



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

“OCURRENCIA DE GENES *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, EN GENOMAS DE CEPAS CLÍNICAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN LA MUCOSA ORAL SANA DE ESCOLARES DE 6 A 12 AÑOS DE LA COMUNIDAD DE OÑACAPAC-SARAGURO-ECUADOR, 2019”

TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE ODONTÓLOGO

AUTOR: RODRÍGUEZ CHALCO, ANA FABIOLA

DIRECTOR: Dra. MSc. ORELLANA BRAVO, PAOLA PATRICIA

CUENCA-ECUADOR

2020

*Yo me gradué en los
50 años de La Cato!*

DECLARACIÓN:

Yo, Rodríguez Chalco, Ana Fabiola declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado la totalidad de las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento; y eximo expresamente a la UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

La UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y normatividad institucional vigente.



.....

Autor/a: Ana Fabiola Rodríguez Chalco

C.I.: 0104919600

CERTIFICACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

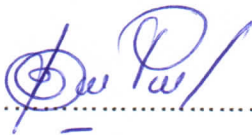
Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado **“OCURRENCIA DE GENES *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, EN GENOMAS DE CEPAS CLÍNICAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN LA MUCOSA ORAL SANA DE ESCOLARES DE 6 A 12 AÑOS DE LA COMUNIDAD DE OÑACAPAC-SARAGURO-ECUADOR, 2019”**, realizado por **RODRÍGUEZ CHALCO, ANA FABIOLA**, ha sido inscrito y es pertinente con las líneas de investigación de la Carrera de Odontología, de la Unidad Académica de Salud y Bienestar y de la Universidad, por lo que está expedito para su presentación.

Cuenca, Mayo 2020



Dra. Paola Orellana Bravo
MAGISTER EN BIOTECNOLOGIA
Libro 3 Foto 332 N°964

Dra. MSc. Paola Patricia Orellana Bravo

DPTO. DE INVESTIGACIÓN ODONTOLOGÍA

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

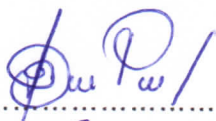
Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado “**OCURRENCIA DE GENES *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, EN GENOMAS DE CEPAS CLÍNICAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN LA MUCOSA ORAL SANA DE ESCOLARES DE 6 A 12 AÑOS DE LA COMUNIDAD DE OÑACAPAC-SARAGURO-ECUADOR, 2019**”, realizado por **RODRÍGUEZ CHALCO, ANA FABIOLA**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, Mayo 2020



Dra. Paola Orellana Bravo
MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA
Libro 3 Folio 332 N°964

Tutora: Dra. MSc. Paola Patricia Orellana Bravo

DEDICATORIA.

Esta tesis está dedicada a mis padres quienes con su amor me ayudaron y apoyaron incondicionalmente para que yo pueda cumplir este sueño, a mi hermana quien fue un soporte para mí y con mucho esfuerzo me supo guiar en todo momento.

EPÍGRAFE.

“La perfección no se alcanza cuando no hay nada que añadir, si no cuando no hay
nada que quitar”

Antoine de Saint-Exupéry, 1980

AGRADECIMIENTOS:

Le agradezco a Dios por guiarme sabiamente durante mi vida, a mi tutora quien confió en mí y me permitió realizar este trabajo investigativo, a mis padres y hermanos por todo el apoyo que me dieron y a mis sobrinas quienes me dieron fortaleza para seguir adelante y finalmente a mis amigas quienes estuvieron conmigo durante todo este proceso.

LISTA DE ABREVIATURAS

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

TSST: Toxina del Síndrome del Shock Tóxico.

IL-1: Interleucina 1.

IL-6: Interleucina 6.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral.

hlg: Hemolisina gamma.

Se: Enterotoxina estafilocócica.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

sea: Enterotoxina estafilocócica a.

agr: Regulador genético accesorio.

sar: Regulador accesorio estafilocócico.

IAE: Intoxicación alimentaria estafilocócica.

Ng: Nanogramo.

UFC/g: Unidad Formadora de Colonias/gramo.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

QS: Quorum Sensing.

ÍNDICE

RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO I.....	15
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	15
1 PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
2 JUSTIFICACIÓN.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MARCO TEÓRICO	18
4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
4.1.1 Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
4.1.2 Colonización.....	19
4.1.3 Cultivo	19
4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> en la cavidad oral	20
4.2.1 Infecciones en la cavidad oral.....	20
4.3 Factores de virulencia.....	21
4.3.1 Hemolisinas	22
4.3.2 Enterotoxina Estafilocócica (SE)	23
4.4 Reacción en cadena de la polimerasa	25
4.5 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	27
5 HIPÓTESIS	30
CAPÍTULO II.....	31
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL.....	31
1. MARCO METODOLÓGICO.....	32
2. POBLACIÓN Y MUESTRA	32
2.1. Criterios de selección.....	32
2.1.1. Criterios de inclusión.....	32
2.1.2. Criterios de exclusión.....	32
3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	33
4. INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	34
4.1. Instrumentos documentales.....	34
4.2. Instrumentos mecánicos.....	34

4.3. Materiales y Equipos	34
4.4. Recursos.	35
5. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS.....	35
5.1 Ubicación espacial.....	35
5.2 Ubicación temporal.....	35
5.3 Procedimientos de la toma de datos.	35
6 PROCEDIMIENTOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS	41
7 ASPECTOS BIOÉTICOS.....	41
CAPÍTULO III.....	42
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	42
1. RESULTADOS	43
2. DISCUSIÓN.....	46
3. CONCLUSIÓN.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. Medio de transporte Stuart.....	35
Fig.2. Agar Sal Manitol.....	36
Fig.3. Amplicones de los genes.....	38
Fig.4. Gel de agarosa y colocación de Syber Safe.....	38
Fig.5. Cámara de electroforesis.....	39
Fig.6. Transiluminador UV.....	39
Fig.7. Amplificación de la secuencia del gen <i>hlg-1</i> que codifica para Hemolisina.....	40
Fig.8. Amplificación de la secuencia del gen <i>hlg-2</i> que codifica para Hemolisina.....	40
Fig.9 Amplificación de la secuencia del gen <i>sea</i> que codifica para Enterotoxina.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Presencia del gen <i>hlg-1</i> que codifica para Hemolisina 1.....	43
Tabla N°2. Presencia del gen <i>hlg-2</i> que codifica para Hemolisina 2.....	43
Tabla N°3. Presencia del gen <i>sea</i> que codifica para Enterotoxina.....	44
Tabla N°4. Genes <i>hlg-1</i> , <i>hlg-2</i> y <i>sea</i> que se presentan en la misma cepa de <i>S. aureus</i>	44

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, que codifican para Hemolisinas y Enterotoxinas en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral de niños de Oñacapac-Saraguro. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Estudio descriptivo de temporalidad retrospectivo, se obtuvieron 110 muestras tomadas de la cavidad oral de niños de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro; 17 de estas muestras fueron positivas para *S. aureus*. Las reacciones de PCR incluyeron la detección de los genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, que codifican para Hemolisinas y Enterotoxinas de esta bacteria. Para la recolección de datos se utilizó una ficha de registro de extracción de ADN y PCR en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Católica de Cuenca. **RESULTADOS:** De acuerdo al total de las cepas analizadas, se observó la presencia de los genes que codifican para Hemolisinas: el gen *hlg-1* con un 47%, el gen *hlg-2* con un 12% y el gen *sea* que codifica para Enterotoxina no se detectó en las muestras positivas de *S. aureus*, también se encontró que la cepa 48 y 113 presentan los dos genes *hlg-1* y *hlg-2* que codifican para Hemolisinas. **CONCLUSION:** De las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac- Saraguro la frecuencia del gen *hlg-1* fue de un 47%, *hlg-2* de un 12%, ninguna cepa presento el gen *sea*, también se determinó la existencia de 2 genes a la vez, *hlg-1* y *hlg-2*, en las cepas 48 y 113.

PALABRAS CLAVES: *Staphylococcus aureus*, Hemolisina, Enterotoxina, Factores de virulencia.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the frequency of the virulence genes *hlg-1*, *hlg-2* and *sea*, that encode Hemolysins and Enterotoxins in oral strains of *Staphylococcus aureus* in the oral mucosa of children from Oñacpac-Saraguro. **MATERIALS AND METHODS:** Descriptive study, retrospective temporality, 110 samples taken from the oral cavity of children aged 6 to 12 years of age from the community of Oñacpac-Saraguro were obtained; 17 of these samples were positive for *S. aureus*. PCR reactions included detection of the *hlg-1*, *hlg-2* and *sea* genes that encode for Hemolysins and Enterotoxins of this bacterium. For data collection, a DNA extraction and PCR extraction record was used at the Laboratory of Genetics and Molecular Biology of the Catholic University of Cuenca. **RESULTS:** According to the total of the strains analyzed, the presence of the genes coding for Hemolysins was observed: the *hlg-1* gene with 47%, the *hlg-2* gene with 12% and the gene *sea* encodes Enterotoxin was not detected. Detected in the positive samples of *S. aureus*, it was also found that the strain 48 and 113 have the two genes *hlg-1* and *hlg-2* that code for Hemolysins. **CONCLUSION:** Of the oral strains of *Staphylococcus aureus* isolated in children from Oñacpac- Saraguro, the frequency of the *hlg-1* gene was 47%, *hlg-2* 12%, no strain presented the gene *sea*, the existence of 2 genes was also determined at the same time, *hlg-1* and *hlg-2*, in strains 48 and 113.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*, Hemolysin, Enterotoxin, Virulence factors.

INTRODUCCIÓN.

Staphylococcus aureus, es el principal patógeno de su grupo que desarrolla infecciones de diversos tipos, tanto de origen comunitario como hospitalario ⁽¹⁾. Es un microorganismo Gram positivo, que se encuentra dentro de la familia de los cocos; responsable de diversas enfermedades como sepsis, abscesos, choque tóxico, enfermedades nosocomiales y es causante de brotes de intoxicación alimentaria. Dentro de la cavidad oral están asociadas a infecciones periodontales o periapicales por su amplio espectro de virulencia y resistencia a los antibióticos ⁽²⁾.

