



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

“OCURRENCIA DE GENES *seb*, *sec* y *sed*, 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 ORTEGA, DIANA CAROLINA

DIRECTOR: Dra. MSc. ORELLANA BRAVO, PAOLA PATRICIA

CUENCA-ECUADOR

2020.

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

DECLARACIÓN:

Yo, Rodríguez Ortega, Diana Carolina 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: Rodríguez Ortega Diana Carolina.

C.I.: 1900480433

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 *seb*, *sec* y *sed*, 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 ORTEGA, DIANA CAROLINA**, 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, 2020



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

Dra. MSc. Orellana Bravo, Paola Patricia.

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 *seb*, *sec* y *sed*, 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 ORTEGA, DIANA CAROLINA**, 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, 2020



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

Tutora: Dra. MSc. Orellana Bravo, Paola Patricia

DEDICATORIA.

A mis padres Pedro y Paola quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía.

A mi abuelita que con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis amigos, por apoyarme cuando más los necesite, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.

EPÍGRAFE

“Se escribe a partir de lo que se ha conseguido ser”.

Simone de Beauvoir, 194

AGRADECIMIENTOS:

Primeramente, doy gracias a Dios por permitirme tener tan buena experiencia a lo largo de este proceso en mi carrera, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son los resultados de tu ayuda.

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme en cada larga y agotadora noche de estudio, sus esfuerzos son impresionantes y su amor para mí es invaluable; gracias a mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante todo este proceso.

A mi abuelita ya que fue la persona después de mis padres que más se preocupaba por mí, me enseñó muchas cosas vitales para la vida y me encamino siempre por el buen sendero.

A mi tutora de tesis Paola Orellana agradecerle ya que cada día ha sido nuestra mano derecha y quien me ha guiado durante la realización de mi tesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

TSST: Toxina del Síndrome del Shock Tóxico.

Se: Enterotoxina estafilocócica.

sea: Gen que codifica para la enterotoxina estafilocócica a.

agr: Gen regulador genético accesorio.

sar: Gen regulador accesorioestafilocócico.

IAE: Intoxicación alimentaria estafilocócica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

LPV: Leucocidina de Pantón Valentin.

EMRSA: Epidemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

TSST-1: Toxina del síndrome del shock tóxico.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
CAPÍTULO I.....	16
PLANTEAMIENTO TEÓRICO	16
1.PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo General.....	18
3.2 Objetivos especificos.....	18
4. MARCO TEÓRICO.....	19
4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.1. 1. Hábitat.....	19
4.1. 2. Epidemiología.....	19
4.1.3. Patogenia.....	19
4.1. 4. Características Microbiológicas.....	20
4.1.5. Colonización.....	20
4.2. Factores de Virulencia.....	20
4.3. Enterotoxinas Estafilococicas.....	21
4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	23
4.4.ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION	25
5. HIPÓTESIS	27
CAPÍTULO II.....	28
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL.....	28
1.MARCO METODOLÓGICO.....	29
2. POBLACIÓN Y MUESTRA	29
2.1. Criterios de selección.....	29

2.1.1.Criterios de inclusión.....	29
2.1.2. Criterios de exclusión.....	29
3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	30
4.INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	31
4.1. Instrumentos documentales.....	31
4.2. Instrumentos mecánicos.....	31
4.3. Materiales y Equipos	31
4.4. Recursos.....	32
5. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS.....	32
5.1 Ubicación espacial.....	32
5.2 Ubicación temporal.....	32
5.3 Procedimiento para la toma de datos.....	30
6. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE DATOS	39
7. ASPECTOS BIOÉTICOS.....	39
CAPÍTULO III.....	40
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	40
1.RESULTADOS.....	41
2. DISCUSIÓN.....	44
3.CONCLUSIÓN.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Fig.1. Medio de transporte Stuart	32
Fig.2. Siembra en Agar Sal Manitol	33
Fig.3. Amplicones de los genes... ..	35
Fig.4. Gel de agarosa y colocación de Syber Safe.....	36
Fig.5. Cámara de electroforesis.....	36
Fig.6. Transiluminador UV	37
Fig.7. Amplificación de la secuencia del gen <i>seb</i> que codifica para Enterotoxina.....	38
Fig.8. Amplificación de la secuencia del gen <i>sec</i> que codifica para Enterotoxina	38
Fig.9 Amplificación de la secuencia del gen <i>sed</i> que codifica para Enterotoxina	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Presencia del gen <i>seb</i> que codifica para Enterotoxina	41
Tabla N°2. Presencia del gen <i>sec</i> que codifica para Enterotoxina	41
Tabla N°3. Presencia del gen <i>sed</i> que codifica para Enterotoxina.....	42
Tabla N°4. Genes <i>seb</i> , <i>sec</i> y <i>sed</i> que se presentan en la misma cepa de <i>S. aureus</i> ..	43

RESUMEN.

OBJETIVO: Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *seb*, *sec*, y *sed*, que codifican para enterotoxinas en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral de niños de Oñacpac- Saraguro. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se realizó un 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 Oñacpac-Saraguro; 17 de estas muestras fueron positivas para *S. aureus*. Las reacciones de PCR incluyeron la detección de los genes *seb*, *sec* y *sed* que codifican para 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:** Del total de las 17 muestras analizadas (positivas a *S. aureus*), podemos evidenciar que 2 muestras presentaron el gen *seb*, no existió la presencia del gen *sec* y 1 muestra presentó el gen *sed* de las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños. **CONCLUSIÓN:** La frecuencia del gen *seb*, que codifica para enterotoxina, fue de un 12%, ninguna de las cepas presentó el gen *sec*, la frecuencia del gen *sed* fue de un 6% del total de las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacpac-Saraguro y no se determinó la existencia de 2 o más genes que codifican para enterotoxinas en las cepas de *S. aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, Factores de Virulencia.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the frequency of the virulence genes *seb*, *sec*, and *sed*, which code for enterotoxins in oral strains of *Staphylococcus aureus* isolated in the oral mucosa of children from Oñacpac- Saraguro. **MATERIALS AND METHODS:** A retrospective descriptive study of temporality was carried out. 110 samples were obtained from the oral cavity of children between 6 and 12 years of age in the community of Oñacpac-Saraguro; 17 of these samples were positive for *S. aureus*. The PCR reactions included the detection of the *seb*, *sec* and *sed* genes that code for 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:** Of the total of the 17 samples analyzed (positive for *S. aureus*), we can show that 2 samples had the *seb* gene, there was no presence of the *sec* gene and 1 sample had the *sed* gene of the *S. aureus* strains isolated from the oral mucosa of children. **CONCLUSION:** The frequency of the *seb* gene, which codes for enterotoxin, was 12%, none of the strains presented the *sec* gene, the frequency of the *sed* gene was 6% of the total of the oral strains of *Staphylococcus aureus* isolated in children of Oñacpac-Saraguro and the existence of 2 or more genes coding for enterotoxins in the *S. aureus* strains isolated in the healthy oral mucosa of schoolchildren was not determined.

