



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Evaluación de la frecuencia del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en muestras de hisopado cutáneo y nasal de equinos de la provincia del Azuay mediante la técnica de LAMP”

Trabajo de titulación previo a la obtención del
Título de Médico Veterinario Zootecnista.

Autores:

Diego Sebastián Larriva Salazar

CI: 0104476379

Correo electrónico: sebaslarriva@hotmail.com

Marco Antonio Picón Saavedra

CI: 0106775653

Correo electrónico: marcopicon0@gmail.com

Director:

Dra. María Silvana Méndez Álvarez

CI: 0102606373

CUENCA-ECUADOR

06 septiembre de 2021



RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva de importancia mundial, está ampliamente diseminada y establece un alto riesgo en hospitales y comunidades, ya que es uno de los principales agentes etiológicos de bacteriemias, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones de piel, endocarditis infecciosa y abscesos. Esta se encuentra en la piel de forma saprófita tanto de animales como personas, una de las cualidades de la bacteria es la codificación del gen *mecA*, el cual le permite adquirir resistencia contra la meticilina y la mayoría de antibióticos β -lactámicos, por lo que en la actualidad es una de las bacterias de mayor interés de investigación. Los equinos son portadores comunes de la bacteria por lo que su identificación permitirá aportar información y ayudar a la comunidad médica ecuatoriana en el diagnóstico de dicho patógeno. El objetivo del estudio fue utilizar la técnica de LAMP para evaluar la frecuencia del gen *mecA* en muestras de hisopados cutáneos y nasales de 60 equinos adultos entre 5 y 13 años de edad, en dos zonas geográficas de la provincia del Azuay que corresponden a Tarqui y Paute. En los resultados se obtuvieron diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *S. aureus*; mas no entre el tipo de hisopado o la zona geográfica; en cuanto a MRSA, no se amplificó el gen *mecA* en las muestras de la población estudiada por lo que esta investigación excluye la presencia de MRSA en equinos sanos en las zonas de interés.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Gen *mecA*. Hisopado cutáneo. Hisopado nasal. LAMP.



ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a Gram positive bacteria of global relevance, it's highly disseminated and signifies an elevated risk for hospitals and communities since it is one of the main etiological agents for bacteremia's, surgical wound infections, skin infections, infectious endocarditis and abscesses. This bacterium can be found in skin samples, with the same frequency in animals as in humans as a saprophyte microorganism. One of the individualizing qualities of the pathogen is the codification of the *mecA* gene, which allows the bacteria to acquire resistance against Methicillin and most B-lactam antibiotics. Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) is currently recognized as one of the most studied pathogens due to its high resistance to the majority of commonly used antibiotics. Equids are common carriers of the bacteria, henceforth its identification from cutaneous and nasal swabs will denote further information which will help the Ecuadorian medical community in the diagnostics of the mentioned pathogen. The objective of this study was to utilize the LAMP technique to evaluate the frequency of the *mecA* gene in samples from 60 horses between 5 and 13 years old in two different geographical locations of the Azuay province, corresponding to Tarqui and Paute. We obtained significant differences between the parameters of presence or absence of *S. aureus* but not between the type of sample collection method or geographical location, meaning the bacteria was found regardless of location or collection method. Regarding MRSA, we were unable to detect genetic material that corresponded to the gen *mecA*, this finding allows us to rule out the presence of MRSA in healthy horses of the areas of interest.

Key words: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *mecA* gene. Cutaneous swab. Nasal swab. LAMP.



ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
AGRADECIMINTOS	14
AGRADECIMIENTOS	15
DEDICATORIA.....	16
DEDICATORIA.....	17
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	18
1.1. OBJETIVOS.....	21
1.1.1 Objetivo general.....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
1.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
CAPITULO 2: REVISIÓN LITERARIA.....	22
2.1. Staphylococcus aureus.....	22
2.2. MRSA.....	24
2.3. Presentación clínica en equinos	26
2.4. Características clínicas de MRSA en personas	28
2.5. Hisopado nasal y cutáneo.	29
2.6. Métodos moleculares	30
2.7. Extracción de ADN.....	31
2.8. Métodos de purificación	32
2.9. Cuantificación del ADN.....	33
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Área de estudios	35
3.2. Tipo y tamaño de la muestra.....	36
3.3. Colecta, conservación y transporte de la muestra	36
3.4. Lisis celular	37



3.5. Amplificación de control del proceso de ADN total de las muestras de hisopado cutáneo y nasal	38
3.6. Amplificación de ADN de <i>S. aureus</i> mediante el ensayo de LAMP	41
3.7. Amplificación e identificación del gen <i>mecA</i>	43
3.9. Análisis estadístico	44
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSION	46
CAPITULO 6: CONCLUSIONES	55
CAPITULO 7: RECOMENDACIONES	56
CAPITULO 8: BIBLIOGRAFÍA	57
CAPITULO 9: ANEXOS	65



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos previos para ensayo LAMP	39
Tabla 2. Tiempos y temperaturas para proceso de desnaturalización y alineación	40
Tabla 3. Tiempos y temperaturas para la extensión e inactivación	40
Tabla 4. Reactivos previos para ensayo LAMP	42
Tabla 5. Tiempos y temperatura para desnaturalización y alineamiento	43
Tabla 6. Enzima Bsm ADN polimerasa concentración y volumen	43
Tabla 9. Distribución de 120 muestras de equinos sanos de la provincia del Azuay según frecuencia de <i>S. aureus</i>	47
Con relación a la frecuencia de MRSA considerando el lugar de la colecta del hisopado y la zona geográfica donde se encuentran los equinos, se obtuvieron los siguientes resultados:.....	53
Tabla 10. Distribución de <i>S. aureus</i> en los dos tipos de hisopado dentro de la zona geográfica de Tarqui.....	53
Tabla 11. Distribución de <i>S. aureus</i> en los dos tipos de hisopado dentro de la zona geográfica de Paute.....	53



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de hidrolización de β -lactámicos	25
Figura 2. Mapa del Azuay con áreas de interés señaladas. Área de estudio 1, Tarqui y Área de estudio 2, Paute.....	35
Figura 3. Lectura de resultados de LAMP para la detección de material genético de equino como control de proceso mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio.....	46
Figura 4. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de <i>S. aureus</i> de las muestras 21-40 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 25 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute.....	48
Figura 5. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de <i>S. aureus</i> de las muestras 41-60 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 53 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute.....	48
Figura 6. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de <i>S. aureus</i> de las muestras 61-80 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 70 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute.....	49
Figura 7. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de <i>S. aureus</i> de las muestras 101-120 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 102 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute.....	49
Figura 8. Lectura de resultados de LAMP para la detección del gen <i>mecA</i> mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 25, 53, 70, 120 negativas para MRSA	50



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografía de día de toma de muestra en la zona geográfica de Paute	65
Anexo 2. Fotografía de toma de muestras en la zona geográfica de Tarqui	65
Anexo 3. Conservación de la muestra -80°C	66
Anexo 4. Materiales previos a la manipulación en cámara de bioseguridad doble flujo	66
Anexo 5. Manipulación de la muestra dentro de la cámara de bioseguridad doble flujo	66
Anexo 6. Muestras para centrifugación previas a la concentración de ADN.....	67
Anexo 7. Muestras post-centrifugación previa a concentración de ADN.....	67
Anexo 8. Muestras post-decantación con ADN concentrado.....	68
Anexo 9. ADN de muestra concentrado previa a ensayos LAMP	68
Anexo 10. Muestras etiquetadas previas al ensayo LAMP	69
Anexo 11. Muestras preparadas para ensayo LAMP.....	70
Anexo 12. Muestras en termociclador/Baño María	70
Anexo 13. Materiales para la preparación de gel agar para electroforesis	71
Anexo 14. Ebullición de la preparación de agarosa en buffer TAE previo a la colocación de bromuro de Etidio.....	71
Anexo 15. Cámara de electroforesis	72
Anexo 16. Gel agar con tinción de bromuro de Etidio preparado y colocado en cámara de electroforesis	72
Anexo 17. Muestras cargadas en el gel agar listas para la electroforesis	73
Anexo 18. Lectura del resultado de LAMP de material genético de <i>S. aureus</i> mediante electroforesis en gel agar de la muestra 1 – 20	73



Anexo 19. Lectura del resultado de LAMP de material genético de <i>S. aureus</i> mediante electroforesis en gel agar de la muestra 21 – 40	74
Anexo 20. Lectura del resultado de LAMP de material genético de <i>S. aureus</i> mediante electroforesis en gel agar de la muestra 41 – 60	74
Anexo 21. Lectura del resultado de LAMP de material genético de <i>S. aureus</i> mediante electroforesis en gel agar de la muestra 61 – 80	75
Anexo 22. Lectura del resultado de LAMP de material genético de <i>S. aureus</i> mediante electroforesis en gel agar de la muestra 81 – 100	75
Anexo 23. Lectura del resultado de LAMP de material genético de <i>S. aureus</i> mediante electroforesis en gel agar de la muestra 101 – 120	76
Anexo 24. Lectura de resultado de LAMP de material genético del gen <i>mecA</i> mediante electroforesis en gel agar de las muestras positivas a <i>S. aureus</i>	76
Anexo 25. Lectura de resultados de LAMP de material genético de equinos mediante electroforesis en gel agar muestra 1 - 10	77
Anexo 26. Resultado de LAMP de material genético de equino mediante electroforesis en gel agar de la muestra 11 – 39	77
Anexo 27. . Resultados sobre la presencia y ausencia de <i>S. aureus</i> mediante la prueba estadística de Mc Nemar	78
Anexo 28. Análisis estadístico para las diferentes zonas geográfica y el tipo de hisopado de acuerdo a la presencia de <i>S. aureus</i>	78
Anexo 29. Resultados de la presencia y ausencia de <i>S. aureus</i> resistente a metilicina entre el tipo de hisopado y en las dos zonas geográficas.....	78
Anexo 30. Distribución de MRSA en las muestras en estudio de las dos zonas geográficas mediante los dos tipos de hisopados.....	79



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Marco Antonio Picón Saavedra en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la frecuencia del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en muestras de hisopado cutáneo y nasal de equinos de la provincia del Azuay mediante la técnica de LAMP", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 06 de septiembre de 2021

Marco Antonio Picón Saavedra

C.I: 0106775653



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Marco Antonio Picón Saavedra autor del trabajo de titulación "Evaluación de la frecuencia del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) en muestras de hisopado cutáneo y nasal de equinos de la provincia del Azuay mediante la técnica de LAMP", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 06 de septiembre de 2021

Marco Antonio Picón Saavedra

C.I: 0106775653



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Diego Sebastián Larriva Salazar en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la frecuencia del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en muestras de hisopado cutáneo y nasal de equinos de la provincia del Azuay mediante la técnica de LAMP", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 06 de septiembre de 2021

Diego Sebastián Larriva Salazar

C.I: 0104476379



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Diego Sebastián Larriva Salazar, autor del trabajo de titulación “Evaluación de la frecuencia del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en muestras de hisopado cutáneo y nasal de equinos de la provincia del Azuay mediante la técnica de LAMP”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 06 de septiembre de 2021

Diego Sebastián Larriva Salazar

C.I: 0104476379



AGRADECIMIENTOS

Marco

Agradezco a Dios por esta meta que me ha permitido cumplir y por la luz que ha guiado mi camino convirtiéndome en la persona que soy.

Agradezco a mis padres Galo y Alexandra quiénes me apoyaron desde que era un niño en cada paso de mi vida de manera incondicional, enseñándome el camino correcto y a ser un hombre de bien.

A mi hermano Santiago quién siempre ha sido mi mejor amigo en cada parte de mi vida y con quién en podido contar en cualquier dificultad, le agradezco sus consejos y todo el apoyo que me ha dado, sobre todo por estar siempre presente.

A la Dra. Silvana Méndez mi directora de tesis, quién confió en nosotros, nos brindó su tiempo y paciencia además de su apoyo infinito con su conocimiento para poder alcanzar esta meta muy importante

Al Dr. Antonio Vallecillo que día a día aporta con su conocimiento y enseñanzas que las llevaré por siempre. Mis sinceros agradecimientos por el tiempo que nos dedicó para que alcancemos este logro.

A mi novia Gabriela León, quién desde pequeños siempre tenía las palabras correctas en los todo momento y quién ha sido y será mi inspiración para todos los proyectos presentes y futuros.

A mis familiares y amigos quienes supieron darme aliento y hacer que este proceso sea muy emotivo y sobre todo disfrutar del tiempo.



AGRADECIMIENTOS

Sebastián

Agradezco a mis padres por ser la piedra angular de mi formación académica y por siempre apoyarme en todas mis decisiones. Gracias por escucharme y ser mis mayores admiradores siempre.

Agradezco a mis abuelos por inculcar en mí desde pequeño la persistencia y búsqueda del conocimiento, son mi mayor ejemplo y espero algún día sobrepasar sus logros y acontecimientos.

A Paulina por siempre estar a mi lado en las buenas y en las malas, y por siempre presionarme a alcanzar mis metas.

A todos los profesores involucrados en este proyecto, quienes no dudaron en extender su mano y darnos su tiempo para cumplir esta meta.



DEDICATORIA

Marco

A Dios quién siempre de la mano está presente en mi vida guiándome por el camino correcto.

Dedico a mis padres mi gran inspiración Galo Picón y Alexandra Saavedra quienes con el amor y esfuerzo me han ayudado a salir adelante, superarme día a día, brindándome la educación y el ejemplo a seguir tanto en mi vida personal como profesional, les dedico este pequeño escalón en mi vida por ser mis padres, por ser los mejores papás del universo.

A mi hermano Santiago quién fue mi mejor amigo en cada uno de los procesos de mi vida y mi compañero para cada reto propuesto desde el más pequeño hasta el más grande, disfruto cada momento que compartimos juntos.

Dedico a mi novia Gabriela León el presente logro y los futuros proyectos en camino, porque con su amor desde pequeños supo darme mucha fuerza para superarme, además de haber sido mi inspiración en metas pasadas sigue siendo el motor para cada paso que doy hoy en vida,

Dedico a todos mis familiares y amigos cercanos a quienes aprecio mucho.



DEDICATORIA

Sebastián

A mis padres, Francisco Larriva y Karen Salazar quienes han dado todo por mí, espero poder dedicarles muchos logros más.

A mis abuelos Diego y Aida por demostrarme lo que una persona puede lograr con determinación y esfuerzo, gran parte de lo que soy y llegare a ser es gracias a ustedes.

A Paulina por su interés excepcional en mi formación profesional, espero tener tu apoyo siempre.



