



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE ODONTOLOGIA

“OCURRENCIA DE GENES *hla*, *hly* y *hld*, 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 ODONTOLOGO

AUTOR: NELLY MARIBEL MINCHALO SIGUA

DIRECTOR: Dra. MSc. ORELLANA BRAVO, PAOLA PATRICIA

CUENCA - ECUADOR

2020

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

DECLARACIÓN

Yo, Nelly Maribel Minchalo Sigua, declaro bajo el juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría lo cual no ha sido previamente presentando para ningún trabajo de titulación y he consultado todas las referencias bibliográficas que incluyen en este documento, y eximo 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 de este trabajo, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y normatividad institucional vigente.



.....

Autora: Nelly Maribel Minchalo Sigua

C.I.: 0150210698

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 *hla*, *hIb* y *hIc*, 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 **MINCHALO SIGUA, NELLY MARIBEL**, 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, septiembre 2020



.....

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 *hla*, *hlb* y *hld*, 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 **MINCHALO SIGUA, NELLY MARIBEL**, 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, septiembre 2020



.....
Tutora: Dra. MSc. Orellana Bravo, Paola.

DEDICATORIA

Este trabajo se la dedico a Dios por haberme permitido llegar hasta este momento de mi formación profesional, a mis padres que día a día me apoyaron, a mi abuelito. Daniel a mi hijo, se las dedico a mis abuelitos que en estos momentos ya no están presentes cada uno contribuyo con un consejo en su debido momento para que yo pueda ir a escalando mi meta de igual manera a todos mis amigos y familiares que directa e indirectamente me ayudaron a concluir mi carrera.

Minchalo Sigua Nelly Maribel

EPÍGRAFE

“La inteligencia consiste no solo en el conocimiento,
sino también en la destreza de aplicar
los conocimientos en la práctica.”

Aristóteles (AC)

AGRADECIMIENTO.

Quiero agradecer a Dios por haberme brindado sabiduría y fuerzas por haberme permitido día tras día abrir mis ojos y levantarme para perseguir mi meta y llegar hasta este momento de mi vida profesional, quiero agradecer a mis padres por haberme ayudado y motivado a llegar a cumplir mi sueño depositando en mi la confianza

de ser una gran profesional.

A mi abuelito Daniel por ser un hombre maravilloso que día a día estuvo motivándome y dándome los consejos para seguir por un buen camino.

Quiero agradecer a mis compañeros que luego se convirtieron en mi familia gracias Carolina R. y Daniel V.

Quiero agradecer a la Dra. Paola Patricia Orellana por haberme brindado su colaboración para la culminación de este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

hla: Hemolisina alfa.

hlb: Hemolisina beta.

hld: Hemolisina delta

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

QS: Quorum-sensing

ÍNDICE

RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO I.....	15
PLANTEAMIENTO TEORICO.....	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 microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
4.1.2. Colonización	¡Error! Marcador no definido.
4.2. Enfermedades que causa <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> en la cavidad oral.	19
4.2.1. Elementos de virulencia y patogenicidad	19
4.2.2. Clasificación de las toxinas que se encuentran en el <i>S. aureus</i>	20
4.3. Hemolisinas.....	20
4.3.1. Hemolisina Alfa	21
4.3.2. Hemolisina Beta	21
4.3.3. Hemolisina Delta.....	22
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	22
5. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION.....	24
6. HIPÓTESIS	26
CAPITULO II.....	¡Error! Marcador no definido.
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL.....	27
1. MARCO METODOLOGICO	¡Error! Marcador no definido.
2. POBLACION Y MUESTRA	28
2.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN.	28
Criterios de inclusión:.....	28
Criterios de exclusión:.....	28
2.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA.	¡Error! Marcador no definido.
3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	¡Error! Marcador no definido.
4. INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE	

DATOS.....	30
4.1 Instrumentos documentales	30
4.2 Instrumentos mecánicos.....	30
4.3. Materiales y Equipos	¡Error! Marcador no definido.
4.4. RECURSOS.....	31
5. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS.....	31
5.1. Ubicación espacial.....	31
5.2. Ubicación temporal.....	31
5.3. Procedimientos de la toma de datos.....	31
CAPITULO III.....	38
1. RESULTADOS	39
TABLA N° 1. Presencia del gen <i>hla</i> que codifican para hemolisina.....	39
TABLA N° 2 Presencia del gen <i>hlb</i> que codifica para hemolisina.....	39
TABLA N° 3 Presencia del gen <i>hld</i> que codifica para hemolisina.....	40
TABLA N°4. Genes <i>hla</i> , <i>hlb</i> y <i>hld</i> que se presentan en la misma cepa de <i>S. aureus</i>	41
2. DISCUSIÓN	42
3. CONCLUSIÓN	43
4. BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 1.....	48
FICHA DE EXTRACCIÓN DE ADN	48
Anexo 2.....	49
CONCENTIMIENTO INFORMADO PARA LA MUESTRA DE TOMA BIOLÓGICA .	49
Anexo 3.....	50
ASENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS ..	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. Medio de transporte Stuart.....	33
Fig.2. Agar Sal Manitol	34
Fig.3. Amplicones de los genes.....	36
Fig.4. Gel de agarosa y colocación de Syber Safe.....	37
Fig.5. Cámara de electroforesis	37
Fig.6. Transiluminador UV.....	38
Fig.7. Amplificación de la secuencia del gen <i>hla</i> que codifica para Hemolisina	39
Fig.8. Amplificación de la secuencia del gen <i>hllb</i> que codifica para Hemolisina.....	39
Fig.9 Amplificación de la secuencia del gen <i>hld</i> que codifica para Hemolisina	39

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1. Presencia del gen *hla* que codifican para hemolisina. **¡Error! Marcador no definido.**

TABLA N°2 Presencia del gen *hnb* que codifica para hemolisina. ... **¡Error! Marcador no definido.**

TABLA N°3 Presencia del gen *hld* que codifica para hemolisina. .. **¡Error! Marcador no definido.**

TABLA N°4. Genes *hla*, *hnb* y *hld* que se presentan en la misma cepa de *S. aureus*.....**¡Error! Marcador no definido.**

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *hla*, *hnb* y *hld*, que codifican para hemolisinas en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral de niños de Oñacapac-Saraguro, Ecuador. **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 implicaron la detección de los genes *hla*, *hnb* y *hld*, que codifican para hemolisinas 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 8 muestras presentaron el gen *hla*, 4 muestras presentaron el gen *hnb* y 9 muestras presentaron el gen *hld*, se determinó la existencia de 2 o más genes que codifican para hemolisinas en las cepas 12, 21, 88, 89 y 113. **CONCLUSIÓN:** La frecuencia del gen *hla*, fue de un 47%, del gen *hnb*, fue de un 24%, del gen *hld*, fue de un 53%, la frecuencia de cepas que presentaron dos y tres genes simultáneamente fue del 18% y 12% respectivamente, genes que codifican para hemolisinas presentes en cepas de *S. aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de Oñacapac-Saraguro, concluyendo que estas cepas son altamente virulentas.