Key words: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, Virulence Factors.

INTRODUCCIÓN.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria patógena importante en los seres humanos, ya que conserva la habilidad de infectar diferentes tejidos celulares, dada la variedad de factores de virulencia es considerado un patógeno perfecto, equipado para colonizar, invadir y diseminarse. ⁽¹⁾

Esta bacteria puede llegar a provocar factores de virulencia representados por variedad de proteínas bacterianas⁽¹⁾. Entre ellas encontramos enterotoxinas, hemolisinas, toxina del síndrome del shock tóxico y leucocidinas, este microorganismo puede producir enterotoxinas termorresistentes las más conocidas: *sea*, *seb*, *sec* y *sed* . ⁽¹⁾

La especie más característica que existe en la cavidad bucal es *Staphylococcus aureus*, su presencia se determina como componente de la flora oral, y en algunos casos puede estar asociada a infecciones. ⁽²⁾

Cerca del 20–30% de los individuos son portadores constantes de *Staphylococcus aureus*, lo cual significa que se encuentran persistentemente colonizados por esta bacteria. ^(2,3)

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

Este estudio pretende determinar la ocurrencia de genes *seb*, *sec* y *sed* 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 Oñacap-Saraguro-Ecuador, 2019.

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

1. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Staphylococcus aureus es un microorganismo que representa uno de los principales patógenos de gran importancia en el ser humano, se ha considerado su distribución a nivel mundial y existe un gran impacto de morbi-mortalidad, no solamente es considerable en infecciones hospitalarias, sino también a nivel comunitario, sin duda uno de los patógenos más importantes en la actualidad ⁽³⁾. 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 *seb*, *sed* y *sec* de *Staphylococcus aureus* que colonizan la cavidad oral de niños de Oñacapac-Saraguro?

2. JUSTIFICACIÓN.

Este tema de investigación está enfocado principalmente en conocer la ocurrencia de genes de virulencia en cepas orales de *Staphylococcus aureus*, que tipos de cepas se encuentran circulando en la cavidad bucal en niños escolares, en la comunidad de Saraguro. Esta investigación busca la ocurrencia de los genes *seb*, *sec* y *sed*, que codifican para 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. Desde el punto de vista científico el presente estudio tiene un nivel de originalidad nacional, debido a que no existen estudios de este tipo publicados en nuestra región, mucho menos en una comunidad étnicamente pura como la de Saraguro. El presente tema de interés personal dado que se presenta como parte de los requerimientos del programa académico de Odontología para titulación, este trabajo está dentro de las líneas de investigación de la Universidad Católica de Cuenca y también dentro de los tópicos de investigación en la carrera de Odontología Ocurrencia de genes *seb*, *sec* y *sed* en genomas de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral sana, por lo tanto, tiene concordancia con las políticas institucionales de investigación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *seb*, *sec*, y *sed*, que codifican para 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 *seb*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac- Saraguro mediante PCR.
- Cuantificar la frecuencia del gen *sec*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac - Saraguro mediante PCR
- Cuantificar la frecuencia del gen *sed*, 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*.

S. aureus, se caracteriza por ser una bacteria que puede llegar a producir varios tipos de infecciones, por esta razón se considera uno de los problemas significativos en la salud pública, esta bacteria se encuentra como el principal causante de infecciones nosocomiales, considerado el segundo patógeno más común implicado en intoxicación alimentaria. ⁽⁴⁾⁽⁵⁾

4.1.1 Hábitat.

Podemos encontrar *S. aureus* en los seres humanos, con mayor frecuencia en la nasofaringe, piel, pliegues inguinales, etc., logra adaptarse en el ser vivo formando parte de la flora normal sin causarle daño, también podemos encontrar esta bacteria en reservorios animales como: ganado, aves de corral, cerdos, principalmente en animales que producen leche, causando así gran variedad de infecciones en las glándulas mamarias que pueden contaminar diversidad de productos lácteos, pudiendo ser causa de intoxicación alimentaria. ⁽⁵⁾

Una de las especies más representativas en la cavidad oral es *Staphylococcus aureus*, su presencia como parte de la microbiota oral es controversial, puede llegar a estar asociada a infecciones supurativas de las glándulas salivales produciendo así infecciones endodónticas, periodontales que pueden afectar comúnmente a pacientes inmunocomprometidos, la colonización va a aumentar significativamente cuando existan este tipo de infecciones. ⁽⁶⁾

4.1. 2 Epidemiología.

Staphylococcus aureus, es un microorganismo que se caracteriza por ser un agente patógeno, la mayor parte de cepas son resistentes a la meticilina, esta bacteria puede encontrarse principalmente en la piel y mucosa nasal de una persona sana, sin embargo, las defensas pueden disminuir y originar diversidad de infecciones, existe un riesgo elevado en individuos que se encuentran hospitalizadas o inmunocomprometidos. ⁽⁶⁾

Es importante en la salud pública conocer que existen diversidad de infecciones causadas por esta bacteria pues se han reportado que existen altas cifras de brotes epidémicos a nivel mundial, con mayor frecuencia se darán en la comunidad y en los

hospitales, estos brotes en la actualidad se clasifican en infecciones adquiridas en la comunidad e infecciones nosocomiales respectivamente .⁽⁶⁾