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Una de las funciones críticas de los médicos veterinarios a nivel global y particularmente en países en vías de desarrollo es la prevención de enfermedades zoonóticas. Además de promulgar protocolos ya establecidos para enfermedades endémicas y bien descritas, una de las labores más importantes de la comunidad veterinaria es identificar, estudiar y predecir futuros patógenos que si bien no son un problema hoy, tienen el potencial de ser una amenaza para la sociedad en el futuro. Tanto en la medicina humana como veterinaria, la aparición de bacterias multiresistentes es un tema de máxima prioridad, se estima que dentro de pocos años, la resistencia bacteriana será la principal causa de muerte en animales y en personas (Bengtsson-Palme y Larsson, 2015). Una de las bacterias más importantes por su rápida evolución y su alta prevalencia, es el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Su relevancia en la medicina radica en que está presente como una bacteria relativamente inofensiva en la piel del hospedero; sin embargo, es oportunista, es decir infecta cuando las condiciones son aptas para su supervivencia y multiplicación. (Lin y col., 2011)

Gracias a su potencial evolutivo avanzado, *S. aureus* ha adquirido resistencia a antibióticos pocas décadas después de la implementación masiva de éstos para tratamientos de infecciones. El primer mecanismo de resistencia consistió en secretar enzimas conocidas como penicilinasas, gracias a éstas, la bacteria se volvió resistente a la penicilina. A luz de este evento médico, empezaron a utilizar meticilina, antibiótico betalactámico, como medida para tratar pacientes de la cepa resistente a la penicilina. Pocos años después se describió el mecanismo de resistencia en base al gen *mecA* el cual confiere a la bacteria resistencia a una diversa variedad de antibióticos (Bengtsson-Palme y Larsson, 2015). Así se describió *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina o MRSA por sus siglas en inglés.

Diferentes estudios alrededor del mundo demuestran la presencia de MRSA tanto en personas como animales; uno de los hospedadores comunes son los équidos, en los que se ha identificado



en piel por diferentes métodos diagnósticos entre ellos cultivos bacterianos y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cercenado & de Gopegui, 2008). Sin embargo, en Ecuador no se han realizado estudios sobre la identificación de estos agentes bacterianos en equinos mediante las técnicas de biología molecular. (Frick y col., 2010)

MRSA es una de las principales bacterias colonizadoras de incisiones quirúrgicas, heridas en piel y responsables de una gran cantidad de abscesos e infecciones mamarias en la mayoría de mamíferos (Leonard y Markey, s/f). Generalmente está asociada a hospitales, sin embargo hay estudios donde se ha encontrado que la prevalencia aumentó de 0% en el 2002 a 37% en el 2008 en equinos (van Duijkeren y col., 2010), y a su vez se ha identificado la bacteria en el personal y veterinarios que trabajan con animales infectados, no se sabe hasta cierto punto si el veterinario es el responsable de la infección, sin embargo es muestra de que los animales son un reservorio importante de la bacteria. (Rousseau y col., 2005)

En la práctica médica, el cultivo bacteriano es el más utilizado para el diagnóstico de *S. aureus* resistente a la meticilina pero debido a la característica de la bacteria se requiere de un laboratorio con bioseguridad nivel 3 donde se realicen pruebas de identificación, ya que son altamente infecciosos; en nuestro país al existir un déficit de laboratorios con un estricto nivel de bioseguridad, el empleo de la biología molecular es una alternativa que nos permite diagnosticar la presencia de bacterias patógenas en diferentes tipos de muestras biológicas. Además, técnicas de biología molecular como PCR se han utilizado en diversos estudios para evidenciar la presencia de estos agentes por medio de la detección de ADN siendo muy eficientes en cuanto a la especificidad y sensibilidad; sin embargo el costo y otros factores hacen que la técnica sea muy compleja. Otra de las pruebas mencionadas de biología molecular es el ensayo LAMP, el cual es una alternativa muy competente ante los problemas de costos y tiempo suscitados por la PCR. (Lara y col., 2007)



El presente estudio estableció un protocolo LAMP para el diagnóstico de MRSA de muestras cutáneas (axilares) y nasales de equinos sanos de la provincia del Azuay, con la finalidad de estandarizar la prueba como alternativa de diagnóstico para la bacteria, además de aportar con un sondeo general de la presencia o ausencia del patógeno en dos zonas de la provincia con dos pisos altitudinales, Paute y Tarqui otorgando una pauta general y esperando aportar una herramienta diagnóstica útil para la logia médica del país.



1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Evaluar la frecuencia del gen *mecA* de MRSA en muestras de hisopado cutáneo y nasal en dos zonas geográficas diferentes de la provincia del Azuay mediante la técnica de LAMP

1.1.2 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de LAMP para la identificación de MRSA en muestras de hisopados cutáneos y nasales de equinos.
- Identificar la presencia de material genético del gen *mecA* de MRSA en hisopados cutáneos y nasales en equinos.
- Comparar la frecuencia de MRSA entre el hisopado cutáneo con el hisopado nasal y entre la zona de Tarqui con la zona de Paute.

1.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Existirán diferencias en las frecuencias del gen *mecA* de MRSA en dependencia de la fuente de la muestra y de las dos zonas geográficas?



CAPITULO 2: REVISIÓN LITERARIA.

2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria esférica Gram positiva de gran importancia a nivel mundial que pertenece al género *Staphylococcus* de la familia *Staphylococcaceae*, se estima que un 30% de toda la población está infectada por *S. aureus* (Tong y col., 2015) y que un tercio de la población se infecta intermitentemente, esta fue aislada en 1883 por primera vez de heridas quirúrgicas por Sir Alexander Ogston, lo llamaron *Staphylococcus* por el griego staphyle que significa en racimo de uvas y por los micrococos responsables de supuración e inflamación, el presente género consta de 40 especies y subespecies, siendo *S. aureus* la que provoca patologías más severas en comparación a las demás cepas, se clasificó como aureus por su coloración amarilla característica, otorgada por un pigmento carotenoide ligado a la membrana, reactivo al oxígeno llamado Staphyloxantina, está demostrado que impide la fagocitosis al recolectar especies reactivas al oxígeno (Thomer y col., 2016). Una de las principales características de *S. aureus* es su capacidad de coagular sangre, este proceso está mediado por dos productos secretados por la bacteria, coagulasa y proteína ligadora del factor de Von Willenbrand. La mayor parte de infecciones por *S. aureus* se dan por heridas quirúrgicas, sin embargo la bacteria puede ingresar sin necesidad de una lesión aparente. (Thomer y col., 2016)

S. aureus crece en condiciones aeróbicas facultativas siendo 37°C la temperatura óptima para su rápido crecimiento, sin embargo, sobrevive y se multiplica entre 10°C y 45°C, la característica de la bacteria es multiplicarse formando clústers, esto se debe a la división sucesiva en tres planos perpendiculares con respecto a las células hermanas pudiendo cambiar levemente la posición mientras están unidas. (la Cervantes-García y col., 2014)

Es importante considerar las características morfológicas para comprender a la bacteria de mejor manera, partiendo desde la pared celular la cual posee 2 componentes, el



peptidoglicano que es el componente básico tanto de Gram positivas como negativas, está compuesto por ácido-N-acetilmurámico y ácido N-acetilglucosamina y subunidades de disacáridos que otorgan la estructura y mantiene estable a la bacteria, además de ser importante durante la fase infectiva por actuar como endotoxina y adherirse a las proteínas, el otro componente son los ácidos teicoicos o polisacáridos que forman el 50% del peso de la pared bacteriana y actúan como mediadores entre la unión de la bacteria con superficies específicas en las mucosas, gracias a la porción hidrofóbica mediante uniones específicas a la fibronectina (Mensa y col., 2008). La membrana citoplasmática que se encuentra estructurada por proteínas, lípidos y glúcidos también presenta sus peculiaridades como la proteína A que es utilizada por la prueba de aglutinación para identificar *S. aureus* y también presenta una proteína llamada coagulasa, su nombre hace referencia debido a que produce coagulación del plasma al convertir el fibrinógeno en fibrina. (Mandell y col., 2012). Otro factor importante es la cápsula que está formada por polisacáridos llamada slime o cápsula mucoide, favorece que se adhieran las bacterias a diferentes células y cumple una función importante antifagocitaria, se han tipificado 11 serotipos capsulares, estos polisacáridos en conjunto con las adhesinas incrementan el desarrollo del biofilm incrementando la adhesividad (Hurtado y col., 2002)

Existe un gran número de variantes genéticas de MRSA, sin embargo, por lo menos el 19% de infecciones producidas por MRSA en humanos provienen de la variante CC398, comúnmente asociada a vida silvestre, sin embargo estudios epidemiológicos indican que un 80 a 90% de casos están relacionados a animales o a la cercanía de ellos, especialmente cerdos. Sin embargo el otro 10 a 20 % se da en personas no relacionadas con animales, lo que indica la presencia de transmisión humano a humano por parte del serotipo CC398. Generalmente este tipo de infección está relacionada a contacto con animales de granja (aves de corral, cerdos, bovinos y ovinos) sin embargo estudios en otros países han determinado un 0.5 a 11% de caballos portadores. (van Duijkeren y col., 2010)



2.2. MRSA

MRSA fue identificado por primera vez en 1961, cuando se introdujo a la meticilina como una alternativa a la penicilina en pacientes que mostraban resistencia, poco después de combatir a la bacteria con meticilina se reportaron los primeros casos de resistencia en el Reino Unido, actualmente MRSA es una bacteria nosocomial diseminada a nivel mundial (van Duijkeren y col., 2010). Su amplia difusión es un problema global de alta importancia, su gran capacidad de producir bacteriemia compromete el área de la salud en todos los países industrializados (Kobayashi y col., 2015).

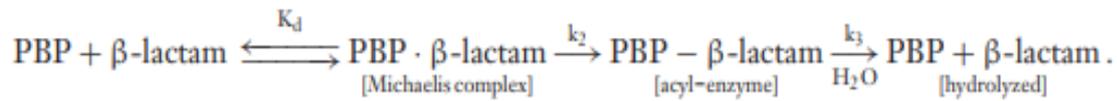
La resistencia a la meticilina se codifica en el gen *mecA*, no se ha identificado su origen pero se supone que evolucionó de un pariente lejano de *S. aureus*. Este gen codifica una proteína resistente a la meticilina que se liga a la penicilina impidiendo su llegada a la membrana de peptidoglicano (Enright y col., 2002). A diferencia de la resistencia a la penicilina, éste no está mediado por una β -lactamasa sino por una proteína ligadora de penicilina (PBP), el gen que codifica esta proteína (*mecA*) ha sido encontrado solo en MRSA donde impide la reacción de los beta lactámicos al disminuir el sitio de acción enzimático de las B lactamasas protegiendo la transpeptidación que de otra forma sería inactivada por el antibiótico. (Peacock y Paterson, s/f). Se han planteado varios mecanismos de resistencia donde se involucran de distintas maneras a PBP y PBP2a, el último siendo el que otorga una mayor resistencia. En equinos se han identificado cepas de MRSA capaces de codificar penicilinasas que reducen el espectro de acción de los antibióticos otorgando una resistencia media. (Maddox y col., 2015)

Los mecanismos de resistencia pueden ser tanto naturales como adquiridos, la transcripción de *mecA* es sin embargo dependiente de la presencia de Beta lactámicos por lo que



se considera adquirido ante un desafío de la bacteria. (Enright y col., 2002) El proceso de resistencia puede así ser resumido en la hidrolización del Beta lactámico.

Figura 1: Mecanismo de hidrolización de β -lactámicos



(Peacock y Paterson, 2015)

La generación de PBP está a su vez regulada por el ligando de MecI, cuando el ligando MecR1 se encuentra con una molécula de Beta lactámico dispara una reacción sobre el locus L3, esto a su vez activa L2 y L1, esto lleva a la proteólisis de MecI ya que las partículas de pared celular derivadas de la acción del antibiótico se unen a MecI impidiendo su función de limitar la activación de mecA, la activación de la metalloproteinasas mecR2, transcribe la codificación de MecR2 el cual también se liga a MecI causando su proteólisis y permitiendo la codificación de mecA y la subsecuente producción de PBP2a. (Peacock y Paterson, 2015).

La fisiopatología de las infecciones clínicas y subclínicas de MRSA, tanto en personas como animales se explican por una serie de procesos dependientes de la condición inicial del sujeto que actúa como vector del patógeno. Se ha descrito la transmisión de MRSA hospitalario y comunitario basándose en la expresión del gen positivo a la leucocidina Pantón Valentine (PVL). La amplificación del gen PVL es útil para diferenciar la fuente original de contagio de MRSA, lo que a su vez aporta información valiosa sobre la tendencia pandémica mundial de la bacteria. Una gran parte de las transmisiones se dan en animales jóvenes sin condiciones previas, se ha demostrado que uno de los factores más comunes en el contagio comunitario es la exposición a abscesos abiertos en pacientes infectados. La falta de higiene y el incorrecto



debridamiento por parte de personal de la salud incrementan el índice de contagio. (Tristan y col., 2007)

Una de las condiciones más comunes y posiblemente la más peligrosa es la neumonía necrotizante por MRSA. Generalmente afecta a animales inmunosuprimidos o con condiciones respiratorias preexistentes. Uno de los mecanismos que otorgan a MRSA su capacidad de infección, es la propiedad de poder infectar a individuos sanos sin presentar síntomas hasta que la situación favorece la multiplicación de la bacteria (Tristan y col., 2007). La neumonía se caracteriza por una rápida y exagerada reacción del hospedero con neutrófilos (PMN) focalizada en el lugar de infección. Los animales cuentan con muchos mecanismos de defensa en las vías aéreas, lo que hace que una infección bacteriana sea poco común y generalmente multimodal con la participación de diversos mecanismos de virulencia. La presencia del gen PVL ha demostrado mediar la reacción exagerada por parte del organismo causando una leucopenia secundaria y un exceso de citoquinas pro inflamatorias en el foco de infección. Esto media la liberación del factor de necrosis tumoral entre otras citoquinas que permiten incrementar el daño pulmonar por parte de la bacteria. Esto a su vez incrementa el distres respiratorio volviendo a la superficie pulmonar un medio ácido en donde MRSA puede desarrollarse ávidamente y secretar toxinas que incrementan la lisis de eritrocitos y PMN'S. (Bien y col., 2011)

2.3. Presentación clínica en equinos

Existen estudios que determinan la presencia de MRSA en equinos, sin embargo no se reporta una gran cantidad de casos clínicos, por lo que se hipotetiza que los caballos actúan como vectores del patógeno (Maddox y col., 2015). La mayoría de casos clínicos reportados indican afecciones de piel, vías aéreas, abscesos, infecciones de incisiones quirúrgicas y



articulaciones que pueden variar desde bacteriemias ligeras a críticas que terminan en la muerte del animal. (Carfora y col., 2016)

Se han realizado pruebas donde se estudia la reacción de los sinoviocitos equinos en presencia de *S. aureus* y se encontró que hay una reacción inflamatoria con la acumulación de IL-1, IL-6 y TNF intraarticular, a su vez se encontró una reducida producción de condroitín sulfato y ácido hialurónico aun cuando la bacteria ya no estaba presente, esto es de relevancia clínica ya que muchas heridas punzantes en articulaciones, especialmente en animales jóvenes pueden llegar a afectar la vida deportiva del animal a futuro, así se elimine la causa primaria de infección. (Hardy y col., 1998)

Cerca de 4,8 de 1000 caballos sometidos a procedimientos quirúrgicos presentan una infección por MRSA en hospitales a nivel mundial, sin embargo, si la bacteria coloniza el hospital y al personal, la tasa de infección puede escalar abruptamente. (Leonard y Markey, s/f)

Uno de los aspectos más importantes, es la infección cruzada en hospitales de equinos, se pueden identificar brotes en los cuales una gran cantidad de pacientes internados así como médicos tratantes muestran signos de infección por MRSA y son positivos a análisis moleculares de la bacteria (van Duijkeren y col., 2010). Es por esto que, es importante identificar y relacionar a los caballos como vectores de MRSA, especialmente cuando estos presentan infecciones de heridas quirúrgicas, celulitis o abscesos, ya que por la multiresistencia de la bacteria, casos de tratamientos comúnmente simples, pueden convertirse en emergencias con resultados fatales tanto en personas como équidos (Weese y col., 2006).