S. aureus presenta toxinas que se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, tenemos a la Hemolisina gamma que tiene la capacidad de lisar los eritrocitos, macrófagos y neutrófilos; está constituida por dos componentes, las proteínas S y F, que están codificadas por los genes *hlg-1* y *hlg-2*, estos genes se localizan en el ADN de la cepa. Por otro lado, tenemos a la Enterotoxina con su gen *sea*, que está asociada a los brotes de intoxicación alimentaria ⁽³⁾.

En la actualidad se emplean protocolos para la detección molecular de los genes de virulencia de *S. aureus* por medio de la reacción de cadena de polimerasa, que es una técnica biotecnológica, que se utiliza para diferentes muestras biológicas ⁽³⁾.

En nuestro país no se ha encontrado estudios recientes sobre este tema de investigación.

El propósito de este estudio es analizar la ocurrencia de genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, en genomas de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacpac-Saraguro-Ecuador, 2019.

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

1 PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Staphylococcus aureus es un agente causal de infecciones de piel, endovasculares, nosocomiales, neumonías, osteomielitis y sepsis ⁽⁴⁾. Su diversidad patogénica le permite colonizar, adaptarse y sobrevivir en distintos tejidos celulares durante la infección. Presenta una variedad de antígenos celulares y extracelulares, asimismo, tiene la capacidad de portar genes y producir toxinas como Leucocidina de Panton Valentine, Hemolisinas y Enterotoxinas, estos factores de virulencia contribuyen a una progresión más rápida y compleja de la enfermedad bajo determinados factores ambientales, que le permiten al hospedero una mejor adaptación ⁽⁵⁾. No se conoce la ocurrencia de genes de virulencia, surgió por la existencia de *Staphylococcus aureus* en niños de Saraguro de la comunidad de Oñacapac. Por ello se planteó la siguiente interrogante: ¿Cuál es la ocurrencia con la que en los genomas de cepas orales se detectan los genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea* de *Staphylococcus aureus* que colonizan la cavidad oral de niños de Oñacapac-Saraguro?

2 JUSTIFICACIÓN.

La presente investigación estudia la ocurrencia de genes de virulencia en cepas orales de *Staphylococcus aureus*, causantes de infecciones cutáneas, infecciones endodónticas, abscesos periapicales, neumonía, osteomielitis. Esta investigación busca la ocurrencia de los genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, que codifican para Hemolisinas y Enterotoxinas en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro. La relevancia humana del estudio, se relaciona con los factores de riesgos que este microorganismo puede ocasionar en personas inmunodeprimidas. En base a la relevancia social, es necesaria la promoción y la prevención sobre la salud bucodental en la población de Oñacapac-Saraguro. La relevancia científica se sabe que hasta el momento no hay estudios realizados en nuestro país y mucho menos en el cantón Saraguro. El tema de investigación es de interés personal, considerando que se presenta como parte de los requisitos del programa académico de Odontología para la titulación. Por lo tanto, este estudio está dentro de las líneas de investigación de la Universidad Católica de Cuenca y dentro de los tópicos de investigación en la carrera de Odontología, por lo que concuerda con las políticas institucionales de investigación.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, que codifican para hemolisinas y enterotoxinas en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral de niños de Oñacapac-Saraguro.

3.2 Objetivos específicos.

- Cuantificar la frecuencia del gen *hlg-1*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro mediante PCR.
- Cuantificar la frecuencia del gen *hlg-2*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro mediante PCR.
- Cuantificar la frecuencia del gen *sea*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro mediante PCR.
- Cuantificar la frecuencia de cepas que presentan dos y tres genes simultáneamente.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 *Staphylococcus aureus*

Es un patógeno de la familia de los cocos, Gram positivo, anaerobio facultativo que se encuentra agrupado en forma de racimos de uva, presenta un tamaño de 0.5 a 1.5 micras, no son móviles y no crean esporas. Produce catalasa, la cual evita la formación de radicales tóxicos y facilita la transformación de dióxido de hidrógeno en agua y oxígeno, se desarrolla en casi todos los medios bacteriológicos a una temperatura de 37°C, tiene actividad metabólica, se manifiesta desde un color blanco hasta un amarillo intenso y llega a los tejidos más profundos ⁽⁶⁾.

S. aureus causa infecciones adquiridas tanto en hospitales como la comunidad; en los adultos se presenta de manera permanente entre un 20 y 30% en el vestíbulo nasal y la orofaringe y el 50% de manera intermitente; en ocasiones se produce la infección por la misma cepa que coloniza sus fosas nasales ⁽⁷⁾.

4.1.1 Características generales de *Staphylococcus aureus*

S. aureus se adhiere a varias superficies por medio de una matriz polimérica extracelular, llamada biopelícula que protege al microorganismo frente a los antibióticos y el sistema inmunitario ⁽⁸⁾.

Los fagocitos ejercen una función importante en defensa al huésped contra la infección por *S. aureus*, sin embargo, este agente ha desarrollado varias estrategias para evadir el sistema inmune del ser humano, un componente clave para resistir el ataque de los fagocitos del huésped es la producción de toxinas citolíticas ⁽⁹⁾.

Diversas cepas presentan cápsulas que eliminan la fagocitosis de las células blancas, también poseen coagulasa (elemento de aglutinación en el área de la pared celular); la secreción de coagulasa y proteínas se relacionan y activan la protrombina del factor hemostático del huésped, la producción de aglutininas en la superficie bacteriana y las proteínas se adhieren a la fibrina polimerizada e inician el proceso de virulencia ocasionando lesiones de absceso. Los patógenos involucran un amplio espectro de factores secretados encargados de la destrucción de células inmunes alterando las lesiones de absceso en exudado purulento, de forma que *Estafilococo aureus* se extiende para elaborar nuevas lesiones infecciosas o infectar nuevos huéspedes ⁽¹⁰⁾. También tiene la capacidad de desarrollarse en los tejidos más profundos causando infecciones invasivas y potencialmente mortales como endocarditis, osteomielitis y sepsis; de la misma manera puede activar enfermedades impulsadas por exotoxinas, como intoxicación alimentaria ⁽¹¹⁾.

4.1.2 Colonización

S. aureus, coloniza, crece y se multiplica en las fosas nasales, especialmente en el vestíbulo nasal que está en relación con el epitelio escamoso húmedo del tabique adyacente al orificio nasal, sin embargo, puede estar en diferentes áreas del cuerpo como la nasofaringe, piel y con menor frecuencia en el tracto gastrointestinal y genitourinario ⁽¹²⁾. Estudios recientes demostraron que también puede colonizar la garganta de los niños y la cavidad bucal, considerando que son un reservorio relevante de la dispersión de gotitas producidas por el habla, tos y estornudo ⁽¹³⁾.

Entre los factores que influyen la colonización resaltan los poblacionales, los sociodemográficos y los genéticos, también varía mucho dependiendo la raza, el sexo y la edad. Los individuos de raza blanca, de sexo masculino y de edades menores muestran mayores índices de colonización. La población pediátrica presenta la prevalencia más alta de colonización entre el 11,9% y el 53,8% de acuerdo al grupo etario; de la misma manera, las infecciones ocurren con más frecuencia en personas colonizadas con el microorganismo permaneciendo el portador por largo tiempo con un riesgo de infección subsecuente ⁽¹⁴⁾.

Su capacidad patogénica le permite colonizar, adaptarse y sobrevivir en distintos tejidos celulares durante la infección; la producción de factores de virulencia crea una resistencia a los antimicrobianos, mientras que otros codifican su plasticidad genética. De tal manera que todos estos componentes contribuyen a una progresión más rápida y compleja de la enfermedad bajo determinados factores ambientales que le proporcionan una mayor adaptación al hospedero ⁽⁵⁾.

La colonización se ha clasificado en tres tipos:

- Portador resistente: Individuos que colonizan una cepa específica durante largos periodos.
- Portadores intermitentes: Sujetos cuyas cepas colonizadoras evolucionan con frecuencia.
- No portadores: Sujetos que no han tenido contacto con *S. aureus* ⁽¹²⁾.

4.1.3 Cultivo

Estafilococos aureus, se desarrolla en medios de cultivo a temperaturas de 37°C pero crean un mejor pigmento a una temperatura ambiente de 20 a 25°C bajo condiciones aerobias o microaerófilas. Suelen crear colonias de color gris a un amarillo profundo y en medios sólidos toma forma redonda, lisa y brillante, crece en medios como: agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro corazón ⁽¹⁵⁾.

El medio de cultivo selectivo utilizado para excluir el microorganismo, es el agar sal manitol, el cual inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas, por su alto contenido de sal y a su vez se realiza un reconocimiento presuntivo basándose en la coloración amarilla de las colonias.

S. aureus se puede transformar en manitol con la elaboración de ácido, la acidificación altera el color del medio que invierte de rosa pálido a amarillo. En el cultivo de muestras estériles se emplean en caldos de enriquecimiento como tioglicolato o caldo cerebro corazón ⁽¹⁵⁾.

4.2 *Staphylococcus aureus* en la cavidad oral

Puede estar presente en la microbiota de la cavidad oral y causar infecciones, aunque, no desempeñan un papel importante como patógeno intraoral pero puede estar involucrado en ciertas patologías como la queilitis angular, mucositis oral, periodontitis, candidiasis, úlceras crónicas e infecciones profundas que afectan hasta el cuello, está es la más frecuente en las infecciones orofaciales de origen odontogénico ^{(16),(17)}. Este patógeno puede estar aislado con frecuencia en la cavidad oral de niños, adultos mayores y personas que presenten enfermedades sistémicas e inmunosuprimidos ^{(18),(19)}.

El tratamiento ortodóntico u ortopédico incrementa los niveles de levaduras y de *Staphylococcus aureus* en la boca, ya que el uso de estos aparatos dentales pueden actuar como una red para que los microorganismos se adhieran a su superficie, ya sean en materiales de acrílico, de vidrio, compuestos o selladores convirtiéndose así en un nicho para la colonización, este es un factor de riesgo en enfermedades periodontales y gingivales por la acumulación de placa que presentan alterando la microbiota oral ⁽²⁰⁾.