4.1.3 Patogenia.

El 50% de la población puede ser portadora *de S. aureus* a nivel mundial y podemos encontrar este microorganismo de forma permanente en las fosas nasales, piel, etc., cuando estas barreras se destruyen la bacteria invade los tejidos más profundos en donde pueden ocasionar diferentes tipos de infecciones. Los pacientes que poseen mencionadas infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* suelen infectarse con la misma cepa que los coloniza, pudiendo inclusive transmitir esta bacteria entre individuos en la comunidad. ⁽⁷⁾

La incidencia de bacteriemia e intoxicaciones alimentarias en los últimos años producida por *S.aureus* está aumentando de manera alarmante. ⁽⁸⁾

4.1.4 Características Microbiológicas.

Staphylococcus aureus, son cocos grampositivos, de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, anaerobias facultativas, esta bacteria requiere de sales, vitaminas y aminoácidos para su crecimiento, estos microorganismos van a ser resistentes a la desecación, congelación y calor. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

4.1.5 Colonización.

S. aureus, coloniza principalmente la piel, nasofaringe, tracto gastrointestinal, etc., esta bacteria podemos encontrarla en humanos y animales, es considerado un microorganismo patógeno oportunista, existe una alta prevalencia de portadores en niños, se puede dar autoinfecciones con cepas que el individuo porta en la piel o a su vez en la nariz, esta bacteria puede estar presente sin causar ningún síntoma, pero con el tiempo puede llegar a ser un factor de riesgo predisponente para adquirir infecciones ya sean graves como las enfermedades sistémicas o leves como enfermedades de la piel. ⁽⁹⁾

4.2 Factores de Virulencia.

Los factores de virulencia se caracterizan por ser moléculas procedentes de bacterias tienen la capacidad de provocar múltiples enfermedades en el individuo. *S. aureus* produce varios factores de virulencia entre ellos están: toxinas como las hemolisinas,

enterotoxinas, leucocidinas, toxinas exfoliativas y adhesinas, una de las características más frecuentes es que las toxinas pueden dañar de forma directa los tejidos, iniciando reacciones tóxicas en un tejido específico, de esta manera las toxinas serán las responsables de generar síntomas característicos de múltiples enfermedades. ⁽⁹⁾

S. aureus produce un conjunto de enzimas como: nucleasas, proteasas, y colagenasas, que se limitan a favorecer su habilidad de invadir y poder originar infecciones en el individuo, la principal función de estas proteínas es la de degradar tejidos locales del huésped para así poder transformarlos en nutrientes para esta bacteria. ⁽⁹⁾

Varias cepas provocan proteínas como: enterotoxinas estafilocócicas, la toxina del síndrome shock tóxico, toxinas exfoliativas y la leucocidina, algunos de los factores de virulencia presentes en la bacteria están representadas por una familia de proteínas bacterianas con actividad superantigénica. ⁽¹⁰⁾

4.3 Enterotoxinas Estafilocócicas.

Existen enterotoxinas producidas por *S. aureus* pertenecientes a la familia de superantígenos, que son capaces de producir estimulación general del sistema inmune, las enterotoxinas son resistentes a la acción de enzimas del tracto digestivo e hidrosolubles. ⁽¹⁰⁾

La producción de infección alimentaria por *S. aureus* va a depender de múltiples factores como: la cepa involucrada, el inoculo, la puerta de entrada y la respuesta inmunológica al huésped. ⁽¹¹⁾

Las enterotoxinas estafilocócicas se clasifican de acuerdo al alfabeto siguiendo un mismo esquema de acuerdo como iban siendo descubiertas, por ejemplo, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see*, las podremos diferenciar una de otra por sus características antigénicas, encontramos diferentes tipos de enterotoxinas que han sido distinguidas serológicamente, ya sea por un análisis genético o bioquímico. ⁽¹¹⁾

Las enterotoxinas estafilocócicas se clasifican de acuerdo a los efectos biológicos que se producen en cada una de las células, ya que existe una interacción masiva al momento de llegar al torrente sanguíneo y va a producir variedad de síntomas que pueden ocasionar efectos colaterales llegando a provocar náuseas, vómito y fiebre. En general, existen mecanismos que pueden causar severas intoxicaciones alimentarias,

que dependerán de la cantidad de alimento ingerido, existen diferentes genes que codifican para enterotoxinas estafilocócicas, pero solo unos pocos han sido estudiados a profundidad siendo los más comunes *sea* y *seb*.⁽¹²⁾

Pueden existir cepas aisladas desde brotes de intoxicación alimentaria que producen genes que codifican para enterotoxinas principalmente (*sea*) y encontramos en menor medida *sed*, *sec* y *sed*.⁽¹²⁾

El gen *sea*, se caracteriza por ser el gen más frecuente y está profundamente relacionada con intoxicación alimentaria.⁽¹²⁾

El gen *seb*, además de estar involucrado en cuadros de intoxicación alimentaria, también es analizado por su potencial uso como arma biológica inhalada.⁽¹²⁾

El gen *sec*, es considerado un tipo de factor de virulencia serológico clásico, una de las causas comunes en la intoxicación alimentaria.⁽¹²⁾

El gen *sed*, se caracteriza por ser la segunda toxina estafilocócica promotora de intoxicación alimentaria a nivel mundial, varios estudios han demostrado que solo una pequeña cantidad de esta toxina ha sido necesaria.^{(13) (14)}

Las enterotoxinas además de ser proteínas bacterianas piogénicas, están relacionadas con enfermedades humanas, tales como diarrea y vómito e incluso puede darse una colitis pseudomembranosa, además son las responsables de la intoxicación alimentaria que van a resultar de la ingestión de enterotoxinas que se encuentren en el alimento que fue contaminado.^{(15) (16)}

Uno de los principales problemas en la salud a nivel mundial son las enfermedades transmitidas por alimentos, siendo *Staphylococcus aureus* el agente etiológico más común en las intoxicaciones alimentarias.^{(17) (18)}

La intoxicación alimentaria es una condición que se dará dentro de 24 a 48 horas, en donde se presentará síntomas comunes como vómito y diarrea, existirá un periodo de incubación corto en donde se hallarán proteínas bacterianas que serán codificadas por poseer un gen y una misma cepa en donde se producirá más de un tipo de enterotoxina.^{(19) (20)}

La presencia de enterotoxinas en alimentos procesados, se debe a la inadecuada práctica, contaminación cruzada con manipuladores o por la utilización de materia prima contaminada.^{(21) (22) (23)}