Se ha demostrado la teoría que los neutrófilos actúan como portadores de MRSA inactivo, la bacteria coloniza el sistema gastrointestinal y genera infecciones cuando el ambiente es el apropiado, este es el caso de abscesos en lugares aparentemente intactos, donde



una isquemia muscular puede desencadenar una infección por MRSA vectorizada en neutrófilos. Además se ha probado que el índice de infección es mayor cuando existe daño de tejido, isquemia o ambos, es por esto que las heridas quirúrgicas pueden infectarse con MRSA a pesar de realizarse con todas las normas de asepsia. (Krezalek y col., 2017).

Se han reconocido varios genotipos de MRSA que afectan a équidos a nivel mundial. De estos genotipos el más común es MRSA CC398, el cual adquiere su resistencia por medio del gen Mec-A y está presente tanto en animales silvestres como en humanos. Estudios realizados en Dinamarca probaron la presencia del genotipo CC398 en todos los cultivos positivos a MRSA, en donde obtuvieron 4.2% de prevalencia. (Islam y col., 2017)

Otra de las presentaciones comunes de infecciones por MRSA en equinos es la sinusitis crónica, a pesar de que en la mayoría de casos el agente causal no es *S. aureus*, infecciones por *Streptococcus equi equi*, pueden volverse casos de sinusitis crónica cuando la mucosa afectada y el tracto respiratorio superior debilitado por la infección previa son colonizados por MRSA, la presentación clínica usualmente varía de paciente a paciente pero por lo general involucra secreción mucopurulenta de una o ambas narinas. La colonización de MRSA incrementa la probabilidad de que se necesite una aproximación más agresiva al tratamiento como trepanaciones de seno frontal y lavado de bolsas guturales. (Carfora y col., 2016)

2.4. Características clínicas de MRSA en personas

Es importante conocer que el MRSA se lo ha clasificado en dos cepas, *S. aureus* resistente a meticilina comunitario (CA-MRSA) que hace referencia a infecciones contraídas en zonas alejadas de los factores de riesgo como hospitales y asilos de ancianos, este tipo de cepa principalmente contraen personas que conviven en hacinamiento o personas que tiene contacto muy frecuente con la piel de otras personas como deportistas de lucha; la otra cepa corresponde al *S. aureus* resistente a meticilina hospitalario (HA-MRSA) que se caracteriza



por ser mucho más agresivo que el CA-MRSA debido a su diferente presentación clínica y por ser más resistente a antibióticos. (Huang y col., 2006)(Choo, 2017)

El cuadro clínico del CA-MRSA es muy similar al producido por el *S. aureus* meticilina sensible (MSSA), que se caracterizan por infecciones piógenas cutáneas y de tejidos blandos que pueden ser un tipo de celulitis, forunculitis o abscesos, generalmente se desarrollan próximas a llagas, úlceras o heridas abiertas; sin embargo; también pueden aparecer en zonas que presentan toda la continuidad del tejido, en donde la primera manifestación es una zona eritematosa similar a una picadura de araña, seguida de tumefacción, pus y fiebre, convirtiéndose en abscesos profundos en poco tiempo, mientras que HA-MRSA se caracteriza por neumonías y sepsis.(Gupta, 2014)

Generalmente el CA-MRSA se asocia a infecciones leves y superficiales, no obstante pueden interiorizarse en el organismo provocando daños severos como neumonía necrotizante, empiema, sepsis, fascitis necrotizante, osteomielitis, púrpura fulminante, tromboflebitis, (Cervantes García y Salazar Schettino, 2015), shock séptico e infecciones diseminadas causando endocarditis aguda, miocarditis, pericarditis, meningitis, artritis entre otras llegando a ser mortal.(Camarena y Sánchez, 1999)

Uno de los cuadros más estudiados es la neumonía necrotizante causada por CA-MRSA productoras de la toxina LPV debido a su alta mortalidad en niños y jóvenes, esta toxina induce a necrosis y apoptosis de los leucocitos provocando fiebre alta, hemoptisis, leucopenia e infiltrados alveolares difusos que se convierten en abscesos, gran parte de los casos es a partir de una viremia previa como la gripe. (Cervantes García y Salazar Schettino, 2015)

2.5. Hisopado nasal y cutáneo.

Existen diversos métodos de toma de muestras para identificar MRSA, tanto en humanos como animales. Los más comunes solicitados por personal médico son hisopados provenientes de



debridaciones quirúrgicas, hisopados nasales, muestras de abscesos y heridas quirúrgicas infectadas. Los hisopos pueden ser de diversos materiales, los más comunes son los de algodón y de rayón. Para ciertos estudios es más conveniente el uso de rayón, sin embargo, la economía y facilidad de acceso del algodón hacen que sea el más utilizado a nivel mundial. Estudios de ciencias forenses han determinado que los más costosos y difíciles de adquirir hisopos de nilón son los más eficientes para recuperar ADN. (Freire-Paspuel y col., 2020) No existen diferencias significativas en cuanto a la capacidad de extracción ya que en su gran mayoría están sobre los 100 µl de absorción. (Bruijns y col., 2018)

2.6. Métodos moleculares

La amplificación de ácidos nucleicos es una herramienta muy valiosa empleada en la mayoría de las áreas de las ciencias de la vida, dentro de ellos podemos citar a la medicina clínica en donde se emplea para el diagnóstico de enfermedades de diversa índole como trastornos genéticos o infecciosos (Notomi, 2000). Alrededor del mundo se han creado diferentes técnicas de biología molecular entre ellas la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) creada en 1986 por Kary Mullis la cual utiliza una variación de temperaturas alternadas entre altas y bajas que permite separar las hebras de ADN, posterior se deja que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder replicarlas nuevamente (Saiki y col., 1985). Otras técnicas creadas incluyen la replicación de secuencia autosostenida (3SR), la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), las dos últimas técnicas mencionadas eliminan el proceso de desnaturalización por calor por medio de reacciones de transcripción directa e inversa para poder amplificar la secuencia, estas técnicas fueron creadas por (Guatelli y col., 1990) y (Compton, 1991) respectivamente.

En el año 2000 se crea una nueva técnica conocida como amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que es un método complejo que permite amplificar pocas copias



de ADN a 10^9 en menos de una hora bajo una misma temperatura, además, presenta una alta sensibilidad y especificidad. El método de LAMP se basa en ADN polimerasa con una alta actividad de desplazamiento o cuatro cebadores o primers mínimo y máximo seis, diseñados específicamente, dos cebadores internos más dos cebadores externos. Al iniciar la técnica se emplean cuatro primers pero posterior durante la reacción de ciclo se emplean solo los dos internos que se los llama cebador interno directo (FIP) en sus siglas en inglés Forward Inner Primer (F1C, F2) y cebador interno inverso BIP de sus siglas en inglés Bac-knard Inner Primer (B1C, B2)(Sánchez y col., 2014), cada uno de estos primers presenta dos secuencias distintas, una en sentido del ADN y otra en contrasentido del ADN, la una se utiliza para el cebado de la primera etapa y la otra para el autocebado en procesos posteriores(Notomi, 2000)

Los primers externos se los denominan F3 y B3 que hibridan los extremos de la secuencia genética, mientras que los primers internos FIP y BIP presentan secuencias bidireccional, lo que da lugar a que se forme un bucle (Parida y col., 2008). Los cebadores se los realiza de forma que identifiquen 8 regiones de la secuencia objetivo, lo que se traduce en una alta especificidad de la técnica; además, el empleo de enzimas termoestables como Bst polimerasa y Bsm polimerasa que son aisladas del *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus smithii* respectivamente, poseen una actividad similar a la helicasa ya a que abre la cadena de ADN a temperaturas entre 60 y 65°C desnaturalizándose sobre los 70°C, esta cualidad es importante en la amplificación isotérmica y es una clara ventaja sobre el PCR convencional ya que no se requiere el paso de desnaturalización del ADN a 90°C (Garrido, 2016)

2.7. Extracción de ADN

La mayoría de pruebas mediante biología molecular emplean técnicas de extracción y purificación de ADN, este proceso permite la extracción de ácidos nucleicos y purificarlos para poder realizar las diferentes técnicas de biología molecular, la importancia de realizar correctos



protocolos de extracción de ADN es para evitar falsos negativos y para poder concentrar el ADN de manera que minimice cualquier contaminante existente en la muestra que pueda interferir en el proceso. La extracción de ADN comienza con la lisis celular la cual permite exponer los ácidos nucleicos presentes y liberarlos para el estudio, existen diferentes procedimientos de lisis celular que podemos emplear, entre ellos tenemos el empleo de kits comerciales que viene con las instrucciones del fabricante, por rotura mecánica como trituración, lisis hipotónica, etc., otra alternativa es un tratamiento químico que facilite solubilizar las membranas como detergentes, agentes caotrópicos, etc., y mediante digestión enzimática como proteinasa K, achromopeptidasa, etc.. Es importante mencionar que los medios en el cual se realiza la lisis celular suelen contener EDTA el mismo que forma un complejo con los iones Mg que impide el funcionamiento de las DNasas (Somma, 2020)

2.8. Métodos de purificación

La purificación de ADN se realiza posterior a la lisis celular y es importante para obtener resultados más confiables, como se mencionó anteriormente evitar falsos negativos por posibles contaminantes, este proceso está fundamentado por las características fisicoquímicas de la molécula, como se conoce el ADN está compuesto por dos cadenas formando una doble hélice por la unión de los nucleótidos. Los nucleótidos se forman por una base nitrogenada que puede ser adenina, guanina, timina o citosina, por un grupo fosfato y un azúcar que es la desoxirribosa la unión de los nucleótidos se da mediante enlaces fosfodiéster que da estructura a la molécula. Las bases de cadena opuestas se relacionan mediante puentes de hidrógeno que permite mantener estable la estructura del ADN. Debido a la carga negativa de los fosfatos le otorga al ADN una carga negativa y lo hace polar, al tener cargas iguales los fosfatos se repelen y presentan una fuerte tenencia hidrofílica por ello que el ADN puede disolverse en soluciones acuosas ya que forma una capa hidratante alrededor de la molécula pero en presencia de agentes como etanol se rompe dicha capa hidratante que favorece la exposición de los grupos



fosfatos (Green y Sambrook, 2012), al añadir cationes que presentan una carga opuesta al ADN como el sodio permite la precipitación del ADN debido a que reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas (Patricia et al., n.d.)

La separación del ADN de las proteínas y lípidos se realiza mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación, por las características antes mencionadas permite separar al ADN en medios acuosos mientras que las proteínas y lípidos se separan en solventes orgánicos, la separación de la fase acuosa y orgánica se realiza mediante centrifugación de esa manera se puede aislar al ADN, los solventes utilizados comúnmente son el cloroformo, fenol y alcohol isoamílico. Una vez separados los lípidos y proteínas mediante las fases mencionadas se utiliza etanol para romper las capas hidratantes y soluciones con cationes como sodio que permitan la atracción de los grupos fosfatos mediante atracción de cargas y al ser centrifugadas el ADN se precipite en el fondo permitiendo decantar el etanol sobrante, posteriormente se debe realizar un lavado con etanol al 70% el cual permite retirar el excedente del etanol utilizado con anterioridad, se debe centrifugar para evitar perder material genético en la nueva decantación, una vez terminado este proceso el sobrante de etanol se elimina por evaporación protegiendo el material de la luz solar hasta que se elimine por completo el etanol y poder rehidratar el ADN con la solución buffer utilizada.(Green y Sambrook, 2012)

2.9. Cuantificación del ADN

La cuantificación de material genético suele realizarse mediante electroforesis posterior a ensayos PCR o LAMP, consiste en una separación de moléculas que se mueven por un campo eléctrico por efecto de atracción de cargas (García Pérez, 2000) entre los métodos más empleados son en gel de agarosa o poliacrilamida siendo el último más empleado en proteínas, la agarosa es un polímero que forma fibras helicoidales de manera de malla tridimensional que presenta conductos entre 50 y mayores a 200 nm, por ellos de acuerdo al peso molecular van



avanzando por la malla, se suele emplear bromuro de Etidio como agente intercalante que permite visualizar el ADN, su posición y cantidad relativa en el gel posterior a la electroforesis, ya que el bromuro de Etidio absorbe la luz ultravioleta. (Fierro, 2014)

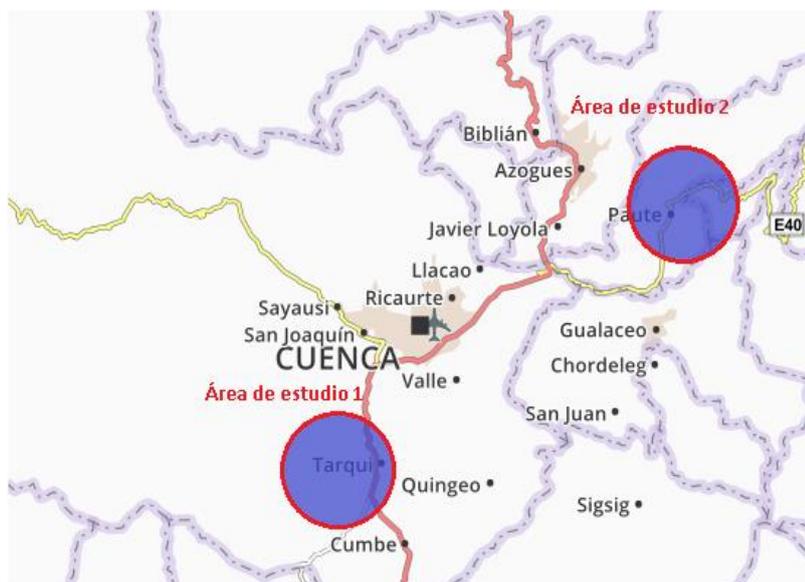
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudios

El área de estudio para este experimento fue el cantón Paute de la provincia del Azuay y la parroquia Tarqui del cantón Cuenca de la provincia del Azuay. Paute está ubicado a 42 km de Cuenca, posee un clima subtropical-templado y se encuentra a una elevación de 2100 m.s.n.m. no existe un censo o sistema de identificación de equinos en el sector; sin embargo, es de conocimiento general que una gran población de équidos viven en la zona, además de que varias actividades ecuestres se realizan con frecuencia en el cantón. (Bermeo, 2013)

La parroquia Tarqui está ubicada a 15 km de la ciudad de Cuenca, es un sector principalmente ganadero donde se encuentra la mayor concentración de equinos en la provincia del Azuay, varía ampliamente en altitud, desde 2500 m.s.n.m. hasta 3400 m.s.n.m. su clima es templado, tiene un rango promedio entre 15 y 18°C lo que otorga una gran diversidad de ecosistemas. (Ontaneda, 2015)

Figura 2. Mapa del Azuay con áreas de interés señaladas. Área de estudio 1, Tarqui y Área de estudio 2, Paute.



