manitol. Además, toleran condiciones ambientales variables como la desecación, congelación y calor, su óptimo crecimiento es de 30-37°C y con pH de 4.0-9.8, es tolerante a la sal hasta en un 20%. Presenta pigmentación de color amarillo debido a la producción de carotenoides y se desarrolla en medios sólidos en formas redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. Cuando se cultiva en agar sangre, las colonias de *S. aureus* aparecen rodeadas por una zona de β -hemólisis. Así mismo, están facultados de coagular las proteínas séricas del plasma. (Maricela, 2015)

Pueden ser parte de la microbiota normal de la piel y mucosas de los humanos; sin embargo, este puede comportarse como oportunista, lo que puede producir supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Un tipo común de intoxicación por alimentos es causado por una enterotoxina termoestable producida por algunas cepas de *Staphylococcus*. Estos múltiples factores de virulencia, variados mecanismos de resistencia tanto natural como adquirida, contribuyen en las graves afectaciones al ser humano. (Pérez, 2012)

Actualmente, su interés se debe a su elevada frecuencia de aislamiento de cepas resistentes a Meticilina, como causa principal de brotes de infección nosocomial, (SARM-AH). Recientemente, ha emergido a nivel comunitario el *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistente de origen comunitario, que se denomina SARM-AC (Reyes, 2009).

7.2 Patogenia e inmunidad

El *S. aureus* produce dos tipos de enfermedades, choque tóxico y enfermedad invasiva. La enfermedad invasiva tiene como características la formación de abscesos superficiales purulentos; esto no se observa en personas con buena salud, sino que en personas debilitadas por otra enfermedad como la desnutrición, procedimientos quirúrgicos, sistema inmunológico deprimido y diabetes (Chen, 2015).

El mecanismo de defensa esencial del huésped son los leucocitos, ya que al momento que se genera la inflamación de algún tejido, las células endoteliales guían a los leucocitos al sitio de la infección mediante moléculas de adhesión; posteriormente, se procede a la liberación de diferentes citoquinas en el torrente sanguíneo. Estas células endoteliales infectadas emplean moléculas de adhesión tipo 1 (CD54), moléculas de adhesión vascular tipo 1 (CD106) y moléculas de clase I del complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC I), lo cual los *Staphylococcus* se adhieren a estos receptores y, posteriormente, son fagocitados (Rojas, 2012).

Ante la defensa del organismo, la bacteria emplea numerosos mecanismos que intervienen en contra del sistema inmunitario, activa diversas enzimas y toxinas que posibilitan su protección y desencadenan los procesos infecciosos. La toxina mejor caracterizada es la PVL, induce la degranulación de los leucocitos polimorfonucleares y la liberación de mediadores de la inflamación. Por consiguiente, se asocia a las infecciones de piel y tejidos blandos así como a la neumonía necrotizante o forunculosis. Los SARM-AC sintetizan esta toxina y logran producir otro tipo de infecciones como endocarditis, osteomielitis o septicemia. (Campechano, 2010)

7.3 Patología

Las afectaciones estafilocócicas se dividen en localizadas y generalizadas; las localizadas están favorecidas por una higiene personal deficiente, por traumatismos menores y procesos dermatológicos. Las generalizadas incluyen la bacteriemia estafilocócica, la cual puede complicarse con endocarditis, infección metastásica o el síndrome séptico. (Vega, 2014)

Las infecciones incluyen colonización, invasión epitelial o mucosa, neutralización de las defensas del huésped, destrucción tisular y respuesta inflamatoria local o generalizada. En las intoxicaciones la fase inicial es la colonización por una cepa toxicogénica, seguida por la producción de la toxina, su absorción y la aparición de la enfermedad. Los principales factores de virulencia de este microorganismo se basan en los componentes de su pared bacteriana, en la gran cantidad de enzimas y toxinas que produce en determinadas circunstancias, de supervivencia intracelular (Guzman, 2010).

Las cepas comunitarias son más virulentas que las cepas intrahospitalarias, ya que pueden producir infección en pacientes inmunocompetentes y posee la capacidad de generar graves complicaciones. La mayoría de estas virulencias se debe a la síntesis por la bacteria de la toxina PVL, responsable de la lisis leucocitaria. La liberación de radicales libres de oxígeno y gránulos citotóxicos por los neutrófilos lisados desencadena una respuesta inflamatoria que causa necrosis tisular.

La toxina de PVL se ha relacionado fundamentalmente con lesiones supurativas necróticas, como furúnculos y abscesos cutáneos, pero también se ha aislado en pacientes con neumonía necrotizante grave adquirida en la comunidad (Reyes, 2009).

7.4 El genoma de *S. aureus*: estructura y elementos que lo conforman

El tamaño del genoma de *S. aureus* varía en función de la cepa secuenciada pero oscila aproximadamente entre 2,742 y 3,043 Mb. El genoma está estructurado por tres categorías que son el core, el core variable y el genoma accesorio. El core o núcleo, comprende aproximadamente el 75% del genoma, se encuentran muy conservados en todas las cepas, y en su mayoría se asocian al metabolismo central y a otras funciones esenciales. El core variable, constituye el 10% y están relacionados a la codificación de proteínas de superficie y de regulación. El genoma accesorio, forma el 25% y lo integran elementos genéticos móviles que se transfieren horizontalmente entre las cepas que incluyen bacteriófagos, las islas de patogenicidad, los cassette cromosómicos, los plásmidos y los transposones. (Lindsay, 2010)

Los transposones son elementos genéticos móviles que codifican determinantes de genes de patogenicidad y de resistencia a los antimicrobianos o a metales pesados. Hay transposones de pequeño tamaño como el Tn552 que lleva el gen *bla* que codifica una penicilinasasa, o el Tn554 que lleva genes de resistencia a la Eritromicina y a la Espectinomicina. (Rowland, 1989)

El genoma accesorio suelen ser portadores de genes que codifican determinantes de patogenicidad como el gen *sea* o *entA* que codifica la enterotoxina A, los genes *Luk-S* y *Luk-F* que codifican la PVL, el gen *scin* que codifica una proteína inhibidora del complemento, el gen *chip* que codifica una proteína inhibidora de la quimiotaxis, y el gen *sak* que codifica la estafiloquinasa (Baba T, 2002).

Las islas de patogenicidad, son estructuras similares a los bacteriófagos pero que carecen de genes que les permitan la transferencia horizontal y por ello, necesitan de bacteriófagos que les permitan la transferencia. Se han descrito varias islas genómicas como SaPI1 (*Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island), y SaPI2 que son portadoras del gen *tst-1*, que codifica la toxina del síndrome del shock tóxico, las islas SaPI3 y SaPI4 que llevan genes que codifican enterotoxinas. (Lindsay, 2010)

Los plásmidos, son moléculas extracromosómicas de ADN circular de diversos tamaños, que pueden transferirse de una célula a otra mediante conjugación. Los plásmidos de pequeño tamaño suelen contener 1 o 2 genes que codifican resistencias a los antimicrobianos y los de mayor tamaño pueden llevar genes que codifican determinantes de resistencia a metales pesados y a detergentes (Khan, 2005).

7.4.1. Gen *mecA*

La resistencia a la meticilina está determinada por la adquisición del gen *mecA*, que codifica la proteína ligadora de penicilina con baja afinidad por los Betalactámicos (PBP2a o PBP2'). Este gen está situado en el elemento genético móvil denominado Cassette Cromosómico Estafilocócico (SCCmec) y se piensa que procede de los *Staphylococcus* coagulasa negativa, aunque el origen no está del todo claro. Las proteínas MecI y MecR1, productos de los genes *mecI* y *mecR1*, respectivamente, controlan la activación del gen *mecA*. La exposición a Betalactámicos induce la síntesis de la proteína MecR1 que inactiva al *mecI*, permitiendo así la síntesis de PBP2a (Zhang HZ., et al., 2001).

El gen *mecA* tiene 2,1 kb de longitud, se localiza en una isla genómica móvil, que se llama cromosoma de Cassette Estafilocócico mec (SCCmec). Actualmente se reconocen siete tipos principales de SCCmec (Tipo I a VII), que varían en tamaño de 20.9 a 66.9 kb. El SCCmec tipo I (34,3 kb), IV (20,9 - 24,3 kb), V (28 kb), VI (20,9 kb) y VII (35,9 kb) causan sólo resistencia a los antibióticos Betalactámicos, mientras que SCCmec tipo II y III (66,9 kb) causan resistencia a múltiples clases de antibióticos, debido a los genes adicionales de resistencia a los fármacos integrados en SCCmec, que son plásmidos integrados.

Las cepas SARM-AC contienen SSCmec tipos IV al VII, lo cual son muy pequeños y se transfiere fácilmente. Según estudios, el tipo IV le confiere la resistencia a la Meticilina (Calvo, et.al., s.f). En cuanto a los aislados de SARM-AH pueden llevar los cassettes SCCmec de los tipos I, II, III, que son de mayor tamaño (David, 2010; Bordes, 2015).

El SCCmec es un elemento genético móvil, insertado en el cromosoma de SARM en una localización específica en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta OrfX (Open Reading frame) y su función es desconocida por el momento. Se han descrito elementos SCCmec estructuralmente diferentes, pero estos elementos comparten las siguientes características: son portadores del complejo génico mec y del complejo génico ccr, que codifica recombinasas específicas de sitio responsables de la movilidad del SCCmec. Estos elementos se integran en lugares específicos en el cromosoma de la bacteria denominados secuencias de inserción (IS431 y IS1272), que sirven de diana para las recombinasas ccr y en los extremos presentan secuencias repetidas que contienen las secuencias de inserción (Katayama Y, 2001).

Se han descritos tipos de SCCmec en función de las características de los genes ccr y secuencias adyacentes, así como de la secuencia de la zona mec y sus genes reguladores. También se diferencian según los determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones. Hasta el momento, se han descrito cinco tipos de SCCmec (I-V) y un determinado número de variantes o subtipos (IA, IIIA, IIIB, IVA, IVB, IVC) clasificados en base a la secuencia de la región J (junkyard), siendo siete las últimas variantes descritas (IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IVE y IVF) (Ma XX, 2002).

Se han presentado otros mecanismos de resistencia a meticilina que se asocian a CMI a Meticilina entre 8 y 16 µg/ml. Uno de estos mecanismos es la hiperproducción de penicilinasas, denominado BORSA (Borderline *Staphylococcus aureus*) lo cual presenta resistencia a Meticilina pero sensibilidad a inhibidores de β-lactamasas. También se han descrito cepas que presentan resistencia a Meticilina debido a una modificación de sus PBPs causada por mutaciones genéticas o por la hiperproducción de estas, y se les denomina MODSA (Modified *Staphylococcus aureus*).

Recientemente, se ha descrito otro mecanismo de resistencia mediado por un gen homólogo del *mecA* (*mecA_{ALGA251}*) que no se detecta por los métodos moleculares convencionales (García, et.al, 2011).

7.4.1.1. Regulación de la expresión gen *mecA* en los Betalactámicos

En el caso de la Meticilina y Oxacilina, está determinado por la presencia del gen *mecA*, la cual codifica para una PBP alternativa, la PBP2a de baja afinidad por este antibiótico. La regulación del gen *mecA* viene de la codificación de la proteína transdutora MecR1 y el codificante de la proteína represora Mecl, que forman operón. Así mismo, participan otros genes reguladores como lo son las proteínas Blal y BlaRI, que controla la expresión de la Betalactamasa. (Bordes, 2015)

Las proteínas de la pared son reguladas por los represores Mecl y Blal que están unidas en forma de dímero a las dos regiones operadoras situadas entre los genes *mecA* y *mecR1* y entre los genes *blaZ* y *blaR1*. Sin embargo, el enlace reprime la transcripción a ARN de todos los genes, por lo que el gen *mecA* se reprime forzosamente. Cada uno de los dos monómeros de la proteína Mecl está constituida por un dominio N-terminal que se une al ADN cromosómico (DBD: DNA-binding domain o dominio de unión) y un dominio C-terminal de dimerización (DD: Dominio de dimerización).

Cuando se administra un betalactámico, podría ser Meticilina y Oxacilina, se genera la unión del dominio sensorial extracelular (PBP-domain) de la proteína de membrana MecR1. Al mismo tiempo, se desencadena la activación autolítica del dominio intracelular de MecR1 (MEP-domain) con la actividad metaloproteasa, lo que ocasiona la lisis del enlace de dimerización de la proteína Mecl, donde se encuentra enlazado el gen *mecA*. Al desprenderse esa región, tanto como el gen *mecA* como la del operón *mecl-mecR1*, origina la producción de la PBP2a. (Bordes, 2015)

7.4.2. Pantón Valentine Leukocidín (PVL)

7.4.2.1. Historia

La toxina estafilocócica fue descrita por Pantón y Valentine en 1932. Los primeros casos nosocomiales de PVL positivos fueron detectados entre 1950 y 1960. Se descubrió que los SARM productores de PVL podían causar infecciones más severas, debido a que los pacientes presentaban necrosis tisular y sepsis. El gen de PVL no necesariamente es el principal factor de virulencia en las cepas, ya que existen otros factores tales como las regiones J. (Pantón P., 2003)

7.4.2.2. Mecanismos de acción

Esta toxina pertenece a las toxinas sinergohimenotrópicas, las cuales inducen poros en las membranas celulares. El factor PVL es codificado en un profago conocido como Φ – PVL, el cual es un virus integrado dentro del contenido cromosómico de *S. aureus*. Sus genes secretan dos toxinas proteicas llamadas *Luk-S* y *Luk-F*, las cuales tienen un peso de 31 y 34 kDa respectivamente.

Estas subunidades actúan juntas y se ensamblan en la membrana de las células de defensa del hospedero, particularmente en los leucocitos, monocitos y macrófagos. Las subunidades trabajan juntas y forman un anillo con un poro central a través del cual la célula elimina su contenido y actúa como un superantígeno (Melles D., 2006).

El factor citotóxico para los neutrófilos humanos, puede desempeñar un papel importante en las infecciones por SARM-AC. Sin embargo, bajo ciertas condiciones patogénicas, como necrosis y abscesos, que son característicos de *S. aureus*. Modelo para la aparición de SARM-AC que produce PVL: una cepa de *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) es infectada y lisogenizada por un fago (*phiSLT*) que alberga los genes *Luk-S* y *Luk-F* que codifican la PVL.

Posteriormente, un cassette de resistencia a meticilina (SCCmec IV y V) que porta el gen *mecA* se transfiere horizontalmente a la cepa y se integra en el genoma en una ubicación que es distinta de la del sitio de integración *phiSLT* (Kaneko, et. al., 1998)

7.4.3. Subunidades *Luk-S* y *Luk-F*

Se han identificado 7 leucotoxinas bipartitas en *S. aureus*: Pantón Valentine leukocidin, *LukM* / *LukF'*-PV, dos γ -hemolisinas, *LukE* / *LukD* y una variante de la misma, y más recientemente, *LukH* / *LukG* también llamado *LukAB*. Por otro lado, se ha demostrado que *S. intermedius* expresa una leucotoxina *LukS-I* / *LukF-I*, mientras que ciertos genes relacionados se pueden encontrar en otras especies de *Staphylococcus*. A diferencia de otras leucocidinas formadoras de poros de *S. aureus*, la PVL no es hemolítica (Woodin, 1959).

El gen *Luk-F*, ante todas las estructuras, es un marcador molecular que indica la presencia o ausencia de la citotoxina, ya que está presente en una específica región que es *rRNA 16S* por lo que relativamente transcribe el gen *Luk-F* en cepas comunitarias. Además, esta región es altamente conservada y pueden influir en la hibridación de material genético con la misma especie, es decir, entre cepas de *S. aureus*; por tales razones, es posible la transmisión horizontal y más frecuente. Sin embargo, El gen *Luk-S*, es un gen que está presente en islas de patogenicidad por lo que en este sitio pueden estar ciertos grupos (clústers) de genes de virulencia; igualmente, este sitio logra codificar dicho gen y lo incluyen a elementos móviles, que le permiten la transferencia a otro cepa de la misma especie. (Said-Salim, et.al,2005)

La muerte celular prematura de neutrófilos puede ser extremadamente relevante en la virulencia de ORSA-AC. Como los neutrófilos son la principal defensa contra las bacterias invasoras, su muerte celular excesiva muy probablemente comprometa en gran medida el sistema inmune del huésped. Además, el daño celular no controlado de neutrófilos descarga muchos componentes proinflamatorios dentro del tejido del huésped, lo que también podría promover esencialmente el desarrollo de la enfermedad.

De acuerdo con la actividad citolítica de PMN de PVL, la neutropenia es un hallazgo clínico frecuente asociado con la neumonía necrotizante PVL positiva de *S. aureus* (Löffler, et.al, 2010).