4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Es una técnica que se maneja en biología molecular con el fin de alcanzar varias copias de un fragmento de ADN, se fundamenta en elaborar una actividad enzimática que sucede de forma normal en las células de nuestro organismo. ^{(24) (26)}

Se han desarrollado varios protocolos de PCR que tienen como objetivo permitir la detección específica, rápida y simultánea de toxinas estafilocócicas de un fragmento de ADN. ^{(27) (28)}

Los pasos de una PCR son:

- **Desnaturalización** térmica del ADN que vamos a usar como molde. ⁽³⁰⁾
- **Anillamiento** debe estar a una temperatura más baja que la desnaturalización, aquí se dará la unión con los cebadores sintéticos (primers) con el fin que la secuencia permita unir uno a cada lado de la secuencia diana. ⁽³⁰⁾
- **Extensión** por parte del ADN polimerasa de los oligonucleicos anillados que actúan como primers o cebadores. ⁽³⁰⁾

Estos tres pasos se repetirán varias veces hasta obtener miles de copias del ADN diana.

En el resultado final de PCR influyen muchos factores los principales:

- Concentración y calidad del ADN. ⁽³⁰⁾
- Apropiado diseño de los cebadores. ⁽³⁰⁾
- Calidad y tipo de polimerasa. ⁽³⁰⁾
- Programa de amplificación. ⁽³⁰⁾

Al momento de mencionar la técnica de PCR van a existir ventajas, una de las más importantes es destacar su alto grado de especificidad, en la detección de enterotoxinas.

^{(29) (30)}



Gráfico 1. Multiplicación de ADN por PCR.

4.5. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.

González M, Flórez G., et al. en una investigación acerca de la “Detección y expresión de superantígenos y de resistencia antimicrobiana en aislamientos obtenidos de mujeres portadoras de *Staphylococcus aureus* que cuidan y alimentan niños establecieron la correlación entre genes de enterotoxinas mediante cultivos en aislamientos de *S. aureus* se encontró que el 22.0% correspondían a portadores de *Staphylococcus aureus*.

En una investigación denominada Portación de *Staphylococcus aureus* multirresistente a antimicrobianos en la cavidad bucal de niños que concurren para un tratamiento en una clínica odontológica, los autores Cataldo K., Russomando J., Fariña N., et al, encontraron que el 33% de 112 niños que se incluyeron en el estudio eran portadores de *S.aureus*

Pereira C., Costa K., et al, en su artículo: Papel de *Staphylococcus spp.* en la mucositis oral, es un artículo científico de revisión bibliográfica que habla sobre los conocimientos actuales de la bacteria, la presencia de *Staphylococcus aureus* en la mucosa oral, destacando que lo más importante en este artículo es el desarrollo de la bacteria en la actualidad en la mucosa oral.

González M, et al, realizaron un estudio denominado “Frecuencia de colonización de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en un grupo de niños en edad escolar” estudio 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* con un porcentaje del 36.7%.

En un artículo de revista denominado Colonización y factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en una población infantil de Montería los autores Caldera D., Buevas F., et al, tuvieron como objetivo determinar la prevalencia y las características microbiológicas y moleculares del SARM en una población infantil sana en donde se obtuvo como resultado que la tasa de colonización por SARM fue del 9,3%.

En un 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 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.

En un artículo de revista denominado Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación, los autores Zendejas H., Avalos M., et al, hablan sobre las diferentes características que posee la bacteria destacando en este artículo varias características para el aislamiento y estudio del patógeno utilizando varios métodos microbiológicos.

Rodríguez F., Carpinelli B. et al, en su artículo denominado Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta, durante el año 2010 tuvieron como objetivo determinar un perfil de virulencia detectando los genes codificantes de hemolisinas, enterotoxinas y toxinas exfoliativas 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 Panton Valentine, el cual fue el factor de virulencia más frecuente (58%), seguido de las hemolisinas alfa y beta (8%). Las enterotoxinas y las toxinas exfoliativas fueron menos frecuentes (0-2%).

En un artículo denominado, Genes codificadores para enterotoxinas de aislamientos de estafilococos coagulasa negativos y coagulasa positivos a partir de muestras de mastitis bovina los autores Merchan M., Castellanos N., et al, tuvieron como objetivo determinar la presencia de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas *Staphylococcus aureus* fue la cepa más frecuente (88,5 %). El gen *sea* (1,7 %), el gen *seb* (3,6 %), el gen *sec* (3,6 %), y en el gen *sed* no se detectó ninguna de las cepas evaluadas (0%).

En un 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” Suarez et al, analizaron por medio de reacción en cadena de la polimerasa la aparición del gen que codifica para la enterotoxina A en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus*. Se examinaron 69 cepas de *S. aureus* y se realizó un análisis estadístico donde se obtuvo que el gen *sea* estaba presente en 7 de estas cepas, es decir en un 4%.

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 *seb*, *sec* y *sed*, que codifican para 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>seb</i>	Gen <i>seb</i> que codifica para Enterotoxinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>seb</i> .	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos. Ficha de registro.
Genotipo <i>sec</i>	Gen <i>sec</i> que codifica para Enterotoxinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>sec</i> .	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de Datos Ficha de registro.
Genotipo <i>sed</i>	Gen <i>sea</i> que codifica para Enterotoxinas en <i>Staphylococcus</i>	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>sed</i> .	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos. Ficha de registro.
Presencia de múltiples genes	Genes <i>seb</i> , <i>sec</i> y <i>sed</i> que codifican para Enterotoxinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia de genes, se establece mediante amplificación por PCR.	Genes <i>seb</i> , <i>sec</i> y <i>sed</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>seb, sec, sed</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.

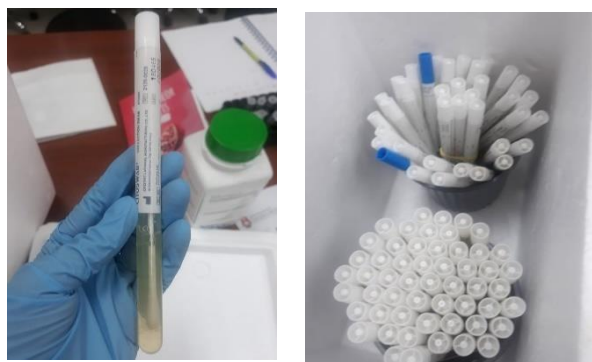


Fig. 1. Medio de transporte Stuart.