(Michelin, 2020)



3.2. Tipo y tamaño de la muestra

3.2.1. Procedimiento

En el presente proyecto se realizó la toma de muestras a 60 equinos adultos entre 5 y 13 años de edad dividiéndolos en dos grupos, 30 animales para la zona de Tarqui y 30 animales para la zona de Paute, se obtuvieron dos muestras por cada equino, la primera de hisopado cutáneo y la segunda de hisopado nasal; resultando un total de 120 muestras, cada uno de los animales corresponden a una unidad experimental. El tamaño de la muestra igual o mayor a 30 es estadísticamente representativo al no tratarse de casos de prevalencia y al tener una población infinita.

3.3. Colecta, conservación y transporte de la muestra

3.3.1. Materiales de trabajo

3.3.1.1. Materiales físicos

- Guantes de látex
- Hisopos estériles
- Tubos estériles de transporte
- Cooler
- Mascarilla

3.3.1.2. Materiales químicos

- Etanol 70%
- 10mM tris HCl
- 1mM EDTA
- 2-5% glicerol

3.3.1.3. Materiales biológicos

- 60 equinos adultos de 5-13 años en la provincia del Azuay, Ecuador.



3.3.2. Procedimiento

La colecta de muestras se realizó mediante un hisopado cutáneo de la región axilar y otro hisopado de la región nasal, posteriormente los hisopos fueron colocados en tubos de vidrio estériles que contenían una solución que permitió almacenar las muestras; previamente los tubos fueron identificados para cada equino y por tipo de hisopado; además, las muestras fueron protegidas de la luz solar directa y llevadas hacia el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

3.4.Lisis celular

3.4.1. Materiales

3.4.1.1. Materiales físicos

- Hisopos
- Microcentrifuga

3.4.1.2. Materiales químicos

- Achromopeptidasa
- Tris-HCl + EDTA

3.4.1.3. Materiales biológicos

- Células obtenidas del muestreo

3.4.2. Procedimiento

Se depositó el hisopo en un tubo de microcentrifugación con 200 μ l de buffer para lisis, el cual contenía 1U/ μ l de achromopeptidasa en 10 mmol/L de Thris-HCl pH 8 y 1mmol/L de EDTA, posteriormente se mezcló por 5 segundos y se incubó a 37°C durante 15 minutos, luego se llevó el preparado a ebullición por 5 minutos, se procedió a centrifugar la muestra a 10000 x g por 1 minuto y se removió el hisopo. Se colocó fenol-cloroformo relación 1:1 y se centrifugó a 1400 x g por 10 minutos; se extrajo la parte soluble en ADN (150ul) y se colocó



en un tubo PCR, se añadió etanol absoluto relación 260:100 más cloruro de sodio relación 4:100, esta solución se centrifugó a 1400 x g por 10 minutos, se decantó y se colocó 500 ul de alcohol al 70% para lavado; se centrifugó a 1400 x g por 10 minutos, se decantó dejando secar la muestra a temperatura ambiente hasta el día siguiente, finalmente se colocó buffer a la muestra.

3.5. Amplificación de control del proceso de ADN total de las muestras de hisopado cutáneo y nasal

3.5.1. Materiales

3.5.1.1. Materiales de laboratorio y equipos

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Microtubos eppendorf
- Tubos de PCR
- Termociclador

3.5.1.2. Materiales químicos o reactivos

- Agua grado biología molecular.
- Buffer de reacción Bsm
- dNTP's
- Betaína
- Oligonucleótidos:
 - FIP: CTGCTAGGAAGAATAGAGCAAATGG-
AGAAGGAGAATCAGAACTCGT
 - BIP: ACATCTTCACAACAACCCTATTTCT-
ATTAATTGAGTAGAGTTCTGGC



- F3: CGAGCTCCATTTGACCTAAC
- B3: AAGGAGAGCTTTAATGGTGA
- LF: TGC GTATTCAACGTTGAATCCAG
- LB: AGGAGCATTT CACAACCCCT

3.5.1.3. Materiales biológicos

- AND total extraído de las muestras cutáneas

3.5.2. Procedimiento

En un tubo PCR, por cada muestra incluida en el ensayo de amplificación se adicionó los reactivos indicados en la Tabla 1, obteniendo un volumen final de reacción de 12 μ l.

Tabla 1. Reactivos previos para ensayo LAMP

Reactivo:	Concentración:	Volumen:	Concentración final:
Agua grado biología molecular.	No aplica.	6 μ l	No aplica.
Buffer de reacción	10 X	1.25 μ l	1X
dNTP's	10 mM c/u	0.125 μ l	0.1 mM c/u
Betaína	4 M	2 μ l	800 mM
FIP	100 μ M	0.2 μ l	1.6 μ M
BIP	100 μ M	0.2 μ l	1.6 μ M
F3	25 μ M	0.1 μ l	0.2 μ M
B3	25 μ M	0.1 μ l	0.2 μ M
LF	100 μ M	0.1 μ l	0.4 μ M
LB	100 μ M	0.1 μ l	0.4 μ M
Enzima Taq DNA polimerasa	5 U/ μ l	0.2 μ l	0.04 U/ μ l



La premezcla preparada se homogenizó en el vortex por 4 a 6", se colectó por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20", posteriormente se marcaron los tubos de PCR (200 μ l), y se colocó 10 μ l de la premezcla, se adicionó 2 μ l de ADN de la muestra correspondiente. Los tubos con las reacciones de amplificación (12 μ l) se colocaron en el termociclador y se sometieron al perfil de temperatura indicado en la Tabla 2 con el propósito de generar los amplicones o productos de LAMP del control de proceso, luego se colocaron en el baño María/termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturalización y el alineamiento:

Tabla 2. Tiempos y temperaturas para proceso de desnaturalización y alineación

Paso:	Desnaturalización	Alineamiento
Tiempo (min`, s`):	5´	5´
Temperatura (°C):	94 °C	4°C

Transcurrido este tiempo, se sacaron los tubos de PCR (200 μ l) del baño María/termociclador y se añadió la enzima Bsm ADN polimerasa cuya concentración inicial fue de 8 U/ μ l, concentración final de 0,32 U/ μ l, volumen por μ l reacción 0,5 obteniendo un volumen final por uL reacción de 12.

Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el baño María/termociclador según los tiempos y temperatura indicados en la Tabla 4.

Tabla 3. Tiempos y temperaturas para la extensión e inactivación

Paso:	Extensión	Inactivación
Tiempo (min`, s`):	60´	10`
Temperatura (°C):	60 °C	80°C



3.6. Amplificación de ADN de *S. aureus* mediante el ensayo de LAMP

3.6.1. Materiales

3.6.1.1. Materiales de laboratorio y equipos

- Baño María/Termociclador
- Tubos de PCR
- Set de micropipetas (1ml, 200ul y 20ul con puntas estériles)

3.6.1.2. Materiales químicos o reactivos.

- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502)
- Oligonucleótidos:
 - FIP: TAGCTGCAGCACTAAGGGGC-CCACGCCGTAAACGATGAG
 - BIP: ACGCATTAAGCACTCCGCCT-GGGTCCCCGTCAATTCCT
 - F3: CGTGGGGATCAAACAGGATT
 - B3: CATGCTCCACCGCTTGTG
 - LF: GGAAACCCCTAACACT
 - LB: GGGGAGTACGACCGCAAGGT
- Reacción buffer 1X (20mM Tris-HCl +10mM (NH₄)₂SO₄ +10mM KCl+2mM MgSO₄+0.1% Triton X-100 pH 8.8 @ 25°C)
- dNTP's
- *Bsm* ADN polimerasa

3.6.1.3. Materiales biológicos

- ADN total extraído de las muestras de sangre

3.6.2. Procedimiento

Previo a la amplificación de ADN de *S. aureus* se realizó un control de proceso, para detectar ADN total, esto con el objetivo de validar que el protocolo de extracción de ADN de equino fue correcto, utilizando oligonucleótidos de equino y los reactivos mencionados en la



Tabla 1, se siguieron los pasos detallados en la sección 3.5.2. para la amplificación del control de proceso. para detección de ADN de *S. aureus* se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP con todos los reactivos que se describieron en la **sección 3.4.2.**, con el volumen requerido para el número de muestras analizadas, colocando en el siguiente orden los reactivos:

Tabla 4. Reactivos previos para ensayo LAMP

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial:	Final:	Por reacción*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	12.2µl x n
Buffer de amplificación 10 x	10X	1X	2.5 µl x n
dNTP's	10 mM	1.4 mM	0.7 µl x n
Oligonucleótido FIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido BIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido F3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido B3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LF	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido LB	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Betaína	4M	800mM	5 µl x n

*n= número de muestras

La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6", se colectó por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20", posteriormente se marcaron los tubos de LAMP (200 µl), se colocó 22 µl de la premezcla y se les adicionó 2 µl de la muestra de ADN total correspondiente obteniendo reacciones de amplificación de 24 µl, para la incubación de esta premezcla se colocaron en el baño María/termociclador con el fin de que suceda la desnaturalización y el alineamiento a tiempos y temperatura descritos en la Tabla 5.

**Tabla 5. Tiempos y temperatura para desnaturalización y alineamiento**

Paso:	Desnaturalización	Alineamiento
Tiempo (min`, s`):	5´	5´
Temperatura (°C):	94°C	4°C

Culminado los 10 minutos, se retiraron los tubos y se añadió la enzima Bsm ADN polimerasa según lo indicado en la Tabla 6:

Tabla 6. Enzima Bsm ADN polimerasa concentración y volumen

Reactivo:	Concentración		Volumen
	inicial	final	por reacción
Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa	8 U/ µl	0.32 U/ µl	0.5 µl
Volumen final:	----	---	24 µl

Posteriormente para los procesos de extensión e inactivación se sometió esta mezcla en el baño María/termociclador durante 60´ a una temperatura de 60 °C y por 10´ a 80 °C respectivamente.

3.7. Amplificación e identificación del gen *mecA*

3.7.1. Procedimiento

Se realizó el mismo procedimiento descrito en la **sección 3.6.2** con las muestras positivas a *S. aureus*, con la variación de que se utilizaron los primers respectivos para detectar el gen *mecA*, los cuales se detallan a continuación:

- **FIP:** GTGGATAGCAGTACCTGAGCC-TTGATGCTAAAGTTCAAAGAGT
- **BIP:** CCTCAAACAGGTGAATTATTAGCAC-CTTCGTTACTCATGCCATAC
- **F3:** AAGATGGCAAAGATATTCAACT
- **B3:** AGGTTCTTTTTTATCTTCGGTTA



- **LF:** TAATCATTTTTTCATGTTG
- **LB:** TGTAAGCACACCTTCATATGACGT

3.8. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio

3.8.1. Procedimiento

Se preparó la solución de buffer TAE 10:1 1X, se realizó el gel agarosa al 0.8 % en solución buffer TEA 1X, antes de que se gelifique se adicionó 3 µl de Bromuro de Etidio, se vertió la agarosa en la bandeja para gel y se dejó gelificar aproximadamente por 15 minutos. Las reacciones del control de proceso del ensayo LAMP fueron sometidas al proceso de amplificación, se les adicionó 5 µl de la Solución buffer de carga para ADN 6X se colocaron en sus respectivos pozos del gel agar para la electroforesis y en uno de los pozos se colocó 450 ng del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp o 1 Kbp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321). Los fragmentos se resolvieron en el gel de agarosa, sometiendo el mismo a 100 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel; una vez resueltos los productos del ensayo LAMP, se foto-documentaron para su análisis.

Se consideraron como muestras válidas todas aquellas en la que se logró amplificar el fragmento correspondiente al control de proceso. Como muestra positiva del ensayo LAMP se consideró una curva positiva aquella en la que se observó el ADN de *S. aureus* amplificado.

3.9. Análisis estadístico

Las variables utilizadas en el estudio fueron las fuentes de la muestra y las zonas geográficas de estudio que corresponden a las variables independientes y como variable dependiente nominal la frecuencia de material genético del gen *mecA* de MRSA obtenidos por



la técnica de LAMP. Se utilizó un diseño completamente al azar y para evaluar los resultados se realizó un estudio de tipo descriptivo, se utilizaron frecuencias absolutas y relativas, una prueba de chi-cuadrado y una prueba de Nemar para la comparación de la frecuencia de MRSA entre hisopado cutáneo con nasal y la zona de Tarqui con la zona de Paute.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSION

Tras realizar las pruebas respectivas se pudo cumplir el objetivo de establecer un protocolo para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina mediante hisopados cutáneos y nasales en dos zonas geográficas de la provincia del Azuay, en el que se realizó un control de proceso, primero identificando ADN de equino, seguido de *S. aureus* y al final mec A. Debido al tipo de muestras y el método de recolección, el control positivo de ADN de equino fue negativo (**Figura 3**). Deducimos que este resultado se debió a que el ADN pudo fragmentarse y al no tener una cadena completa se imposibilita la amplificación por la técnica de LAMP. Cada una de las muestras tenía su control positivo, se sometieron a detección de material genético de *S. aureus* y la fase final en la que las pruebas positivas para *S. aureus* se sometieron al ensayo LAMP para *S. aureus* resistente a meticilina.