7.4.3.1. Funcionamiento de las subunidades *Luk-S* y *Luk-F*

Las subunidades se secretan antes de que se ensamblen en un heptámero formador de poros en membranas de leucocitos polimorfonucleares (PMN), lo que conlleva a la lisis. La *Luk-S* inicia la unión a un receptor no identificado en PMN donde posteriormente se dimeriza con *Luk-F* seguido de la unión alternativa entre los componentes *Luk-F* y *Luk-S* hasta que el heptámero está ensamblado. Cuando *Luk-S* se une a los PMN, una proteína quinasa del huésped (A o C) fosforila la *Luk-S* seguida de la inducción de los canales iónicos de Calcio, lo que produce los poros. Esto sugiere la inducción de señales de eventos de transducción que pueden desencadenar la producción de interleucinas y mediadores inflamatorios (Vianello, 2006).

Dependiendo de la concentración de PVL se pueden dar dos vías: altas concentraciones generan lisis de PMN debido a la formación de poros en la membrana leucocitaria y en bajas concentraciones causara apoptosis que implica la formación de poros en la membrana mitocondrial. La necrosis tisular podría ser el resultado de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los PMN lisados. Alternativamente, la liberación del contenido de gránulos de PMN lisados podría desencadenar una respuesta inflamatoria, que eventualmente dará como resultado la necrosis tisular. Es poco probable que la PVL tenga un efecto necrótico directo sobre las células epiteliales (Boyle-Vavra & Daum, 2007).

Todo patógeno para poder realizar daño al huésped, necesita adquirir diversos factores de virulencias que les proporcione sobrevivir a las embestidas de la respuesta inmunológica como también de realizar el mayor daño posible. Cabe mencionar, que las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* son bicomponentes necesarios para la autoprotección del *S. aureus* y de generar graves afectaciones al huésped.

No obstante, dichas subunidades no pueden ejercer su función si falta una de ellas, aunque la cepa solo tenga una subunidad no quiere decir que no tenga PVL y que no la puede aplicar ni adquirir. Cuando ya es transferida la subunidad faltante, las subunidades realizan sinergia entre ellas lo que acciona a la citotoxina (Prevost, et.al, 1995).

7.5. Factores de virulencia

La virulencia de ORSA posee múltiples factores que incluyen componentes estructurales y secretados. En el establecimiento de la infección, este patógeno cuenta con numerosas proteínas de superficie que han sido denominadas componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular, (MSCRAMMs), las cuales median la adherencia a los tejidos del hospedero, lo que permite la invasión celular y sobrevivencia dentro de la células epiteliales. Además, le confiere protección frente al sistema inmune y antibióticos. (Ortiz, 2013)

No obstante, ORSA emplea otros mecanismos que le facilitan el ingreso y sobrevivencia, tales elementos como las capas lipídicas, toxinas y enzimas que mantienen al huésped en condiciones graves. Las capas lipídicas son constituyentes de la pared bacteriana que le ofrece resistencia al ambiente, a la respuesta inmune y al tratamiento. Las toxinas son producidas por componentes de la pared celular (enzimas) e inducen actividades biológicas destructivas. Las enzimas actúan cerca del foco de infección que ocasiona destrucción y diseminación de tejidos adyacentes. (Gómez, 2013)

Las capas lipídicas mantienen de los ataques endógenos o exógenos ya que presentan el biofilm que se encarga de expresar genes de resistencia y producción de proteínas; también contiene peptidoglucano que se encarga de la estabilidad de la pared celular y evita la acción del fármaco mediante la modificación del sitio de acción (PBP2) codificada por el gen *mecA*; además contiene ácidos teicoicos o polisacárido A que inducen a la producción de anticuerpos; y la capsula, inhibe la fagocitosis (Pérez, 2012).

Entre las enzimas que se despliegan ante los fagocitos está la catalasa, la cual se encarga de desdoblar el peróxido de hidrógeno, tóxico para el microorganismo, en agua y oxígeno; la coagulasa convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que produciría una capa de fibrina en el absceso estafilocócico protegiendo de la fagocitosis. La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico de la matriz del tejido conectivo (destrucción tisular) y la penicilinas hidroliza el anillo β -lactámico, inactivando la penicilina. (Murray, 2007)

Las toxinas son responsables de los síntomas característicos de muchas enfermedades. Entre las más importantes está la hemolisina, que tiene la capacidad hemolítica y citolítica; exfoliatinas, destrucción de la epidermis; toxina de shock tóxica, induce a la liberación de citocinas; enterotoxinas, irrita las paredes entéricas. PVL es una citotoxina formada por 2 subunidades, *Luk-F* y *Luk-S*, posee la capacidad de destruir los leucocitos y está asociada a la necrosis en los tejidos del huésped. Puede actuar como un superantígeno, por lo que se genera muertes en períodos tan cortos como 72 horas (Hawkes., 2000).

7.6. Factores y población de riesgo

La fácil diseminación de ORSA se debe a diferentes tipos de factores tales como biológicos, edad, sexo, enfermedades recurrentes de piel, condiciones de maceramiento o laceración continua de la piel, uso reciente de antibióticos. Los factores ambientales como estrecho contacto, hacinamiento, falta de higiene (convivencia familiar, en alojamientos públicos, comunidades cerradas) y los factores socioculturales en los cuales se encuentran el uso compartido de ropas, objetos de uso personal, instrumentos deportivos (sensores, armas deportivas, etc...), contacto físico estrecho. (Maricela, 2015)

La transmisión de SARM-AC es producto de la exposición previa a los agentes antimicrobianos, la cirugía o heridas abiertas, el sistema inmune debilitado y grave enfermedad, residencia de largo plazo en un centro de salud (hogar de ancianos, centro de enfermería), causantes de la enfermedad o las condiciones, en particular, la enfermedad renal crónica, diabetes mellitus insulina dependiente, enfermedad vascular periférica, dermatitis o lesiones en la piel. (Guzman, 2010)

Los procedimientos invasivos (cateterismo urinario, líneas intravenosas, la diálisis, traqueotomías, G tubos), los pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI), el contacto repetido con el sistema de salud, la colonización anterior por un organismo resistente a múltiples fármacos. Estos genes por facilidad de propagación, genera peligro a toda la población en general (Baño, et.al, s.f.). Las SARM-AC rara vez causa infecciones que amenazan la vida y causa más frecuentemente infecciones de la piel, como forúnculos o granos (Móreno, 2010).

7.7 Manifestaciones clínicas

Las infecciones por SARM se producen tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que propician la penetración del microorganismo desde la piel hasta los tejidos profundos. Según estudios señalan la relación que existe entre la citotoxina PVL y las infecciones graves de piel y tejidos blandos, así como la fascitis y neumonía necrotizante, por lo que aporta a la virulencia en SARM-AC; mientras que las cepas de SARM-AC generan infecciones generalizadas debido a la bacteriemia que ocasiona endocarditis y síndromes sépticos (Chen, et. al., 2015; Blanco, 2008).

Las infecciones localizadas más importantes se encuentran los abscesos cutáneos, foliculitis, forúnculos y carbuncos que generan acumulaciones de pus y afectan todas las capas de la piel. La celulitis afecta la dermis y tejido subcutáneo, lo que genera sensibilidad y dolor. El síndrome de piel escaldada estafilocócica es el desprendimiento cutáneo y con mayor frecuencia en niños menores de 6 años. La fascitis necrotizante que se disemina rápidamente en los tejidos blandos y con dolores desproporcionales, originada por lesiones o traumas quirúrgicos. (Palombarani, 2007)

Las infecciones generalizadas más principales se presenta el síndrome de shock tóxico que causa daños multiorgánicos y es mortal. La endocarditis genera inflamación y formación vegetativa en esa área. Neumonía necrotizante inicia repentino y de rápido empeoramiento, ya que destruye el tejido pulmonar y provoca insuficiencia respiratoria, por tales razones posee una alta tasa de mortalidad.

Las intoxicaciones alimentarias causan irritabilidad gástrica, lo cual va consigo vómito y diarrea. La osteomielitis destruye tejido óseo y descalcifica. La artritis séptica inflama las articulaciones y conduce a la pérdida de la movilidad (Crossley, et.al., 2006).

7.8. Epidemiología

Menos del 5% de las cepas aisladas de *S. aureus* son PVL positivas incluyendo a SARM y SASM. Estos casos ocurren generalmente en brotes que involucran a todo un país o región. Las cepas PVL positivas son usualmente adquiridas en la comunidad y generalmente afectan a niños y adultos jóvenes sanos. (Panton P., 2003)

Las cepas de *S. aureus* productoras de PVL muy a menudo originan cuadros de celulitis, infecciones de piel, abscesos y carbunco. Raramente producen infecciones más severas como bacteriemia o neumonía necrotizante. Las infecciones clínicas tienden a estar acompañadas de otros factores de riesgo tales como hacinamiento, lesiones cutáneas por deportes de contacto, el uso de material contaminado como toallas mojadas, afeitadoras, manos mal lavadas o daño en la piel por otras condiciones como eczema. (Xue Ma X., 2006)

Comparando casos de neumonía necrotizante, el 85% de los casos PVL positivos corresponden a casos de la comunidad, mientras que los casos adquiridos en hospitales son casi nulos. Los casos de la comunidad afectan a población joven y sana y generalmente más del 40% son mortales. Ello demuestra un rol importante en los brotes de infecciones bacterianas fatales. PVL incrementa la expresión de la proteína estafilocócica A, un factor clave en la neumonía como agente pro inflamatorio (Bradley, 2006).

La resistencia a la Meticilina ha llevado a un problema de escala mundial, ya que las cifras crecientes que se reportan son preocupantes, y el “estafilococo dorado” es un agente que se disemina fácilmente y el comportamiento de la infección es agresiva, con la que este agente no solo lleva resistencia a la Meticilina, sino a la totalidad de antibióticos betalactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenems (Echevarría & Iglesias, 2003).’

Por tal razón, el médico emplea Vancomicina como última opción terapéutica contra este patógeno; sin embargo, por la frecuencia de la administración de este fármaco, la cepa ha desarrollado susceptibilidad reducida ($\text{CMI} \geq 8 \mu\text{g/mL}$) y provoque, en un futuro, dificultad en el abordaje terapéutico (A. Howe, et al., 2004).

Las cepas SARM-AH, se caracteriza por su tendencia para producir brotes epidémicos en los hospitales, aunque es posible que algunos clones específicos tengan mayor capacidad epidémica. El microorganismo se transmite principalmente a través del personal sanitario (Transmisión cruzada), aunque la transmisión directa desde sanitarios colonizados, y quizás en menor medida, desde objetos contaminados juegan un papel relevante en la epidemiología (Gómez, 2013). Por definición, se detecta a partir de las 48 horas del ingreso, o bien de las 48 horas tras el alta del paciente (David, 2010).

Las infecciones por SARM-AC son con frecuencia niños, y en cualquier caso, más jóvenes que aquellos con SARM nosocomial; las cepas de SARM comunitario se diferencian de las nosocomiales en que suelen ser sensibles a los antibióticos no betalactámicos que tiene actividad anti estafilocócica, en que son habitualmente productoras de una serie de exotoxinas (particularmente PVL) y en que suelen tener el gen *mec*. Causan principalmente infecciones de piel y partes blandas, que en ocasiones son graves. (Móreno, 2010). Se considera SARM-AC, cuando son detectados en pacientes no ingresados o dentro de las primeras 48 h del ingreso (Klebens, et. al, 2007)

7.9. Métodos diagnósticos

Para la detección de SARM se han empleados diversos métodos diagnósticos para su confirmación, tanto así que se logra identificar a la bacteria de manera fenotípica y molecular. Kirby Bauer nos da una idea del tipo de resistencia mediante la medida del halo de inhibición; en caso de *mecA* positivo la cefoxitina obtendrá un halo $\leq 19 \text{ mm}$ y viceversa $\geq 20 \text{ mm}$ (Ardanuy, et.al, 2011).

Actualmente, el VITEK 2 compact lleva control de la realización de las pruebas de identificación y antibiograma mediante las tarjetas de memoria, lo cual trata e interpreta los resultados, este dispositivo emplea el mismo principio que el anterior método y con la diferencia que emplea concentración mínima inhibitoria (CMI) (Biomerieux, 2016).

Para la detección de PVL, *mecA* y *nuc*, una vez identificado fenotípicamente todos los aislados y realizados su sensibilidad, se procede a confirmar la cepa resistente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); la reacción en cadena de la polimerasa, es un método que crea millones de copias de un fragmento específico de ADN in vitro, a partir de una sola molécula del mismo, en un tiempo aproximado de 2 horas. El principio de la PCR es la desnaturalización térmica del ADN (separación de ambas cadenas), seguida de la síntesis de nuevas moléculas utilizando a las cadenas originales como molde.

La modalidad de la técnica que se utilizó fue la PCR convencional punto final. Es convencional debido a la detección del producto a amplificar, a partir de la electroforesis en gel de agarosa o acrilamida que da como resultado la visualización del producto amplificado mediante una banda. La intensidad de la banda va dependiendo de la cantidad de producto amplificado y su longitud, lo cual se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas. Además, este método es considerado cualitativo, debido a que permite detectar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado. También es punto final por la obtención del producto de PCR se analiza posteriormente a los 25 a 35 ciclos en el puente previo a la saturación de la reacción mediante el gel de agarosa. (Gómez, 2013)

7.10. Farmacorresistencia

Hoy en día casi en la mayoría de los centros hospitalarios cuentan con resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, lo cual impulsa a convertirse en una cepa muy peligrosa, ya que adquiere ciertos elementos genéticos, que comprenden plásmidos, elementos genéticos transponibles (secuencias de inserción y transposones) y las islas genómicas que le confieren resistencia a los antibióticos. (Lyon & R., 2009)

7.10.1. Resistencia a Meticilina

Estas cepas producen una forma especial de proteína PBP2 (la llamada PBP2a) que posee una baja afinidad por los Betalactámicos, incluyendo la meticilina. Parece que el gen codificador se transfiere en un transposón. Este tipo de resistencia se debe a la incorporación en el ADN bacteriano de un gen, conocido como *mecA*. Este gen es un fragmento de ADN cromosomal adicional de 30 a 50 Kb, que posee dos elementos regulatorios (*mecR1* y *mecI*) que controlan la transcripción del gen *mecA* (Gil M., 2000).

Los genes que determinan la resistencia a la Meticilina en *S. aureus* están incluidos en una pequeña porción del genoma denominado SCCmec IV (staphylococcal chromosomal cassette mec type IVa por sus siglas en inglés), la cual codifica para la resistencia a la meticilina y no tiene los genes de multiresistencia de las cepas intrahospitalarias asociadas a SCC mec II (Baba T., et. al, 2002) . La epidemia actual deriva de estas mismas cepas, pero con el paso del tiempo adquirieron el SCC mec tipo IV (Diep B., et.al., 2006).

7.10.2. Betalactámicos

Estos antibióticos constituyen a un gran grupo de fármacos incluyendo derivados de la Penicilina, Cefalosporinas, Monobactámicos, Carbacefem, Carbapenems e inhibidores de la Betalactamasas. Estos producen un efecto bactericida mediante la inhibición de las enzimas unidas a la membrana responsable de catalizar las etapas vitales en la biosíntesis de la pared celular. Dicha inhibición es el resultado directo de la unión del antibiótico a una o más enzimas sensibles a la Penicilina covalente, denominado Proteínas de Unión a Penicilina (PBP). (Gilman, 2012)

Las bacterias resistentes a la Penicilina originales se muestran para producir una Betalactamasa inducible extracelular (penicilinasas), que inactiva el antibiótico a través de hidrólisis del anillo de Betalactámico. El gen estructural de Betalactamasas (*Blaz*) está presente en transposones o restos de los mismos Tn552-similares.

Estos elementos se realizan comúnmente por un grupo diverso de los llamados plásmidos de resistencia / Betalactamasas de metales pesados que van desde 15 a 45 kb de tamaño. (Gómez, 2013). Por otra parte, puede surgir mutaciones de genes o por la adquisición de genes extraños que codifican nuevas proteínas fijadores de penicilinas con menor afinidad por los antibióticos, lo cual alteran el sitio de acción del antibiótico; así mismo, se puede producir la modificación de las porinas de la capsula externa, lo que genera disminución de la permeabilidad (Lozano C. F., 2012).

7.10.3 Otros antibióticos con resistencias

El incremento de la prevalencia de ORSA implica un serio problema terapéutico en el ambiente hospitalario. Estos microorganismos, con sus amplios patrones de resistencia, que incluyen agentes antibacterianos de diversos grupos, han estimulado la búsqueda de tratamientos alternativos constituyendo una extensa línea de investigación en los últimos años. Por lo general, la mayoría de los ORSA presenta resistencia a otros antimicrobianos como Eritromicina, Tetraciclina, Estreptomicina y Clindamicina. Los antibióticos glicopeptídicos se han constituido en una excelente herramienta terapéutica para estas infecciones, si bien ya se han descrito cepas resistentes a vancomicina (Deresinski, 2007).