4.2.1 Infecciones en la cavidad oral.

S. aureus se ha encontrado en infecciones endodónticas, abscesos y en tejidos óseos de los huesos maxilares. En niños menores de 2 años, suele lesionar el maxilar superior a la altura de molares temporarios y en niños mayores afectan usualmente al maxilar inferior, ya que se desarrolla rápidamente por el contenido medular y se benefician ante enfermedades sistémicas. De la misma manera han sido aislados de la saliva y de pacientes con estomatitis y parotiditis ⁽³⁵⁾.

Se localiza en biopelículas supra y subgingivales de pacientes con gingivitis y periodontitis. En pacientes con enfermedad periodontal, el tratamiento sistémico con tetraciclinas provoca el sobre desarrollo, es decir, una superinfección, de *Estafilococo aureus*, *Streptococos spp.* y *Cándida spp.* en el ecosistema periodontal ⁽³⁵⁾.

En los sitios con periimplantitis se localizan una mayor proporción de *Estafilococcus aureus* en un 15%, periodontitis en 1,2% y gingivitis en 0,06%, factor que podría demostrar su posible intervención en la falla de osteointegración de los implantes ⁽³⁵⁾.

4.3 Factores de virulencia.

Son aquellos que cumplen la función de intervenir en el proceso de infección de una enfermedad y codificar los genes que son controlados por una estructura compleja de factores de regulación transcripcional. Por otra parte, la virulencia tiene la capacidad de proporcionar adhesinas y formar biopelículas en cepas donde los microorganismos se agregan, colonizan y crecen protegidos de la acción de antimicrobianos y anticuerpos en defensa al hospedero. Varios de los factores de virulencia se han desarrollado para atacar mecanismos inmunes, principalmente neutrófilos y macrófagos. Dependiendo del sitio de infección el grupo de factores de virulencia van a causar la enfermedad, por medio de la red regulatoria que es la clave de la infección por *S. aureus*, permitiendo la adaptación del microorganismo y la evolución durante la infección ⁽¹⁶⁾.

En medios de cultivo los factores de virulencia están vinculados a la superficie externa y se manifiestan en la fase logarítmica de crecimiento. Comenzando por el reconocimiento de las estructuras del huésped por parte de las adhesinas para facilitar su colonización haciendo que se multipliquen los microorganismos y la secreción de toxinas y enzimas ⁽⁸⁾, sin embargo, para alcanzar la constancia intracelular se debe impedir la respuesta inmune e inflamatoria del huésped ⁽¹⁶⁾.

El Quorum Sensing (QS) es un sistema de supervivencia e invasión al huésped que se encuentra organizado por la comunicación célula-célula. El QS está formado por proteínas producidas por las bacterias que se denominan como autoinductores con la ayuda de los factores ambientales puede activar un gran número de genes ⁽⁴⁾.

El sistema de QS más analizado en *Staphylococcus aureus* se denomina regulador de genes accesorios o *agr*, que cumple un factor importante en las distintas fases de elaboración de la infección, y especialmente en la formación de biocapas ⁽⁴⁾.

Los factores se han clasificado en tres categorías:

1. Proteínas, involucradas en la adhesión celular del huésped materiales extracelulares, como la coagulasa.
2. Enterotoxinas, TSST-1, la Leucocidina de Pantón Valentine, se encuentran involucradas en los mecanismos de evasión de las defensas del huésped.
3. Hemolisinas, se involucra en la invasión al huésped y penetración de los tejidos ⁽²¹⁾.

4.3.1 Hemolisinas

Se han reconocido cuatro hemolisinas: alfa, beta, gamma y delta; que son sintetizadas por las cepas de *S. aureus*. Poseen capacidad hemolítica y citolítica, actúan sobre ciertas células del huésped como leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos ⁽²²⁾.

La hemolisina se produce como monómero y se oligomeriza formando poros; tienen la capacidad de destruir la membrana de los monocitos y promover la secreción de IL-1, IL-6 y TNF- α , también inducen el flujo de las células del huésped. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual las hemolisinas de *Estafilococos aureus* inician las respuestas inmunes del huésped ⁽²²⁾.

4.3.1.1 Hemolisina gama

Son toxinas bicomponentes que contienen dos proteínas secretadas por separado, el componente de clase S y clase F, que son polipéptidos de liberación lenta y rápida en una columna de intercambio iónico; se han denominado así por su movilidad electroforética, actúan sinérgicamente en células polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, neutrófilos y es capaz de lisar a los eritrocitos ⁽²³⁾, es decir, que la actividad biológica resulta de la combinación de un componente de clase S con un componente de clase F, entonces tenemos que cada toxina en el grupo de hemolisina gamma podría dar lugar a dos toxinas biológicamente activas. El efecto tóxico depende de la acción sinérgica de las proteínas de clase S y F sobre los neutrófilos o eritrocitos humanos. La hemolisina gamma es desarrollada por más del 99% de las cepas de *S. aureus* ⁽²⁴⁾, sin embargo, no es identificable en las placas de agar sangre, debido al efecto inhibitor del agar sobre la actividad de la toxina, se piensa también que tiene un efecto de inducción sobre la liberación de mediadores de la inflamación ⁽¹⁷⁾.

Varios estudios han demostrado que los componentes de estas proteínas surgen de dos locus distintos dentro del genoma de *S. aureus*, con resultado de las dos toxinas. En las cepas que contienen ambas citotoxinas, están disponibles tres componentes S (*hlgA*, *hlgBC* y *LukS-PV*) y dos componentes F (*hlgB* y *LukF-PV*). Un alto nivel de compatibilidad está presente entre estos productos genéticos. Los genes de la hemolisina gamma, se reproducen de un locus único, situado en un fragmento cromosómico; los extractos de un clon que contiene este fragmento fueron hemolíticos y leucotóxicos. Los cuadros de lectura en orden se denominan *hlgA*, *hlgC* y *hlgB*, que corresponden a genes de la hemolisina gamma previamente identificados. El gen *hlgC* y *hlgB* se reproducen en un solo ARNm, mientras que el gen *hlgA* se expresa por separado. Las tres proteínas codificadas se interpretan como una única secuencia, que se separan para formar la proteína de subunidad madura secretada. Los productos

maduros tienen pesos moleculares de 32,000 para el gen *hlgA*, 32,500 para el gen *hlgC* y 34,000 para el gen *hlgB*. El gen *hlgA* se ha denominado el componente g1, y el gen *hlgB* y *hlgC* juntas forman el componente g2 de la hemolisina gamma. Mediante los estudios químicos e inmunológicos de los cuatro componentes y la clonación de secuencia de nucleótidos de los genes, se encontró que la leucocidina y la hemolisina comparten el componente *LukF* o *hlg-1*, en las dos toxinas y la especificidad de ambas toxinas depende del componente *LukS* y *hlg-2* ⁽²⁵⁾.

El espectro de actividad de la toxina gamma contra los eritrocitos susceptibles es diferente al de las otras toxinas que dañan la membrana estafilocócica, esta lisa los eritrocitos, los leucocitos y es citotóxica para las células linfoblásticas humanas ⁽²⁶⁾.

La hemolisina gamma se puede purificar por la adsorción discontinua en hidroxapatita y elución con fosfato de potasio, los componentes S y F pueden dividirse eluyendo con dos tampones de fosfato de potasio diferentes ⁽²⁶⁾. La antigenidad de la toxina gamma se ha documentado apropiadamente ya que se mostró que el anticuerpo contra la gamma-lisina interactúa con la toxina para provocar una sola línea de precipitación después de la difusión en agar. No hubo evidencia de reacción cruzada entre la antitoxina gamma y otras citolisinas estafilocócicas. También se indicó que la evaluación de gamma-antilisina en humanos logra ser útil en el diagnóstico de osteomielitis estafilocócica ⁽²⁷⁾.

4.3.2 Enterotoxina Estafilocócica (SE)

Son proteínas de intoxicación alimentaria que pueden estar implicados en infecciones de los individuos como la gastroenteritis; se la conoce también como superantígenos y toxinas pirogénicas; puesto que tienen una acción biológica de pirogenicidad y superantigenicidad ^{(15),(28)}. La integración inicial está dada por el receptor del linfocito T y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-II) de la célula que presenta el antígeno; se estimula por mecanismos superantígenos del sistema inmunitario y produce una importante pérdida de agua, sin embargo, son proteínas simples termotolerantes, de bajo peso molecular que se transforman en un precursor proteico con una secuencia aminoterminal ⁽²⁸⁾.

Es una familia de más de 20 enterotoxinas estafilocócicas y estreptocócicas diferentes, que intervienen en una relación filogenética, estructura, función y homología de secuencia comunes. En la actualidad, se han identificado 23 genes de enterotoxinas y los principales detectados en intoxicaciones alimentarias son: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see*. Estas toxinas son proteínas básicas compuestas de aproximadamente 220–240 aminoácidos y tienen pesos moleculares similares de 25–30 kDa. La enterotoxina es

inalterable a la inactivación química, proteólisis y desnaturalización por ebullición, tiene propiedades higroscópicas, permaneciendo solubles en agua y en soluciones salinas ⁽³¹⁾.

Las enterotoxinas se originan en la fase posexponencial del desarrollo bacteriano y su proceso genético está dirigido por tres sistemas de regulación: el regulador genético accesorio, regulador accesorio estafilocócico, un sistema de represión catabólica, inclusive existe una relación entre la producción de coagulasa y la elaboración de SE por lo tanto, tenemos que gran parte de las cepas de *S. aureus* son productoras de coagulasa, la cual es la principal característica fenotípica que se debe examinar en los aislamientos procedentes de los alimentos y están asociadas a intoxicación alimentaria estafilocócica ⁽²⁹⁾.