Figura 3. Lectura de resultados de LAMP para la detección de material genético de equino como control de proceso mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio

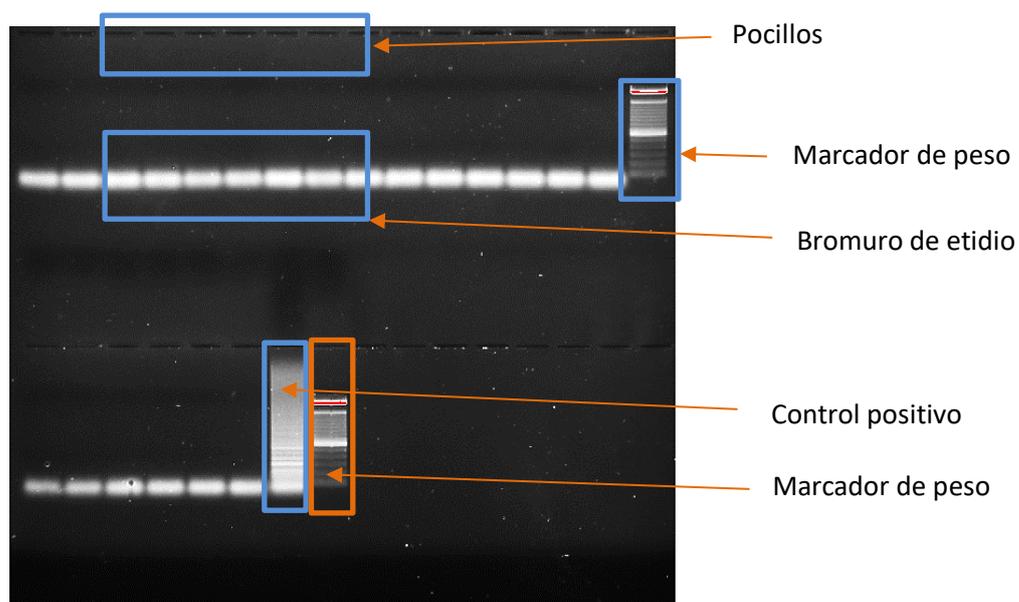




Tabla 9. Distribución de 120 muestras de equinos sanos de la provincia del Azuay según frecuencia de *S. aureus*

	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Porcentaje
Positivos	4	0,03333333	3,33%
Negativos	116	0,96666667	96,67%
TOTAL	120	1	100,00%

Estimador Mc Nemar <0.0001

Los 4 casos positivos a *S. aureus* en equinos sanos nos permite deducir la presencia de equinos portadores de *S. aureus*. en la provincia del Azuay. Al 95% de confianza existe evidencia que hay diferencia estadísticamente significativa entre la presencia y ausencia de *S. aureus*.

Los resultados proponen un escenario real acerca de la existencia de una bacteria con potencial de multiresistencia. Al ser un patógeno bastante generalizado en mamíferos, *S. aureus* establece un riesgo tanto laboral por zoonosis, como animal por antropozoonosis.

Los resultados de los casos positivos del ensayo LAMP se pueden observar en las **Figuras 4, 5, 6 y 7**; que corresponden a la amplificación del material genético mediante electroforesis.

Figura 4. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de *S. aureus* de las muestras 21-40 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 25 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute

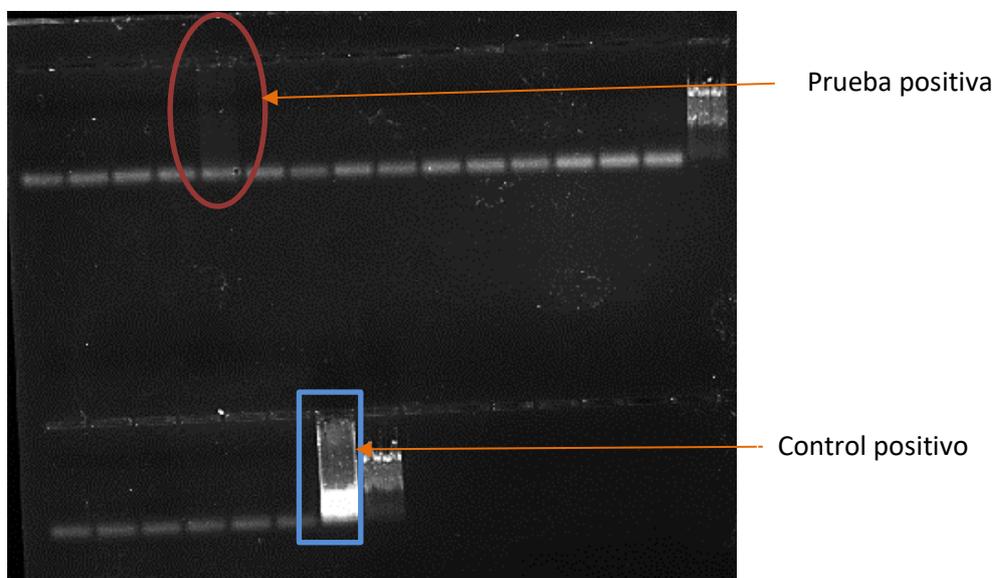


Figura 5. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de *S. aureus* de las muestras 41-60 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 53 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute

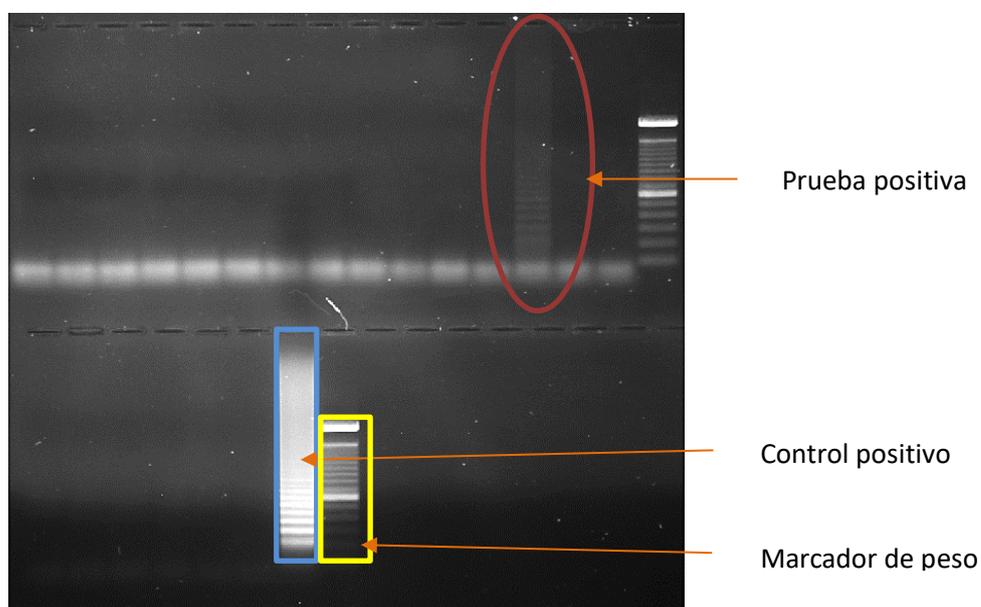


Figura 6. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de *S. aureus* de las muestras 61-80 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 70 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute

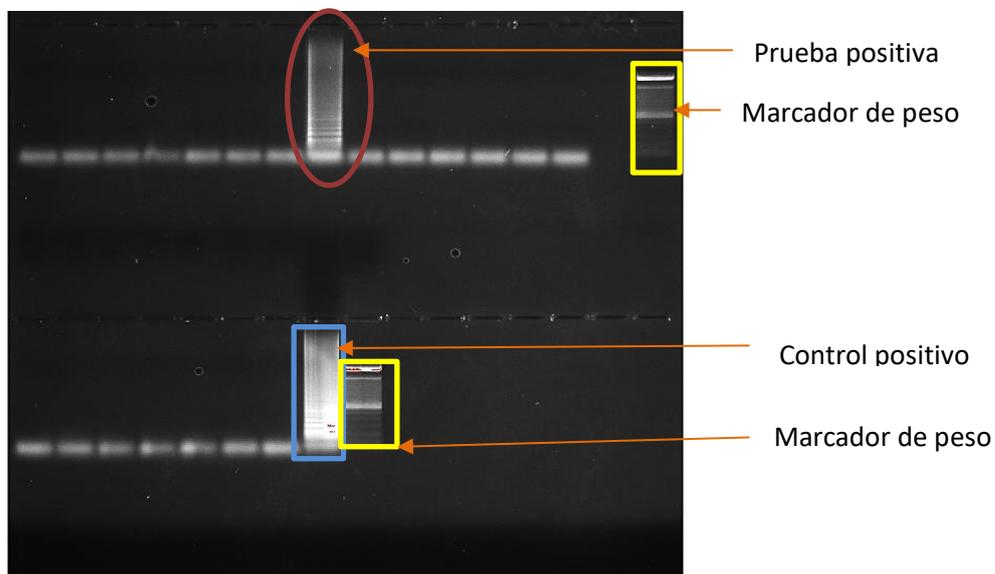
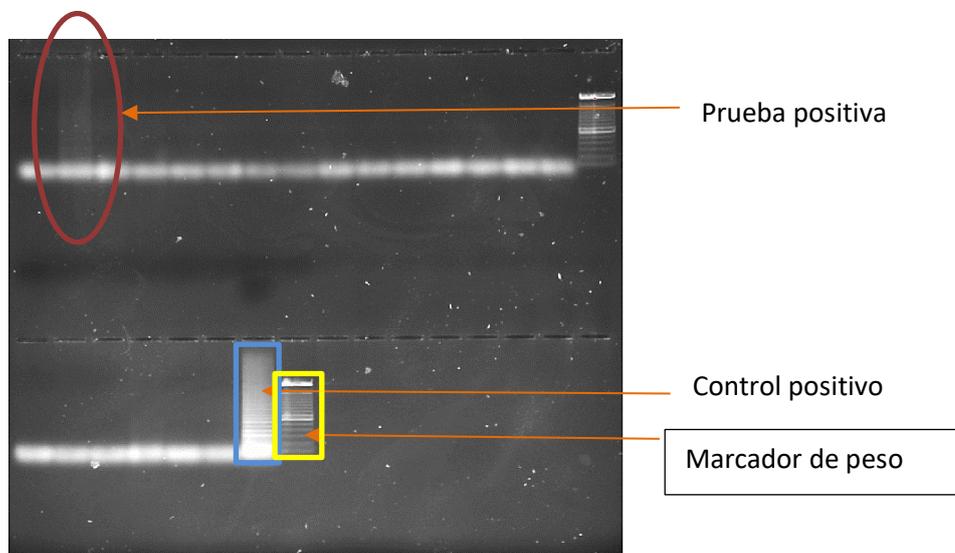
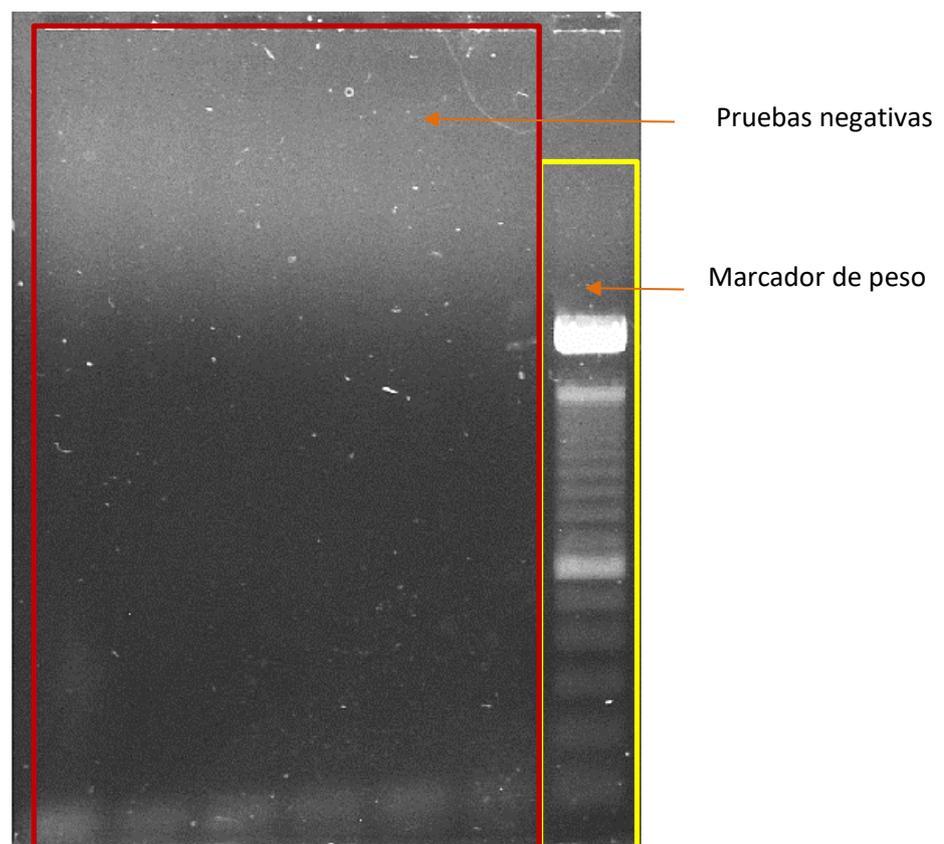


Figura 7. Lectura de resultados del ensayo LAMP para la amplificación del material genético de *S. aureus* de las muestras 101-120 mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 102 positiva correspondiente a hisopado nasal en la zona de Paute



Los resultados son similares a los obtenidos por Leonard y Markley (2010), quienes identificaron *S. aureus* en 4,8 % de 1000 caballos muestreados, sin embargo ellos estudiaron la presencia de la bacteria en equinos sometidos a heridas quirúrgicas. Esta relación en resultados puede deberse a la teoría de que neutrófilos actúan como portadores de la bacteria y acarrean el patógeno directamente al lugar donde se inicia una cadena inflamatoria. Este mecanismo de supervivencia aprovecharía la secreción de exudado que propicia un ambiente óptimo para la proliferación de la bacteria, un mecanismo similar puede observarse en miositis bacterianas donde no existe un aparente punto de ingreso del patógeno. (Peacock y Paterson, 2015)

Figura 8. Lectura de resultados de LAMP para la detección del gen *mecA* mediante electroforesis en gel agar teñido con bromuro de Etidio, muestra 25, 53, 70, 120 negativas para MRSA





La frecuencia de MRSA fue nula en nuestro estudio, dicho resultado expone la ausencia de la bacteria en piel y vías nasales superiores de los equinos seleccionados para el estudio. Sin embargo, nuestra prueba de control positivo demuestra ser un filtro adecuado para la selección de calidad de muestras que podría aplicarse a futuros estudios de identificación de MRSA. Si bien este proceso no es requerido en la mayoría de pruebas moleculares comerciales, brinda validez y asevera la calidad de las muestras recolectadas.