Los antibióticos macrólidos como la Eritromicina y Oleandomicina, Lincosamidas tales como la Lincomicina y Clindamicina, y antibióticos de estreptogramina tipo B detener la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S y causando la disociación del peptidil-ARNt durante la elongación. Resistencia al grupo Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas (MLS) de antibióticos resultados de la N6-dimethylation de un residuo de adenina en el 23S rRNA, que causa una reducción en la afinidad con el antibiótico, por modificación enzimática del antibiótico, o por transporte activo del antibiótico fuera de la célula (Lyon & R., 2009).

La resistencia inducible a los antibióticos MLS es comúnmente codificada por el gen rRNA metilasa, erm (C), que se encuentra en los pequeños plásmidos de múltiples copias, cuyo prototipo es el de 3,7 kb del plásmido pE194 RC.

La resistencia inducible a los antibióticos MLS mediadas por el gen *erm* homóloga (A), en combinación con la resistencia a la Espectinomicina Aminociclitol codificada por *spe*, también puede ser debido a una inserción cromosómica del transposón Tn554 6,7 kb. La resistencia a los antibióticos constitutiva de la MLS mediada por *erm* (B) es exhibida por plásmidos de resistencia β -lactamasa / de metales pesados, tales como pl258, debido a la posesión del transposón Tn551 de 5,3 kb (Vega, 2014).

La Tetraciclina y Minociclina pertenecen a una clase de antibióticos compuesta de un núcleo tetracíclico lineal al que están unidos varios grupos funcionales. Inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S y la prevención de asociación de aminoacil-tRNA con su sitio aceptor. Dos mecanismos de resistencia a la tetraciclina se han identificado en *S. aureus*; eflujo activo a través de tetA (K) y tetA (L) y la protección ribosomal través tetA (M) (Crossley, et al., 2006)

La resistencia a los antibióticos aminoglucósidos puede ser debido a mutaciones que alteran la estructura de los ribosomas de modo que ya no se une al antibiótico, o afecta a la activación de la membrana celular y de este modo disminuir la absorción de la aminoglucósido. Sin embargo, el mecanismo más común de resistencia a los aminoglucósidos es la modificación enzimática del antibiótico. Los aminoglucósidos modificados en los grupos amino por una acetiltransferasa aminoglucósido, o grupos hidroxilo por un aminoglucósido adeniltransferasa (AAD) / nucleotidyltransferase o un aminoglucósido fosfotransferasa (APH), no pueden unirse con los ribosomas y por lo tanto ya no inhibir la síntesis de proteínas bacterianas. (Lopez & Montesinos, 2005)

El principal mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas en *S. aureus* consiste en mutaciones en las dianas de acción del antibiótico, en concreto en la ADN Topoisomerasa IV (GrlA y GrlB) y en la ADN-girasa (GyrA y GyrB). Asimismo, la resistencia puede estar ocasionada por mutaciones en el gen *norA*, responsable de un mecanismo de expulsión activa.

Entre las fluoroquinolonas disponibles las menos activas son Norfloxacin y Ciprofloxacino, seguidas de Ofloxacino, Levofloxacino y Esparfloxacino y de Moxifloxacino y Gemifloxacino, siendo estas 2 últimas las que presentan mayor actividad frente a estafilococos. (Martínez, 2005)

La resistencia a Cloranfenicol en *S. aureus*, es con mayor frecuencia debido a la actividad de una enzima de desintoxicación inducible, Cloranfenicol Acetiltransferasa (CAT). Todas las enzimas de *S. aureus* CAT son de la clásica tipo A, con los subtipos A-7, A-8 y A-9 realizado en los plásmidos pC221, pC223 y pC194, respectivamente. La resistencia a Cloranfenicol posee cuatro plásmidos caracterizados pC221, pUB112, pC223 y pC194 los cuales tienen regiones de replicación distintas, que sugiere diversas historias evolutivas para cada plásmido, esto es a pesar de las secuencias de la proteína CAT de pUB112 y pC221 que difieren en sólo cuatro aminoácidos (Lozano C. F., 2012).

En última instancia, se propone que tales cambios resultan en la Vancomicina secuestro a través de un aumento en el número de residuos D- Ala-D-Ala, que actúan como sitios diana falsos, y una posterior reducción de la difusión de la Vancomicina a través de la pared celular modificada a través de la Vancomicina 'obstrucción, gen Van A'. Sin embargo, los cambios genéticos que conducen al fenotipo hVISA / VISA aún no se han determinado con claridad.; varios genes se han asociado con resistencia a la Vancomicina intermedio, por ejemplo el operón *vraSR* y la de dos componentes GRAS gen sensor. (Echevarría & Iglesias, 2003)

7.11. Tratamiento

SARM ha demostrado gran capacidad para desarrollar resistencia a la mayoría de los antibióticos. Las cepas de SARM-AC tienen patrones de resistencia (habitualmente son sensibles a los antibióticos no betalactámicos) diferentes a los aislados de origen nosocomial que son multiresistentes. Hasta el momento, Vancomicina ha sido el único antibiótico que ha mantenido su actividad y ha sido de elección contra estas cepas.

Sin embargo, se ha producido en algunas cepas una susceptibilidad reducida debido al uso constante de este fármaco. No obstante, si este tipo de resistencia se disemina, las opciones terapéuticas resultarían complicadas (Borraz, 2006).

Las alternativas a la Vancomicina son Teicoplanina, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Clindamicina y el uso combinado de quinolonas más Rifampicina, recientemente se ha demostrado que la Quinupristina y Dalfopristina es tan eficaz como la Vancomicina (Móreno, 2010). El drenaje es la medida terapéutica más importante en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* supuradas (abscesos), incluidos los producidas por SARM o *Staphylococcus Aureus*-PVL (+) (López, 2012).

Se utiliza en cepas sensibles a Meticilina: Amoxicilina, Cefalosporinas, Imipenem, Fluoroquinolonas y Clindamicina. En caso contrario, se emplea Linezolid y Glicopéptidos, Vancomicina (Rodvold KA, 2014). En caso de infecciones adquiridas a través de los alimentos no se tratan con antimicrobianos, dado que es causa de toxinas preformadas en el alimento colonizado por *S. aureus*, se debe de ingerir abundantes líquidos o solución electrolítica para reponer lo perdido por el vómito y la diarrea o bien lavado gástrico (Boyce, 2014).

7.12. Medidas de Prevención

Para evitar la diseminación de ORSA es prioritario mantener la asepsia, el lavado de manos y la esterilización de materiales compartidos, de esta manera se logra controlar la propagación dentro de las instituciones de salud. Debe de aplicarse procedimientos de aislamientos estrictos a los pacientes portadores de dicha multiresistencia y seguir el tratamiento respectivo. En caso de intoxicaciones alimentarias, se debe preparar adecuadamente los alimentos, consumirlos de inmediato o refrigerarlos y no mantenerlo en temperatura ambiente. Para alcanzar el éxito en la lucha contra esta bacteria multiresistente se necesita seguir al pie de la letra las medidas preventivas. (Azurtza, et.al., 2011)

VIII. DISEÑO METODOLÓGICO

Área de estudio

Se realizó en el Hospital Solidaridad, Managua; en el periodo de Enero - Octubre 2017.

Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo prospectivo de corte transversal, ya que el objetivo de la investigación es detectar la presencia de los genes *mecA* y subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican Pantón Valentine Leukocidin (PVL) en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina (ORSA).

Universo

Fue comprendido por 38 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados e identificados de muestras de pacientes con diferentes procesos infecciosos en el año 2017.

Muestra

Las muestras en estudio fueron 24 cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia a Oxacilina confirmadas por el Sistema Vitek 2 Compact en el año 2017.

Tipo de muestreo

El muestreo es no probabilístico por conveniencia (Sampiere, 2010).

Criterio de Inclusión

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* que presentan resistencia a Oxacilina confirmados por Vitek 2 Compact, aisladas de paciente con cualquier proceso infeccioso ingresado o atendido en los servicios o salas del Hospital Solidaridad, durante el período estipulado.

Criterios de exclusión

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a Oxacilina.

Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de información

Procedimiento para el procesamiento de las muestras

La identificación de las cepas de *Staphylococcus aureus* y el perfil de resistencia antimicrobiana, fue realizada por el personal del Hospital Solidaridad, a través del sistema Vitek 2 Compact a partir de muestras biológicas obtenidas de pacientes con diferentes procesos infecciosos.

De los cultivos de agar sangre de carnero al 5%, se preparó una escala de MacFarland al 0.5 usando el DensiChek Plus, luego tomando un inóculo de la cepa problema, se realizó una suspensión homogénea en un tubo de ensayo que contiene 3 ml de solución salina al 0.45%, en ambas tarjetas, tanto identificación como antibiograma, se pasan 280 µl en tubos con 3 ml de solución salina. La tarjeta AST-GP67 contiene los siguientes antibióticos: FOX, CIP, DA, E, G, LEV, MOX, LIZ, F, OXA, QDA, RA, PG, TETRA, TGC, SXT, VA.

Transporte

El traslado de las cepas de *S. aureus* con fenotipo resistente a Oxacilina del hospital Solidaridad a los laboratorios de biología molecular del POLISAL – UNAN, Managua, se realizó en agar sangre de carnero al 5%, las placas fueron selladas con cinta testigo y envueltos en papel kraft; cada cepa llevo consigo su respectivo código y ficha de recolección de datos.

Detección molecular del gen *mecA*, *nuc* y subunidades *Luk-S* y *Luk-F* en cepas ORSA

En el Laboratorio de Biología Molecular del POLISAL – UNAN, Managua, se realizó la PCR convencional para la detección de los genes *mecA* y *nuc*, utilizando el protocolo de Smyth (Smyth R.W, 2001) y la detección de las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* se realizó por separado siguiendo el protocolo de McClure (McClure & et.al, 2006) según se describen a continuación:

NUCLEÓTIDOS		
<i>mecA</i> F	5'-GCA ATC GCT AAA GAA CTA AG-3'	222 bp
<i>mecA</i> R	5'-GGG ACC AAC ATA ACC TAA TA-3'	
<i>nuc</i> F	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'	281 bp
<i>nuc</i> R	5' -AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	
<i>Luk-S</i> F	5' TGG CGC TGA GGT AGT CAA AA 3'	572bp
<i>Luk-S</i> R	5'GGG GTA ATT CAT TGT CTG GCA 3'	
<i>Luk-F</i> F	5' GCA GCT CAA CAT GAT CAC ACC 3'	509bp
<i>Luk-F</i> R	5' GTG CTT CAA CAT CCC AAC CA 3'	

Extracción

Para la extracción del ADN las cepas analizadas y los controles fueron reaislados en agar sangre de carnero al 5 % por 18 h. de incubación a 37° C; del cultivo fresco se tomó una asada y se inoculó en viales de 1.5 ml con 100 µl de agua sigma, se colocó en Termobloque por 30 minutos, la muestra se dejó enfriar en hielo por 5 minutos, luego se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se extrajo el sobrenadante el cual contiene el ADN del microorganismo.

Cuantificación

Se evaluó la pureza y concentración del ADN extraído en el Nanodrop. Para una muestra pura de ADN, la relación entre la absorbancia a 260 y 280nm (A260/A280) es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/A_{280} > 1.6$. Un valor $A_{260}/A_{280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un ratio $A_{260}/A_{280} > 2.1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. Ya concluida la cuantificación del ADN, se procedió a guardarlo a una temperatura de -80°C.

Preparación de los masters mix

Para la detección de los genes *mecA* y *nuc*, se realizó un master mix en tubos eppendorf de 1.5 ml y se distribuyó en tubos de 0.5 ml, la master mix contiene los siguientes volúmenes: Buffer 10x (Thermo Scientific) 5 µl, DNTPs 1 µl, Primers *mecA* (Forward/Reverse) 2 µl, Primers *nuc* (Forward/Reverse) 1 µl, Taq polimerasa 1 µl, Agua sigma 34 µl y ADN molde 3 µl, para un volumen final de 50 µl. El master mix para las subunidades, se realizó usando los siguientes volúmenes: Primer Luk-S (Forward/Reverse) 3 µl, Primer Luk-F (Forward/Reverse) 3 µl, dNTP's 1 µl, Buffer 10X 5 µl, Taq Polimerasa 1 µl, Agua Sigma 28 µl, Muestra ADN 3.0 µl para un volumen final de 50ul.

Amplificación

La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador de PCR, marca Eppendorf AG, Modelo: 22331, Voltaje: 100-130, Potencia: 800 watt, Frecuencia: 50/60 H. Para la amplificación del ADN molde se utilizó puRe Taq Ready-To-Go PCR beads, la concentración correspondió a Tris-HCl 10 mM, (pH 9.0), KCl 50 mM, Mg Cl₂ 1.5 mM, DNTP 200 uM y Taq polimerasa 2.5 µl.

Para *mecA* y *nuc*, el programa de amplificación fue: 95 °C por 7 minutos, (95 °C por 10 segundo, 58 °C por 20 segundo, 72 °C por 2 minutos, 72 °C por 5 minutos 30 ciclos) finalizo en 4 °C. El tiempo que demoro el Termociclador en amplificar el ADN fue de un 1 h y 30 minutos.

Para las subunidades *Luk-S* y *Luk-F*, el programa de amplificación fue: la desnaturalización inicial 95°C por 2 min, (desnaturalización 95 °C por 30 seg, alineamiento 63 °C por 1 min, extensión 72 °C, por 45seg. 25 ciclos), extensión final 72 °C por 7 min y finaliza en 4°C. El tiempo en el Termociclador fue de un 1 h y 10 minutos.

Electroforesis en gel de Agarosa

Se utilizó geles de Agarosa al 1.5 % de la compañía Invitrogen con un volumen de 1.5 µl de bromuro de ethidium. La electroforesis se corrió a 120 voltios por 40 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados y fotografiados en una cámara con luz ultra violeta. El gen *mecA* es de 222 bp y *nuc* que identifica la especie de *Staphylococcus aureus*, es de 281 bp. El gen *Luk-S* es de 572 pb y *Luk-F* es de 509 pb, todos fueron obtenidos de la compañía Thermo Scientific.

El control de calidad de los métodos utilizados se realizó utilizando las siguientes cepas controles:

1. CCUG 35601 *S. aureus*.
2. ATCC 25923 *S. aureus*.

Plan de tabulación y análisis

Para la realización del documento y presentación, se utilizaron programas computarizados de Microsoft Office 2013: Word y Power Point. Igualmente, se empleó el programa estadístico IBM.spss.21 para la tabulación de los datos y la elaboración de gráficos y tablas, en conjunto con Excel 2013.

Consideración de la Investigación

Para la realización de la investigación en el Hospital Solidaridad se envió cartas dirigidas al director del hospital, jefe de laboratorio y responsable del área de Bacteriología solicitando la aprobación del estudio, una vez aprobado dicho permiso, se procedió a la recolección de la información de las cepas de *Staphylococcus aureus* que presentan fenotipos de resistencia a Oxacilina mediante una ficha de recolección de datos. Los datos obtenidos y resultados se utilizaron con fines científicos siendo aprobado el proyecto por parte del comité de ética y de investigación de la Institución. Por lo que, los autores de este investigación declaramos no tener ningún conflicto de interés.

Financiamiento

Este estudio, se realizó con fondos para proyectos de investigación (FPI), de la UNAN-Managua, otorgado al tutor **MsC. Oscar Arbizú Medina** y ejecutado por la Dirección Vice-Rectorado de investigación y posgrado.

Limitaciones del estudio

Falta de presupuesto para la compra de medios de cultivos (Agar sangre de carnero al 5%, agar Mueller Hinton y Agar DNAsa) y reactivos de PCR (Taq polimerasa).