La evolución de SE aumenta rápidamente a temperaturas apropiadas de 20–37°C y con un pH 4–7.4; las manifestaciones clínicas son náuseas, vómito, espasmo abdominal, diarrea, moco, sangre en el vómito y las heces, esto ocurre dentro de 2 a 6 horas después de haber ingerido alimentos contaminados y el cuadro suele mostrar un progreso favorable. La SE no actúa directamente sobre el tracto gastrointestinal, sino que afecta a las citocinas y metabolitos producidos por las células T, macrófagos, monocitos y mastocitos. Los niños y las personas que viven en sitios vulnerables son los más afectadas ya que al ingerir 100ng sufrirán de intoxicación alimentaria. Una de las características más importantes son que pueden persistir incluso después de que los alimentos se hayan procesado o cocinado. Los pacientes con esta enfermedad a menudo necesitan hospitalización, especialmente individuos inmunosuprimidos ⁽³⁰⁾. En algunas ocasiones *S.aureus* subsiste en los alimentos cocidos incluso cuando ya no resulte viable, es por esto que se debe analizar si se trata de aislamientos producidos por enterotoxinas ⁽³³⁾.

El sistema regulador se vincula con la capacidad que tiene el microorganismo en reproducir niveles aproximados a 10⁶ UFC/g, se manifiesta que la temperatura es un factor ambiental en el progreso de esta bacteria la cual ejerce un papel importante en la expresión de los genes de las enterotoxinas estafilocócicas. Dada la existencia de *S. aureus* en las fosas nasales y la piel de los individuos, es fundamental manifestar que los productores de alimentos que no usan adecuadamente guantes y mascarillas o no respetan con las normas de bioseguridad aumentan el riesgo de contaminación de los alimentos en los procesos de elaboración y comercialización ⁽³²⁾.

4.3.2.1 Enterotoxina estafilocócica A

Es una de las toxinas más frecuentes asociada a los brotes de intoxicación alimentaria por lo que es extremadamente potente; tan solo con una cantidad mínima de 100 ng es capaz de causar síntomas de intoxicación. Este acontecimiento radica en la gran susceptibilidad que presentan las plaquetas y los monocitos sobre esta toxina en las personas, presenta el 80% de intoxicación alimentaria y a diferencia de otras enterotoxinas, el gen *sea* no está regulado por el regulador genético accesorio (*agr*) o el regulador accesorio estafilocócico (*sar*)⁽²⁹⁾. Existen diferentes tipos de enterotoxinas en *Staphylococcus aureus* y algunos estudios concuerdan que el gen *sea* es el más relacionado con intoxicaciones alimentarias. Por otra parte, este gen es el más frecuente en las cepas de *S. aureus* de origen humano y por tanto también en los productos que requieren manipulación y están preparados para el consumo humano⁽³²⁾.

4.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Es la técnica de diagnóstico molecular más utilizado, presenta una duración de 2 a 3 horas para completar el protocolo⁽³³⁾. Es un procedimiento sencillo y rápido para la multiplicación de ADN, está presente en distintas muestras biológicas y obtiene millones de reproducciones de una determinada secuencia, también duplica filamentos de ADN celular a partir de un molde que funcione.

Las fases de PCR son:

- **Desnaturalización:** al calentar la muestra a una temperatura entre 94 y 96°C descompone los puentes de hidrógeno, es así que cada cadena forma una nueva cadena suplementada de ADN⁽³³⁾.
- **Alineamiento:** las cadenas de ADN que fueron separadas, se ordenan a la región que se va amplificar a una temperatura entre 40 a 60°C, lo que permitirá el alineamiento de los iniciadores⁽³³⁾.
- **Extensión del ADN:** Se incrementa la temperatura a 72°C para lo cual el ADN polimerasa se unirá a los iniciadores y empezará la replicación⁽³³⁾.

Las tres etapas se reanudan continuamente y en cada ciclo se amplifica dos cadenas complementarias, la cual va aumentando de manera proporcional una nueva copia y de esta millones de copias de fragmentos⁽³³⁾.

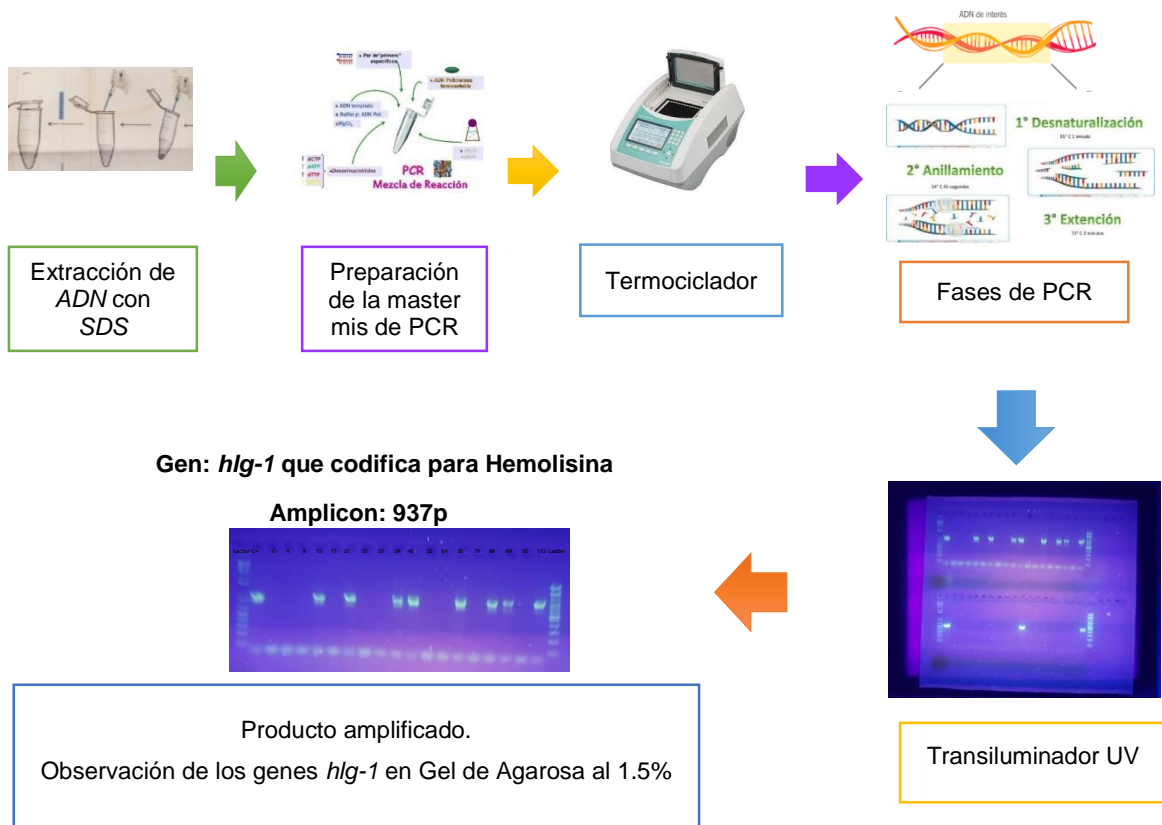


Gráfico 1. Multiplicación de ADN por PCR

4.5 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En el artículo de revista denominado, “Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, durante el año 2010”, de Rodríguez Acosta F, et al., presentaron un estudio de 50 aislados de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras clínicas de secreciones de piel, partes blandas o líquidos corporales de pacientes menores de 17 años. Los aislados contaban con datos de portación de Leucocidina de Pantón Valentine, el cual fue el factor de virulencia más frecuentemente detectado (58%), seguido de las hemolisinas alfa (16%) y beta (8%). Las enterotoxinas y las toxinas exfoliativas fueron menos frecuentes (0-2%), y no se detectaron genes codificantes de las enterotoxinas C y D.

Miyake et al., presentaron en su artículo de “Incidencia y caracterización de *Staphylococcus aureus* en las lenguas de los niños”, la evaluación de trescientos siete niños que presentaban enfermedades dentales, estos fueron examinados por su transporte oral de *Staphylococcus aureus*, el patógeno humano persistente más común. El 84% de ellos fueron positivos para estafilococos, y el 33% fueron positivos para *S. aureus*. Entre las 100 cepas de *S. aureus* aisladas, 40 cepas produjeron enterotoxina y 19 cepas produjeron toxina exfoliativa.

Nelianne J, et al., analizaron en su artículo de revista denominado “Inmunogenicidad de toxinas durante la infección por *Staphylococcus aureus*”, muestras de suero de 206 pacientes infectados por *S. aureus* y 201 sujetos controles ingresados en el hospital para determinar la unión de inmunoglobulina (Ig) G a 20 toxinas, utilizando tecnología basada en citometría de flujo. Los niveles de anticuerpos se asociaron con la presencia de genes de toxina definida por reacción en cadena de la polimerasa en aislamientos homólogos de *S. aureus*. Los niveles de IgG dirigidos a la toxina exfoliativa ETA, ETB, hemolisina g (*HlgB*), leucocidina (*LukD*, *LukE*, *LukS*), enterotoxina estafilocócica *SEA*, *SEE*, *SEH*, *SEI* y *SEIM* fueron mayores en pacientes infectados con *S. aureus* que en sujetos control.

Prevost G, et al., en su artículo “La leucocidina de Pantón-Valentine y la hemolisina gamma de *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 están codificadas por locus genéticos distintos y tienen diferentes actividades biológicas” estudiaron los genes que codifican la hemolisina gamma. Los tres ORF que constituyen el locus tipo *hlg* de *S. aureus* ATCC 49775 se clonaron en un fragmento de ADN de 4,5 kb en el plásmido pUC19. Este fragmento se hibridó con las sondas *hlgA* y *hlgC*. Los extractos brutos de *E. coli* NM522 recombinante positivo fueron capaces de inducir hemólisis de eritrocitos a diluciones de

hasta 1/800 y fueron leucotóxicos a diluciones de hasta 1/300, mientras que los extractos crudos de *E. coli* transformados con pUC19 solo no tuvieron hemolíticos o actividad leucotóxica.