El proceso en cadena involucra que una muestra no es aceptable a menos que cumpla todos los parámetros de identificación de material genético de diversos orígenes. Este principio se ve utilizado en un estudio de Bath y colaboradores (2020) quienes generaron una prueba para la detección de fiebre aftosa en el campo, en este estudio se usó un RT-LAMP con control interno positivo, la importancia de nuestra prueba de control interno, en la que primero identificamos ADN de equino, seguido por *S. aureus* y MRSA, radica en la amplia diseminación de *S. aureus* en personas. Dicho evento incrementa el riesgo que por mal manejo de muestras se obtengan falsos positivos. (Bath y col., 2020)

En el Ecuador, existen estudios acerca de la prevalencia de MRSA en diversos animales domésticos. Zambrano-Mila y colaboradores (2020), encontraron que el 6.25% de cobayos en el país son portadores de MRSA. Otra investigación en estudiantes de medicina del Ecuador encontró un 45% de portadores de MRSA (Bastidas y col., 2019). Aunque en nuestra investigación no se identificaron equinos portadores de MRSA, gracias al control positivo interno, logramos identificar un 3.33 por ciento de equinos portadores de *S. aureus*. La ausencia del gen *mec-A* en muestras nasales y cutáneas de equinos no significa que la bacteria no está presente en el medio, ya que en pocas generaciones puede mutar cuando se presenta un desafío. El mal uso de antibióticos junto a la alta prevalencia en poblaciones específicas dentro del país hace que sujetos no expuestos a ambientes hospitalarios puedan presentar infecciones por MRSA con un resultado terapéutico deplorable en comparación a las infecciones por MSSA,



Lowy (2003). Este fenómeno puede causar que animales nunca expuestos a condiciones hospitalarias presenten infecciones graves por MRSA dificultando el manejo de enfermedades tanto en producción como clínica de medicina veterinaria. Esto plantea un reto a futuro en el uso de antibióticos de todo el ecosistema de manejo de especies mayores.

Los resultados obtenidos en esta investigación no coinciden con los reportados por Giacoboni y col. (2018) quienes demuestran una prevalencia del 5% de MRSA en equinos sanos de la provincia de Buenos Aires en muestras de vestíbulo nasal. El estudio permite brindar información valiosa a toda la comunidad que incluye profesionales de sanidad animal, tenedores de equinos y profesionales de la salud pública al tratarse de una bacteria zoonótica que causa graves complicaciones de salud; debido a la multiresistencia de la cepa, su tratamiento es complejo y de pronóstico reservado según la evolución, se debería realizar el presente estudio en diferentes especies domésticas de las zonas para evaluar el impacto sanitario y poder concientizar de acuerdo a la realidad de nuestro medio a toda la comunidad con énfasis en los criadores de animales quienes son más propensos ya que representan un 30% del total de infectados por *S. aureus* resistente a meticilina (Van Rijen y col., 2008)



Con relación a la frecuencia de MRSA considerando el lugar de la colecta del hisopado y la zona geográfica donde se encuentran los equinos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 10. Distribución de *S. aureus* en los dos tipos de hisopado dentro de la zona geográfica de Tarqui

	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Porcentaje
Tarqui Nasal Positivos	0	0	0,00%
Tarqui Nasal Negativos	30	0,5	50,00%
Tarqui Cutáneo Positivos	2	0,03333333	3,33%
Tarqui Cutáneo Negativos	28	0,46666667	46,67%
Total	60	1	100,00%

Chi Cuadrado Pearson ($p > 0.9999$)

Tabla 11. Distribución de *S. aureus* en los dos tipos de hisopado dentro de la zona geográfica de Paute

	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Porcentaje
Paute Nasal Positivos	2	0,03333333	3,33%
Paute Nasal Negativos	28	0,46666667	46,67%
Paute Cutáneo Positivos	0	0	0,00%
Paute Cutáneo Negativos	30	0,5	50,00%
Total	60	1	100,00%

Chi Cuadrado Pearson ($p > 0.9999$)

De los 4 resultados positivos a *S. S. aureus*; dos corresponden a hisopados cutáneos en la zona de Tarqui y dos a hisopados nasales en la zona de Paute. Al 95% de confianza existe evidencia que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de hisopado o las zonas geográficas, es decir las medias son estadísticamente iguales. Cabe mencionar que se puede detectar *S. aureus* por medio de los dos tipos de hisopados y en las dos zonas geográficas.



Según lo indicado en párrafos anteriores, la detección del gen *mec-A* mediante la técnica de LAMP fue nula; por lo que, al realizar la prueba de Chi cuadrado comparando la frecuencia de MRSA entre el hisopado cutáneo con el hisopado nasal y entre las dos zonas geográficas el resultado evidencia que no hay diferencia estadísticamente significativa.

(Anexo 30)

Todas las muestras fueron sometidas a todos los procesos de control positivo, el cual mostró ser un procedimiento eficaz para la reducción de errores y como un respaldo de los resultados de la prueba de LAMP. Además, nos sirvió como un método efectivo para estandarizar el procedimiento de la prueba con el fin de validar su funcionalidad. Gracias a la minuciosidad del análisis de muestras, obtuvimos un protocolo LAMP relevante y extrapolable para el análisis de ADN equino, ADN de *S. aureus* y ADN del gen *mec A*.



CAPITULO 6: CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo LAMP como un método molecular útil para el diagnóstico de patógenos, con especial valor predictivo en base a la situación actual de los dos conjuntos de animales.
- Se identificó *S. aureus* de manera saprófita en equinos sanos en las dos zonas geográficas mediante los dos tipos de hisopados con un porcentaje de 3,33% en cada zona.
- No se identificó la presencia del gen *mecA* que caracteriza a *S. aureus* resistente a meticilina en la población estudiada lo que indica el estado sanitario de los equinos.
- No se encontraron diferencias significativas del gen *mec A* de MRSA en las dos poblaciones estudiadas Paute y Tarqui.
- No se encontraron diferencias significativas del gen *mec A* de MRSA en relación a la ubicación anatómo-topográfica del hisopado (nasal o cutánea).



CAPITULO 7: RECOMENDACIONES

- Extrapolar la tesis a otras especies domésticas ya que se trata de una de las bacterias más peligrosas en la actualidad debido a la multiresistencia que presenta y por ser de carácter zoonótico siendo la responsable de muchos decesos anuales a nivel mundial tanto en jóvenes como adultos por las complicaciones severas de MRSA.
- Realizar un caldo de cultivo nutritivo previa a la lisis celular para aumentar la carga bacteriana y la sensibilidad del análisis y detectar la presencia de material genético en caso de que existirá una carga bacteriana baja.
- Realizar más investigaciones para aclarar qué tipo de hisopo es el mejor para realizar hisopados en équidos.



CAPITULO 8: BIBLIOGRAFÍA

- Bastidas, C. A., Villacrés-Granda, I., Navarrete, D., Monsalve, M., Coral-Almeida, M., & Cifuentes, S. G. (2019). Antibiotic susceptibility profile and prevalence of mecA and lukS-PV/lukF-PV genes in *Staphylococcus aureus* isolated from nasal and pharyngeal sources of medical students in Ecuador. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2553–2560. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219358>
- Bath, C., Scott, M., Sharma, P. M., Gurung, R. B., Phuentshok, Y., Pefanis, S., Colling, A., Singanallur Balasubramanian, N., Firestone, S. M., Ungvanijban, S., Ratthanophart, J., Allen, J., Rawlin, G., Fegan, M., & Rodoni, B. (2020). Further development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of foot-and-mouth disease virus and validation in the field with use of an internal positive control. *Transboundary and Emerging Diseases*, tbed.13589. <https://doi.org/10.1111/tbed.13589>
- Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D. G. J. (2015). Antibiotic resistance genes in the environment: Prioritizing risks. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 6, p. 396). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399-c1>
- Bermeo, H. (2013). *Proyecto: DIPECHO VII "IMPLEMENTACIÓN DE LA*
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2011). Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* : Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response . *Journal of Pathogens*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/601905>
- Bruijns, B. B., Tiggelaar, R. M., & Gardeniers, H. (2018). The Extraction and Recovery Efficiency of Pure <sc>DNA</sc> for Different Types of Swabs. *Journal of Forensic Sciences*, 63(5), 1492–1499. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13837>
- Camarena, J. J., & Sánchez, R. (1999). *Meticilina, Infección por Staphylococcus aureus*



resistente a.

Carfora, V., Caprioli, A., Grossi, I., Pepe, M., Alba, P., Lorenzetti, S., Amoroso, R., Sorbara, L., Franco, A., & Battisti, A. (2016a). A methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Sequence Type 8, spa type t11469 causing infection and colonizing horses in Italy. *Pathogens and Disease*, 74(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw025>

Carfora, V., Caprioli, A., Grossi, I., Pepe, M., Alba, P., Lorenzetti, S., Amoroso, R., Sorbara, L., Franco, A., & Battisti, A. (2016b). A methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Sequence Type 8, spa type t11469 causing infection and colonizing horses in Italy. *Pathogens and Disease*, 74(4), 25. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw025>

Cercenado, E., & de Gopegui, E. R. (2008). *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(SUPPL. 13), 19–24. <https://doi.org/10.1157/13128776>

Cervantes García, E., & Salazar Schettino, P. M. (2015). *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 2(62), 100–111.

Choo, E. J. (2017, June). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial infections. *Infection and Chemotherapy*, 49(2), 143–144. <https://doi.org/10.3947/ic.2017.49.2.143>

Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. In *Nature* (Vol. 350, Issue 6313, pp. 91–92). <https://doi.org/10.1038/350091a0>

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7687–7692. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>

Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En*



Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos, 27–52.

- Freire-Paspuel, B., Vega-Mariño, P., Velez, A., Castillo, P., Gomez-Santos, E. E., Cruz, M., & Garcia-Bereguiain, M. A. (2020). Cotton-Tipped Plastic Swabs for SARS-CoV-2 RT-qPCR Diagnosis to Prevent Supply Shortages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 356. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00356>
- Frick, M. A., Moraga-Llop, F. A., Bartolomé, R., Larrosa, N., Campins, M., Roman, Y., Vindel, A., & Figueras, C. (2010). Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad en niños. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), 675–679. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.007>
- García Pérez, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag*, 1((2)), 31–41.
- Garrido, P. (2016). TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE O LAMP. VENTAJAS EN EL DIAGNÓSTICO SANITARIO. *ECUADOR ES CALIDAD - Revista Científica Ecuatoriana*, 3(1). <https://doi.org/10.36331/revista.v3i1.50>
- Giacoboni, G., Gagetti, P., Kienast, M., López, C., Faccone, D., & Corso, A. (2018). Equinos sanos de la provincia de Buenos Aires colonizados con *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. *Med Vet*, 3(99).
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning This is a free sample of content from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition. Click here for more information or to buy the book.*
- Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D., & Gingeras, T. R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1874–1878.



<https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874>

Gupta, R. C. (2014). *Infecciones por SARM*.

Hardy, J., Bertone, A. L., & Malemud, C. J. (1998). Effect of synovial membrane infection in vitro on equine synoviocytes and chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research*, 59(3), 293–299. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9522948/>

Huang, H., Flynn, N. M., King, J. H., Monchaud, C., Morita, M., & Cohen, S. H. (2006). Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MSRA infections in Sacramento, California. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2423–2427. <https://doi.org/10.1128/JCM.00254-06>

Hurtado, M. P., De La Parte, M. A., & Brito, Y. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22.

Islam, M. Z., Espinosa-Gongora, C., Damborg, P., Sieber, R. N., Munk, R., Husted, L., Moodley, A., Skov, R., Larsen, J., & Guardabassi, L. (2017). Horses in Denmark Are a Reservoir of Diverse Clones of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 543. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00543>

Kobayashi, S. D., Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. In *American Journal of Pathology* (Vol. 185, Issue 6, pp. 1518–1527). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030>

Krezalek, M., Hyoju, S. K., & Zaborina, O. (2017). *Article in Annals of Surgery*. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002173>

la Cervantes-García, E., el García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40.



- Lara, H. H., Ayala, N. V., & Rodríguez, C. (2007). Laboratorios de bioseguridad nivel 3 y 4: investigación de patógenos peligrosos. *Rev Mex Patol Clin*, 54(4), 177–186.
- Leonard, F. C., & Markey, B. K. (n.d.). *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: A review*. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.008>
- Lin, Y., Barker, E., Kislow, J., Kaldhone, P., Stemper, M. E., Pantrangi, M., Moore, F. M., Hall, M., Fritsche, T. R., Novicki, T., Foley, S. L., & Shukla, S. K. (2011). Evidence of multiple virulence subtypes in nosocomial and community-associated MRSA genotypes in companion animals from the upper midwestern and Northeastern United States. *Clinical Medicine and Research*, 9(1), 7–16. <https://doi.org/10.3121/cmr.2010.944>
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 111, Issue 9, pp. 1265–1273). The American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>
- Maddox, T. W., Clegg, P. D., Williams, N. J., & Pinchbeck, G. L. (2015). Antimicrobial resistance in bacteria from horses: Epidemiology of antimicrobial resistance. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 47, Issue 6, pp. 756–765). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/evj.12471>
- Mandell, G., Bennett, J., & Dolin, R. (2012). *ENFERMEDADES INFECCIOSAS: PRINCIPIOS Y PRACTICA / GERALD L. MANDELL, JOHN E. BENNETT Y RAPHAEL DOLIN*.
- Mensa, J., Barberán, J., Llinares, P., Picazo, J., Bouza, E., Alvarez-Lerma, F., Borges, M., Serrano, R., León, C., Guirao, X., Arias, J., Carreras, E., Sanz, M., García-Rodríguez, J., Sociedad Española de Quimioterapia, Sociedad Española de Medicina Interna, Sociedad Española de Medicina Interna, Sociedad Española de Medicina Intensiva, C. y U. C., Asociacion Española de Cirujanos, & Asociacion Española de Hematología y Hemoterapia. (2008). Guidelines for the treatment on infections caused by methicillin-



resistant *Staphylococcus aureus*. *Revista Espanola de Quimioterapia : Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 21(4), 234–258.

Michelin. (2020). *Mapa Sinincay - plano Sinincay - ViaMichelin*.

Notomi, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63.

Ontaneda, N. (2015). *UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL FACULTAD DE TURISMO, HOTELERÍA Y GASTRONOMÍA CARRERA: INGENIERÍA EN GESTIÓN TURÍSTICA Y PRESERVACIÓN AMBIENTAL TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN GESTIÓN*.

Parida, M. M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 407–421).
<https://doi.org/10.1002/rmv.593>

Patricia, L., Velázquez, A., Del Consuelo, M., Martínez, A., & Romero, A. C. (n.d.).
Extracción y purificación de ADN.

Peacock, S. J., & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 84, pp. 577–601).
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>

Rousseau, J. D., Willey, B. M., & Mcgeer, A. (2005). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses Investigation into Factors Associated with Surgical Site Infections Following Tibial Plateau Leveling Osteotomy in Dogs View project PRIDE Study: Post-pandemic Review of anti-Influenza Drug Effectiveness View project. In *Article in Journal of the American Veterinary Medical Association*.



<https://www.researchgate.net/publication/7990739>

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N.

(1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354.

<https://doi.org/10.1126/science.2999980>

Sánchez, E., Maritza, N., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación

isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico.

CON-CIENCIA, 2(1), 125–138.

Somma, M. (2020). *WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR*

EUROPE WELTGESUNDHEITSORGANISATION REGIONALBÜRO FÜR EUROPA

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE BUREAU REGIONAL DE L'EUROPE

Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimento.