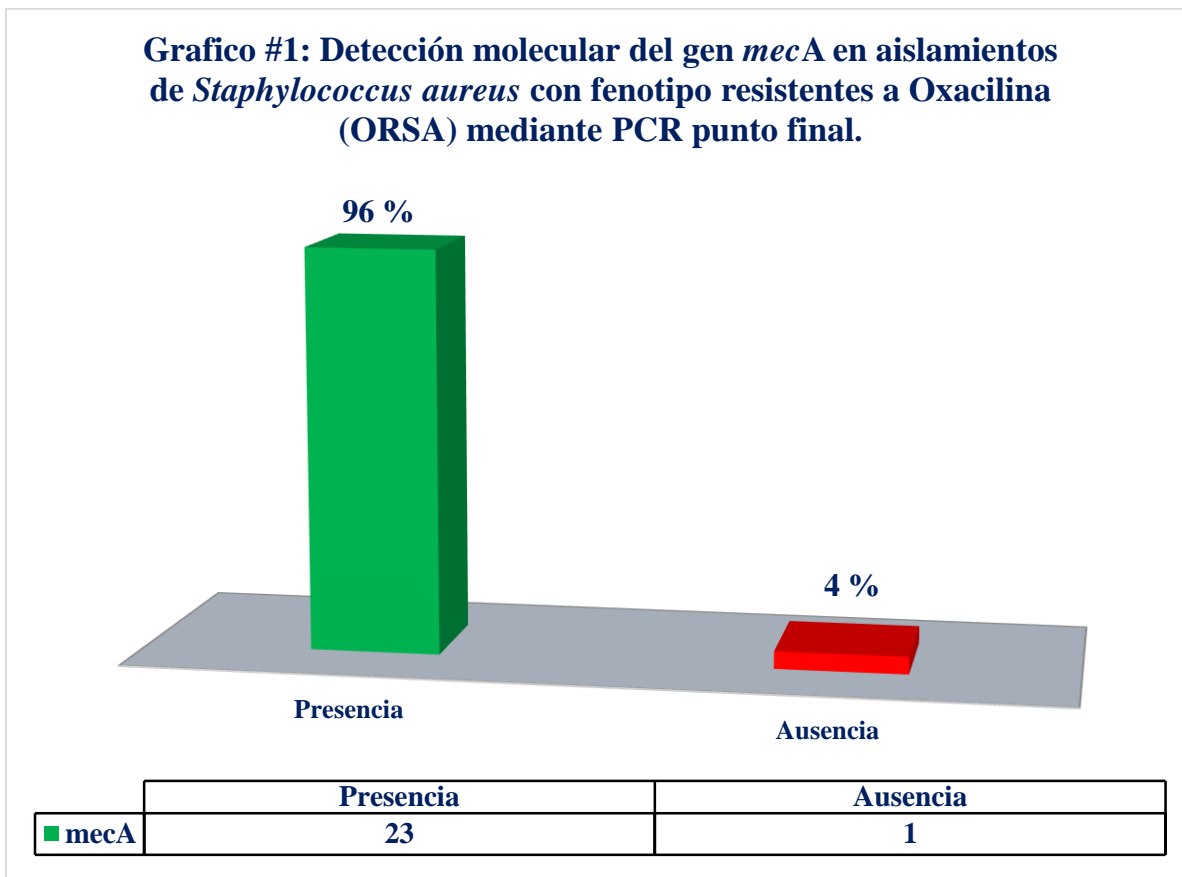
OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	SUB VARIABLE	INDICADORES	VALOR	CRITERIO	INSTRUMENTO
Gen mecA		Pares de Bases	222 pb	Presencia Ausencia	Base de Datos y hoja de Resultado
Gen Luk	Luk-S	Pares de Bases	572 pb	Presencia Ausencia	Base de Datos y hoja de Resultado
	Luk-F	Pares de Bases	509 pb	Presencia Ausencia	
Tipos de Muestras	Orina	PCR	222 pb	Presencia Ausencia	Base de datos y hoja de resultados
	Sangre		572pb		
	Líquidos corporales Secreciones Heridas Abscesos Exudados Punta de catéter		509 pb		
Distribución por sala	Medicina de mujeres	PCR	222 pb	Presencia Ausencia	Base de datos y hoja de resultados
	Medicina de varones		572pb		
	UCI		509 pb		
	Consulta externa Neurocirugía Pediatría Oncología				

	Farmaco	S ≤	I	R ≥	
Perfiles de Resistencia antimicrobiana presente en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	AST-GP67				Base de datos y hoja de resultados
	Cefoxitin Screen	4	-	8	
	Ciprofloxacina	1	2	4	
	Clindamicina	0.5	1-2	4	
	Eritromicina	0.5	1-4	8	
	Gentamicina		8	16	
	Levofloxacina	1	2	4	
	Linezolid	4	-	8	
	Moxifloxacina	0.5	1	2	
	Nitrofurantoina	32	64	128	
	Oxacilina	2	-	4	
	Quinupristina/ Dalfopristina	1	2	4	
	Rifampicina	0.5	-	32	
	Penicilina G	0.12	-	0.25	
	Tetraciclina	4	8	16	
	Tigeciclina	0.12	-	2	
Trimetropin Sulfametoxazol	2/38	-	4/76		
Vancomicina	2	4-8	16		

IX. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADO

Grafico #1: Detección molecular del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo resistentes a Oxacilina (ORSA) mediante PCR punto final.



Fuente: Tabla #1

Se analizaron 24 cepas de *Staphylococcus aureus* que presentaron resistencia a Oxacilina, identificados por el sistema VITEK 2 Compact. Posteriormente, se confirmó la especie de *S. aureus* por la presencia del gen *nuc*, el cual estaba presente en el 100% de las cepas en estudio, mediante PCR convencional. La presencia del gen *mecA* que confiere la resistencia a Oxacilina se encontró en 23 aislamientos, con una frecuencia de 96%.

Staphylococcus aureus resistente a Oxacilina (ORSA) ha emergido como uno de los microorganismos causantes de infecciones más importantes no solo en los Hospitales, sino también a nivel comunitario sin factores de riesgos aparentes entre los que se pueden citar previa ingestión de antibióticos, hospitalización reciente y el uso de dispositivos médicos invasivos.

La frecuencia de *S. aureus* resistentes a Oxacilina (ORSA) varían de un área geográfica a otra, sin embargo en nuestro país los recursos para el estudio y el monitoreo de la epidemiología de estas cepas continúan siendo limitados. Gracias al esfuerzo de la Organización Panamericana de la Salud, se ha logrado establecer un amplio rango de frecuencia que van desde las bajas, correspondientes a : Cuba (6%), Honduras (12%), y Nicaragua (20%); pasando por las moderadas, correspondientes a Ecuador (20%), Venezuela (25%); Bolivia (36%); Argentina (42%); Paraguay (44%) y Colombia (47%); hasta llegar a las más altas que se encuentran en: México (52%); Costa Rica (58%); Uruguay (59%); Guatemala (64%); Chile y Perú, con 80% cada uno. (Castellano, 2014)

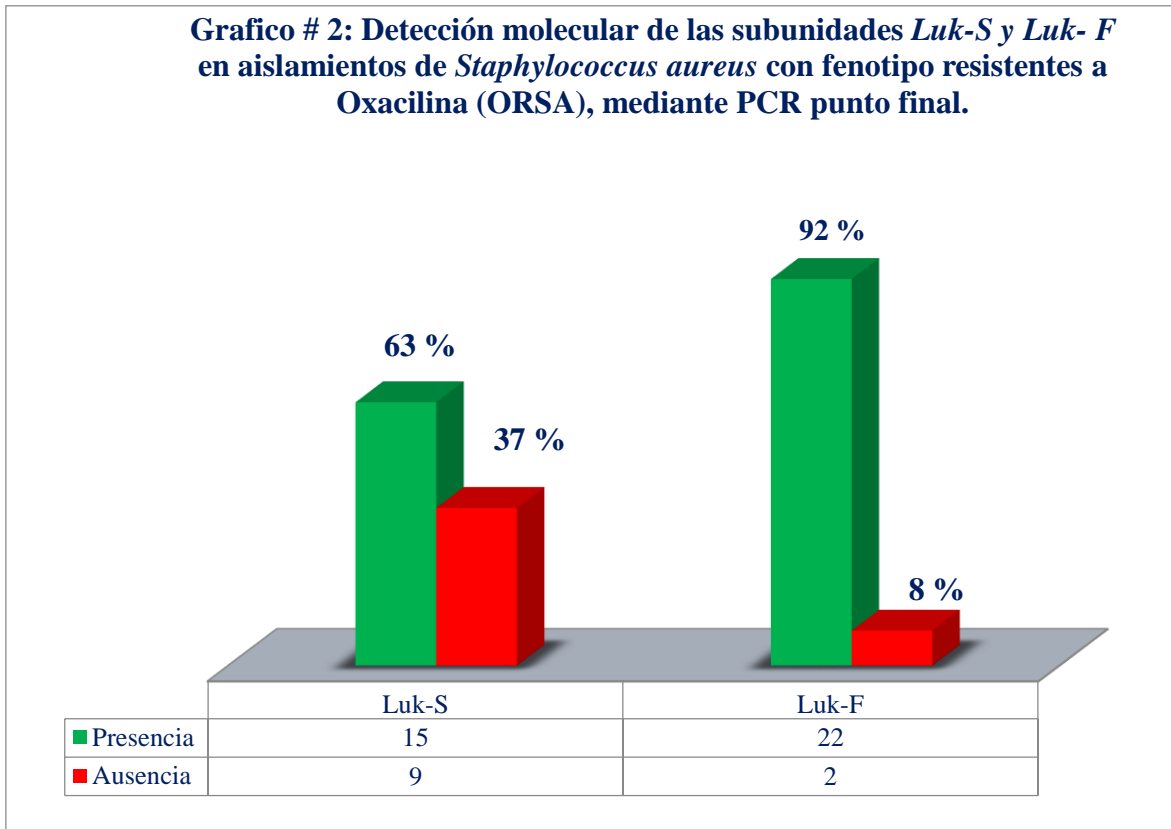
El 96% de los aislamientos ORSA obtenidos en este estudio presentaron el gen *mecA*, estos resultados coinciden con el primer estudio molecular realizado en Nicaragua por Lara y col., en el año 2000, los cuales reportaron que el 93% de las cepas ORSA aisladas de pacientes hospitalizados en el departamento de pediatría del Hospital HEODRA tenían el gen *mecA*. (Lara, 2003). En otro estudio realizado por Arbízú en el año 2010 en el que se estudiaron 234 muestras clínicas, reportó que 51 (22%) de los aislamientos eran ORSA positivo, sin embargo solo un 44% de estas cepas presentaban el gen *mecA* (Arbizu, 2010). Cabe mencionar que en este último estudio, el número de aislamientos estudiados fue mayor al de nuestra investigación, lo que podría ser causa de discrepancia entre los resultados.

Otros autores obtuvieron resultados similares al de esta investigación, en cuanto a la presencia del gen *mecA*. Sánchez y col. realizaron un estudio prospectivo, en donde analizaron 46 muestras, el 100 % resultaron ORSA positivo, portadores del gen *mecA*. (Sanchez, 2016). Otro estudio realizado en el periodo comprendido entre Enero y Marzo, 2015, en donde se estudiaron 42 cepas ORSA aisladas en el laboratorio de referencia bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), se encontró que el 100% de los aislamientos presentaron el gen *mecA*. (Romero & Castellano, 2016)

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio se puede evidenciar una alta frecuencia de aislamientos ORSA codificada por el gen *mecA*, lo que demuestra que estas cepas son uno de los microorganismos más aislados en la práctica médica, convirtiéndose en una amenaza y un verdadero problema de salud pública. Este hallazgo podría deberse a que Nicaragua tiene agravantes en relación con el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos, ya que es un país donde no se controla la venta de estos fármacos y existe una cultura de automedicación. También existe una práctica de prescripción médica temprana de antibióticos para afecciones que podrían no requerirlos, como son las enfermedades respiratorias y diarreicas, que en su mayoría resultan ser de otra etiología. (Cáceres, 2011)

Dado que los métodos fenotípicos utilizados para la detección de la resistencia a Oxacilina requiere de la expresión de la PBP2a, la cual puede ser heterogénea como la hiper producción de β lactamasas, modificación del sitio de acción (PBP) o verse influenciada por las condiciones de cultivo, es necesario realizar la confirmación de esta resistencia mediante la detección del gen *mecA* a través de PCR que es considerada el método de referencia. (Navarro., 2013). Este estudio constituye un primer acercamiento para conocer mejor la epidemiología de las cepas ORSA que circulan en los hospitales del país, cabe mencionar que los resultados obtenidos son preocupantes, considerando que *S. aureus* se encuentra colonizando con frecuencia la piel, faringe y las fosas nasales, aumenta el riesgo de producir infecciones.

Grafico # 2: Detección molecular de las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* en aislamientos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo resistentes a Oxacilina (ORSA), mediante PCR punto final.



Fuente: Tabla #2

Se encontró la presencia de la subunidad *Luk-S* en 15 aislamientos con una frecuencia del 63%. La subunidad *Luk-F* se encontró en 22 cepas con una frecuencia del 92%.

Panton Valentine Leukocidin (PVL) es considerada uno de los factores de virulencia más importantes de *S. aureus*. El primer ORSA positivo para PVL se observó a fines de 1990 y desde entonces estas cepas se han distribuido globalmente por todo el mundo. Actualmente se está debatiendo el papel de la PVL en el aumento de la virulencia de *S. aureus* y su patogenicidad, PVL es el responsable de necrosis tisular, acelerando la apoptosis y la destrucción de células polimorfo nucleares y mononucleares contribuyendo así a la morbilidad y mortalidad de sus infecciones, además es utilizada como un marcador de SARM-AC por presentar en un 95% el SCCmec IV. (Garnier F, 2006)

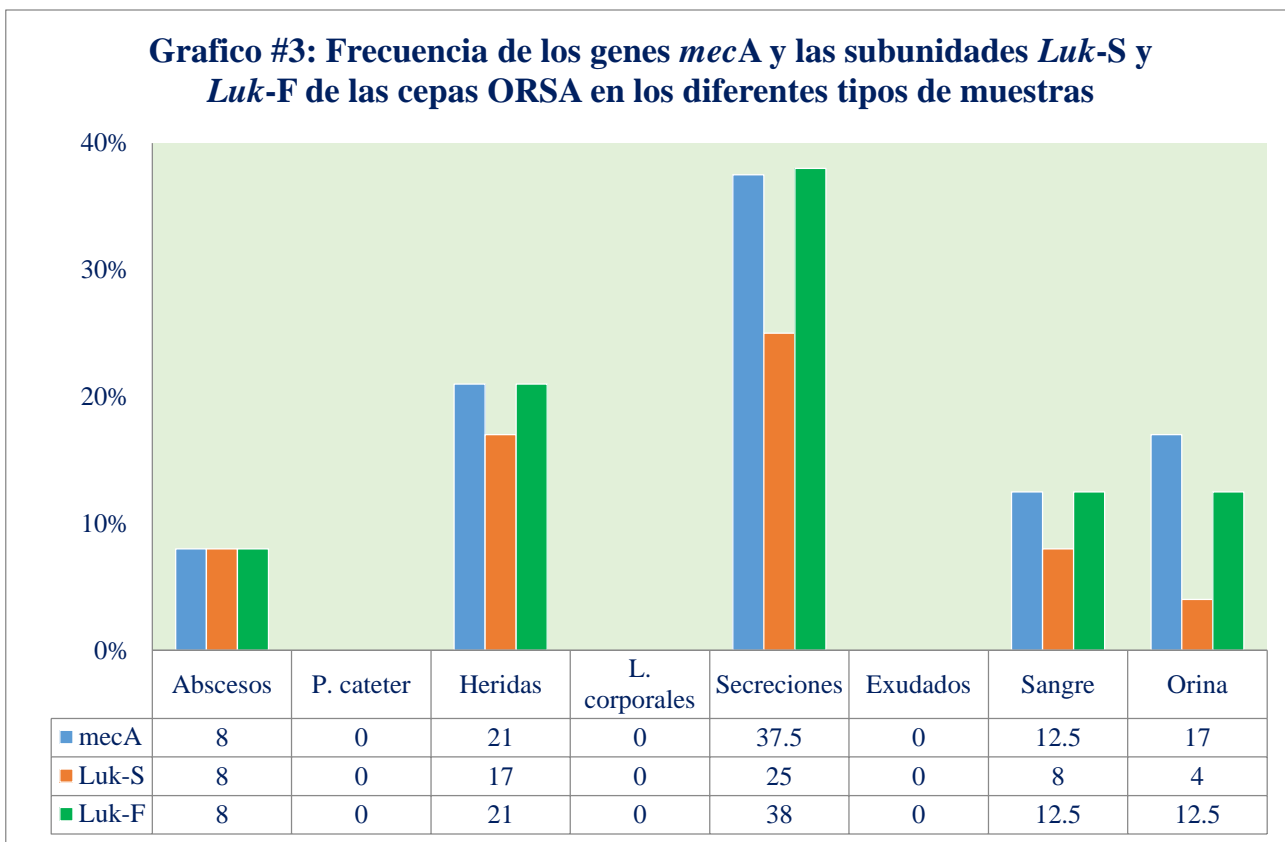
Debido a que la incidencia de las infecciones producidas por ORSA varía de un lugar a otro, la prevalencia de los genes co-transcritos o subunidades *Luk-S* y *Luk-F* que codifican la producción de PVL no es la misma en todo el mundo, varían, en general, entre el 37% y el 83%. (Kaneko J, 2004).