PALABRAS CLAVES: *Staphylococcus aureus*, hemolisinas, PCR

ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the frequency of the virulence genes *hla*, *hlb* and *hld*, which code for hemolysins in oral strains of *Staphylococcus aureus* isolated in the oral mucosa of children from Oñacpac-Saraguro-Ecuador. **MATERIALS AND METHODS:** Retrospective descriptive study of temporality, 110 samples were obtained from the oral cavity of children between 6 and 12 years of age in the community of OñaCapac-Saraguro; 17 of these samples were positive for *S. aureus*. The PCR reactions involved the detection of the *hla*, *hlb* and *hld* genes, which code for Hemolysins of this bacterium. For data collection, a DNA extraction and PCR extraction record were 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 evidence 8 samples presented the *hla* gene, 4 samples presented the *hlb* gene and 9 samples presented the *hld* gene, it was determined the existence of 2 or more genes that code for hemolysins in strains 12, 21, 88, 89 and 113. **CONCLUSION:** The frequency of the *hla* gene was 47%, the *hlb* gene was 24%, the *hld* gene was 53%, The frequency of strains that presented two and three genes simultaneously was 18% and 12% respectively, genes that code for hemolysins present in *S. aureus* strains isolated in the healthy oral mucosa of schoolchildren from Oñacpac-Saraguro, concluding that these strains are highly virulent.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*, hemolysins, PCR

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) microorganismo que posee la capacidad de invadir e infectar distintos tejidos, posee genes que codifican para factores de virulencia que contribuyen a una rápida progresión de la enfermedad. *S. aureus* es un microorganismo patógeno importante ya que es responsable de infecciones hospitalarias y comunitarias. Las infecciones que causa *S. aureus* pueden ir desde infecciones leves a nivel de la piel e intoxicaciones alimentarias a enfermedades que comprometen la vida del ser vivo como la neumonía, el síndrome del shock tóxico, septicemia, etc., que pueden llevar a la muerte del ser vivo. La gravedad de las patologías depende de los factores de virulencia que posea este microorganismo, entre los factores de virulencia producidos por *S. aureus* tenemos: toxina TSST, toxinas exfoliativas, enterotoxinas, leucocidinas, hemolisinas.⁽¹⁾

El propósito de este estudio es la detección de los genes *hla*, *hlb* y *hld* que codifican para las hemolisinas en las cepas de *S. aureus* aisladas en la mucosa oral de los escolares de 12 años en la comunidad de Oñacapac-Saraguro, Ecuador 2019.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEORICO

1. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Staphylococcus aureus es un patógeno extraordinario que tiene cualidades de supervivencia en condiciones ambientales desfavorables, la cual colonizan partes del cuerpo humano como las mucosas y la piel, llegando a causar daños graves como son las infecciones en los tejidos.⁽¹⁾ La virulencia de *S. aureus* es muy compleja, ya que involucra numerosos factores y distintos sistemas de regulación y se han manifestado distintos factores de virulencia dentro de ello tenemos la producción de enzimas, toxinas y superantígenos.⁽¹⁾ Algunas de cepas de *S. aureus* tienen la capacidad de reducir proteínas extracelulares, presenta hemolisinas como son *hla*, *hly* y *hld* que tienen la capacidad hemolítica y citolítica ya que actúan sobre determinadas células del huésped.⁽²⁾ No se conoce la ocurrencia de los genes que codifican para hemolisinas, surgió por la existencia de *Staphylococcus aureus* en los niños de Saraguro de la Comunidad de Oñacpac. Por ello se planteó la siguiente interrogante ¿Cuál es la ocurrencia con la que en los genomas de cepas orales se detectan los genes *hla*, *hly* y *hld* de *S. aureus* que colonizan la cavidad oral de niños de la comunidad de Oñacpac Saraguro?.

2. JUSTIFICACIÓN

Este tema de investigación está enfocado en detectar la ocurrencia de los genes de virulencia (hemolisinas) en las cepas de *S. aureus* que se encuentran en la cavidad oral de los niños escolares, en la comunidad de Saraguro.

La relevancia humana del estudio, se relaciona con los factores de riesgo que *Staphylococcus aureus* puede ocasionar en personas inmunocomprometidas.

En base a la relevancia social, es necesaria la promoción y la prevención sobre la salud bucodental en la población de Oñacpac- Saraguro.

Desde el punto de vista científico este estudio tiene un nivel de originalidad nacional, debido a que no existen estudios de este tipo publicados en nuestro país, y menos en la etnia de Saraguro. Este tema de investigación se presenta como tema de interés personal, como parte de uno de los requerimientos del programa académico de la carrera de Odontología para la titulación, este trabajo está dentro del margen de investigación en Odontología como es el detectar los genes que codifican para hemolisinas *hla*, *hly*, *hld*, aisladas en la mucosa oral por lo cual tiene un nivel de concordancia con las políticas institucionales de investigación.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *hla*, *hlb* y *hld*, que codifican para hemolisinas 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 *hla*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Saraguro mediante PCR.
- ✓ Cuantificar la frecuencia del gen *hlb*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Saraguro mediante PCR.
- ✓ Cuantificar la frecuencia del gen *hld*, que está presente en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Saraguro mediante PCR.
- ✓ Cuantificar la frecuencia de cepas que presentan dos y tres genes simultáneamente.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria gram positiva, oportunista, su diámetro está dentro de 0.5 a 1.5 micras. Esta bacteria se reconoce por formar racimos. Este microorganismo es de fácil adaptación y afectan a los mamíferos.⁽³⁾⁽⁴⁾ En el ser humano este microorganismo patógeno puede causar una multitud de infecciones letales, esta bacteria ha desarrollado resistencia a casi todos los antimicrobianos, es capaz de producir intoxicaciones alimentarias e infecciones a nivel de la piel.⁽⁵⁾⁽²⁾ *Staphylococcus aureus* puede causar infecciones adquiridas en la comunidad y también a nivel hospitalario dejando graves secuelas.⁽⁶⁾⁽¹⁾ Causando bultos o granos a nivel de la piel así como provocando el síndrome de shock tóxico, endocarditis, neumonía y sepsis.⁽⁷⁾ *Staphylococcus aureus* es el principal responsable de las bacteriemias que se producen en las casa de salud.⁽⁸⁾⁽⁹⁾

4.1.1 Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*.

Cocos gran positivos, no esporulados, inmóviles, no producen cápsula, la pared celular de este microorganismo posee la unión de ácidos teicoicos que es una gran diferencia a nivel de los micrococos,⁽²⁾ tiene la capacidad de producir catalasa y coagulasa lo que lo convierte en un patógeno muy agresivo para el ser humano.⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ Cuando forma colonias en los diferentes medios de cultivo producen un pigmento dorado.^{(2) (3)}

4.1.2 Colonización

Es la presencia, crecimiento, reproducción de la bacteria sin la respuesta en el hospedero, esta bacteria se puede encontrar a nivel de las fosas nasales, nasofaringe, partes adyacentes como son el vestíbulo nasal, a nivel del epitelio escamoso húmedo del tabique, se puede encontrar a nivel de la piel, periné, en el tracto gastrointestinal, axilas, vagina, etc.⁽¹²⁾⁽¹³⁾

Staphylococcus aureus es un microorganismo que su principal sitio de colonización en las personas es la mucosa de la nariz, si la proliferación de esta bacteria aumenta el riesgo de una infección es mayor. Esta bacteria puede extenderse hasta el torrente sanguíneo, esparcirse a órganos importantes y producir infecciones.⁽⁶⁾