Thomer, L., Schneewind, O., & Missiakas, D. (2016). Pathogenesis of *Staphylococcus*

aureus Bloodstream Infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*,

11(1), 343–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044351>

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015).

Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical

Manifestations, and Management. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

Tristan, A., Ferry, T., Durand, G., Dauwalder, O., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., &

Etienne, J. (2007). Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Journal of Hospital Infection* (Issue S2).

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.02.021>

van Duijkeren, E., Moleman, M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M., Multem, J.,

Troelstra, A., Fluit, A. C., van Wamel, W. J. B., Houwers, D. J., de Neeling, A. J., &



- Wagenaar, J. A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: An investigation of several outbreaks. *Veterinary Microbiology*, *141*(1–2), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.009>
- Van Rijen, M. M. L., Van Keulen, P. H., & Kluytmans, J. A. (2008). Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(2), 261–263. <https://doi.org/10.1086/524672>
- Weese, J. S., Rousseau, J., Willey, B. M., Archambault, M., McGeer, A., & Low, D. E. (2006). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses at a Veterinary Teaching Hospital: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *20*(1), 182–186. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02839.x>
- Zambrano-Mila, M., Rodriguez, A. S., Rivera-Olivero, I. A., Salas-Rueda, M., Caceres-Orellana, M. V., de Waard, J. H., & Garcia-Bereguain, M. A. (2020). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carriage among guinea pigs raised as livestock in Ecuador. *One Health*, *9*, 100118. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100118>



CAPITULO 9: ANEXOS

Anexo 1. Fotografía de día de toma de muestra en la zona geográfica de Paute



Anexo 2. Fotografía de toma de muestras en la zona geográfica de Tarqui

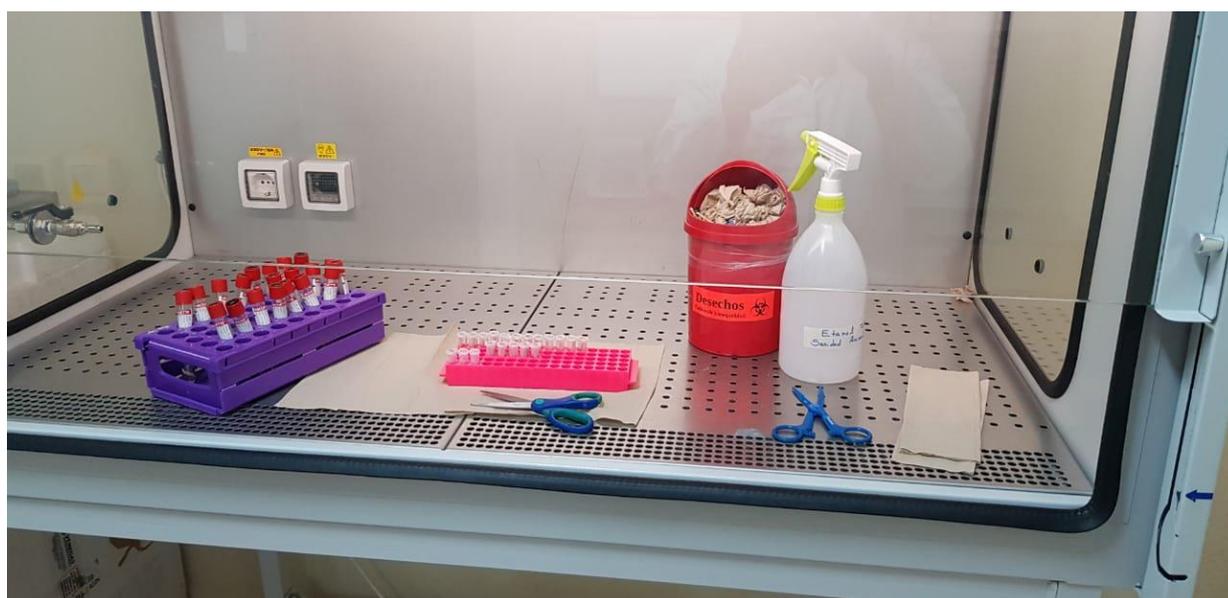




Anexo 3. Conservación de la muestra -80°C



Anexo 4. Materiales previos a la manipulación en cámara de bioseguridad doble flujo



Anexo 5. Manipulación de la muestra dentro de la cámara de bioseguridad doble flujo



Anexo 6. Muestras para centrifugación previas a la concentración de ADN



Anexo 7. Muestras post-centrifugación previa a concentración de ADN



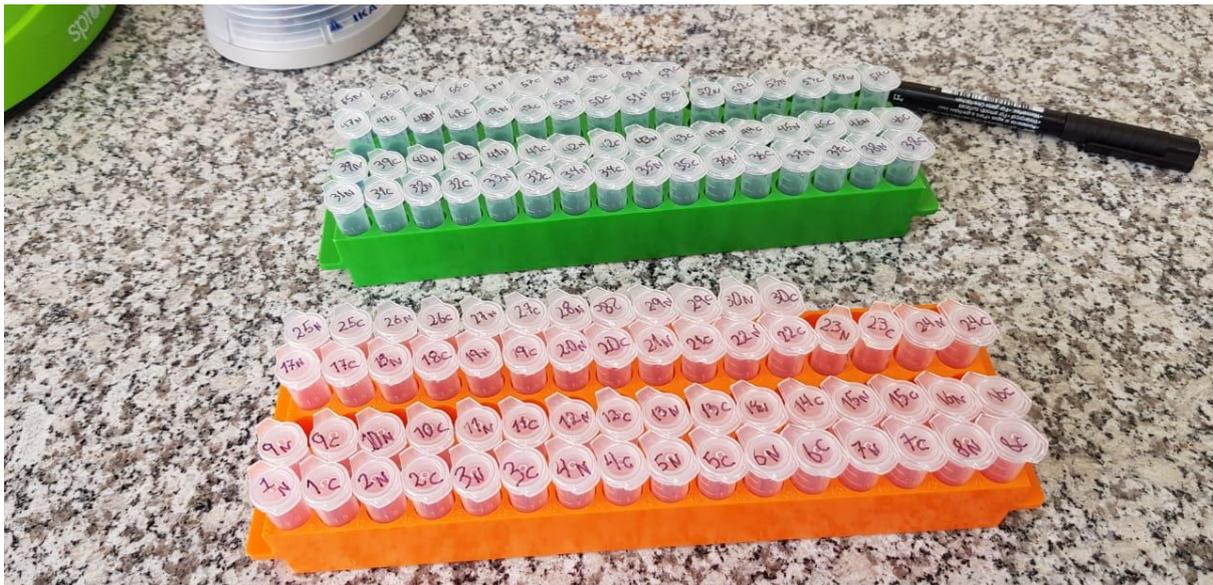
Anexo 8. Muestras post-decantación con ADN concentrado



Anexo 9. ADN de muestra concentrado previa a ensayos LAMP

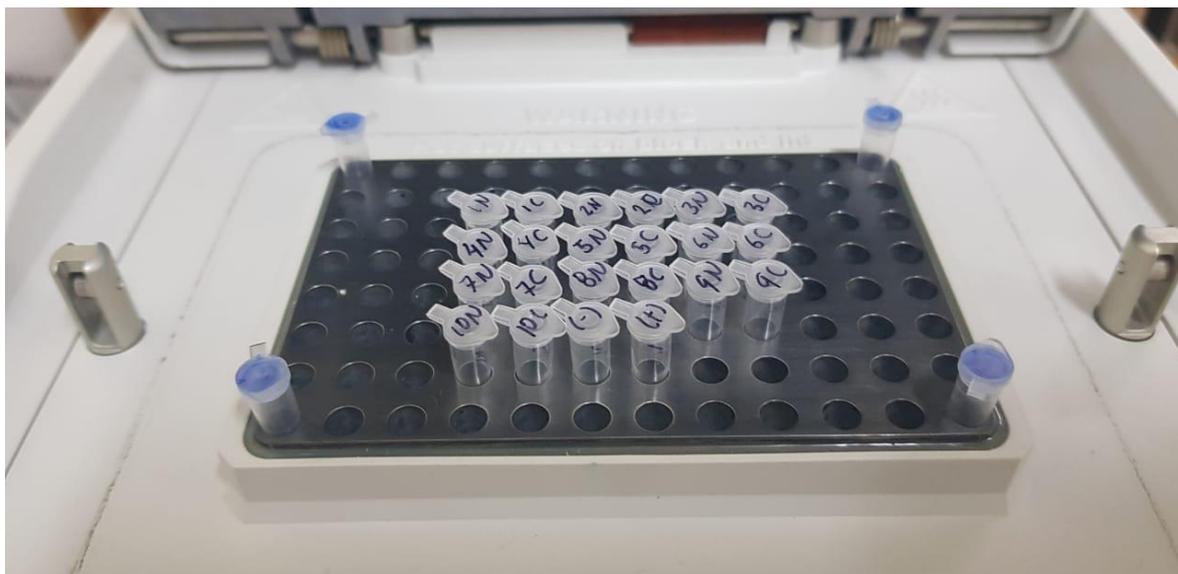


Anexo 10. Muestras etiquetadas previas al ensayo LAMP





Anexo 11. Muestras preparadas para ensayo LAMP

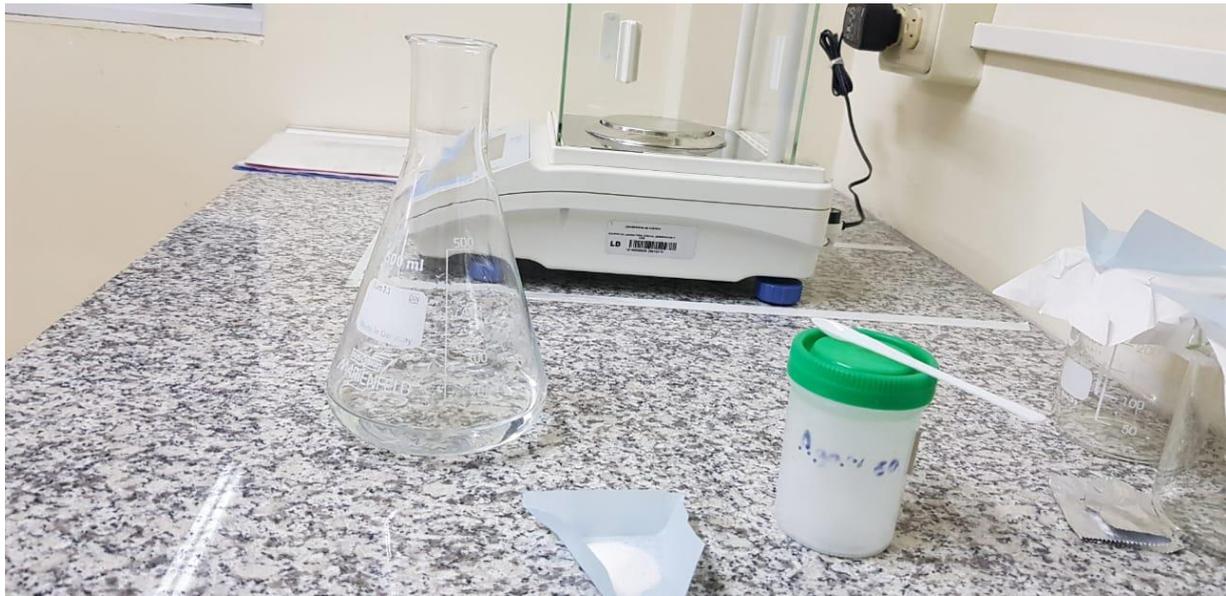


Anexo 12. Muestras en termociclador/Baño María

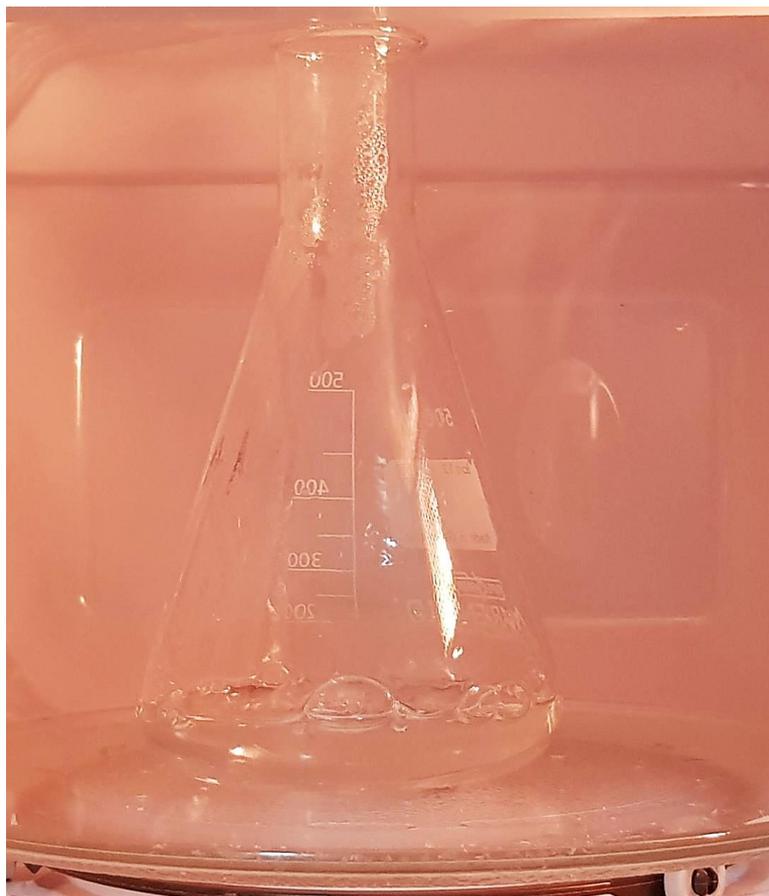




Anexo 13. Materiales para la preparación de gel agar para electroforesis



Anexo 14. Ebullición de la preparación de agarosa en buffer TAE previo a la colocación de bromuro de Etidio