En el presente estudio se encontró en mayor porcentaje *Luk-F* (92%) seguido de *Luk-S* (63%), lo que concuerda con la literatura, ya que el gen *Luk-F*, ante todas las estructuras, es el marcador molecular que indica la presencia de la citotoxina. Al estar presente en la región 16S del rRNA, la cual es altamente conservada y puede influir en la hibridación de material genético entre cepas de *S. aureus*; por tales razones, es posible que la transmisión horizontal y la expresión del gen *Luk-F* sea más frecuente. *Luk-S* en cambio, es un gen que está presente en islas de patogenicidad, en este sitio se encuentran ciertos grupos (clústers) de genes de virulencia, que lo incluyen en elementos móviles, permitiendo solo la transferencia entre cepas de la misma especie, es por ello que no todas las cepas *S. aureus* poseen esta particularidad, sin embargo no están exentas de adquirirlo. (Said-Salim, et al., 2005)

En nuestro estudio hemos encontrado resultados muy similares a los informes de varios países en donde muestran la prevalencia creciente de los genes *Luk-S* y *Luk-F* que codifican para PVL. En un estudio realizado por Jiménez y cols en donde se estudiaron 60 aislamientos ORSA obtenidos de una población pediátrica y de adultos encontraron que el 73% eran *Luk-S* y *Luk-F*, PVL positivas (Jiménez J, 2011). En otro estudio realizado por Sánchez en pacientes de la ciudad de Villavicencia, Colombia en donde se analizaron 46 aislamientos ORSA, se encontró que, 44/ 46 (96 %) cepas portaban los genes que codifican para PVL. (Sanchez, 2016).

Sin embargo, muchos autores de estudios que han utilizado una metodología similar a la nuestra encontraron tasas de prevalencia mucho más bajas, que oscilan entre el 50 y 69%. Guisty y cols realizaron un estudio en Colombia en el 2011 en donde se analizaron 141 cepas ORSA-AC, encontraron que 92/141 (65%) eran positivas para PVL. (Giusti A, 2011). Romero y cols en un estudio realizado en pacientes atendidos en el Hospital Universitario de Maracaibo en los que se estudiaron 24 aislamientos ORSA encontraron, que 13 (54%) aislamientos presentaron genes que codifican la toxina PVL. (Romero & Castellano, 2016). Estos datos reflejan que la prevalencia de *PVL* varía mucho entre ubicaciones geográficas y poblaciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede evidenciar una alta frecuencia de aislamientos ORSA, con presencia de las subunidades que codifican Pantón Valentine Leukocidin, sin embargo la activación de ésta, requiere el ensamblaje de los dos polipéptidos *Luk-S* y *Luk-F* respectivamente, en nuestro estudio encontramos que solo 15 (63%) cepas ORSA pueden expresar la toxina y causar daño a los pacientes infectados. El 29 % (7/24) de las cepas restantes poseen la toxina de forma inactiva.



Fuente: Tabla #3

El tipo de muestra en que se aislaron con mayor frecuencia las cepas ORSA portadores del gen *mecA* fueron las secreciones, con un frecuencia del 37.5 %, seguido de las heridas con el 21 %, las orinas con el 17%, la sangre con el 12.5 % y los abscesos con el 8%.

Los tipos de muestras en la que se aisló con mayor frecuencia ORSA con presencia de la subunidad *Luk-S* fueron las secreciones con un 25 %, seguido de las heridas con un 17 %, sangre un 8 %, en abscesos un 8 % y en orinas un 4 %. Así mismo, la subunidad *Luk-F* se aisló con mayor frecuencia en secreciones con un 38%, seguido de las heridas con un 21 %, orinas un 12.5%, en sangre 12.5 % y finalmente los en abscesos un 8 %.

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria comensal de la mucosa nasal y de la piel de los seres vivos. Estos colonizan en algún momento a aproximadamente un 30 % de la población. Sin embargo, es uno de los patógenos más importantes como causa de infecciones adquiridas en la comunidad o en el ambiente hospitalario, estas pueden ser infecciones superficiales de la piel o infecciones generalizadas y graves tales como neumonías, bacteriemia, endocarditis, y choque tóxico que ponen en riesgo la vida de los pacientes.

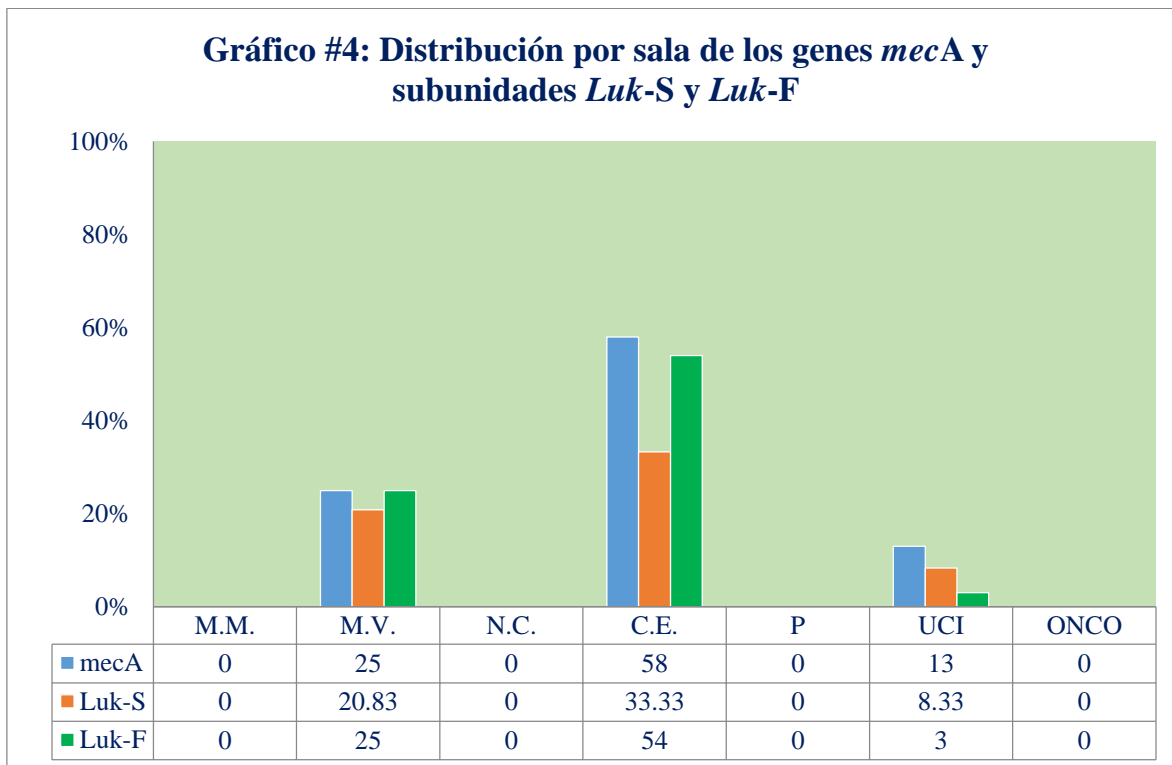
Un estudio realizado por Nascimento en donde analizó mediante PCR 103 cepas *S. aureus* resistentes Oxacilina aislados de muestras clínicas obtenidas de pacientes internados en diversos hospitales de Brasil, encontró que el 100 % presentaban el gen *mecA* y el tipo de muestra en que se aislaron con mayor frecuencia estas cepas fueron las secreciones (26,2%), sangre (23,3%), seguido de heridas quirúrgicas (15.5%) y punta de catéter (15.5%), exudados (14.6%) y orina (4,9%). (Nascimento, 2014)

En comparación a nuestro estudio en donde la principal muestra en que se aislaron las cepas ORSA con mayor frecuencia fueron las secreciones, seguido de las heridas, orina, sangre y abscesos. Este hallazgo podría deberse a que las infecciones de tipo comunitario son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, ya que afectan a piel y a tejidos blandos, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. Estas cepas comunitarias pueden ingresar al huésped mediante lesiones traumáticas que puede sufrir en la vida cotidiana (fracturas, heridas, esguinces, quemaduras, contusiones, luxaciones).

En un estudio realizado por Bhatta y cols, detectaron mediante PCR multiplex la presencia de los genes *mecA* y PVL en 139 aislamientos, encontraron un (56.8%) 79/139 de los aislados eran portadores de estos genes. La mayoría de los aislados PVL positivos se obtuvieron de muestras de pus que representan 74/98 (75.5%), luego la sangre 14/98 (14.3%) y orina 12/ 98 (16.6%). Los tipos de muestra restantes mostraron un menor porcentaje de genes de PVL, mientras que entre los ORSA, de las muestras del entorno hospitalario, ninguno de los aislados resultó positivo para PVL. (Bhatta, et.al, 2016)

Cabe mencionar que las infecciones nosocomiales más frecuentes son las de heridas quirúrgicas, vías urinarias y vías respiratorias inferiores, prótesis. Estas infecciones intrahospitalarias podrían deberse a la contaminación de los instrumentos y materiales clínicos (materiales de cirugía, puntas de catéter, ventilaciones mecánicas y jeringas) empleados en procedimientos invasivos. También es posible por transmisión cruzadas, portadores ORSA (+) a pacientes hospitalizados o viceversa o bien por descuido del personal de salud. Estos pacientes hospitalizados sufren gravemente los ataques de estas cepas, ya que la mayoría son inmunodeprimidos.

Las cepas portadoras de los bicomponentes *Luk-S* y *Luk-F*, codificadores de la citotoxina PVL, son capaces de lisar leucocitos y mediar a la necrosis tisular en los diferentes órganos, incluyendo órganos vitales como son los pulmones; así mismo, está asociado a la formación de abscesos. Por tales razones, se aprecian en nuestra investigación la presencia de dichos genes en secreciones, heridas y abscesos; por otro lado encontrar estos genes en orina no es muy frecuente y concordamos con el estudio de Nascimento, ya que es posible que se hayan transferido mediante la manipulación de algún catéter urinario, lo que pudo permitir su transferencia genética e ingreso en el huésped.



Fuente: Tabla #4

MM: Medicina de Mujeres, **MV:** Medicina de Varones, **N.C:** Neurocirugía, **C.E:** Consulta Externa, **P:** Pediatría, **UCI:** Unidades de Cuidados Intensivos, **ONCO:** Oncología

Los servicios clínicos donde se encontró mayor frecuencia las cepas ORSA portadores del gen *mecA* fueron la consulta externa con un 58 %, seguido por medicina de varones con un 25 % y UCI con el 13 %.

Las salas en donde se encontró con mayor frecuencia ORSA con presencia de la subunidad *Luk-S* fue la consulta externa con un 33 %, seguido de medicina de varones 20.83 % y las UCI 8.33%. Así mismo, la subunidad *Luk-F* se encontró con mayor frecuencia en la consulta externa con un 54%, seguido de medicina de varones con 25 %, y finalmente en UCI un 13%.

El hospital es un medio que favorece la propagación del microorganismo y puede ser transmitido de paciente a paciente o del paciente al personal de salud, ya sea por contacto directo con secreciones a través de piel y mucosas, sangre u otros líquidos corporales. Distintos estudios han demostrado que estas infecciones son, por lo general, causadas por la propia flora residente del paciente. El reservorio original a partir del cual el paciente adquiere la infección no ha sido establecido con claridad; mientras algunos pacientes están colonizados por *S. aureus* al momento de su hospitalización otros son probablemente colonizados durante la permanencia en el hospital. (Castellanos, et. al., 2005)

El estado portador nasal de *S. aureus*, al parecer juega un papel importante en la epidemiología y patogenia de la infección, ya que sirven como medio de transporte, que facilita la transmisión del microorganismo. El contacto persona a persona y la manipulación de instrumental médico puede ser el modo más probable en que se transmiten las cepas de *S. aureus* de los pacientes hospitalizados a la comunidad, llevando consigo genes de resistencias y factores de virulencia adquiridos. (Schmidt & Hensel, 2004)

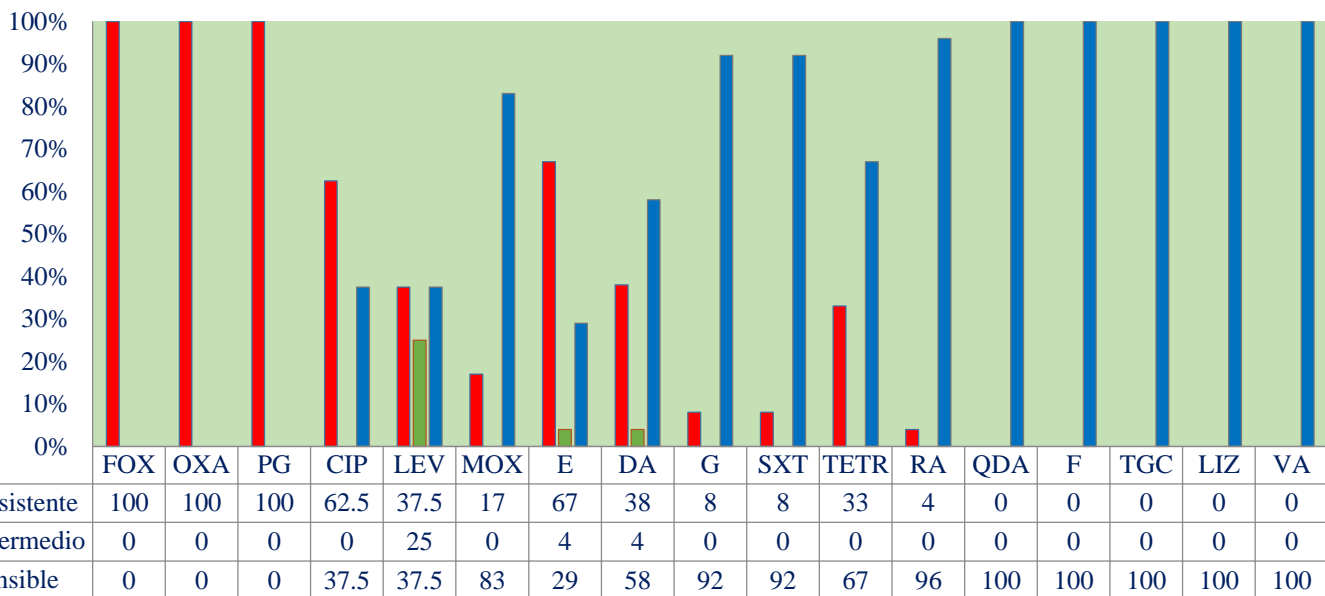
En nuestra investigación, la sala con mayor frecuencia de cepas portadoras de las subunidades *Luk-S* (33%) y *Luk-F* (54%) fue la consulta externa, este hallazgo sugiere que la población general esta propensa a sufrir estas infecciones ya sea por lesiones o traumatismos. Por otra parte, la presencia de los genes en Medicina de Varones, en certeza no lo sabemos puesto que el sexo no es un factor predisponente para padecer de esta infección, ya que puede afectar a cualquier persona sin importar la edad o el sexo en específico. Por otro lado en UCI, son diversos los factores que contribuyen a la diseminación de las cepas ORSA a nivel intrahospitalario entre los más importantes destacan la enfermedad del paciente, el estado inmunológico, el flujo indiscriminado de antibióticos, días prolongados de hospitalización, procedimientos invasivos (cateterización ventilación mecánica), intervenciones quirúrgicas y las practicas higiénicas con cada paciente.

En un estudio realizado en un hospital de México en el que se estudiaron 288 aislamientos de *Staphylococcus aureus* recuperados de muestras clínicas, desde el 01 de septiembre de 2008 al 31 de agosto de 2009, en relación a los aislamientos por servicio hospitalario, Las cepas ORSA se aislaron principalmente de pacientes internados en la Unidad de cuidados intensivos, seguido de la consulta externa y del servicio de Cirugía general. (Navarro, 2013)

En otro estudio realizado por Herrera en el Hospital Enrique Garcés, Ecuador, en donde se aislaron 79 muestras de pacientes provenientes en las diferentes especialidades del hospital, encontró que solo 24 cepas resultaron ORSA positivo portador de los genes *mecA* y las subunidades que codifican PVL, siendo los servicios médicos más afectados Medicina Interna 7 (29,17%), Cirugía Vascular 5 (20,84%), Cirugía Plástica 2 (8.33%), Cirugía General 2 (8.33%), UCI 2 (8.33%), Emergencia 2 (8.33%), Consulta externa 2 (8.33%), Traumatología 1 (4.17%) y Pediatría 1 (4.17%). (Herrera, 2015)

En comparación al estudio anterior en donde el número de cepas ORSA identificadas es similares al nuestro (24 en total), hemos encontrado datos más elevados de positividad en las salas del Hospital Solidaridad, con mayor frecuencia de los genes que codifican la resistencia a Oxacilina y la toxina PVL. Este hallazgo es alarmante ya que demuestra que este microorganismo se ha diseminado en todos los ambientes constituyendo un riesgo para los pacientes atendidos en otros servicios del Hospital ya que no están exentos de padecer estas infecciones.