En el artículo de revista denominado, “Detección de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su correlación con las pruebas de coagulasa y termonucleasa” de Suarez et al, analizaron por medio de reacción en cadena de la polimerasa la apariencia del gen que codifica para la enterotoxina A en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus*. Se examinaron 69 cepas de *Estafilococos aureus* y se realizó un análisis estadístico donde se obtuvo que el gen sea estaba presente en 7 de éstas cepas, es decir en un 4,8%.

Margaret S.et al., realizó un artículo de revista denominado, “*Estafilococos* en la flora oral de niños sanos y aquellos que reciben tratamiento para la enfermedad maligna”, en donde se examinó a 25 niños sanos y 124 niños con neoplasia maligna, estos sometieron a pruebas de detección de *Staphylococcus aureus* y *Estafilococos* coagulasa negativa, se realizaron pruebas de sensibilidad a antibióticos y se analizaron cepas de *S. aureus* para determinar la producción de TSST-1 y Enterotoxinas A – D. El 5% de los niños con neoplasias malignas portaron *S. aureus* y el 50% de los niños sanos presentaron el gen *TSST-1* y la Enterotoxinas A y B en las cepas de *S. aureus*.

El artículo de revista denominado, “Prevalencia de *Staphylococcus spp* y *Candida spp* en la cavidad oral y bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal” de Cuesta A, et al, examinaron a ochenta y dos pacientes, de edades entre 18 a 70 años de edad, con enfermedad periodontal, y al menos dos sitios con la profundidad de sondaje ≥ 3 mm. Del total de los pacientes estudiados, el 42,7% mostraron *Staphylococcus aureus* en la bolsa y el 69,5% en la cavidad oral, mientras que 25,6% mostraron *Candida spp* en la bolsa y 42,7% en la cavidad oral. La prevalencia de *Staphylococcus aureus* en la bolsa periodontal fue de 13,4% y 15,8% en la cavidad oral.

González M, et al, realizaron un estudio denominado “Frecuencia de colonización de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en un grupo de niños en edad escolar” este estudio fue descriptivo, de corte transversal, se analizaron a 512 escolares de la Escuela Primaria República Popular de Angola, de junio a julio del año 2006, en donde se encontró que 188 niños fueron colonizados por *S. aureus* es decir el 36.7%.

En el artículo de revista denominado “*Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos” de Guillen R, et al., estudiaron 123 aislados de *S. aureus*. Los aislados provinieron de 56 niñas (45,5%) y 67 niños (54,5%). Los grupos etarios que presentaron

los mayores porcentajes de infección por *S. aureus* fueron: de 1 a 4 años y de 5 a 14 años con 36,6 y 38,2%, respectivamente.

Smith AJ, et al, desarrollo un estudio sobre "*Staphylococcus aureus* en la cavidad oral: un análisis retrospectivo de tres años de datos clínicos de laboratorio", donde realizo una búsqueda manual sobre los registros de las muestras orales en el laboratorio. Se aislaron 1.017 muestras de *S. aureus*, la patología más reportada fue la queilitis angular en un 22%, mientras que las características clínicas como el eritema, hinchazón, dolor o ardor de la mucosa oral fueron en un 16%.

5 HIPÓTESIS

La presente investigación no requiere hipótesis por tratarse de un estudio descriptivo.

CAPÍTULO II
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. MARCO METODOLÓGICO.

Enfoque: Cuantitativo.

Diseño de Investigación: Descriptivo.

Nivel de investigación: Descriptivo.

Tipo de Investigación:

- **Por el ámbito:** De laboratorio.
- **Por la técnica:** Observacional.
- **Por la temporalidad:** Retrospectivo.

2. POBLACIÓN Y MUESTRA

Se obtuvieron 110 muestras tomadas de la cavidad oral de niños de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro; 17 de estas muestras fueron positivas para *Staphylococcus aureus*, de estas muestras se realizó la detección de los genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*, que codifican para hemolisinas y enterotoxinas de esta bacteria.

2.1. Criterios de selección.

2.1.1. Criterios de inclusión: Se incluyeron en el estudio a todos los Estudiantes de la Escuela de Oñacapac del cantón Saraguro; entre la edad de 6 a 12 años junto con el consentimiento informado firmado por sus padres.

2.1.2. Criterios de exclusión: Se excluyeron a los estudiantes que sean menores de 6 años y mayores a 12 años, también estudiantes que no hayan presentado el consentimiento informado firmado por sus padres.

Tamaño de la muestra

Muestra por conveniencia del estudio.

3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	DIMENSIÓN	INDICADOR	TIPO ESTADÍSTICO	ESCALA	DATO	INSTRUMENTO
Genotipo <i>hlg-1</i>	Gen <i>hlg-1</i> que codifica para Hemolisinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>hlg-1</i> .	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos. Ficha de registro.
Genotipo <i>hlg-2</i>	Gen <i>hlg-2</i> que codifica para Hemolisinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>hlg-2</i> .	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos. Ficha de registro.
Genotipo <i>sea</i>	Gen <i>sea</i> que codifica para Enterotoxinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>sea</i> .	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos. Ficha de registro.
Presencia de múltiples genes	Genes <i>hlg-1</i> , <i>hlg-2</i> y <i>sea</i> que codifican para Hemolisinas y Enterotoxinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia de genes, se establece mediante amplificación por PCR.	Genes <i>hlg-1</i> , <i>hlg-2</i> y <i>sea</i> .	Proporción	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos. Ficha de registro.

4. INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.

4.1. Instrumentos documentales

- Recolección de artículos científicos.
- Para la recolección de datos se utilizó una ficha de registro de extracción de ADN y PCR en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Católica de Cuenca (Anexo 1).

4.2. Instrumentos mecánicos

- Para el análisis de datos se utilizó una laptop HP Core i3.

4.3. Materiales y Equipos

Para el presente estudio se utilizó:

• Medios de transporte Stuart	• Aceite de inmersión	• Termobloque
• Cajas Petri	• Plasma	• Pipetas
• Balanza	• Tubos de ensayo	• Puntas
• Espátula	• Porta objetos	• Tubos PCR
• Asas	• Peróxido de Hidrógeno	• Kit para PCR
• Manitol	• ADNasa	• Primer <i>hlgv</i> , <i>hlg</i> , <i>sea</i>
• Reactivos de Gram	• SDS	• Agarosa
• Microscopio	• Tubos eppendor	• Caldo tripticasa soya
• Suero fisiológico	• Syber safe	• TAE
• Guantes	• Mascarilla	

EQUIPOS ELECTRÓNICOS:

<ul style="list-style-type: none">• Cabina de Bioseguridad	<ul style="list-style-type: none">• Estufa	<ul style="list-style-type: none">• Termociclador
<ul style="list-style-type: none">• Cubeta	<ul style="list-style-type: none">• Fuente de poder	<ul style="list-style-type: none">• Fuente de UV (foto documentador)
<ul style="list-style-type: none">• Microscopio	<ul style="list-style-type: none">• Computadora	<ul style="list-style-type: none">• Cabinas de flujo laminar

4.4. Recursos.

Para realizar el estudio se necesitó recursos institucionales de la Universidad Católica de Cuenca de la Unidad de Salud y Bienestar, Carrera de Odontología, infraestructura (Laboratorio de Biología Molecular y Genética) y recursos financieros que será de autofinanciación mixta.

5. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS.

5.1 Ubicación espacial.

El estudio se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Universidad Católica de Cuenca, ubicado en el tercer piso de la Basílica, en la ciudad de Cuenca; entre la avenida de las Américas y Humbolt.

5.2 Ubicación temporal.

La investigación se realizó entre los meses de septiembre de 2019 y enero del 2020; las muestras fueron tomadas entre los meses noviembre, diciembre del 2018 y en enero del 2019.

5.3 Procedimientos de la toma de datos.

Las muestras tomadas fueron trasportadas mediante el medio de transporte Stuart. Fig. 1.



Fig. 1. Medio de transporte Stuart

Agar sal manitol

Para la elaboración de Agar Sal Manitol, se realizó la homogenización del soluto en el solvente, después se esterilizó a 121°C en la autoclave para que quede una solución estéril, se colocó en las cajas bipetri, se dejó enfriar y se guardó en refrigeración hasta su posterior uso para la siembra de *S. aureus*. Fig. 2.

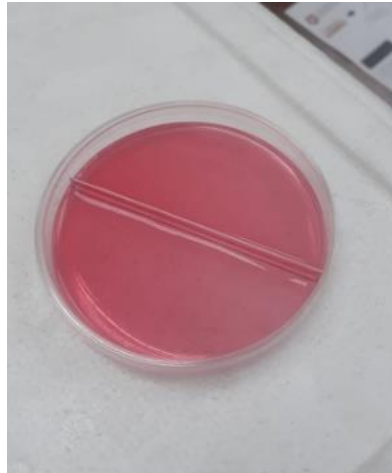


Fig. 2. Agar Sal Manitol

Posteriormente se transmitió las muestras tomadas al medio Agar Sal Manitol, esto sirve como medio selectivo para detectar la presencia de *S. aureus*. Se deja incubar durante 28 a 48 horas en la estufa a 37°C, para luego seleccionar las cajas que cambiaron de color rojo a amarillo.

El primer paso que se realizó es confirmar que la cepa sea *S. aureus*. Las pruebas de crecimiento positivo en Agar Sal Manitol, se confirmó mediante:

- ✓ Catalasa
- ✓ Coagulasa
- ✓ DNasa

En la prueba de Catalasa se utilizó 50ul de peróxido de hidrogeno junto con una pipeta calibrada, luego se tomó una cepa bacteriana con el asa bacteriológica del medio de cultivo en Agar y se procedió a colocarla en H₂O₂ en un porta objetos.

La prueba de coagulasa se realizó mediante un tubo con plasma, se tomó con el asa bacteriológica la muestra de Agar y se procedió a sembrarla, a continuación se colocó en el homogenizador por 30 a 60 segundos y posteriormente se llevó a incubación a 37°C. Los resultados se pueden observar en las primeras 4 hasta 24 horas después.