La colonización de *S. aureus* puede ser de 3 tipos:

1. Portador persistente: Ser vivo colonizado por *S. aureus* por periodos prolongados de tiempo, se calcula que en la población el 10% a 35% están colonizados de esta manera.
2. Portadores intermitentes: Ser vivo donde la cepa que lo coloniza se encuentra en ciertos periodos de tiempo, dentro de este grupo se encuentran del 20% al 75% en este círculo de colonización.
3. No portadores: Ser vivo que nunca estuvo en contacto con este microorganismo dentro de este grupo se encuentra el 5% al 50 %.⁽³⁾

4.1.3 Enfermedades que causa *Staphylococcus aureus*.

Es un microorganismo patógeno, responsable de infecciones a nivel nosocomial y las que son adquiridas en la comunidad, mantiene un alto rango de severidad comenzando desde pequeñas infecciones a nivel de la piel e intoxicaciones por alimentos hasta enfermedades letales como el síndrome de shock tóxico, osteomielitis, neumonía necrotizante, septicemia, etc.⁽⁹⁾

4.1.4 *Staphylococcus aureus* en la cavidad oral.

Se ha aislado una amplia gama de infecciones a nivel de la cavidad oral del ser humano, dentro de las cuales tenemos que a nivel de la mucosa oral se encuentra la queilitis angular, infecciones endodónticas, osteomielitis de la mandíbula, parotiditis, recientemente se reconoció una forma de mucositis orales en pacientes de edades avanzadas que reciben tratamiento parenteral. *S. aureus* en los niños se ve este microorganismo en lesiones del maxilar superior a nivel de los molares deciduos.⁽¹⁴⁾

4.2 Elementos de virulencia y patogenicidad

Staphylococcus aureus tiene la capacidad de producir un gran número de factores de virulencia que van a ayudar en la supervivencia del microorganismo y a su patogenicidad.⁽¹⁵⁾ *S. aureus* produce enzimas, las cuales permiten la penetración e invasión dentro de los tejidos.⁽³⁾ *S. aureus* posee algunos factores de virulencia los cuales llevan una relación con la pared celular y la extracelular, lo que ayuda y favorece a que se dé la patogenicidad en cada una de las cepas. Los factores de virulencia están asociados con la pared de la célula e incluyen a los receptores de la superficie con la capacidad de enlazar inmunoglobulinas esta incluye proteínas externas. Intervienen enzimas como la coagulasa, proteasa, hialuronidasas, etc. Posee toxinas como: hemolisinas, enterotoxinas, la toxina del síndrome del *shock tóxico*, la toxina exfoliativa,

y las leucocidinas. Las hemolisinas son reconocidos como factores de virulencia que actúan mediante la destrucción de la membrana plasmática y a su vez de las plaquetas.⁽³⁾ *S. aureus* produce enterotoxinas estafilocócicas, las toxinas exfoliativas A (ETA) y B (ETB), la toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) y una exotoxina similar nueva en el grupo (SET 1-11).⁽¹⁶⁾

4.1.5 Clasificación de las toxinas que se encuentran en el *S. aureus*.

Factor de virulencia	Genes	Función
Toxina TSST-1	<i>Tst</i>	Causa el Síndrome del Shock Tóxico (TSS)
Toxinas exfoliativas	<i>eta, etb, etc, etd</i>	Causa Síndrome de piel escaldada, impétigo en neonatos y/o enfermedad de Ritter
Enterotoxinas	<i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser, seu.</i>	Intoxicación alimentaria
Leucocidinas (especialmente LPV)	<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	Alteración de la permeabilidad celular, destrucción leucocitaria.
Hemolisinas	<i>hla, hlb, hld, hlg, hlg-2</i>	Ruptura de membranas celulares

4.2 Hemolisinas

Las hemolisinas alfa, beta, gamma y delta son producidas por *S. aureus* las cuales tienen una capacidad hemolítica y citolítica, actúan sobre células del huésped como los eritrocitos, leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos.⁽¹⁷⁾⁽²⁾

Estas hemolisinas han sido potenciales factores de virulencia producidas por *S. aureus*, van actuar sobre la membrana de la célula produciendo una destrucción celular, incluyendo la destrucción lisosomal, isquemias y necrosis de los tejidos, estas hemolisinas son consideradas importantes en diferentes patologías graves.⁽⁹⁾

4.2.3 Hemolisina Alfa

La hemolisina alfa es una proteína sintetizada por el gen *hla*, es la hemolisina más estudiada, ya que interviene en la formación de poros, este gen se encuentra en el genoma central de la bacteria, la estructura protéica es similar a la de un hongo la cual se encuentra dividida en tres dominios.

Proteína tóxica que posee una función importante para la bacteria ya que toma los tejidos del huésped y lo convierte en nutrientes para el microorganismo, posee una alta destrucción de los eritrocitos, *hla* posee 1002 pb. Este gen da lugar a un producto primario de 26 aminoácidos, la proteína tiene un peso molecular de 33 KDa y mantiene 3 regiones cortas de alta hidrofobicidad. ⁽¹⁷⁾ Es una toxina que se une a las membranas de las células, cuando se da la unión a la membrana esta se introduce a la capa lipídica y forma una barrera anfipática de un diámetro de 1.5 a 2 nm, alcanza una rápida toxicidad, pues destruye la membrana plasmática y libera compuestos tóxicos por los poros. ⁽⁹⁾⁽¹⁷⁾ Esta también colabora en la muerte de los eosinófilos y participa en la vía autofágica. ⁽¹⁸⁾

Como factor de virulencia el gen *hla*, produce la destrucción de tejidos e infecciones metastásicas. ⁽²⁾ El gen *hla* posee un gen regulador principal llamado (*agr*). ⁽¹⁹⁾

Dentro de los efectos nocivos de *hla* se destaca la actividad de salida de Ca^{2+} la cual permitirá la activación de las vías del metabolismo como el ácido araquidónico, facilitando la formación del tromboxano y prostaciclina que dará como resultado la vasoconstricción local, igualmente se dará la activación y favorecerá la entrada de las plaquetas, activando el mecanismo de apoptosis en la célula. ⁽²⁰⁾

4.2.4 Hemolisina Beta

La hemolisina beta es una proteína sintetizada por el gen *hIb*, esta fue descrita por primera vez en el año de 1935, actúa durante la fase de desarrollo exponencial, va a producir hemólisis y a su vez va a requerir Mg^{2+} como un cofactor, presenta una especificidad por la esfingomielina y fosfatidilcolina. ⁽²⁰⁾ Es una exoproteína hemolítica que posee la capacidad de hidrolizar la esfingomielina que está presente en la membrana plasmática, muestra un incremento de la permeabilidad, donde se da una pérdida progresiva de la carga de la superficie celular, es capaz de actuar sobre los neutrófilos y linfocitos principalmente en los linfocitos T. ^{(17) (7)} La hemolisina beta es una toxina de 35 KDa, su mayor importancia ha sido indicada en varias infecciones del ser vivo, en algunas partes de su organismo como son, en el pulmón y córnea, esta toxina cuenta con la capacidad de inhibir la actividad ciliar en las células epiteliales de la nariz. ^{(21)(22) (23)}