Agar sal manitol

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

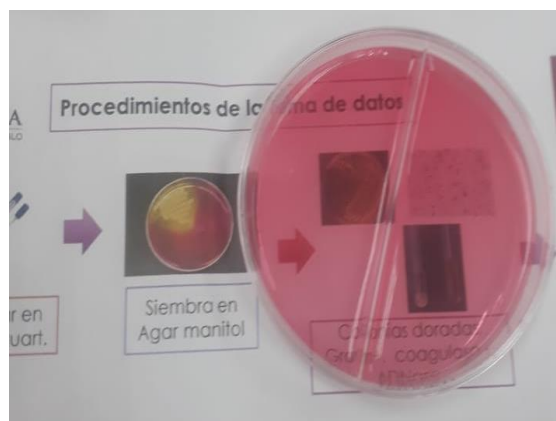


Fig. 2. Siembra de *S. aureus* en Agar Sal Manitol.

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 24 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 debe realizar 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 toma del cultivo de Agar Sal Manitol una porción de colonia de *S. aureus*, luego se procede a suspender en tubos de Eppendorf en 1ml de agua destilada estéril.
- Se coloca 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, y se llevaron los tubos a calor en el equipo termociclador por 15 minutos.
- Añadimos 450 ul de agua libre de nucleasas y centrifugamos por 20 segundos.

Reacción en la Cadena Polimerasa (PCR)

La PCR se desarrolló en un termociclador de marca Bionner, se usó Mastermix GoTaq Green 2x de Promega, que contiene: Go Taq Green polimerasa, dNTP's; buffer de reacción, magnesio, agua y tampón de depósito, a esto se le adiciona el ADN de doble cadena (muestra) y los dos primers específicos para cada gen.

Reactivos	Volumen en ul	Nº de muestras	Volumen total
Master mix µl	10	x 20	200 µl
Primer 1 µl	1,5	x 20	30 µl
Primer 2 µl	1,5	x 20	30 µl
ADN µl	3	x 20	60 µl
Agua µl	5	x 20	100 µl
Volumen final µl	21	x 20	420 µl

Luego de obtener la Mastermix se lleva al termociclador y se procede de la siguiente manera:

1. Desnaturalización inicial por 5 min a 94°C

2. 34 ciclos de:

1 minuto x 94°C para desnaturalización.

1 minuto x 54°C para alineamiento.

1 minuto x 72°C para elongación.

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

Los primers o cebadores utilizados para la detección de *seb*, *sec* y *sed* fueron:

Bacteria	Toxinas	Genes	Primers	Tamaño	Bibliografía
<i>Staphylococcus aureus</i>	Genes que codifican para Enterotoxinas	Seb	F: ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA R: ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	404 pb	Llana et al., 1999
		Sec	F: GTAAAGTTACAGGTGGCAAACTTG R: CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	297 pb	Jarruad et al., 2002
		Sed	F: GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG R: GCTGTATTTTTCTCCGAGAGT	297pb	Jarruad et al., 2002



Fig.3. Amplicones de los genes.

Electroforesis horizontal.

La electroforesis es el siguiente 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 diluye homogéneamente y se lleva 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 del amplicon 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.

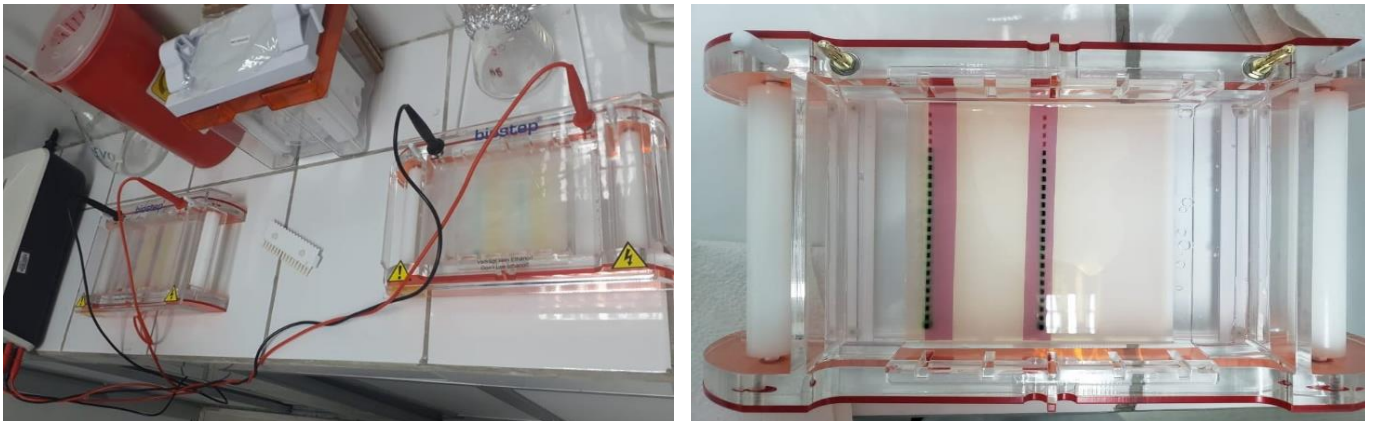


Fig.5. Cámara de electroforesis.

Para la corrida en electroforesis horizontal se trabajó 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 Trasiluminador UV.
Fig.6., Fig.7., Fig.8., Fig.9.

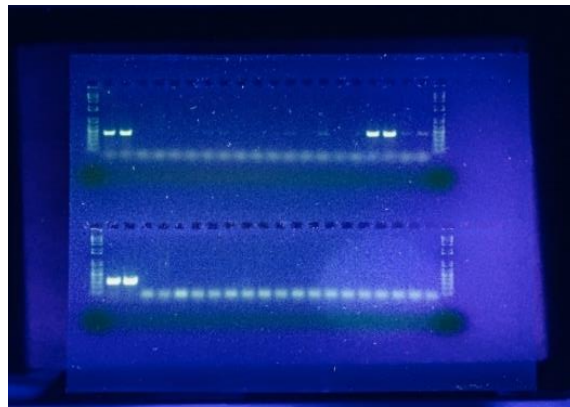


Fig.6. Observación de amplicones en el Trasiluminador.