La prueba final de cultivo fue la DNasa, se utilizó Agar azul de Toluidina y se realizó el mismo proceso que la elaboración de Agar Sal Manitol.

Extracción de ADN

En la extracción de ADN de todas las cepas de *S. aureus*, se aplicó una solución de lisis formada por SDS (Dodecilsulfato sódico) al 1% en NaOH 0,25N y se sometió a ebullición.

El protocolo que se utilizó fue:

Con el asa bacteriológica se tomó del cultivo de Agar Sal Manitol una porción de colonia de *S. aureus*, luego se procedió a suspender en tubos de Eppendorf en 1ml de agua destilada estéril.

Se colocó en el equipo de centrifugación por 10 minutos a una velocidad de 3000 rpm y se descarta el sobrenadante.

Se agregó 50 ul de solución de lisis, se da vortex y se llevaron los tubos a ebullición por 15 minutos.

Añadimos 450 ul de agua libre de nucleasas y centrifugamos por 20 segundos.

Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se desarrolló en un termociclador de marca Bionner, se usó Mastermix GoTaq Green 2x de Promega, la que suministra la polimerasa, en un tampón de reacción con pH 8,5 400uMdTTP, 400UM Dctp, 400dTTP y 3 mM MgCl₂, un tampón verde que aumenta la densidad de la muestra y los tintes amarillo y azul que funcionan como colorantes de carga para los productos cuando son analizados por electroforesis y Protocolo PCR. Fig.3.

Protocolo PCR:

1. Desnaturalización inicial por 5 min a 94°C
2. 34 ciclos de:

1 minuto x94°C para desnaturalización.

1 minuto x54°C para alineamiento.

1 minuto x72°C para elongación.

3. Elongación final de 72°C x 10 minutos.

Los primers o cebadores utilizados para la detección de *hlg-1*, *hlg-2* y *sea* fueron:

Bacteria	Toxinas	Genes	Primers	Tamaño	Bibliografía
<i>Staphylococcus aureus</i>	Genes que codifican para hemolisinas	<i>hlg-1</i>	F:GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC R:CCATAGACGTAGCAACGGAT F:GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	937pb	Llana et al., 1999
		<i>hlg-2</i>	F:GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT R: ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAS	535 pb	Jarruad et al., 2002
	Genes que codifican para enterotoxinas	<i>sea</i>	F: AAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA R: CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	560pb	Jarruad et al., 2002

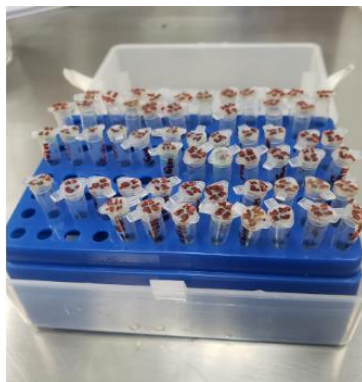


Fig.3.Amplicones de los genes.

Electroforesis horizontal.

La electroforesis es el penúltimo paso a seguir, se realizó en Agarosa al 1.5% con TAE 1X. Se colocó 2ul de Syber Safe para un gel de agarosa de 50gr; se diluyó homogéneamente y se llevó a ebullición. Fig.4.

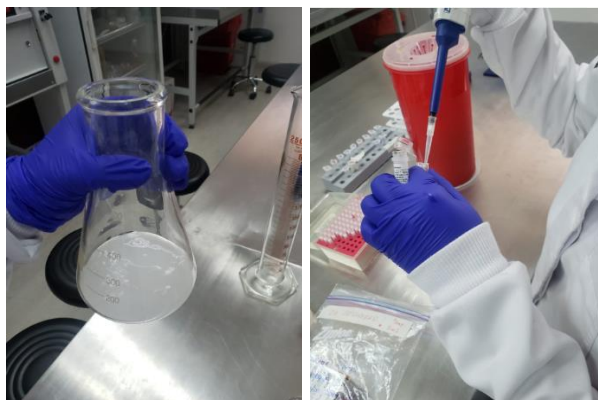


Fig.4. Gel de agarosa y colocación de Syber Safe.

A continuación, la solución se coloca en la cámara de electroforesis y con una pipeta se coloca 3ul de ADN en los pocillos del gel de Agarosa. El ladder que se utilizó fue de 100 pb. La cepa ATCC 43300 se utilizó como control positivo, contrario a esto la cepa ATCC 12344 de *Streptococcus pyogenes* se utilizó como control negativo. Fig. 5.

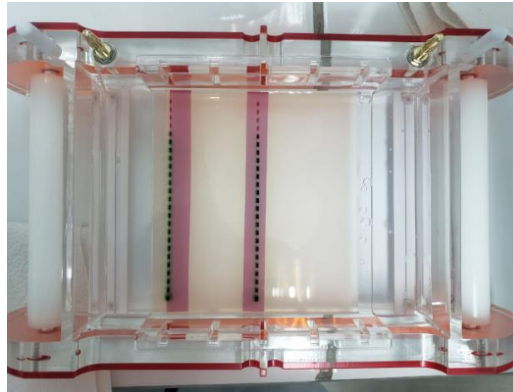


Fig.5. Cámara de electroforesis

Para la corrida en electroforesis horizontal se trabajó con el siguiente protocolo: 90V, 90 mA y 60W por 60 minutos para lograr una separación correcta de los amplicones y la escalera alélica

Finalmente la electroforesis horizontal se la puede observar mediante un Trasluminador UV. Fig.6., Fig.7., Fig.8., Fig.9.

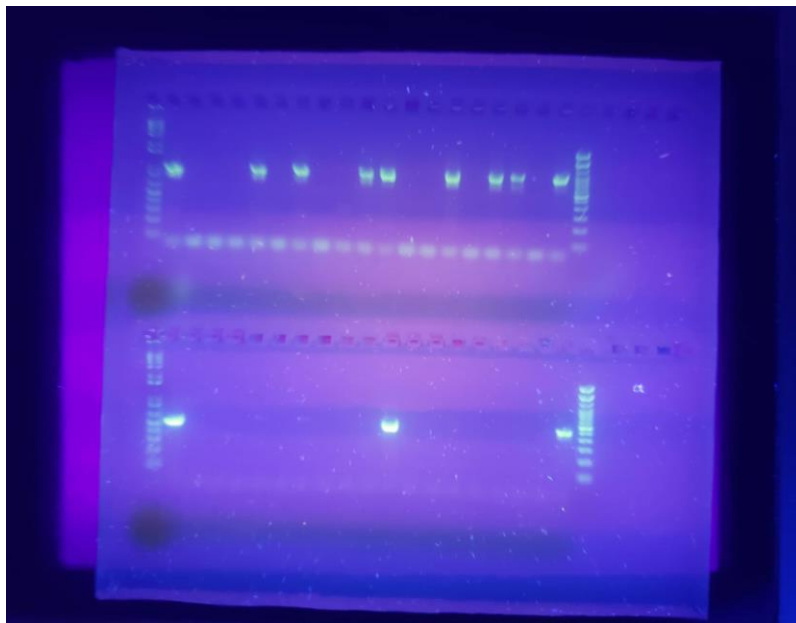


Fig.6. Trasluminador UV

Gen: *hlg-1* (codifica a Hemolisina)

Amplicon: 937pb

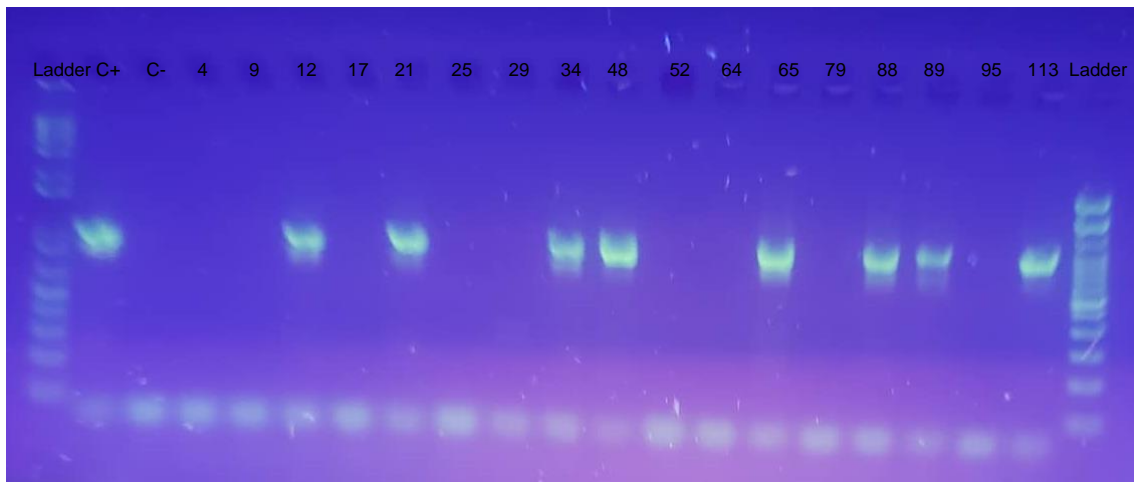


Fig.7. Amplificación de la secuencia del gen *hlg-1* que codifica para Hemolisina.

Gen: *hlg-2* (codifica a Hemolisina)

Amplicon: 535pb



Fig.8. Amplificación de la secuencia del gen *hlg-2* que codifica para Hemolisina.