4.3.3 Hemolisina Delta

La hemolisina delta es una proteína sintetizada por el gen *hld*, poco estudiada, esta hemolisina es causante de daño a nivel de las células, en particular de los eritrocitos.⁽¹⁶⁾ Es una proteína cuyo tamaño es 3KDa es producida por más del 97% de cepas de *S. aureus*, esta actúa al principio como un agente tensoactivo que rompe la membrana celular para luego actuar en los canales aumentando su tamaño, lo que produce el escape del contenido celular.⁽²²⁾ Esta hemolisina separa las membranas de la célula y actúa como surfactante, es mortal en animales de laboratorio en concentraciones elevadas.⁽²⁴⁾

4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción química in vitro que tiene como objetivo la amplificación (crear copias) de una secuencia específica de ADN, permitiendo de esta manera obtener millones de copias de fragmento de ADN.⁽²⁵⁾

Los elementos principales para realizar la PCR son: el ADN molde, la Taq polimerasa, los cebadores o primers, nucleótidos, buffers (cofactores que necesita la enzima).⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾

La reacción de PCR se realiza en 3 etapas principales:

- ✚ **Desnaturalización:** en esta etapa se realiza el calentamiento y la separación de las cadenas de ADN molde, a una temperatura de 95°C en un tiempo de 20 -30 segundos esto va a depender de la velocidad y la temperatura del termociclador, al final de esta fase obtendremos cadenas que servirán para el siguiente paso.
- ✚ **Hibridación:** en esta fase se alinean los primers hacia los extremos, uno a cada lado de las cadenas abiertas de ADN molde, dando lugar a que se forme un complejo templado (ADN molde-primers) en esta etapa es importante que la temperatura este a su punto de hibridación que va desde 50-60°C.
- ✚ **Extensión:** dentro de esta etapa entra a funcionar la Taq polimerasa sobre el complejo templado, la extensión de las cadenas va en dirección del ADN, la temperatura para este paso es de 72°C, finalizando esta etapa se logrará la formación de los amplicones (millones de copias de la cadena de ADN molde) con un tamaño de pb.⁽²⁵⁾

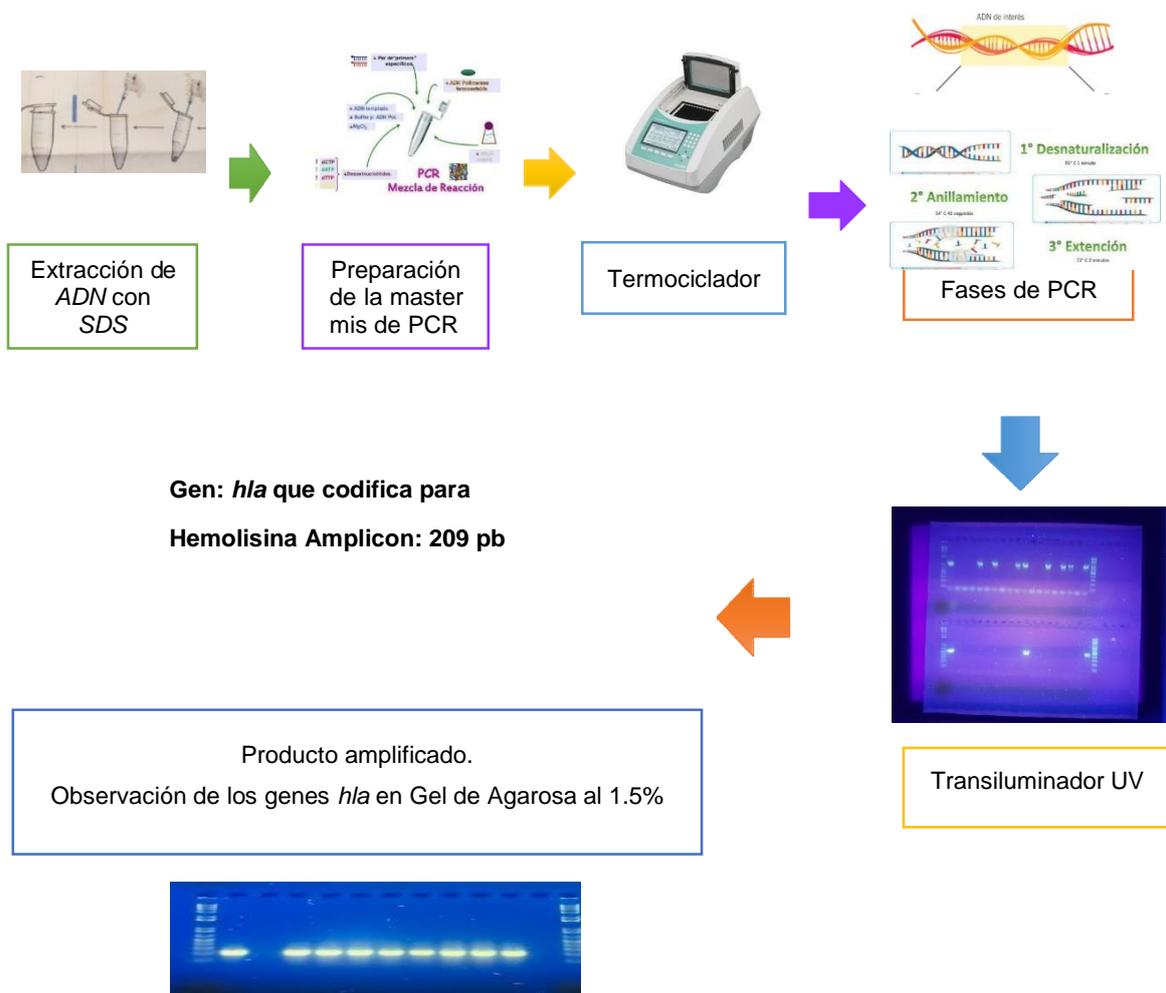


FIGURA 1. Multiplicación de ADN por PCR

4.5 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

1. Quintana et al., En un artículo denominado: Microbiota de los ecosistemas de la cavidad oral, Riobamba-Ecuador, presentó la experiencia de su estudio, los investigadores de este estudio comprobaron que la cavidad oral está compuesta por una cantidad de bacterias las cuales forman una biopelícula, demostrando que algunas de estas bacterias actúan o están implicadas en distintas enfermedades, el objetivo de estudio fue profundizar el estudio de la microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Se realizó una revisión bibliográfica de febrero a junio del 2016 sobre los principales microorganismos que forman parte de los diferentes ecosistemas de la cavidad bucal.
2. Cervantes et al., En el artículo denominado: Características Generales de *Staphylococcus aureus*, donde presentó las características generales y factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*, mediante los estudios de epidemiología molecular, que han permitido entender las relaciones de cada una de las cepas.
3. Rodríguez T. et al., En el artículo denominado: Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*, menciona que la bacteria tiene una capacidad particular para colonizar la piel y las mucosas de los seres humanos en este estudio se ha demostrado un factor primario que está enlazado con el estudio dentro del entorno comunitario dando como resultados contradictorios sobre la relación y la colonización de cepas MRSA.
4. Kumar P. et al., En el artículo denominado: Screening nasal de trabajadores de la salud para portadores nasales de MRSA coagulasa positiva y prevalencia de colonización nasal con *Staphylococcus aureus* de 84 muestras tomadas de trabajadores de la salud 66 muestras portaban *S. aureus* y 18 muestras no presentaban *Staphylococcus aureus*.
5. Drehmer E. et al., En el estudio denominado: Detección de *Staphylococcus aureus* en la boca de los trabajadores de la limpieza hospitalaria, menciona la prevalencia de la colonización en personal de la limpieza, fueron recolectadas 3 muestras de saliva de 63 trabajadores, 43 estaban colonizados por *S. aureus* y

20 trabajadores no estaban colonizados de *S. aureus*, la boca fue identificada como importante reservorio de esta bacteria.