Gen: *seb* (codifica a enterotoxina)

Amplicon: 404pb.

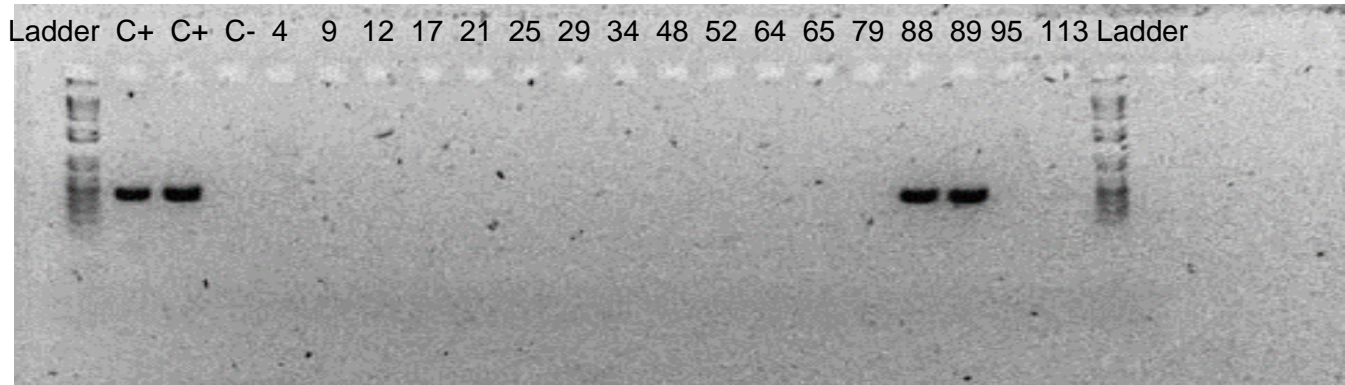


Fig.7. Amplificación de la secuencia del gen *seb* que codifica para Enterotoxinas.

Gen: *sec* (codifica a enterotoxina)

Amplicón:297 pb.

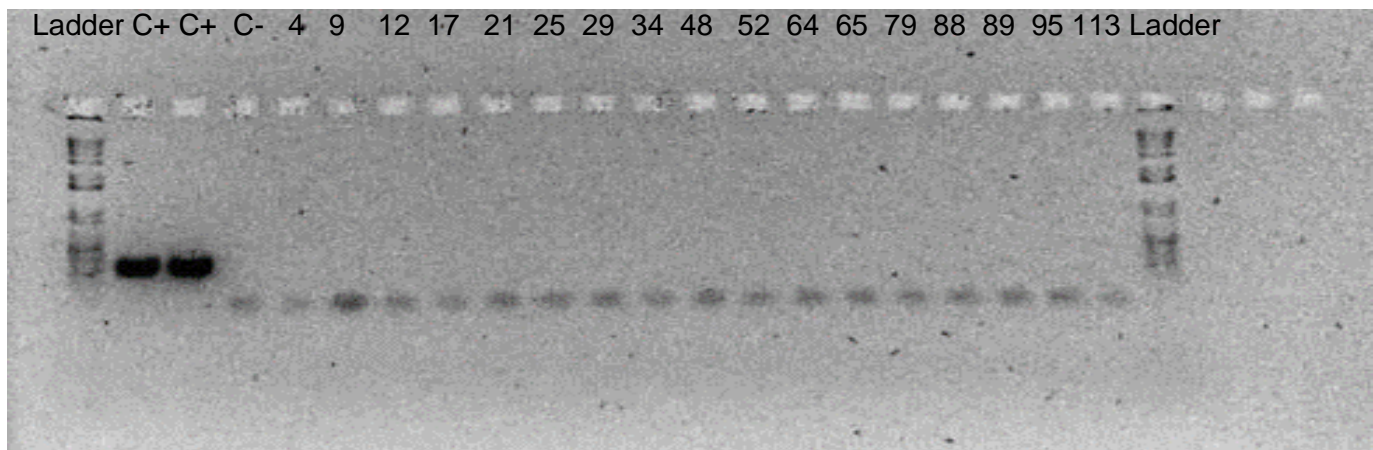


Fig.8. Amplificación de la secuencia del gen *sec* que codifica para Enterotoxina.

Gen: sed (codifica a enterotoxina)
Amplicon: 492 pb.

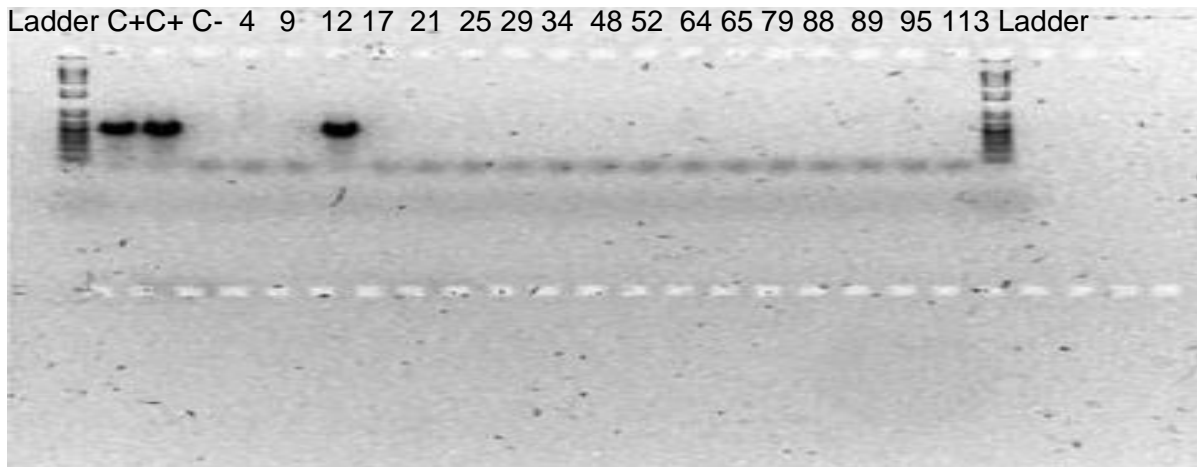


Fig.9. Amplificación de la secuencia del gen *sed* que codifica para Enterotoxina.

5. PROCEDIMIENTOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS

Una vez conseguidos los datos, se observó la existencia de los distintos tipos de genes *seb*, *sec* y *sed*. 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.

6. 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 de la Universidad Católica de Cuenca.

CAPITULO III
RESULTADOS, DISCUSION, CONCLUSIONES.

1.RESULTADOS:

Tabla N° 1. Presencia del gen *seb* que codifica para Enterotoxinas.

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

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras.

En la tabla N°1 encontramos que del total de las 17 muestras analizadas (positivas a *S. aureus*), podemos evidenciar que 2 muestras presentaron el gen *seb*, lo que representa un 12%; y la ausencia del gen en 15 muestras, correspondientes al 88 % 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 *sec* que codifica para Enterotoxina.

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

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras

En la tabla número N°2, podemos observar que del total de las 17 muestras analizadas (positivas para *S. aureus*), no existió la presencia del gen *sec* en las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de la comunidad de Oñacapac-Saraguro.

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

FACTOR DE VIRULENCIA		
Gen: <i>sed</i>		
	N	%
Presencia del gen <i>sed</i>:	1	6
Ausencia del gen <i>sed</i>:	15	94
Total de muestras	17	100

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras.

La tabla N°3, encontramos que del total de las 17 muestras analizadas (positivas a *S. aureus*), podemos evidenciar que 1 muestra presentó el gen *sed*, lo que representa un 6%; y la ausencia del gen en 16 muestras, correspondientes al 94 % de las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de la comunidad de Oñacapac-Saraguro.

Tabla N°4. Tabla de genes *seb*, *sec* y *sed*

FACTORES DE VIRULENCIA			
Cepas	Enterotoxinas		
	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>
4	0	0	0
9	0	0	0
12	0	0	1
17	0	0	0
21	0	0	0
25	0	0	0
29	0	0	0
34	0	0	0
48	0	0	0
52	0	0	0
64	0	0	0
65	0	0	0
79	0	0	0
88	1	0	0
89	1	0	0
95	0	0	0
113	0	0	0

Fuente: Datos tabulados por el autor

La tabla N°4 Nos muestra el análisis de las 17 muestras positivas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral en niños de Oñacpac-Saraguro, se puede evidenciar que no existieron más de dos genes presentes en la misma cepa de *S. aureus*, que se establecieron mediante la amplificación por PCR.

2.DISCUSIÓN.

Las enterotoxinas producidas por *S. aureus* son generadas por infecciones de origen alimentario; en esta investigación buscamos los genes *seb*, *sec* y *sed* que codifican para enterotoxinas que se encuentran presentes en *S. aureus* aislados de la mucosa oral de niños de Saraguro (17 muestras positivas) los resultados obtenidos fueron: 2 muestras positivas para *seb* (12%), ninguna muestra positiva para *sec* (0%) y 1 muestra positiva para *sed* (6%). Se trata del primer estudio en su tipo realizado a nivel local.

En el caso de nuestra población de estudio existe una baja frecuencia de portación de estos genes, pero es importante destacar que al momento que una cepa presenta estos genes son virulentos, por ello deben extremarse cuidados, hacer estudios de seguimiento continuo de esta población altamente susceptible, con el fin de evitar que existan cepas circulantes de *S. aureus* en niños, evaluando que existen factores de riesgo para la colonización en esta comunidad.

Márquez R., en su estudio mediante un recuento de *S. aureus* y detección de enterotoxinas, analizaron 28 cepas que resultaron positivas para *S. aureus*, en donde se determinó que el 11,5% contienen el gen *seb*, el 3.8% tenía el gen *sec* y 3,8% poseía el gen *sed*. A diferencia de nuestro estudio de 17 cepas analizadas se obtuvo el 12% para el gen *seb*, el 6% para el gen *sed* y no se encontró en ninguna cepa el gen *sec*.

Merchán M. et al., en su análisis de genes codificadores para enterotoxinas analizaron 57 cepas, de las cuales el 1.7% poseían el gen *seb*, el 3.4% para el gen *sec* y no se detectó ninguna cepa para el gen *sed*, por consiguiente, existe una diferencia con los resultados realizados en esta investigación ya que de 17 cepas analizadas se observó un 12% para *seb*, no se detectó en ninguna cepa el gen *sec*, y el 6% poseían el gen *sed*

Brizzio A. et al., en su análisis de 12 cepas de *S. aureus* aislados de alimentos, determinó que el gen *seb* se encontraba en un 29 %. A diferencia de nuestro estudio de 17 cepas de *S. aureus*, el 12% resultaron positivas para el gen *seb*, mientras los genes *sec* y *sed*, se encontraron en menor proporción del 14% para cada uno de los genes, en nuestros resultados en el gen *sec* no se encontraron muestras positivas y del gen *sed* se obtuvo 1 muestra positiva con total del 6%.

Corredor F. et al., en su estudio de 100 cepas aisladas de *S. aureus*, determinó que el 17% poseían el gen *sec*, el 11% poseían el gen *seb* y el 3% poseían el gen *sed*. Al contrario, en este estudio existió gran diferencia se analizaron 17 cepas en donde se detectó que el 12% correspondía al gen *seb*, el 6% para el gen *sed* y no se encontró en ninguna muestra positiva para el gen *sec*.

González M. et al., en su estudio en cepas aisladas de *S. aureus* obtenidas de mujeres portadoras de *S. aureus* que cuidan y alimentan niños, determinó que el 22,0 % de los aislamientos correspondía a portadoras de esta bacteria de las cuales el 8.4% poseía el gen *seb*, en el caso de nuestra población de estudio de las 17 cepas analizadas, el gen *seb* no poseía muestras positivas.