Gen: sea (codifica a Enterotoxina)

Amplicon: 560pb

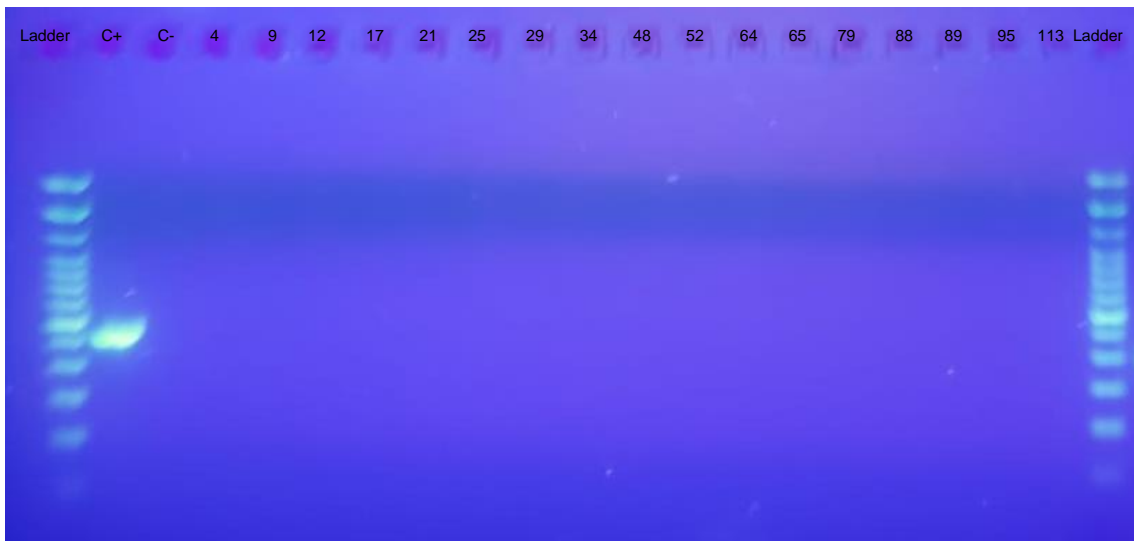


Fig.9. Amplificación de la secuencia del gen sea que codifica para Enterotoxina.

6 PROCEDIMIENTOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS

Una vez conseguidos los datos, se observó la existencia de los distintos tipos de genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea*. Posteriormente se usó el Software Microsoft Excel para crear una base de datos general y poder tabular de una forma más rápida mediante una estadística descriptiva la cual analizó la ocurrencia en los cuadros y tablas.

7 ASPECTOS BIOÉTICOS.

El estudio no presentó conflictos bioéticos ya que no implica el trabajo directo con seres humanos, así también, las cepas han sido obtenidas en un proceso previo en el cual todos los pacientes han firmado un consentimiento informado, por otra parte, este estudio ya sido sometido a aprobación por parte del comité de bioética.

CAPÍTULO III
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. RESULTADOS:

Tabla N° 1. Presencia del gen *hlg-1* que codifica para Hemolisina 1

FACTOR DE VIRULENCIA		
Gen: <i>hlg-1</i>		
	N	%
Presencia del gen <i>hlg-1</i> :	8	47
Ausencia del gen <i>hlg-1</i> :	9	53
Total de muestras	17	100

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras.

En la tabla N°1 se manifiesta que del total de las 17 muestras analizadas (positivas a *S. aureus*), 8 muestras presentaban el gen *hlg-1*, lo que representa un 47%; en cambio 9 muestras no poseen dicho gen, lo que corresponde al 53% de las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de la comunidad de Oñacpac–Saraguro.

Tabla N°2. Presencia del gen *hlg-2* que codifica para Hemolisina 2

FACTOR DE VIRULENCIA		
Gen: <i>hlg-2</i>		
	N	%
Presencia del gen <i>hlg-2</i> :	2	12
Ausencia del gen <i>hlg-2</i> :	15	88
Total de muestras	17	100

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras

De acuerdo a la tabla número N°2, se manifiesta que del total de las 17 muestras analizadas (positivas a *S. aureus*), 2 muestras presentaban el gen *hlg-2*, lo que representa un 12%; en cambio 15 muestras no poseen dicho gen, lo que corresponde al 88% de las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de la comunidad de Oñacpac–Saraguro.

Tabla N°3. Presencia del gen *sea* que codifica para Enterotoxina

FACTOR DE VIRULENCIA		
Gen: <i>sea</i>		
	N	%
Presencia del gen <i>sea</i> :	0	0
Ausencia del gen <i>sea</i> :	17	100
Total de muestras	17	100

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras

La tabla N°3, indica que el gen *sea* está ausente en las 17 muestras positivas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de la comunidad de Oñacpac-Saraguro.

Tabla N°4. Genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea* que se presentan en la misma cepa de *S. aureus*

FACTORES DE VIRULENCIA			
Cepas	HEMOLISINAS		ENTEROTOXINA
	<i>hlg-1</i>	<i>hlg-2</i>	<i>sea</i>
4	0	0	0
9	0	0	0
12	1	0	0
17	0	0	0
21	1	0	0
25	0	0	0
29	0	0	0
34	1	0	0
48	1	1	0
52	0	0	0
64	0	0	0
65	1	0	0
79	0	0	0
88	1	0	0
89	1	0	0
95	0	0	0
113	1	1	0

Fuente: Datos tabulados por el autor

La tabla N°4 presenta el análisis de las 17 muestras positivas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de niños de Oñacpac-Saraguro, aquí se encontró que las cepas 48 y 113 presentan los dos genes *hlg-1* y *hlg-2* que codifican para hemolisinas que se establecieron mediante la amplificación por PCR.

2. DISCUSIÓN:

Este estudio analizó la ocurrencia de genes *hlg-1*, *hlg-2* y *sea* que codifican para hemolisinas y enterotoxinas en cepas clínicas de *S. aureus* aislados de la cavidad oral en niños de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac- Saraguro.

Brizzio A. et al., estudió 12 cepas positivas para *S. aureus*, el 29% de estas cepas se encontraron positivas para el gen *sea*. Al contrario de este estudio que no se detectó el gen *sea* en las 17 cepas aisladas para *S. aureus*.

Suarez. et al., utilizó 11 cepas de *S. aureus* aisladas previamente las analizó y dio como resultado que el 4.8% correspondía al gen *sea* en 7 de éstas cepas. De acuerdo a nuestras 17 cepas analizadas no se obtuvo ningún resultado sobre el gen *sea*.

Prevost. et al, realiza una combinación de los componentes S y F junto con Leucocidina de Panton Valentine y Hemolisina gamma con los genes *hlg1* y *hlg2*, que obtuvo como resultado un 66% para el gen *hlg-1* y con un 62% para el gen *hlg-2*, por consiguiente difieren bastante con los resultados realizados en esta investigación ya que se observó un 47% para *hlg-1* y un 12% para *hlg-2*.

En este estudio realizado el gen *hlg-1* se presentó en un 47% y el gen *hlg-2* en un 12% de las 17 muestras positivas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de Oñacapac- Saraguro, en cambio en el estudio de Guillén Fretes RM. et al., se demostró que el 10% de aislados dio positivo para hemolisina gamma.

En este estudio se obtuvo que del total de las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro, el 47% presentó el gen *hlg-1*, un 12% el gen *hlg-2* y ninguna cepa presentó el gen *sea*, por lo tanto difieren con los resultados mostrados por los diferentes autores.

3. CONCLUSIÓN:

- La frecuencia del gen *hlg-1*, que codifica para hemolisina, fue de un 47% del total de las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro.
- La frecuencia del gen *hlg-2*, que codifica para hemolisina, fue de un 12% del total de las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro.
- Ninguna cepa de *S. aureus* aislada en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro presentó el gen *sea*.
- Se determinó la existencia de 2 genes a la vez, *hlg-1* y *hlg-2* (que codifican para Hemolisinas), en las cepas 48 y 113 de *S. aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Cataldo Russomando K, Jacquett Toledo N, Fariña N, Pereira A, Rodríguez F, Guillén R, et al. Portación de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a antimicrobianos en cavidad bucal de niños que concurren para un tratamiento en una clínica odontológica, Paraguay. *Pediatría Organo Of la Soc Paraguaya Pediatría*. 2014;41(3):201–7.
2. Portillo ME, del Pozo JL. Infecciones por estafilococo. *Med [Internet]*. 2018;12(49):2890–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.002>
3. Rodríguez Acosta F, Carpinelli L, Basualdo W, Castro H, Quiñonez B, Argüello R, et al. Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, durante el año 2010. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud*. 2015;13(1):58–66.
4. Togneri AM, Podestá LB, Pérez MP, Santiso GM. Estudio de las infecciones por *Staphylococcus aureus* en un hospital general de agudos (2002-2013). *Rev Argent Microbiol*. 2017;49(1):24–31.
5. Guillén R, Carpinelli L, Rodríguez F, Castro H, Quiñonez B, Campuzano A, et al. *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: Caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos. *Rev Chil Infectol*. 2016;33(6):609–18.
6. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2014;61(1):28–20.
7. Olarte NM, Valderrama IA, Reyes KR, Garzón MI, Escobar JA, Castro BE, et al. Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en una unidad de cuidados intensivos de adultos de un hospital colombiano: Caracterización fenotípica y molecular con detección de un clon de circulación en la comunidad. *Biomedica*. 2010;30(3):353–61.
8. Verkaik NJ, Dauwalder O, Antri K, Boubekri I, de Vogel CP, Badiou C, et al. Immunogenicity of Toxins during *Staphylococcus aureus* Infection . *Clin Infect Dis*. 2010;50(1):61–8.
9. Spaan AN, Schiepers A, de Haas CJC, van Hooijdonk DDJJ, Badiou C, Contamin

- H, et al. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton–Valentine Leukocidin and γ -Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *J Immunol*. 2015;195(3):1034–43.
10. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections . *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11(1):343–64.
 11. Stacey X., Gilmore KJ, Szabo PA, Zeppa JJ, Baroja ML, Haeryfar SMM, et al. Superantigens subvert the neutrophil response to promote abscess formation and enhance *Staphylococcus aureus* survival in vivo. *Infect Immun*. 2014;82(9):3588–98.
 12. Rodríguez Tamayo EA, Jiménez Quiceno JN. Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Iatreia*. 2015;28(1):66–77.
 13. González AM JG, González ML NB. Frecuencia de colonización de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un grupo de niños en edad escolar. *Rev ENFERMEDADES Infec EN PEDIATRÍA*. 2007;XX(80):86–91.
 14. Moura JP de, Pimenta FC, Hayashida M, Cruz ED de A, Canini SRM da S, Gir E. La colonización de los profesionales de enfermería por *Staphylococcus aureus*. *Rev Lat Am Enferm*. 2011;19(2):325–31.
 15. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Rev Biomed*. 2014;25(3):129–43.
 16. Estela G, Yahireth C, Gonzalez S, Aida H, Jaime B. Frecuencia y caracterización de *staphylococcus spp.* en la mucosa bucal de paciente diabéticos y no diabéticos. *Rev ADM*. 2018;75(5):255–60.
 17. Jackson MS, Bagg J, Kennedy H, Michie J. Staphylococci in the oral flora of healthy children and those receiving treatment for malignant disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2009;12(1):60–4.
 18. Lazarte C, Paladino L, Mollo L, Katra R. Manejo y tratamiento quirúrgico de infecciones por *Staphylococcus aureus*. *Rev Asoc Odontol Argent*. 2018;51–6.
 19. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Natri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus spp* and *Candida spp* in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam*. 2010;23(1):20–6.
 20. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J.