6. Muñoz R. et al., En el estudio denominado: Un rol crítico para hemolisinas y lipoproteínas bacterianas en la activación de la Nlpr3 inducida en *Staphylococcus aureus* en este estudio se describe que para la activación de la caspasa 1 inducida por *S. aureus* se necesita de alfa, beta y gamma hemolisinas mediante la vía Nlpr3.
7. Rodríguez et al., En el estudio denominado: Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren al Hospital General Pediátrico Niños de la Acosta Ñu, durante el año 2010. El objetivo del presente estudio fue identificar la frecuencia de genes, en 50 pacientes pediátricos, el 82% de niños presentaron cuadros clínicos compatibles con algunas infecciones de la piel. Los aislados contaron con datos de portación dando como resultados que la hemolisina alfa estaba presente en un 16% y la hemolisina beta en un 8% de las cepas de *S. aureus* aisladas.
8. Yuky K. et al., En el estudio denominado: Colonización de la piel promovida por beta-hemolisina por *Staphylococcus aureus* en este artículo se menciona que el mecanismo de colonización de la piel por *S. aureus* se da mediante la beta hemolisina (*h1b*) esta toxina juega un papel importante en la colonización de la piel al dañar los queratinocitos, además de su conocida actividad hemolítica para los eritrocitos.
9. Ga Y. et al., En el estudio denominado: Susceptibilidad antimicrobiana y genes de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* aislados de la cavidad oral de pacientes con periodontitis. Presenta un estudio desde julio del 2015 hasta agosto del mismo año, donde se recogió saliva de 112 pacientes con diagnóstico de periodontitis en esta están incluidos 80 pacientes ambulatorios de hospitales dentales, 32 en clínicas dentales en Seúl, estas muestras fueron sometidas a una prueba de sensibilidad para evaluar la prevalencia, factores de virulencia usando el método de PCR, dando como resultado que se detectó que el gen *h1d* (gen que codifica para hemolisina delta) se detectó en un 100% de las cepas de *S. aureus* y la hemolisina *h1a* (gen que codifica para hemolisina alfa) se encontró en un 97,6% de las cepas aisladas.

5. HIPÓTESIS

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

CAPITULO II
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. MARCO METODOLOGICO

Enfoque: Cuantitativo

Diseño de Investigación: Descriptivo

Nivel de la investigación: Descriptivo

Tipo de Investigación:

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

2. POBLACION 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 que codifican para hemolisinas *hla*, *hly* y *hld* 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, firmados 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	DEFINICION	DEFINICION	DIMENSIONES	INDICADOR	TIPO	ESCALA	DATO	INSTRUMENTO
	CONCEPTUAL	OPERATIVA			ESTADISTICO			
Genotipo hla	Gen <i>hla</i> que codifica para Hemolisina en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>hla</i>	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos Ficha de Registro
Genotipo hlb	Gen <i>hlb</i> que codifica para Hemolisina en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>hlb</i>	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos Ficha de Registro
Genotipo hld	Gen <i>hld</i> que codifica para Hemolisina en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Gen <i>hld</i>	Porcentaje	Cualitativo	Nominal	Presencia Ausencia	Base de datos Ficha de registro
Presencia de múltiples genes	Genes <i>hla</i> , <i>hlb</i> y <i>hld</i> que codifican para Hemolisinas en <i>Staphylococcus aureus</i> .	Presencia del gen, se establece mediante amplificación por PCR.	Genes <i>hla</i> , <i>hlb</i> , <i>hld</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 7TH Gen.

4.3. Materiales y Equipos

Para el presente estudio se utilizó:

<ul style="list-style-type: none">• Medios de transporte Stuart	<ul style="list-style-type: none">• Aceite de inmersión	<ul style="list-style-type: none">• Termobloque
<ul style="list-style-type: none">• Cajas Petri	<ul style="list-style-type: none">• Plasma	<ul style="list-style-type: none">• Pipetas
<ul style="list-style-type: none">• Balanza	<ul style="list-style-type: none">• Tubos de ensayo	<ul style="list-style-type: none">• Puntas
<ul style="list-style-type: none">• Espátula	<ul style="list-style-type: none">• Porta objetos	<ul style="list-style-type: none">• Tubos PCR
<ul style="list-style-type: none">• Asas	<ul style="list-style-type: none">• Peróxido de Hidrógeno	<ul style="list-style-type: none">• Kit para PCR
<ul style="list-style-type: none">• Manitol	<ul style="list-style-type: none">• ADNasa	<ul style="list-style-type: none">• Primer <i>hla</i>, <i>hly</i> y <i>hld</i>
<ul style="list-style-type: none">• Reactivos de Gram	<ul style="list-style-type: none">• SDS	<ul style="list-style-type: none">• Agarosa
<ul style="list-style-type: none">• Microscopio	<ul style="list-style-type: none">• Tubos eppendorf	<ul style="list-style-type: none">• Caldo tripticasa soya
<ul style="list-style-type: none">• Suero fisiológico	<ul style="list-style-type: none">• Syber safe	<ul style="list-style-type: none">• TAE
<ul style="list-style-type: none">• Guantes	<ul style="list-style-type: none">• 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 Genética y Biología Molecular de la Universidad Católica de Cuenca) 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 Genética y Biología Molecular 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 sembraron 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, se da vortex 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 Cadena de la 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 *hla*, *hlb* y *hld* fueron:

Bacteria	Toxinas	Gen	Primers	Tamaño	Bibliografía
<i>Staphylococcus aureus</i>	Genes que codifican para Hemolisinas	<i>hla</i>	F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	209 pb	Jarraud.,et al,2002
		<i>hlb</i>	F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309 pb	Jarraud et al., 2002
		<i>hld</i>	F:AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGG AGTG R: TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCTGA	111pb	Jarraud 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 amplicón 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

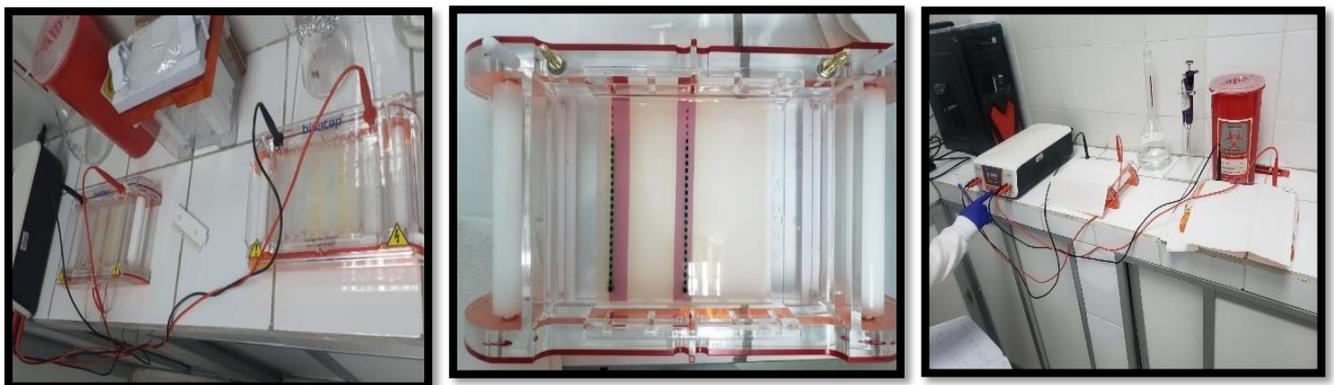


Fig.5. Cámara de electroforesis.