3. CONCLUSIONES:

- La frecuencia del gen *seb*, que codifica para enterotoxina, fue de un 12% del total de las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro.
- Ninguna de las cepas presentó el gen *sec* en *S. aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro presentó el gen *sec*.
- La frecuencia del gen *sed*, que codifica para enterotoxinas, fue de un 6% del total de las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro.
- No se determinó la existencia de 2 o más genes a la vez que codifican para enterotoxinas a la vez en las cepas de *S. aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Cisterna R, Madriaga L. Patogenia de La infección por *Staphylococcus aureus*. Dep Microbiol e Inmunol Fac Med Univ del País Vasco/EHU Bilbao. 2014;11(1):11–7.
2. 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.
3. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections . Annu Rev Pathol Mech Dis. 2016;11(1):343–64.
4. 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.
5. 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.
6. Lazarte C, Paladino L, Mollo L, Katra R. Manejo y tratamiento quirúrgico de infecciones por *Staphylococcus aureus*. Rev Asoc Odontol Argent. 2018;51–6.
7. Gabriela Sanabria B. Evolución de la resistencia de *Staphylococcus aureus*. Evolution of resistance in *Staphylococcus aureus*. Rev Inst Med Trop Sanabria, G. 2014;3(2):27–39.
8. 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.
9. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):16–34.
10. 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 Infecc EN PEDIATRÍA. 2007;XX(80):86–91.
11. Lazarte C, Paladino L, Mollo L, Katra R. Manejo y tratamiento quirúrgico de infecciones por *Staphylococcus aureus*. Rev Asoc Odontol Argent. 2018;51–6.

12. 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.
13. Almeida Cruz ED, Pimenta FC, Hayashida M, Eidt M, Gir E. Detección de *Staphylococcus aureus* en la boca de trabajadores de la limpieza hospitalaria. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2011;19(1):90–6.
14. Caldera DM, Buelvas F, Escobar J, Tovar C. Colonización y factores de virulencia *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una población infantil de Montería. *latreia* 2015;28(3):259–68.
15. González, Yina Marcela Restrepo, Gladys Fernanda Ortiz J, Santacruz J, Álvarez A. Detección y expresión de superantígenos y de resistencia antimicrobiana en aislamientos obtenidos de mujeres portadoras de *Staphylococcus aureus* que cuidan y alimentan niños. *Biomedica* 2018;38(1):96–104.
16. 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 Nú, durante el año 2010. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud*. 2015;13(1):58–66.
17. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Publica Mex* . 2005;47(5):381–7.
18. Routray S, Rath S, Mohanty N. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from saliva samples of patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Res* 19;8(1):30–6.
19. Estrella Cervantes, Rafael García MS. Características generales del *Staphylococcus aureus* Estrella. *Anti-Corrosion Methods Mater* . 1964;11(4):11–4.
20. Mabel Gonzales, Itzel Juárez LG. Frecuencia de colonización de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en un grupo de niños en edad escolar. *Rev ENFERMEDADES Infec EN PEDIATRÍA*. 2007;20(80):86–91.

21. Castañón-sánchez CA. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Evid Médica e Investig en Salud. 2012;5(3):79–84.
22. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. Rev Biomed . 2014;25(3):129–43.
23. Márquez J. Recuento de *Staphylococcus aureus* y detección de enterotoxinas estafilocócicas en queso blanco venezolano artesanal tipo “telita” expandido en mercados de la ciudad de Caracas. Rev la Soc Venez Microbiol. 2012;32(2):112–5.
24. Borges M, Arcuri E, Pereira J, Feitosa T, Kuaye A. *Staphylococcus* Enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados. bol do Cent Pesqui Process Aliment. 2008;26(1).
25. González Julia AM, Elías PY. Elementos de interés clínico en la microbiología molecular de *Staphylococcus aureus* Elements of clinical interest in the molecular microbiology of *Staphylococcus aureus*. Rev Cuba Med Mil 2017;46(4):407–16.
26. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus spp* and *Candida spp* in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. Acta Odontol Latinoa. 2010;23(1):20–6.
27. Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomédica . 2006;17(4):287–305.
28. Perazzi B, Camacho M, Bombicino K, Flores Z. *Staphylococcus aureus*: Nuevos y antiguos antimicrobianos. Rev Argent Microbiol . 2010;42(3):199–202.
29. Cataldo K, Toledo N, Fariña N, Pereira A, Rodríguez F. Portación de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a antimicrobianos en cavidad bucal de niños que concurren para un tratamiento en una clínica odontológica
30. Paraguay. Pediatría Organo Of la Soc Paraguaya Pediatría 2014;41(3):201
Utreras, Chiluisa, Jorge Coba AE. Determinación por PCR en tiempo real de *Escherichia coli* en muestras de comida rápida. Rev CIENCIAS LA VIDA Artículo 2014;19(1):44–50

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>																													
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: 60%;"></th> <th style="width: 20%; text-align: center;">Muestras</th> <th style="width: 20%; text-align: center;">Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MM _____ ul x _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Primer F _____ ul x _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Primer R _____ ul x _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>ADN _____ ul x _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Agua _____ ul x _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Total _____ ul x _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </tbody> </table> <p>Protocolo Usado</p> <p>1.- Desnaturalización inicial _____ min x _____ °C</p> <p>2.- _____ ciclos de:</p> <p style="padding-left: 40px;">Desnaturalización _____ min x _____ °C</p> <p style="padding-left: 80px;">Alineamiento _____ min x _____ °C</p> <p style="padding-left: 40px;">Elongación _____ min x _____ °C</p> <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 _____	_____	_____
	Muestras	Total																															
MM _____ ul x _____	_____	_____																															
Primer F _____ ul x _____	_____	_____																															
Primer R _____ ul x _____	_____	_____																															
ADN _____ ul x _____	_____	_____																															
Agua _____ ul x _____	_____	_____																															
Total _____ ul x _____	_____	_____																															
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 Domínguez

Fecha de Nacimiento: 14/03/2009

SEXO: Femenino: () Masculino: (X)

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 disueltos siguiendo las normas de bioseguridad (convenio EMOV).
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: Hircy 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 Odori. 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.

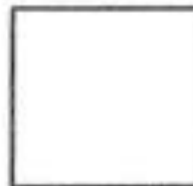
La publicación de los datos se hará respetando el anonimato, es decir, tu nombre no se mencionará.

¿Tienes alguna pregunta?

¿Deseas colaborar con nosotros?

SI NO ()

Firma del Estudiante



PULGAR DERECHO

Nombre y Apellido *Jamila Keizira Te Gomez*

Lugar y Fecha: Cañazapac. 10 de enero de 2019