Gráfico #5: Detección del Perfil de Resistencia de las cepas ORSA a través del VITEK 2 Compact



■ Resistente ■ Intermedio ■ Sensible

Fuente: Tabla # 5

FOX: Cefoxitin, **CIP:** Ciprofloxacina, **DA:** Clindamicina, **E:** Eritromicina, **G:** Gentamicina, **LEV:** Levofloxacino, **MOX:** Moxifloxacina, **LIZ:** Linezolid, **F:** Nitrofurantoina, **OXA:** Oxacilina, **QDA:** Quinupristina/Dalfopristina, **RA:** Rifampicina, **PG:** Penicilina G, **TETRA:** Tetraciclina, **TGC:** Tigeciclina, **SXT:** Trimetoprim Sulfametoxazol, **VA:** Vancomicina.

Se realizó el análisis de 24 cepas resistentes a Oxacilina (ORSA), donde se encontró que presentaban resistencia a diferentes familias de antibióticos, siendo las Fluoroquinolonas: Ciprofloxacina 15/24 (63%), Levofloxacino 9/24 (38%) y 4/24 Moxifloxacina (17%) los fármacos más afectados junto a los Macrólidos (Eritromicina): 16/24 resistentes (67%).

En cuanto a las otras familias de antibióticos de las 24 cepas dio como resultado: Lincosamidas (Clindamicina): 9/24 resistentes (38%); Aminoglucósidos (Gentamicina) y Trimetoprim Sulfametoxazol: 2/24 resistentes (8%); Tetraciclina: 8/24 resistentes (33%) y Rifampicina: 1/24 resistente (4%).

El 100% de las cepas presentaron sensibilidad a Estreptograminas, Nitrofurantoina, Tigeciclina, Linezolid y Vancomicina.

Según el total de cepas aisladas y el resultado de nuestro estudio, refleja que la resistencia a Oxacilina es cada vez mayor probablemente se deba al uso desmedido de fármacos de última línea como primera opción terapéutica, provocando cepas con resistencia intrínseca, dando lugar a la escasez de antibióticos para tratar a estos pacientes.

Un estudio realizado por Mougeot y cols en 2001, propusieron por primera vez la utilización Cefoxitin para el estudio de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina, ya que este fármaco actúa como un inductor más fuerte que la Oxacilina sobre la producción de PBP2 en *S. aureus* que poseen el gen *mecA*. Diversos estudios realizados desde entonces con aislamientos de *S. aureus* han mostrado su utilidad; dando como resultado desde un 96% - 100% de sensibilidad y 99% - 100% de especificidad. Los resultados de estos estudios no difieren del nuestro ya que un 100% de las muestras presentan un test de Cefoxitin positivo. (Díaz, et. al., 2008)

El mecanismo que confiere resistencia a Oxacilina, es complejo, ya que la bacteria ha generado una variación genética, que se encuentra codificada por el gen *mecA*, la cual modifica la estructura de la proteína fijadora a penicilina (PBP2a), lo que impide que la Oxacilina pueda adherirse al lugar donde va a ejercer la acción de bloquear la enzima transpeptidasa cuya función es sintetizar la pared bacteriana. (Sánchez, 2016). Este mecanismo confiere a esta bacteria resistencia absoluta contra las penicilinas semi-sintéticas (Meticilina y Oxacilina) y cefalosporinas de primera y segunda generación. Pero además, es el determinante central que codifica la resistencia a los β-lactámicos de amplio espectro, incluyendo cefalosporinas de tercera, cuarta generación, y los Carbapenemes (Imipenem, Meropenem).

La resistencia conferida por este gen también se extiende a otras familias de antibióticos como las Quinolonas y Lincosamidas, dejando pocas opciones terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones, (Lozano & Echeverry, 2010)

Un estudio realizado por Herrera en Ecuador acerca de la resistencia de SARM demuestra que las cepas ORSA presentan una resistencia considerable en el caso de betalactámicos (100%), tetraciclinas (62,50%), macrólidos (54,17%), y lincosamidas (54,17%) (Herrera, 2015). Otro estudio realizado por Berrios y cols. en el 2010 sobre mecanismos de resistencias de *Staphylococcus aureus* en el Hospital Japón de Nicaragua, se encontró que el 36.6% de las cepas ORSA presentaban resistencia a las fluoroquinolonas y macrólidos. (Berrios, et. al., 2010); En ese mismo año, Cáceres y cols., examinaron en hospitales de Nicaragua 52 cepas con SARM donde el 15% de estas eran multirresistentes, siendo los fármacos más afectados los macrólidos y lincosamidas.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio no difieren de los mencionados anteriormente ya que se refleja que las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina presentan frecuentemente resistencia a las fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) 63%, macrólidos (Eritromicina) 67% y lincosamidas (Clindamicina) 38%, esto debido a que 96% de las cepas estudiadas presentaban el gen *mecA*, y las cepas que poseen este gen presentan enzimas de restricción donde se encuentran transposones y secuencias de inserción que contienen el gen *ermA*, que codifica resistencia constitutiva e inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (Gil M., 2000), siendo este un problema muy importante, ya que limita a un tratamiento adecuado y oportuno para el paciente.

Un estudio realizado por Rodríguez y cols, en 1997, reportaron los primeros casos de fracaso terapéutico a Vancomicina, a las cuales se les denominó *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia (VISA), en 2002 se aisló la primera de las 3 cepas reportadas hasta la fecha con resistencia total al antibiótico, denominadas *Staphylococcus aureus* resistentes a Vancomicina (VRSA). (Rodríguez & Vesga, 2005). En nuestro estudio 100% de las cepas resultaron sensibles a Vancomicina, lo cual es de mucha importancia ya que los glucopéptidos como la Vancomicina ha sido el pilar fundamental para tratar las infecciones por ORSA, dando alternativa a los médicos y de esta manera salvar la vida del paciente.

X. CONCLUSIONES

1. La presencia del gen *mecA* se encontró en 22 aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a Oxacilina (ORSA), con una frecuencia del 96%.
2. La presencia de las subunidades *Luk-S* se identificó en 15 aislamientos con una frecuencia del 63%, así mismo *Luk-F* se encontró en 22 cepas, con una frecuencia del 92%, esto indica un alto nivel de virulencia en las cepas ORSA al ser portadores de los genes que codifican la toxina PVL.
3. Los tipos de muestras, en los que se aisló con mayor frecuencia *Staphylococcus aureus* resistentes Oxacilina (ORSA) codificada por el gen *mecA*, fueron las secreciones con un 38 %; seguido de las heridas con un 21%, orinas un 17%, sangre un 13% y abscesos un 8%. Por otra parte, las subunidades *Luk-S* y *Luk-F*, se encontraron con mayor frecuencia en los aislamientos obtenidos de secreciones, heridas, orina, sangre y abscesos.
4. Las salas con mayor presencia de *S. aureus* resistentes a Oxacilina (ORSA) que portaban el gen *mecA* fueron la consulta externa con un 58 %; seguido por medicina de varones con un 25%, y UCI un 13%. Así mismo, los genes *Luk-S* y *Luk-F*, se encontraron presente en la consulta externa, medicina de varones y UCI.
5. Las cepas *S. aureus* resistentes Oxacilina (ORSA) presentaron mayor resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas y aminoglucósidos, con sensibilidad a Vancomicina, Tigeciclina y Linezolid.

XI. RECOMENDACIONES

Al Ministerio de Salud

Darle importancia y seguimiento a los hallazgos de resistencia antimicrobiana diagnosticados

Al Hospital (Comité de Infecciones)

Mantener la vigilancia activa a la resistencia antimicrobiana y promover medidas de prevención al público en general.

Al Personal de Salud

Debe cumplir todas las medidas de bioseguridad para evitar la propagación del microorganismo

Para el Público en General:

1. Evitar auto medicarse (Buscar atención médica)
2. Mantener hábitos higiénicos saludables personales y en el hogar (higiene respiratorio, constante lavado de manos)
3. Si es una persona con ORSA (+), debe aplicar todas las medidas preventivas para evitar la propagación del microorganismo, haciendo uso de mascarilla y lavado de manos.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN – Managua)

1. Divulgar la información de este tipo de estudios, para instruir a los estudiantes de la importancia que tiene el buen uso de los antimicrobianos.
2. Seguir promoviendo investigaciones de este tipo para mantener información constante y reciente sobre los cambios que va adquiriendo esta bacteria.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- A. Howe, R. M. (2004). Vancomycin Susceptibility within Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Lineages. *EMERGING INFECTIOUS DISEASES*.
- Abente, S., Carpinelli, L., & et.al, .. (2016). Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente y el factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios de infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc.Salud.*, 8-16 p.
- Altamirano, A., Moreno, S., & Berdugo, A. (2000). Principales Medidas en Epidemiología. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Salud Pública .
- Arbizu, O. (2010). *Deteccion molecular del gen mecA y caracterizacion de fenotipos de resistencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina aislados de pacientes y personal de salud HEODRA 2008-2009*. Retrieved from Tesis Maestria Microbiologia. Recuperado de:
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/472/1/219548.pdf>
- Ardanuy, C., Cercenado, E., Morisini, M. I., & Torres, C. (2011). Deteccion fenotipica de mecanismo de resistencia en grampositivos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Azurtza, A. A., Berroeta, F. A., Esparza, H., Vicente, I., & Menicucci, C. e. (2011). Actualización de la Guía de actuación ante *Staphylococcus Aureus* resistente a meticilina (SARM) y otros microorganismos multirresistentes en centros gerontológicos, sociosanitarios y personal con discapacidad. *Osakidetza*. Gobierno Vasco, España.
- Baba T, T. F. (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.
- Baño, J. R. (s.f.). Documento de Consenso sobre el Manejo Clínico de las Infecciones Causadas por *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina en Adultos. Sevilla, España: Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas.
- Barrios, M. L. (2012). Características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus aureus* adquiridas en la comunidad en pediatría. *Tesis doctoral*. Madrid, España: Universidad Complutense De Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría.

- Berrios, G., Fletes, M., & Margorie, G. (2010). *Mecanismos de Resistencia de Staphylococcus aureus aislados en procesos infecciosos de pacientes atendidos en el Hospital Amistad Japon - Nicaragua*. Granada.
- Bhatta, D. R., Cavaco, L. M., Nath, G., Kumar, K., Gaur, A., & Gokhale, S. (2016). Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). Nepal, Kathmandu, India: Central Department of Microbiology, Tribhuvan University,.
- Biomerieux. (2016). *Vitek Sistema Automatico De Identificación*. Recuperado de http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?doc=SPN_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_7
- Blanco, L. A. (2008). Importancia actual de la bacteremia por Staphylococcus aureus en un Hospital Universitario. *Tesis Doctoral*. Madrid, España: Universidad Complutense De Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Medicina.
- Bordes, E. R. (2015). Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en Staphylococcus spp. En centros sanitarios de Mallorca durante los últimos 15 años (1999-2013). Islas Baleares, España: Universidad de las Islas Baleares.
- Borraz, C. O. (2006). *Epidemiología de resistencia a Meticilina en cepas de Staphylococcus aureus aisladas en hospitales españoles*. (U. D. EXPERIMENTAL, Ed.). Recuperado de: [://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42524/1/CBO_TESIS_DOCTORAL.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42524/1/CBO_TESIS_DOCTORAL.pdf)
- Boyce, T. G. (2014). *Intoxicación alimentaria por estafilococos*. Retrieved from Manual Merck. Recuperado de: [://www.merckmanuals.com/es-pr/hogar/trastornos-gastrointestinales/gastroenteritis/intoxicación-alimentaria-por-estafilococos](http://www.merckmanuals.com/es-pr/hogar/trastornos-gastrointestinales/gastroenteritis/intoxicación-alimentaria-por-estafilococos)
- Boyle-Vavra, S., & Daum, R. (2007). Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Pantón–Valentine leukocidin. (87), 3–9 p. Chicago, USA: Laboratory Investigation.
- Bradley, S. (2006). The Role of Toxins in the Changing Epidemiology and Clinical Presentation of Staphylococcal Pneumonia. . Antimicrobial Agents Chemotherapy.
- Brooks, G. F. (2011). *Microbiología Médica de Jawetz, M. & Adelberg, & N. L. García Carbajal*. McGrawHill.
- Cáceres, M. (2011). Frecuencia de portadores nasales de Staphylococcus aureus resistente de hospitales de Nicaragua. *Rev Panam Salud Pública.*, 3-5 p.
- Campechano, L. A. (2010). *Prevalencia de S aureus resistente a meticilina en portadores nasales en el personal de salud del Hospital Escuela de la Universidad*

Veracruzana. Retrieved from Universidad de Veracruz. Mexico. Recuperado de://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/39940/1/alvanilcampechano.pdf

- Castellano, M. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana y diseminación policlonal de cepas de *Staphylococcus aureus*. *Revista Chilena de Infectología*, 165-172 p.
- Castellanos, M., Bermudez, E., Navarro, E., & et.al. (2005). *Staphylococcus aureus*: Estado portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad antimicrobiana. (25), 2, 72-78p. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*
- Chen, Y. Y.-S. (2015). Basis of Virulence in a Pantone-Valentine Leukocidin-Negative Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain. 472-480 p. *The Journal of Infectious Diseases*.
- Crossley, K. B., Jefferson, K. K., Archer, G., & Fowler Jr, V. G. (2006). *Staphylococci In Human Disease*. (2da ed.). Oxford, Reino Unido: WILLET-BLACKWELL.
- David, M. Z. (2010). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Deresinski, S. (2007). Counterpoint: Vancomycin and *Staphylococcus aureus* an antibiotic enters obsolescence. *Clin Infect Dis.*, 44, 1543-8 p.
- Díaz, B., Gutiérrez, I., Lara, M., Laich, F., & Méndez, S. (2008). Evaluación del método de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina en la detección de resistencia a meticilina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus*. *Quimioter*, 213-2016 p.
- Diep B., C. H.-R. (2006). Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 1495-1503 p. *Journal of Infectious Diseases*.
- Echevarría, Z. J., & Iglesias, Q. D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *scielo*, 14(4), 195-203 p.
- García Álvarez L, H. M. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 11(8), 595-603 p.
- Garnier F, T. A.-C. (2006). Neumonía y nuevo clon de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Emerg Infect Dis. Mar*; 12 (3):, 498-500 p.
- Gil M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*, 17(2), 145-152 p.

- Gilman, G. &. (2012). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (9° ed.). McGraw-Hill.
- Giusti A, B. M. (2011). Staphylococcus aureus meticilinoresistente adquirida en la comunidad: Detección de leucocidina de Pantón-Valentine y su relación con el sitio de aislamiento en pacientes de la ciudad de Santa Fe-Argentina. *Rev Panam Infectol*, 8-11 p.
- Gómez, C. G. (2013). *Staphylococcus aureus en población pediátrica: Epidemiología Molecular y Factores de Virulencia*. (MADRID, Ed.) Retrieved from Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología. Recuperado de: [//eprints.ucm.es/22440/1/T34696.pdf](http://eprints.ucm.es/22440/1/T34696.pdf)
- Guzmán, L. T. (2010). Comportamiento del estafilococo aureus meticilina resistente procedente de la comunidad, MRSA-CA en el servicio de infectología pediátrica del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva, Colombia. Neiva, Colombia: Universidad Surcolombiana Facultad de Salud Especialización en pediatría.
- Hawkes., N. (2000). "Baby's death linked to hospital bug". .
- Herrera, K. (2015). Prevalencia de Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina (SARM) en pacientes atendidos en el Hospital General Enrique Garces Durante el Período Enero 2013-Diciembre 2013 . Ecuador : Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Médicas.
- Jiménez J, O. A. (2011). Characterization of virulence genes in methicillin susceptible and resistant Staphylococcus aureus isolates from a pediatric population in a University Hospital of Medellín, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,; *Rio de Janeiro*, Vol. 106(8), 980-985 p.
- Kaneko J, K. Y. (2004). Revisión toxinas citolíticas bacterianas de dos componentes y heteroheptaméricas: estructuras, mecanismo de formación de poros y organización de los genes. *Biosci Biotechnol Biochem*. mayo; 68 (5):., 981-1003 p.
- Kaneko, J. K. (1998). Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Pantón-Valentine leukocidina genes.
- Katayama Y, I. T. (2001). Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7), 1955-1963 p.
- Khan, S. (2005). Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*.