- Staphylococcus aureus* in the oral cavity: A three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br Dent J. 2003;195(12):701–3.
21. Gabriela Sanabria B. Evolución de la resistencia en el *Staphylococcus aureus*. Evolution of resistance in *Staphylococcus aureus*. Rev Inst Med Trop Sanabria, G. 2014;3(2):27–39.
 22. Muñoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Núñez G. A Critical Role for Hemolysins and Bacterial Lipoproteins in *Staphylococcus aureus* -Induced Activation of the Nlrp3 Inflammasome. J Immunol. 2015;183(6):3942–8.
 23. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:12.
 24. Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, et al. Panton-valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. Infect Immun. 1995;63(10):4121–9.
 25. Choorit W, Kaneko J, Muramoto K, Kamio Y. Existence of a new protein component with the same function as the LukF component of leukocidin or γ -hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. FEBS Lett. 1995;357(3):260–4.
 26. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):16–34.
 27. Nariya H, Kamio Y. Identification of the Essential Regions for Luks- and H μ II-Specific Functions of Staphylococcal Leukocidin and μ -Hemolysin. Biosci Biotechnol Biochem. 1995;59(8):1603–4.
 28. Rogolsky M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Rev. 1979;43(3):320–60.
 29. Manfredi EA, Leotta GA, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. Rev Argent Microbiol. 2010;42:212–5.
 30. Wu S, Duan N, Gu H, Hao L, Ye H, Gong W, et al. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins (Basel). 2016;8(7):3–20.
 31. Brizzio AA, Tedeschi FA, Zalazar FE. Descripción de un brote de intoxicación

- alimentaria estafilocócica ocurrido en Las Rosas, Provincia de Santa Fe, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2011;43(1):28–32.
32. Vanegas L M, González G L, Martínez L A, Buitrago F. Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* Enterotoxigénicos aislados de quesos en Bogota. RevMVZ Córdoba. 2008;13(2):1288–93.
 33. Brizzio AA, Tedeschi FA, Zalazar FE. Estrategia de PCR múltiple para la caracterización molecular simultánea de *Staphylococcus aureus* y enterotoxinas estafilocócicas en aislamientos de brotes de origen alimentario. Biomedica. 2013;33(1):122–7.
 34. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2014;31(3):535–46.
 35. Negroni M. Microbiología Estomatológica Fundamentos y guía práctica. Autor: Marta Negroni;; Edición: 2ª; Especialidad: Odontología, Buenos Aires. 2009.

ANEXOS

Anexo 1.

Ficha de registro de extracción de ADN y PCR

FICHA DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR																																							
Código de la muestra:									Procedencia:																														
Bacteria identificada:				<i>Staphylococcus aureus</i> <input type="checkbox"/>																																			
Genes:		<i>tst</i>			<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>hld</i>	<i>hlg-1</i>	<i>hlg-2</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sed</i>	<i>sec</i>																										
PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS																																							
Fecha	Extracción de ADN (SDS-Lisis alcalina-Temperatura)				Cuantificación de ADN _____																																		
Fecha	PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa)				<p>Gen a identificar _____</p> <p>Primers F: _____</p> <p style="padding-left: 100px;">R: _____</p> <p>Cálculos</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;"></th> <th style="width: 20%; text-align: center;">Muestras</th> <th style="width: 30%; text-align: center;">Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MM _____ ul x _____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> </tr> <tr> <td>Primer F _____ ul x _____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> </tr> <tr> <td>Primer R _____ ul x _____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> </tr> <tr> <td>ADN _____ ul x _____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> </tr> <tr> <td>Agua _____ ul x _____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> </tr> <tr> <td>Total _____ ul x _____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> <td style="text-align: center;">_____</td> </tr> </tbody> </table> <p>Protocolo Usado</p> <p>1.- Desnaturalización inicial _____ min x _____ °C</p> <p>2.- _____ ciclos de:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Desnaturalización</td> <td style="text-align: center;">_____ min x _____ °C</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Alineamiento</td> <td style="text-align: center;">_____ min x _____ °C</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Elongación</td> <td style="text-align: center;">_____ min x _____ °C</td> </tr> </tbody> </table> <p>3.- Elongación final: _____ min x _____ °C</p>									Muestras	Total	MM _____ ul x _____	_____	_____	Primer F _____ ul x _____	_____	_____	Primer R _____ ul x _____	_____	_____	ADN _____ ul x _____	_____	_____	Agua _____ ul x _____	_____	_____	Total _____ ul x _____	_____	_____	Desnaturalización	_____ min x _____ °C	Alineamiento	_____ min x _____ °C	Elongación	_____ min x _____ °C
	Muestras	Total																																					
MM _____ ul x _____	_____	_____																																					
Primer F _____ ul x _____	_____	_____																																					
Primer R _____ ul x _____	_____	_____																																					
ADN _____ ul x _____	_____	_____																																					
Agua _____ ul x _____	_____	_____																																					
Total _____ ul x _____	_____	_____																																					
Desnaturalización	_____ min x _____ °C																																						
Alineamiento	_____ min x _____ °C																																						
Elongación	_____ min x _____ °C																																						
Fecha	Electroforesis				<p>Protocolo:</p> <p>_____ Volt</p> <p>_____ mA</p> <p>_____ waH</p> <p>_____ min</p>																																		

MM: Master Mix

SDS: Sodio Dodecilsulfato

F: Forward

R: Reverse

Anexo 2.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Saraguro, 07 de Enero de 2019

Apellidos: Guamán Vargas

Nombres: Anthony Domín

Fecha de Nacimiento: 14/03/2009

SEXO: Femenino: () Masculino: ()

1. Yo "DOY MI CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO" para que miembros del grupo de investigación Genética y Biología Molecular de la carrera de Odontología de la Universidad Católica de Cuenca (profesionales de cuarto nivel o estudiantes del último año de la carrera, debidamente entrenados y capacitados), extraigan muestras de la cavidad oral (boca) de mi representado con un hisopo, las analicen y publiquen los resultados que se obtengan a partir del estudio de dichas muestras, manteniendo el anonimato, es decir, sin identificar a mi hijo(a) o representado(a). Para ello se hará uso de un sistema de codificación numérica, en el que cada paciente será identificado con un código. El acceso a la información completa (datos personales) sólo lo tendrán la directora y co-directora del proyecto.
2. Mi firma al pie de este documento se constituye en el reconocimiento de que los beneficios y posibles riesgos del proceso de toma de esta muestra fueron explicados a mi satisfacción por un profesional de salud calificado.
3. Las muestras biológicas se transportarán y conservarán entre 2-8°C en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Universidad Católica de Cuenca.
4. Las muestras serán desechadas al terminar el proceso de siembra en medios de cultivo agarizado, es decir, en un periodo no mayor de 72 horas. Los instrumentos empleados para la toma de las mismas (hisopos) serán desechados inmediatamente en los contenedores asignados para tal fin, y posteriormente dispuestos siguiendo las normas de bioseguridad (convenio EMCOV).
5. El estudio es totalmente gratuito. No existen beneficios económicos; sin embargo, su hijo(a) recibirá una charla educativa sobre salud bucal.

DECLARO:

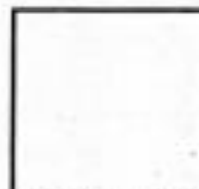
6. Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla de todos los aspectos relacionados con la toma de muestras y los proyectos de investigación relacionados con las mismas.
7. He leído y comprendido la información recibida y se me ha dado la oportunidad de formular todas las preguntas que he creído oportunas.
8. Entiendo que el Laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Unidad de Salud y Bienestar de la Universidad Católica de Cuenca almacenará las muestras y los registros obtenidos, por un tiempo prudencial.
9. Bajo ningún concepto se me ha ofrecido, ni pretendo recibir, ningún beneficio de tipo económico para la toma de esta(s) muestra(s) o la realización de estos análisis.

En consecuencia, doy mi consentimiento para que se realice la toma de la muestra biológica.

Firma del Padre, Madre o Representante Legal

Nombre: Nancy Vargas

Cédula Identidad: 110505266-4



PULGAR DERECHO

Anexo 3.

ASENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS



ASENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Hola! Mi nombre es Odont. Esp. Magaly Jiménez y trabajo en la Universidad Católica de Cuenca. Actualmente mis estudiantes están realizando un estudio para conocer acerca de la salud bucal general del lugar donde vives. Para ello queremos pedirte que nos apoyes.

Tu participación en el estudio consistiría en permitirnos hacer una revisión de tu boca y tomar un poquito de saliva con un hisopo de algodón.

Tu participación en este estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tu papá o tu mamá hayan dicho que puedes participar, si tu no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que, si en un momento dado, ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular tampoco habrá problema.

Esta información será confidencial; esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas. Solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio y, de ser necesario, tus padres.

La publicación de los datos se hará respetando el anonimato, es decir, tu nombre no se mencionará.

¿Tienes alguna pregunta?

¿Deseas colaborar con nosotros?

SI (X) NO ()

.....
Firma del Estudiante



Nombre y Apellido *Jessica Kevisda To Gozari*

PULGAR DERECHO

Lugar y Fecha: Oñaacaspec 10 de enero de 2019