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 Trasiluminador UV. Fig.6., Fig.7., Fig.8., Fig.9.

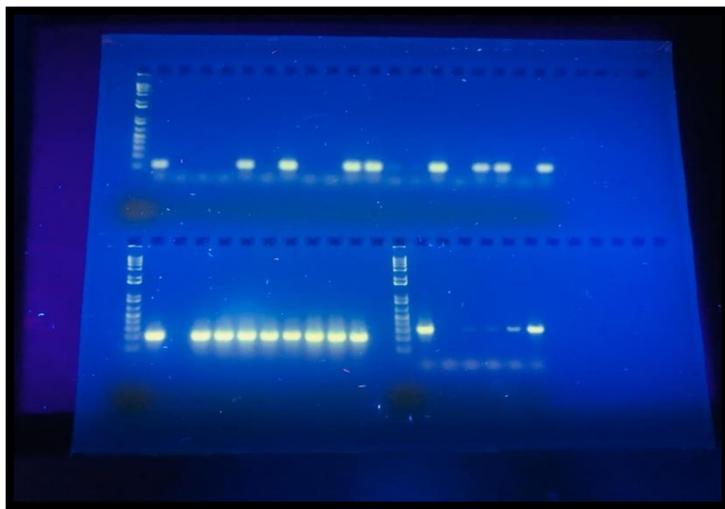


Fig.6. Observación de los 3 amplicones (genes) en el Transiluminador.

Gen: *hla* (codifica a hemolisina)
Amplicon: 209 pb.

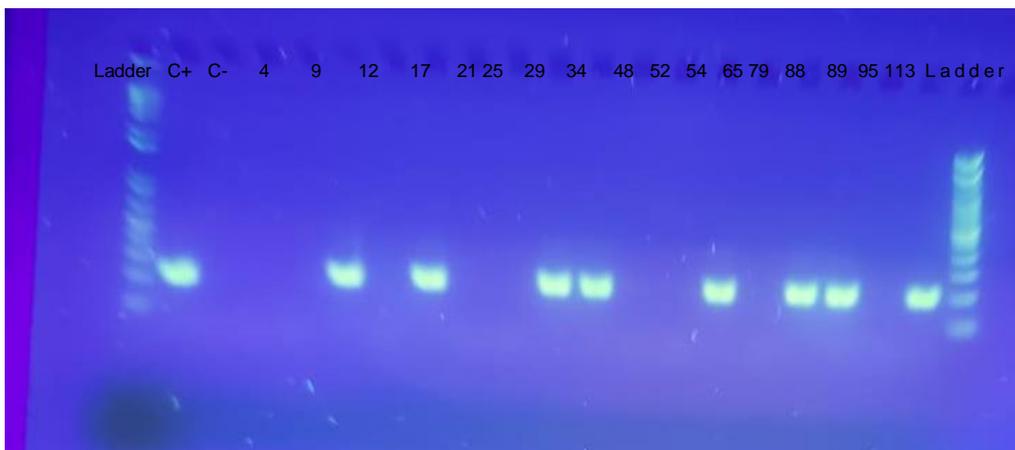


Fig.7. Amplificación de la secuencia del gen *hla* que codifica para hemolisina.

Gen: *hlb* (codifica a hemolisina)
Amplicon: 309 pb.

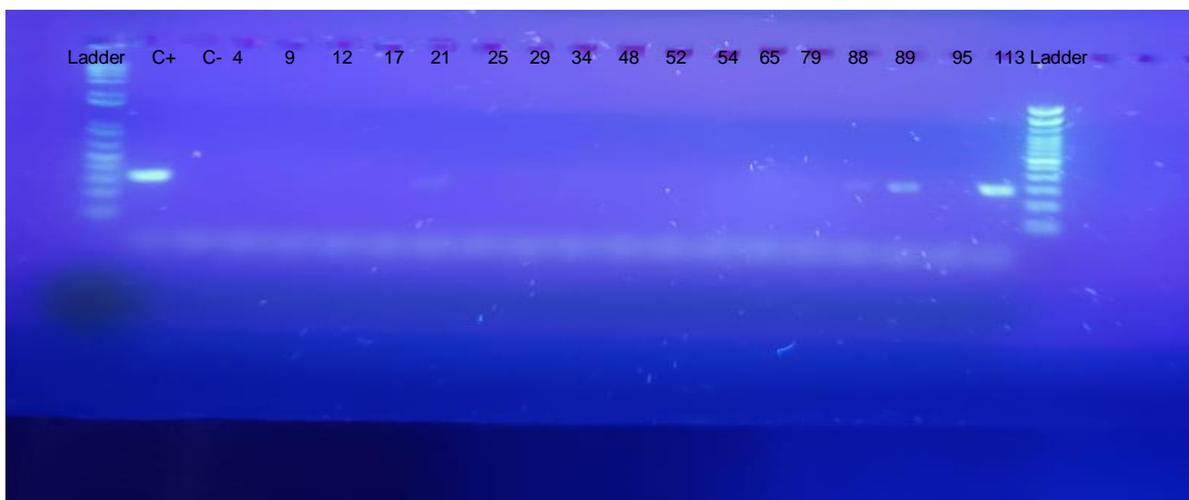


Fig.8. Amplificación de la secuencia del gen *hlb* que codifica para hemolisina.

Gen: *hld* (codifica a hemolisina)
Amplicon: 111pb

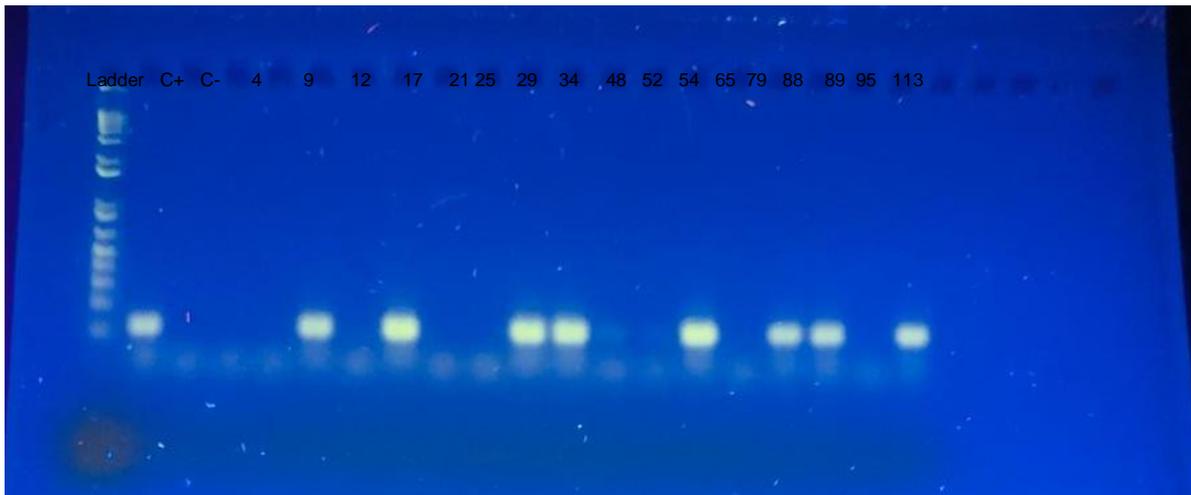


Fig.9. Amplificación de la secuencia del gen *hld* que codifica para hemolisina.

5. PROCEDIMIENTOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS

Una vez conseguidos los datos, se observó la existencia de los distintos tipos de genes *hla*, *hnb* y *hld*. 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.

CAPITULO III
RESULTADOS, DISCUSION, CONCLUSIONES

1. RESULTADOS

TABLA N° 1. Presencia del gen *hla* que codifican para hemolisina alfa.

HEMOLISINA ALFA		
Gen: <i>hla</i>		
	N	%
Presencia del gen <i>hla</i>:	8	47
Ausencia del gen <i>hla</i>:	9	53
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 8 muestras presentaron el gen *hla*, lo que representa un 47%; y la ausencia del gen *hla* en 9 muestras, correspondientes al 53 % de las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de la comunidad de Oñacapac–Saraguro.

TABLA N° 2 Presencia del gen *hlb* que codifica para hemolisina beta.

HEMOLISINA BETA		
Gen: <i>hlb</i>		
	N	%
Presencia del gen <i>hlb</i>:	4	24
Ausencia del gen <i>hla</i>:	13	76
Total, de muestras	17	100

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras.

En la tabla N°2 encontramos que del total de las 17 muestras analizadas (positivas a *S. aureus*), podemos evidenciar que 4 muestras presentaron el gen *hlb*, lo que representa un 24%; y la ausencia del gen *hlb* en 13 muestras, correspondientes al 76 % de 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 *hld* que codifica para hemolisina delta.

HEMOLISINA DELTA		
Gen: <i>hld</i>		
	N	%
Presencia del gen <i>hld</i>:	9	53
Ausencia del gen <i>hld</i>:	8	47
Total, de muestras	17	100

Fuente: Datos tabulados por el autor

N: número de muestras.

En la tabla N°3 encontramos que del total de las 17 muestras analizadas (positivas a *S. aureus*), podemos evidenciar que 9 muestras presentaron el gen *hld*, lo que representa un 53%; y la ausencia del gen *hld* en 8 muestras, correspondientes al 47 % de las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral de los niños de la comunidad de Oñacpac–Saraguro.

TABLA N°4. Genes *hla*, *hnb* y *hld* que se presentan en la misma cepa de *S. aureus*

	FACTORES DE VIRULENCIA		
	Hemolisinas		
Cepas	<i>hla</i>	<i>hnb</i>	<i>hld</i>
4	0	0	1
9	0	0	0
12	1	0	1
17	0	0	0
21	1	1	0
25	0	0	1
29	0	0	1
34	1	0	0
48	1	0	0
52	0	0	1
54	0	0	1
64	0	0	0
65	1	0	0
79	0	0	1
88	1	1	0
89	1	1	1
95	0	0	0
113	1	1	1

Fuente: Datos tabulados por el autor.

La tabla N°4 Nos muestra el análisis de los 3 genes (*hla*, *hnb* y *hld*) en las 17 muestras positivas de *S. aureus* aisladas de la mucosa oral en niños de Oñacapac-Saraguro, se puede evidenciar que la cepa 12 presenta los dos genes *hla*, *hld*; las cepas 21,88 presentan los dos genes *hla*, *hnb* y las cepas 89,113 presentan los 3 genes *hla*, *hnb* y *hld*. genes que codifican para hemolisinas que se establecieron mediante la amplificación por PCR.

2. DISCUSIÓN

Dentro de esta investigación marcamos el objetivo Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *hla*, *hly* y *hld*, que codifican para hemolisinas en cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral de niños de Oñacapac-Saraguro, dicho objetivo al estudiar se determinó que las hemolisinas producidas por *S. aureus*, actúan en la ruptura de las membranas celulares; en la presente investigación buscamos los genes *hla*, *hly* y *hld* que codifican para hemolisinas que se encuentran presentes en *S. aureus* aislados en la mucosa oral de los niños de Saraguro (17 muestras positivas), los resultados obtenidos fueron: 8 muestras positivas para *hla* (47%), 4 muestras positivas para *hly* (24%), 9 muestras positivas para *hld* (53%). Se trata del primer estudio en su tipo realizado a nivel local.

Rodríguez F. et al., en su análisis menciona que en su estudio se analizó 50 muestras positivas de *S. aureus* de las cuales 8 muestras poseen el gen *hla* (16%), 4 muestras poseen el gen *hly* (8%) al contrario del presente estudio donde el resultado fue mayor con 8 muestras que poseen el gen *hla* (47%), 4 muestras que poseen el gen *hly* (24%), de un total de 17 muestras positivas para *S. aureus*.

Núñez G. et al., menciona en su estudio donde analizó 20 muestras positivas para *S. aureus* de los cuales 4 muestras poseen el gen *hld* (20%), al contrario del presente estudio donde el resultado fue mayor con 9 muestras que poseen el gen *hld* (53%) de un total de 17 muestras positivas para *S. aureus*.

Lozano. et al., en su estudio analizó 53 muestras positivas para *S. aureus* de las cuales 48 muestras poseen el gen *hla* (91%), 23 muestras poseen el gen *hly* (43%), 50 muestras poseen el gen *hld* (94%) al contrario del presente estudio donde el resultado fue menor 8 muestras positivas para *hla* (47%), 4 muestras positivas para *hly* (24%), 9 muestras positivas para *hld* (53%), de un total de 17 muestras positivas para *S. aureus*.

Ga-Yeon K. et al., en su estudio analizó 41 muestras positivas para *S. aureus* de las cuales 40 muestras poseen el gen *hla* (98%), 4 muestras poseen el gen *hly* (10%), 41 muestras poseen el gen *hld* (100%) al contrario del presente estudio donde el resultado difiere en 8 muestras positivas para *hla* (47%), 4 muestras positivas para *hly* (24%), 9 muestras positivas para *hld* (53%), de un total de 17 muestras positivas para *S. aureus*.

3. CONCLUSIÓN

- ✓ La frecuencia del gen *hla*, que codifica para hemolisina alfa, fue de 47% del total de las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro.
- ✓ La frecuencia del gen *hlb* que codifica para hemolisina beta, fue de un 24% del total de las cepas orales de *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro.
- ✓ La frecuencia del gen *hld* que codifica para hemolisina delta, fue de un 53% del total *Staphylococcus aureus* aisladas en niños de Oñacapac-Saraguro.

- ✓ La frecuencia de cepas que presentaron dos genes simultáneamente fue del 18% y la frecuencia de cepas que presentaron 3 genes simultáneamente fue del 12% genes que codifican para hemolisinas presentes en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en la mucosa oral sana de escolares de 6 a 12 años de la comunidad de Oñacapac-Saraguro, concluyendo que estas cepas son altamente virulentas.