- Lara, T. M. (2003). Patron de Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislados en niños del area de pediatria del hospital HEODRA de Leon. *Tesis Monografica*. Leon, Nicaragua.: Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua-Leon. Departamento de Microbiologia. Facultad de Ciencia Medicas. .
- Lindsay, J. (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*.
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., . . . Proctor, R. (2010). *Staphylococcus aureus* Pantone Valentin Leukocidin es un factor citotóxico muy potente para los neutrófilos humanos. National Library of Medicine. doi:10.1371/journal.ppat.1000715
- López, M. B. (2012). Características epidemiológicas, clínicas y epidemiológicas de las infecciones por *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad en Pediatría. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría.
- Lopez, S. A., & Montesinos, M. I. (2005). Estudio Epidemiológico de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados en el Hospital Universitario de Canarias (2000-2004). Santa Cruz de Tenerife., España.
- Lozano, C. F. (2012). Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina del linaje CC398 de distintos orígenes: resistencia, virulencia y contenido plasmídico. Logroño, España: Universidad de La Rioja. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. Departamento de Agricultura y Alimentación.
- Lozano, D., & Echeverry, P. (2010). *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montera-Córdoba. *Universitas Scientiarum.*, 159-165 p.
- Lyon, S. O., & R., B. (2009). Genetics of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*. *FUTURE MICROBIOLOGY*, 1-29 p.
- Ma XX, I. T. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.*(46), 1147-1152 p.
- Maricela, V. L. (2015). Identificación de *Staphylococcus* Penicilino resistentes y su relación con la faringoamigdalitis en el personal que trabaja en la elaboración de queso artesanal, en el Cantón la Joya de los Sachas. (A. Ecuador, Ed.) Universidad técnica de Ambato Facultad de Ciencias de la Salud Carrera de Laboratorio Clínico. Retrieved from UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO.

Recuperado de:

<http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10345/1/Villacis%20Lozada,%20Victoria%20Maricela.pdf>

- Martínez, J. M. (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. (1)(23), 25-31. Sevilla, España: Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. Recuperado de: https://www.um.es/biomybiotec/web/Seminarios/2008/papers/A_Pascual_EIMC_rev_qnr_2005.pdf
- McClure, J.-A., John, C., Lau, V., Elsayed, S., Louie, T., & Hutchins, W. &. (2006). Novel Multiplex Assay for Detection of the Staphylococcal Virulence Marker Panton-Valentine Leukocidin Genes and Simultaneous Discrimination of Methicillin-Susceptible from –Resistant Staphylococci. 1141-1144 p. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517915>
- Melles D., V. L. (2006). "Panton-Valentine leukocidin genes in Staphylococcus aureus. *Emergence Infectious Diseases*.
- Móreno, R. &. (2010). *Prevalencia de Staphylococcus aureus Meticilina Resistente en muestras bacteriológicas analizadas en el Hospital Antonio Lenin Fonseca en el periodo comprendido de Enero a Diciembre del 2010*. Managua: UNAN-MANAGUA.
- Murray, P. R. (2007). *Microbiología Médica: Bacteriología S. aureus*. Madrid, España: Copyright © 2013 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc. Versión en español de la 7° edición de la obra en inglés.
- Nascimento, T. (2014). Aspectos epidemiológicos, fisiológicos e moleculares de resistencia a oxacilina en Staphylococcus aureus. Brasil: Universidad Federal de Juiz de Fora.
- Navarro. (2013). Staphylococcus aureus resistente a Meticilina en hospitales de Hermosillo Sonora. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Volumen XVI.*, 1-5 p.
- Ortiz, S. L. (2013). Resistencia a Linezolid en bacterias gram positivas. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana Bogotá. Retrieved from Resistencia al linezolid en bacterias Gram-positivas. Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/9889/DiazOrtizSandraLorena2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Palombarani, S. &. (2007). Infecciones Adquiridas en la Comunidad por Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina en Hospital de Agudos "EVA PERON". San Martín, Buenos Aires, Argentina: Revista Argentina de Microbiología.
- Panton P., C. M. (2003). "Staphylococcal Toxin". Lond O.: M.R.C.P.

- Pérez, M. A. (2012). Identificación molecular de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina en aislamientos obtenidos de pacientes pediátricos del Hospital Universitario de Santander. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander. Departamento de Ciencias Básicas. Maestrías en Ciencias Básicas Biomédicas. Retrieved from UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS. MAESTRIAS EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS. BUCARAMANGA. Recuperado de: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/10064/2/143044.pdf>
- Prevost, G., Couppie, P., Prevosts, P., Gayet, S., Petiaut, P., Crihiert, B., & Monteil, H. &. (1995). Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *42(237-245 p.)*, 1995. Strasbourg, Francia: J. Med. Microbiol. Institut de Bacteriologie de la Faculte de Medecine de Strasbourg.
- R. Monina Klevens, D. M., Melissa A. Morrison, M., Joelle Nadle, M., & al, e. (2007). Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMMA NETWORK*, *298(15):1763-1771 p.* doi:10.1001/jama.298.15.1763
- Reyes, A. S. (2009). PCR Multiplex para la identificación de los genes Luk-S y Luk-F codificantes del marcador Leucocidina Valentine Pantón, simultánea a la detección de resistencia a Meticilina en muestras de Bacteremias causadas por *Staphylococcus aureus*. *Tesis Monográfica*. Singolquí., Ecuador.: Escuela Politécnico del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida Ingeniería en Biotecnología.
- Rodríguez, C., & Vesga, O. (2005). *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. 575-587 p. Medellín, Colombia: Biomedica.
- Rodvold KA, M. C. (2014). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis.*, *58(1)*, 520 p.
- Rojas, C. A. (2012). Epidemiología de las infecciones osteoarticulares por estafilococo *aureus* metilino resistente en los últimos 5 años en el Hospital de la Misericordia. Universidad Nacional De Colombia. Facultad de Medicina. Departamento de Ortopedia y Traumatología.
- Romero, A. S., & Castellano, M. G. (2016). Pantón Valentine leukocidin in MRSA strains isolated from patients at the University Hospital of Maracaibo. *Kasmera.*, 111-120 p.
- Rowland, S. D. (1989). Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *EMBO J.*
- Said-Salim, B., Mathema, B., Braughton, K., Davis, S., Sinsimer, D., Eisner, W., . . . DeLeo, F. &. (2005). Differential Distribution and Expression of Pantón-Valentine

Leucocidin among Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *43*(7), 3373–3379p. *Journal of Clinical Microbiology*.

Sampiere, R. (2010). *Metodología de la Investigación*. Macgrahill.

Sanchez, L. L. (2016). Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina adquiridas en la comunidad en pacientes de Villavicencia, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical.*, 68(1).40-50 p.

Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands en Bacterial Pathogenesis. *Rev.17*(14-56 p.). *Clin. Microbiol.*

Smyth R.W, K. G. (2001). Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*.

Tamariz, J., & Agapito, J. e. (2010). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirida en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Peru. *Rev. Med. Hered*, 4-10 p.

Vega, M. L. (2014). *Staphylococcus aureus* meticilina resistente: clones distribuidos en la comunidad y en el hospital 2002- 2012. Montevideo, Uruguay: PEDECIBA (Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas). Área Biología. Subárea Microbiología.

Vianello, M. A. (2006). Caracterización genotípica de dos factores de virulencia y su regulador agr en cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a Oxacilina. San Paulo, Brazil: Universidad de San Paulo.

Woodin, A. (1959). Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. 158–165 p. Reino Unido: Biochem.

Xue Ma X., I. T. (2006). Molecular epidemiology of Japanese hospital MRSA 1979-85. - Predominance of Panton- Valentine leukocidin positive clones. *Journal of Clinical Microbiology*.

Zhang HZ., H. C. (2001). A proteolytic transmembrane signalling pathway and resistance to B-lactams in *Staphylococcus*. 1962-5 p. *Science*.

ANEXOS

Tabla #1: Detección del gen *mecA* en las cepas ORSA mediante PCR

Gen	<i>mecA</i>	
	F	%
Presencia	23	96
Ausencia	1	4
Total	24	100

F: Frecuencia

Fuente: Resultados del Laboratorio de Biología Molecular y Celular Dr. Elmer Cisneros
In Memoriam del POLISAL, UNAN-Managua

Tabla #2: Detección los genes *Luk-S* y *Luk-F* en las cepas ORSA mediante PCR

Gen	<i>Luk-S</i>		<i>Luk-F</i>	
	F	%	F	%
Presencia	15	62.5	22	92
Ausencia	9	37.5	2	8
Total	24	100	24	100

F: Frecuencia

Fuente: Resultados del Laboratorio de Biología Molecular y Celular Dr. Elmer Cisneros *In Memoriam* del POLISAL, UNAN – Managua

Tabla N° 3. Frecuencia de los genes *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* en cepas ORSA en los diferentes tipos de muestras aisladas en el Hospital Solidaridad

	Genes											
	<i>mecA</i>				<i>Luk-S</i>				<i>Luk-F</i>			
	P	%	A	%	P	%	A	%	P	%	A	%
Orina	4	17	0	0	1	4	3	13	3	12.5	1	4
Sangre	3	12.5	0	0	2	8	1	4	3	12.5	0	0
Líquidos Corporales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Secreciones	9	37.5	1	4	6	25	4	17	9	38	1	4
Heridas	5	21	0	0	4	17	1	4	5	21	0	0
Abscesos	2	8	0	0	2	8	0	0	2	8	0	0
Exudados	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Punta de Catéter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	23	96	1	4	15	62	9	38	22	92	2	8

P: Presencia A: Ausencia

Fuente: Resultados del Laboratorio de Biología Molecular y Celular Dr. Elmer Cisneros

In Memoriam del POLISAL, UNAN-Managua

N° 4: Distribución de los genes *mecA* y las subunidades *Luk-S* y *Luk-F* en cepas ORSA por sala en el Hospital Solidaridad

	Genes											
	<i>mecA</i>				<i>Luk-S</i>				<i>Luk-F</i>			
	P	%	A	%	P	%	A	%	P	%	A	%
Medicina de Mujeres	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Medicina de Varones	6	25	0	0	5	20.83	1	4.16	6	25	0	0
UCI	3	13	0	0	2	8.33	1	4.16	3	13	0	0
Consulta Externa	14	58	1	4	8	33.33	7	29.16	13	54	2	8
Neurocirugía	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pediatría	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oncología	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	23	96	1	4	15	62.5	9	37.5	22	92	2	8

P: Presencia A: Ausencia

Fuente: Resultados del Laboratorio de Biología Molecular y Celular Dr. Elmer Cisneros

In Memoriam del POLISAL, UNAN-Managua

Tabla #5: Detección del Perfil de Resistencia de las cepas ORSA a través del VITEK 2 Compact.

Perfil de Resistencia	Resistente		Intermedio		Sensible		Total	
	F	%	F	%	F	%	F	%
FOX (Cefoxitin)	24	100	0	0	0	0	24	100
CIP (Ciprofloxacina)	15	62.5	0	0	9	37.5	24	100
DA (Clindamicina)	9	38	1	4	14	58	24	100
E (Eritromicina)	16	67	1	4	7	29	24	100
G (Gentamicina)	2	8	0	0	22	92	24	100
LEV (Levofloxacino)	9	37.5	6	25	9	37.5	24	100
MOX (Moxifloxacina)	4	17	0	0	20	83	24	100
LIZ (Linezolid)	0	0	0	0	24	100	24	100
F (Nitrofurantoina)	0	0	0	0	24	100	24	100
OXA (Oxacilina)	24	100	0	0	0	0	24	100
QDA (Quinupristina/Dalfopristina)	0	0	0	0	24	100	24	100
RA (Rifampicina)	1	4	0	0	23	96	24	100
PG (Penicilina G)	24	100	0	0	0	0	24	100
TETRA (Tetraciclina)	8	33	0	0	16	67	24	100
TGC (Tigeciclina)	0	0	0	0	24	100	24	100
SXT (Trimetropin/Sulfametoxazol)	2	8	0	0	22	92	24	100
VA (Vancomicina)	0	0	0	0	24	100	24	100

F: Frecuencia

Fuente: Resultados del laboratorio obtenidos mediante el sistema VITEK 2 Compact del Hospital Solidaridad.

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> ✚ Tubos eppendorf de 0.5, 1.5 y 2 ml estériles ✚ Gradillas para tubos eppendorf ✚ Puntas para micropipetas estériles (diferente capacidad) ✚ Recipiente con hielo ✚ Tubos con 3 mL de medio líquido LB-Amp o placa de LB-Amp ✚ Guantes de látex ✚ Tubos para PCR estériles ✚ Micropipetas para volúmenes de 2, 20 y 200 µl ✚ Palillos estériles ✚ Frasco para desechar puntas sucias de micropipetas ✚ Gel de agarosa ✚ Marcadores indelebles 	<ul style="list-style-type: none"> ✚ Termociclador ✚ Cámara de Electroforesis ✚ Transiluminador con UV ✚ Nanodrop ✚ Centrifugadora ✚ Termobloque ✚ Vortex 	<ul style="list-style-type: none"> ✚ Agar Sangre de Carnero al 5% ✚ Cepa de ORSA (+) ✚ Sobrenadante extraído (ADN molde) ✚ Primers mecA (Foreward and Reverse) ✚ Primers nuc (Foreward and Reverse) ✚ Primers Luk S/F (Foreward and Reverse) ✚ Bromuro de Etidio ✚ Taq Buffer Thermo Scientific ✚ Agua Grado PCR ✚ TBE 10 X ✚ TBE 1X ✚ Loading Buffer ✚ dNTPs ✚ Enzima ADN polimerasa Taq

Base de Datos									
Fecha	Código de Hospital	Código de Laboratorio	Concentración ng/ul	Absorbancia	Tipo de muestra	Sala	<i>mecA</i>	<i>Luk-S</i>	<i>Luk-F</i>
24/01/17	MINSA-1LH	17-025	81.6	1.97	Heridas	C. Externa	P	P	P
24/01/17	1701090030	17-026	68.1	2.0	Orina	C. Externa	P	P	P
24/01/17	1608180759	17-027	120.9	1.90	Heridas	M. de Varones	P	P	P
24/01/17	1701090402	17-028	77.1	2.0	Secreciones	C. Externa	P	P	P
24/01/17	1612170076	17-029	97.8	2.02	Heridas	M. de Varones	P	P	P
24/01/17	1610090090	17-030	143.9	2.02	Sangre	UCI	P	A	P
24/01/17	1612090170	17-031	113.8	2.0	Heridas	M. de Varones	P	P	P
04/04/17	1703020564	17-044	98.6	2.1	Heridas	M. de Varones	P	A	P
09/06/17	1704190313	17-046	60.2	2.1	Orina	C. Externa	P	A	A
09/06/17	1705240132	17-047	52.0	2.1	Orina	C. Externa	P	A	P
09/06/17	1705110050	17-048	43.2	2.0	Secreciones	C. Externa	P	P	P
04/08/17	1706280212	17-049	81.5	1.63	Secreciones	C. Externa	P	P	P
04/08/17	1707120366	17-050	124.7	2.1	Abscesos	C. Externa	P	P	P
04/08/17	1707120366	17-051	412.1	1.51	Abscesos	C. Externa	P	P	P

04/08/17	1707210496	17-052	127.5	1.77	Sangre	M. de Varones	P	P	P
04/08/17	1708140776	17-070	75.9	1.66	Secreciones	C. Externa	P	A	A
04/08/17	1708300537	17-071	38.5	2.07	Secreciones	C. Externa	P	A	P
04/08/17	1708290047	17-072	46.3	1.84	Sangre	UCI	P	P	P
04/08/17	1708160697	17-073	24.9	1.87	Secreciones	UCI	P	P	P
04/09/17	1709040525	17-074	60.9	1.8	Secreciones	C. Externa	P	P	P
09/10/17	1710020192	17-086	369.3	1.85	Orina	C. Externa	P	A	P
24/10/17	1710130388	17-110	52.6	1.80	Secreciones	C. Externa	A	A	P
14/10/17	1710200187	17-111	297.1	1.66	Secreciones	M. de Varones	P	P	P
14/10/17	1710310530	17-112	216.2	2.02	Secreciones	C. Externa	P	A	P

P: Presencia A: Ausencia

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Celular Dr. Elmer Cisneros *In Memoriam* del POLISAL, UNAN-Managua.

Registros de la red de vigilancia Whonet del Hospital Solidaridad, Managua.