BIBLIOGRAFIA

1. Guaca-gonzález YM, Flórez-restrepo GF, Moncayo-ortiz JI, Santacruz-ibarra J, Álvarez-aldana A. Detección y expresión de superantígenos y de resistencia antimicrobiana en aislamientos obtenidos de mujeres portadoras de *Staphylococcus aureus* que cuidan y alimentan niños. 2018;96–104.
2. Cervantes E FPA, Shalit M. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Anti-Corrosion Methods Mater*. 1964;11(4):11–4.
3. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*. 2014;25(3):129–43.
4. Bayles KW, Brinsmade R. crossm Nutritional Regulation of the Sae Two-Component System by CodY in *Staphylococcus aureus*. 2018;200(8):1–16.
5. Guillén R, Carpinelli L, Rodríguez F, Castro H, Quiñónez 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. Castañón-sánchez CA. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evid Médica e Investig en Salud*. 2012;5(3):79–84.
7. Waryah CB, Gogoi-tiwari J, Wells K, Eto KY, Masoumi E, Costantino P, et al. Diversity of Virulence Factors Associated with West Australian Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates of Human Origin. 2016;2016.
8. Garz P, Martínez R, Molina M. *Staphylococcus aureus*: generalidades , mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*. 2019;32:25–38.
9. Rodríguez Acosta F, Carpinelli L, Basualdo W, Castro H, Quiñónez 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.
10. María Paula alarCÓN-laVín1 A,CaroliNa oyarzo2 A, Carlos EsCudEro2 B, , Fabiola CERda-lEal3 C, FraNCisCo. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. 2017;1559–64.
11. Emrah Torlak 1, Emre Korkut 2, Ali T Uncu 3 YŞ 2. Formación de biopelículas en aislados de *Staphylococcus aureus* según la susceptibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. 2015;1–8.
12. Rodríguez Tamayo EA, Jiménez Quiceno JN. Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *latreia*. 2014;28(1):66–77.

13. Alemán.1 DMG, Gámez.2 DIJ, Mesa.3 DLG, Becerra.4 DLN. Staphylococcus aureus resistente a meticilina en un grupo de niños en edad escolar. Rev ENFERMEDADES Infecc EN PEDIATRÍA. 2007;XX.
14. Castaño-Jaramillo LM, Beltrán-Arroyave C, Santander-Peláez LC, Vélez-Escobar AM, Garcés-Samudio CG, Trujillo-Honeysberg M. Características clínicas y microbiológicas de las infecciones de piel y tejidos blandos por staphylococcus aureus en niños de un hospital en Medellín durante los años 2013 a 2015. Rev Chil Infectol. 2017;34(5):487–90.
15. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of staphylococcus species in the oral cavity. J Med Microbiol. 2001;50(11):940–6.
16. Yaline Sánchez-Neira¹ MA-M. Determinación de hemólisis en cepas de Staphylococcus spp . causantes de mastitis bovina. ISUB. 2018;5(1):15–30.
17. El-sayed A, Alber J, Lämmle C, Jäger S, Wolter W, Castañeda-vázquez H. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. 2006;37(2):165–79.
18. Camussone CM, Calvino LF. Virulence factors of Staphylococcus aureus associated with intramammary infections in cows: Relevance and role as immunogens. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2013;45(2):119–30. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
19. Tavares A, Nielsen JB, Boye K, Rohde S, Paulo AC, Westh H, et al. Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) evolution and expression among Staphylococcus aureus clones with hospital and community origin. PLoS One. 2014;9(7).
20. Ohlsen K, Koller KP, Hacker J. Analysis of expression of the alpha-toxin gene (hla) of Staphylococcus aureus by using a chromosomally encoded hla::lacZ gene fusion. Infect Immun. 1997;65(9):3606–14.
21. Casta E. Staphylococcus aureus , su éxito como patógeno y las implicaciones de la resistencia a los antimicrobianos. uis. 2006;29:27–39.
22. Burnside K, Lembo A, Reyes MDL, Iliuk A, Binhtran N, Connelly JE, et al. Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of Staphylococcus aureus by a Serine / Threonine Kinase and Phosphatase. PLoS One. 2010;5(6):1–16.
23. Elizabete R. da Silva, Tatiene R. M. Silva², Angélica M. G. Pereira, Acidália C. Machado KRS. PRODUÇÃO DE HEMOLISINAS POR Staphylococcus aureus ISOLADOS. 2012;6:118–23.
24. Chih-Wei Lo, Yiu-Kay Lai, Yu-Tsueng Liu, Richard L. Gallo and C-MH. Staphylococcus aureus Hijacks a Skin Commensal to Intensify Its Virulence: Immunization Targeting β -Hemolysin and CAMP Factor. J Invest Dermatol [Internet]. 2011;131(2):401–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.319>
25. Wamel WJB Van, Rooijackers SHM, Ruyken M, Kessel KPM Van, Strijp JAG Van. The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus Are Located on α -Hemolysin-Converting Bacteriophages. 2006;188(4):1310–5.
26. Katayama Y, Baba T, Sekine M, Fukuda M. Beta-Hemolysin Promotes Skin

- Colonization by *Staphylococcus aureus*. 2013;195(6):1194–203.
27. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Muñoz-Planillo R, Hasegawa M, et al. *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*. 2013;503(7476):397–401.
 28. L TDD, Ibarra C, Velasquillo C. de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *medigraphic*. 2013;2:70–8.
 29. Bolívar AM, Rojas A, García-lugo P. PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol) Resumen Introducción. 2014;3(1):25–33.
 30. Ciencia LA, Alcance AL, Mano DELA, Zardoya R. Sebbm divulgación la ciencia al alcance de la mano 35. 2019;

ANEXOS

Anexo 1.
FICHA DE EXTRACCIÓN DE ADN

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>hIb</i>	<i>hIc</i>	<i>hIc-1</i>	<i>hIc-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: _____ R: _____</p> <p>Cálculos</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Muestras</th> <th>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> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Desnaturalización</th> <th>Alineamiento</th> <th>Elongación</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>_____ min x _____ °C</td> <td>_____ min x _____ °C</td> <td>_____ 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	Alineamiento	Elongación	_____ min x _____ °C	_____ min x _____ °C	_____ 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	Alineamiento	Elongación																																						
_____ min x _____ °C	_____ min x _____ °C	_____ 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 MUESTRA DE TOMA BIOLÓGICA.

 **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**
COMUNIDAD EDUCATIVA AL SERVICIO DEL PUEBLO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Saraguro, 07 de Enero de 2019

Apellidos: Evamón Vargas

Nombres: Esteban Darcán

Fecha de Nacimiento: 11/03/2009

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 finalizar el proceso de siembra en medios de cultivo agarizados, es decir, en un período 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 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: Esteban Vargas

Cédula Identidad: 110505266-4


PULGAR DERECHO

Anexo 3.

ASENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

9

 **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**
COMUNIDAD EDUCATIVA AL SERVICIO DEL PUEBLO

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 () NO ()

.....
Firma del Estudiante

Nombre y Apellido *Jessica Keviana Tejada*

Lugar y Fecha: Cañacapas 10 de enero de 2019


PULGAR DERECHO