ILUSTRACIONES

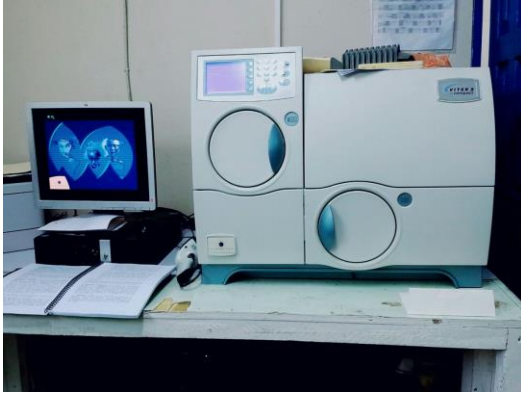


Fig. N° 1. Vitek 2 Compact

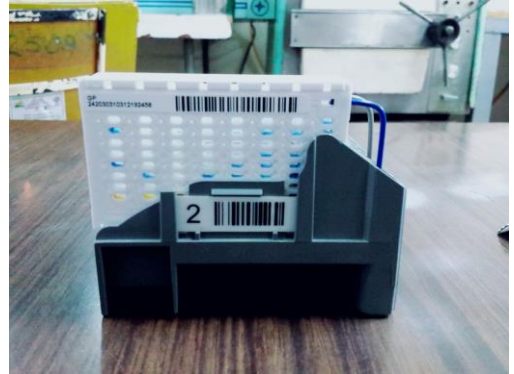


Fig. N° 2. Tarjetas del Vitek 2 Compact



Fig. N° 3. Realización del pool bacteriano



Fig. N° 4. Calentamiento del pool en ThermoBlock

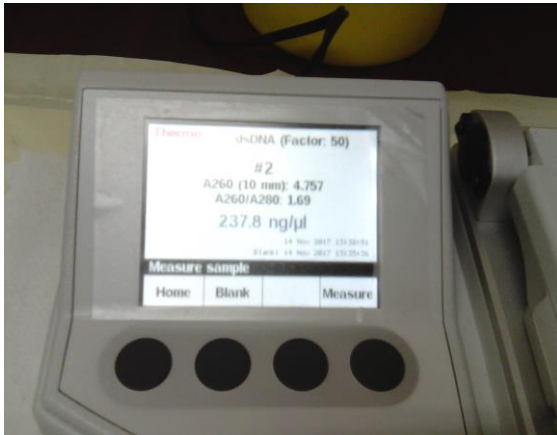


Fig. N° 5. Cuantificación de ADN en Nanodrop

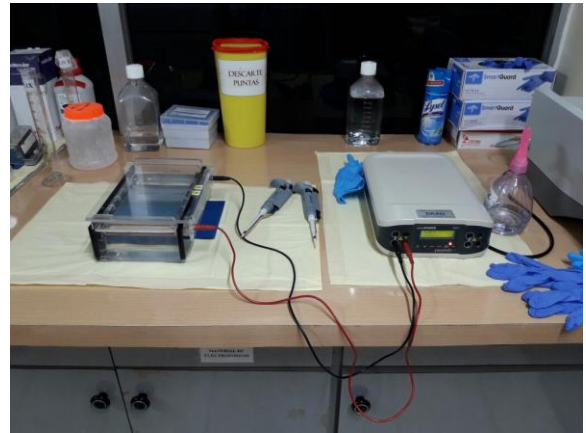


Fig. N° 6. Cámara de Electroforesis



Fig. N° 7. Cámara UV e Impresora

Figura. N° 8.- Resultado de laboratorio. PCR del gen *mecA* y *nuc*.



*Amplificación del gen *mecA* mediante PCR, aproximadamente 222 pb y *nuc* 281 pb. Pozos: 1, Marcador molecular 100 pb ADN Ladder, 2, control negativo mezcla de PCR sin ADN, 3, control positivo *nuc* ATTC 25923, 4 y 5, control positivo *mecA* CCUG 35601, de 6-12, *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes atendidos en el hospital y 10 Mx invalidada por *nuc* negativo.*

Figura. N°. 9: Resultado de laboratorio. PCR de las subunidades *Luk-S* y *Luk-F*



Amplificación de las subunidades que codifican PVL mediante PCR, Luk-F 509 pb y Luk-S 572 pb. Pozos: 1, Marcador molecular 100 pb ADN Ladder, 2, control positivo CCUG 35601, 3, control positivo interno (ORSA 17111) de 4-16, Staphylococcus aureus aislados de pacientes atendidos en el hospital. 17, control negativo, 16, C+, 17, CI.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
NICARAGUA-MANAGUA
UNAN-MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO “RUBEN DARIO”
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD
” LUIS FELIPE MONCADA”
DEPARTAMENTO DE BIOANALISIS CLINICO**



FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS



La presente ficha pretende recoger información acerca de las cepas de *Staphylococcus aureus* con fenotipo de resistencia a Oxacilina, previamente identificadas con el Sistema Vitek 2 Compact, en el Hospital Solidaridad en la ciudad de Managua en el periodo comprendido de Enero a Octubre de 2017, cabe mencionar que no contiene hoja de consentimiento informado, ya que no se trabajara con los pacientes atendidos en el hospital, sino con microorganismos aislados de diferentes muestras clínicas.

No de Expediente:	Fecha:	Sexo: M__ F:___
Tipo de muestra:	Salas:	Edad:

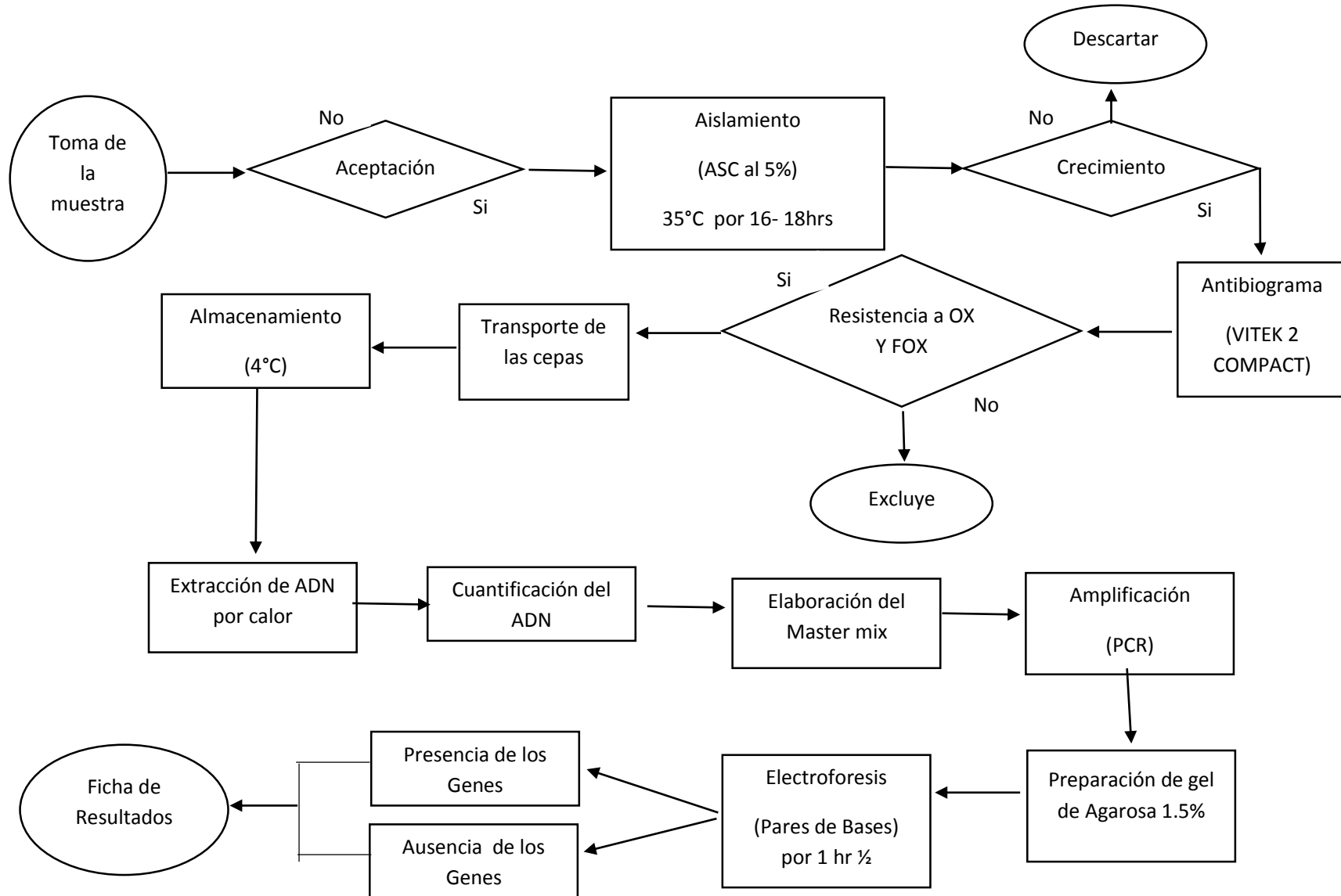
Resultados del Sistema Vitek 2 Compact

Cefoxitin Screen	R__ S__	Linezolid	R__ S__	Penicilina G	R__ S__
Ciprofloxacina	R__ S__	Moxifloxacina	R__ S__	Tetraciclina	R__ S__
Clindamicina	R__ S__	Nitrofurantoina	R__ S__	Tigeciclina	R__ S__
Eritromicina	R__ S__	Oxacilina	R__ S__	Trimetropin	R__ S__
				Sulfametoxazol	
Gentamicina	R__ S__	Quinupristina/D alfopristina	R__ S__	Vancomicina	R__ S__
Levofloxacina	R__ S__	Rifampicina	R__ S__		

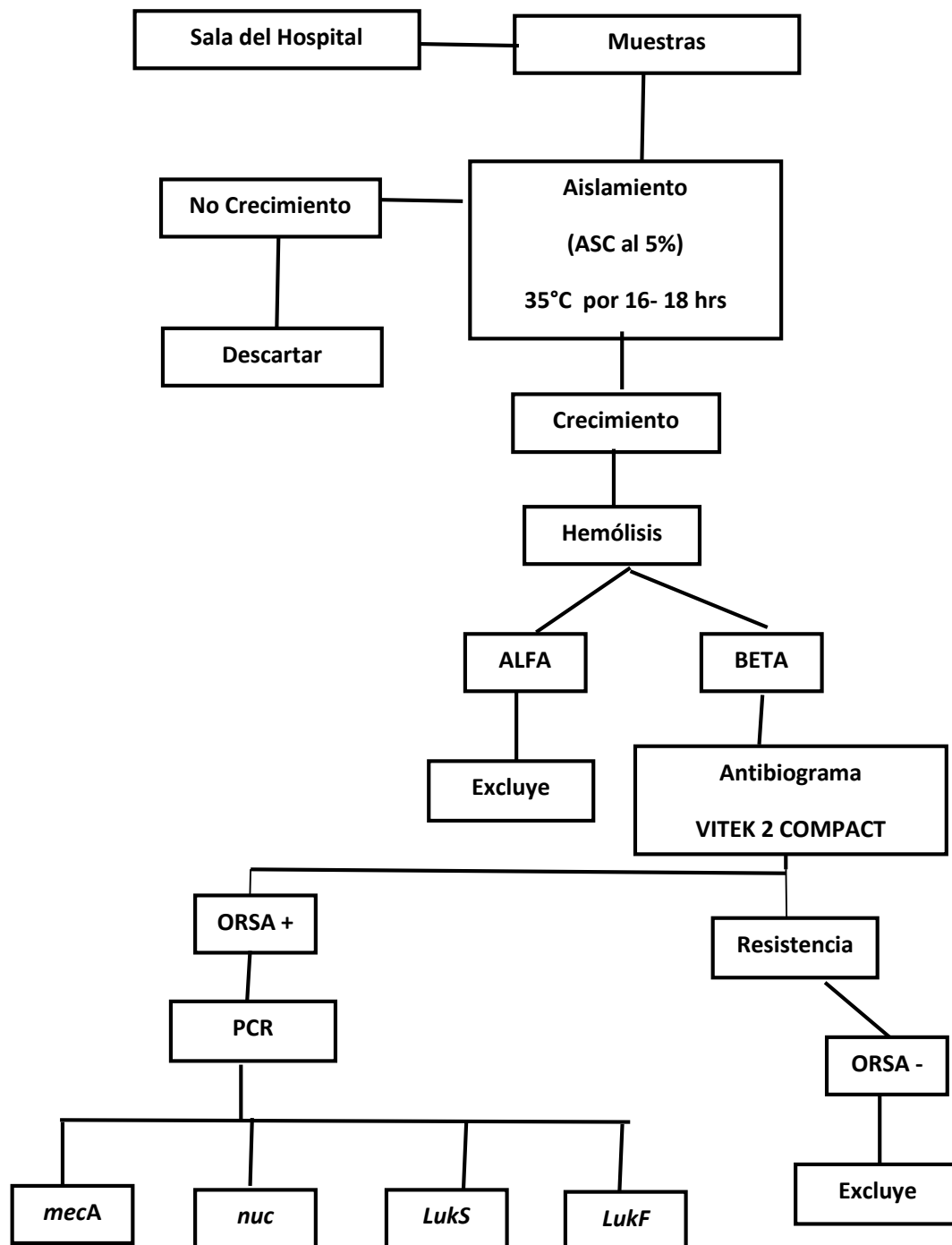
Observaciones:

 <p>Resultados de Laboratorio de Biología Molecular “Ma. Elmer Cisneros <i>in memoriam</i>” POLISAL- UNAN-MANAGUA</p> 		
No de Expediente:		Fecha:
Tipo de muestra:		Sala:
Resultados	Presencia	Ausencia
<i>mecA</i>		
<i>nuc</i>		
<i>Luk-S</i>		
<i>Luk-F</i>		
Observaciones		

Flujograma para la determinación de los genes *mecA*, *nuc* y subunidades *Luk-S* y *Luk-F*



Algoritmo para la detección de *mecA*, *nuc* y subunidades *Luk-S* y *Luk-F* en aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA)



Presupuesto

Nombre del Artículo	Unidad de Medida	Cantidad	Costo	Total
Guantes estériles	Caja	2	\$ 5	\$ 10
Platos Petri	Bolsa de 10 unidades	1	\$ 61	\$ 61
Agar TSA	Frasco 200 ml	1	\$ 53	\$ 53
Sangre de carnero	Bolsa (500ml)	1	\$ 100	\$ 100
Agar Muller Hilton	Frasco de 500 mg	1	\$ 150	\$ 150
Caldo leche 5%	Frasco de (100ml)	1	\$ 145	\$ 145
Asas bacteriológicas desechables	Paquete de 10 asas	10	\$ 4	\$ 40
Puntas (10 – 50 ul)	Caja	10	\$ 5	\$ 50
Puntas estériles para pipetas (150 – 200 ul)	Caja	10	\$ 5	\$ 50
Taq polimerasa	Paquete	1	\$ 395	\$ 395
TBE 10x	Frasco de 1 L	1	\$ 300	\$ 300
Bromuro de Etidio	Frasco de 20 ml	1	\$ 150	\$ 150
Primers	ul	600	\$ 600	\$ 600
Kit de PCR, dNTPs,	Caja	1	\$ 228	\$ 228
Marcador molecular Loading	Caja	1	\$ 243	\$ 243
Agua sigma	Litro	1	\$ 250	\$ 250
Agarosa	Frasco de 100 g	1	\$ 350	\$ 350
Tubos de PCR	Caja	1	\$ 180	\$ 180
Total				\$ 4,085

Glosario

- **Gen:** Es un segmento corto de ADN, que informa a un microorganismo cuando producir una proteína específica.
- **Plásmidos:** Son moléculas de ADN extracromosómicos, circular o lineal que pueden replicarse de forma independiente en una bacteria.
- **Transposones:** Secuencia de ADN, que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula.
- **Gen MecA:** Es el gen que le proporciona resistencia a meticilina y es localizada en el cromosoma bacteriano, que codifica la síntesis de la PBP2a.
- **Gen nuc:** Es el gen confirmatorio de una cepa *Staphylococcus aureus*, ya que son los únicos productores de nucleasas.
- **Gen PVL:** Es el gen que induce la degranulación de los leucocitos polimorfonucleares y libera a mediadores de la inflamación.
- **PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):** Esta técnica que amplifica exponencialmente un fragmento de ADN específico mediante la unión de cebadores o primers para después ser elongados y crear copias del fragmento.
- **Cebadores o Primers:** Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.
- **Cuantificación del ADN:** La espectrofotometría UV/Visible nos permite confirmar que contamos con cantidad suficiente de ácidos nucleicos (DNA/RNA) de calidad adecuada antes de llevar a cabo ensayos de PCR
- **Pureza:** Es la extracción que absolutamente se precipita eficientemente ácidos nucleicos poliméricos y deja atrás ácidos nucleicos monoméricos y de cadena corta, incluyendo los ribonucleótidos del tratamiento con RNAsa en solución.
- **Gen *Luk-F*:** Región Final que conforma el gen de la leucocidina Valentine Pantón
- **Gen *Luk-S*:** Región Inicial que conforma el gen de la leucocidina Valentine Pantón

}