Anexo 15. Cámara de electroforesis

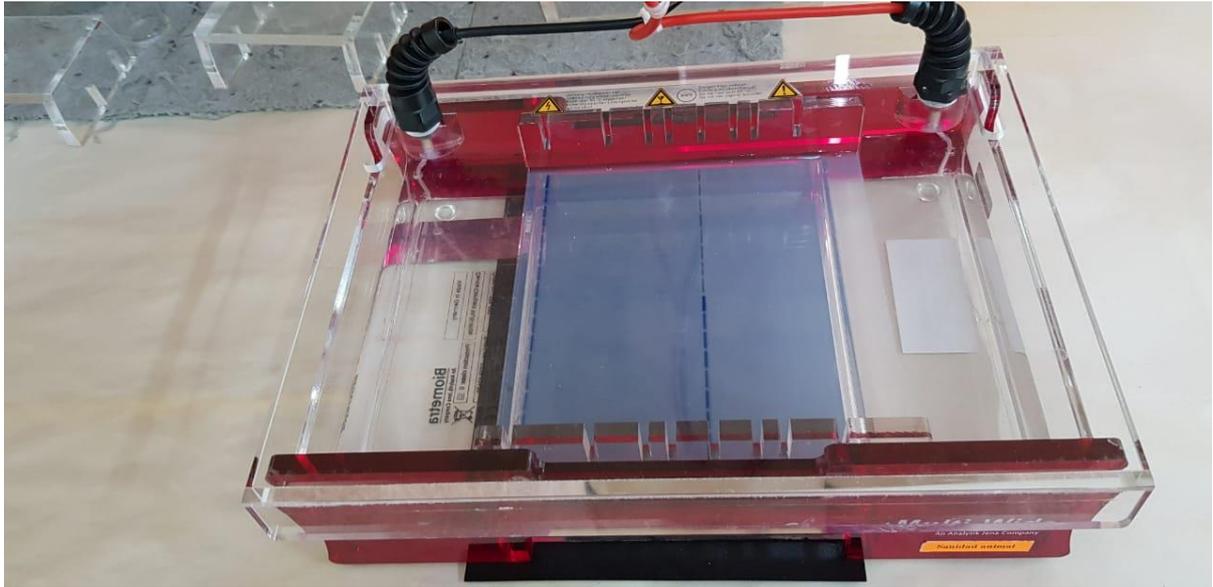


Anexo 16. Gel agar con tinción de bromuro de Etidio preparado y colocado en cámara de electroforesis

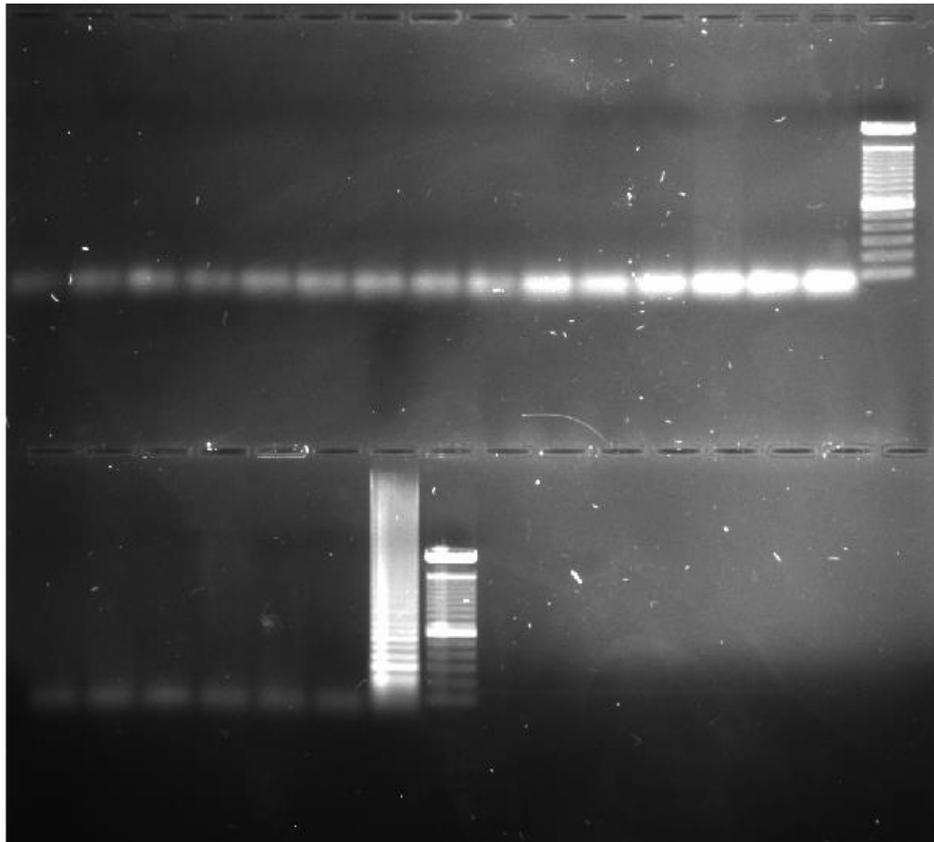




Anexo 17. Muestras cargadas en el gel agar listas para la electroforesis

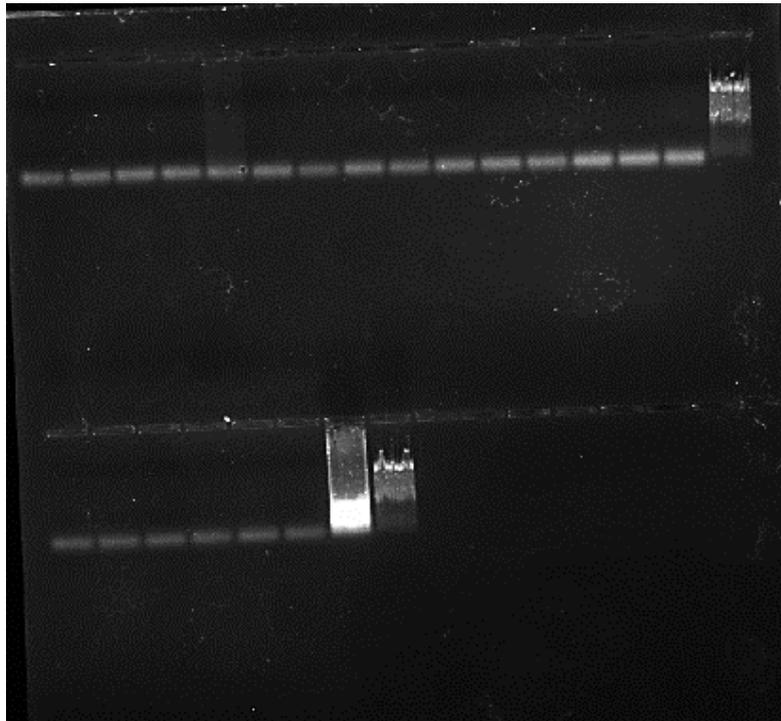


Anexo 18. Lectura del resultado de LAMP de material genético de *S. aureus* mediante electroforesis en gel agar de la muestra 1 – 20

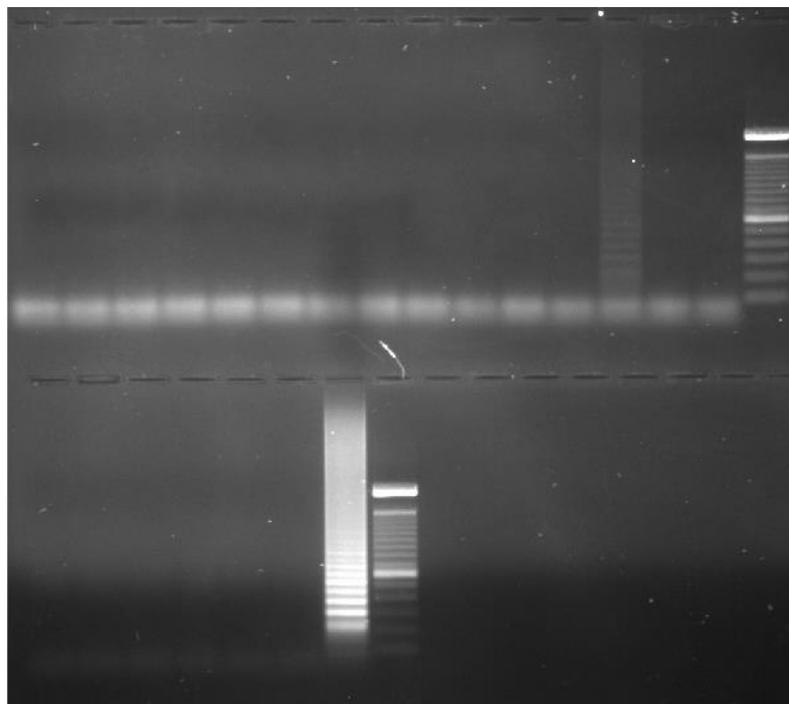




Anexo 19. Lectura del resultado de LAMP de material genético de *S. aureus* mediante electroforesis en gel agar de la muestra 21 – 40

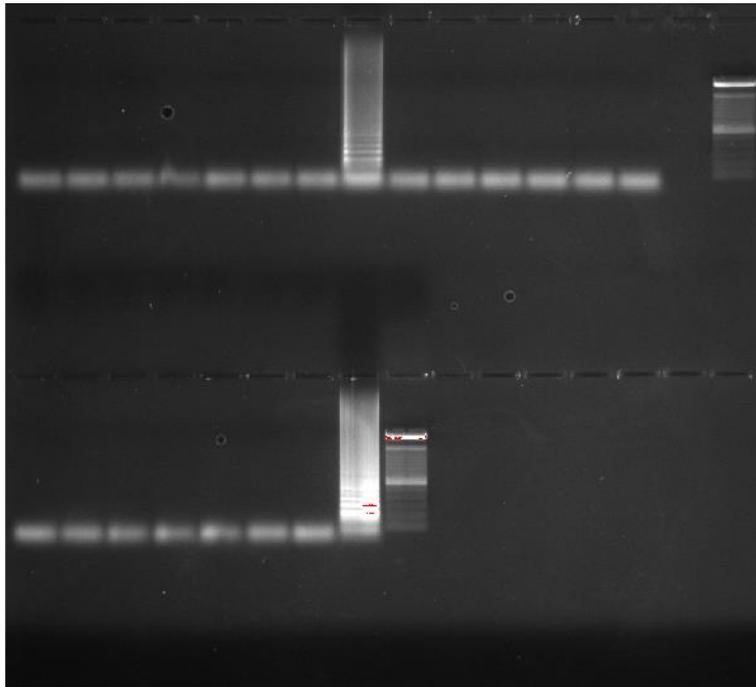


Anexo 20. Lectura del resultado de LAMP de material genético de *S. aureus* mediante electroforesis en gel agar de la muestra 41 – 60

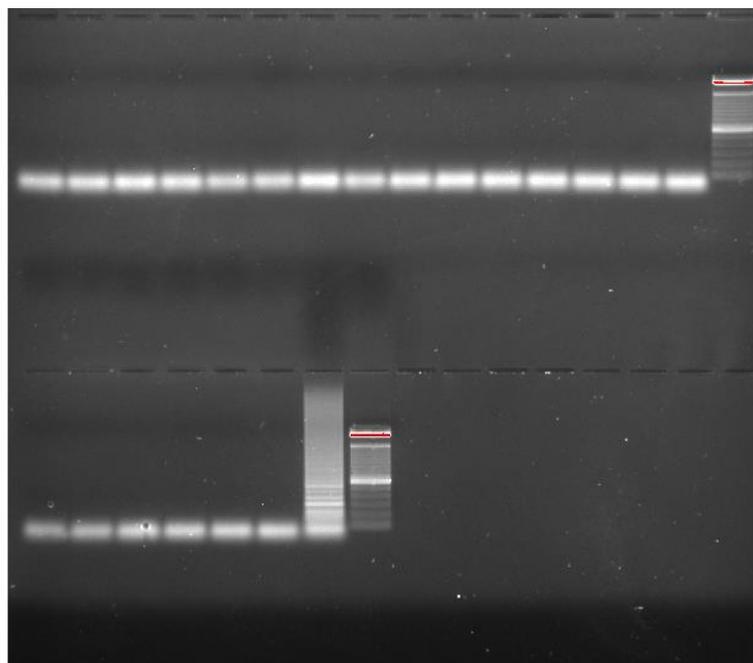




Anexo 21. Lectura del resultado de LAMP de material genético de *S. aureus* mediante electroforesis en gel agar de la muestra 61 – 80

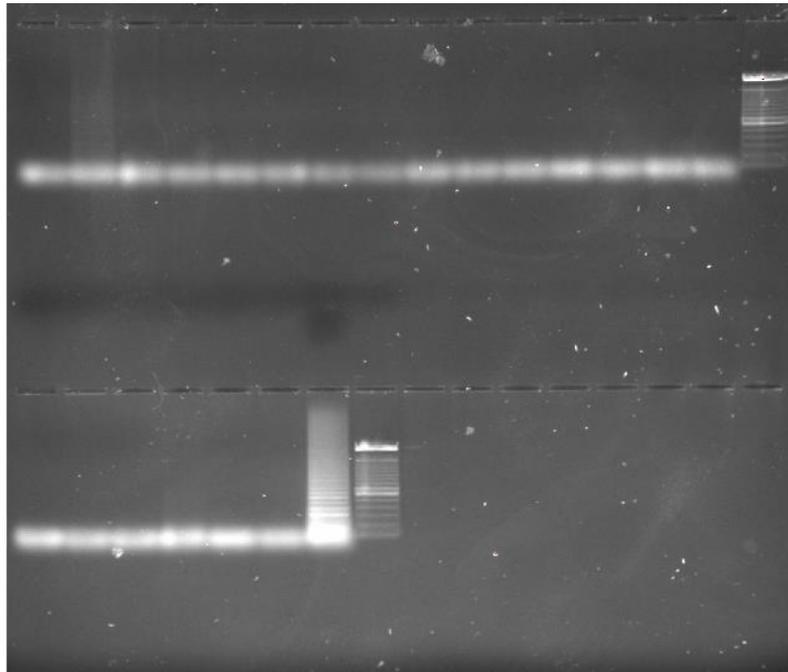


Anexo 22. Lectura del resultado de LAMP de material genético de *S. aureus* mediante electroforesis en gel agar de la muestra 81 – 100

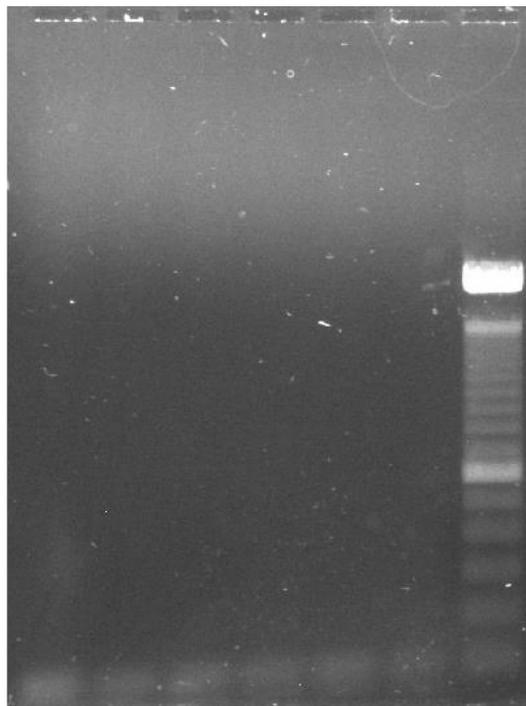




Anexo 23. Lectura del resultado de LAMP de material genético de *S. aureus* mediante electroforesis en gel agar de la muestra 101 – 120

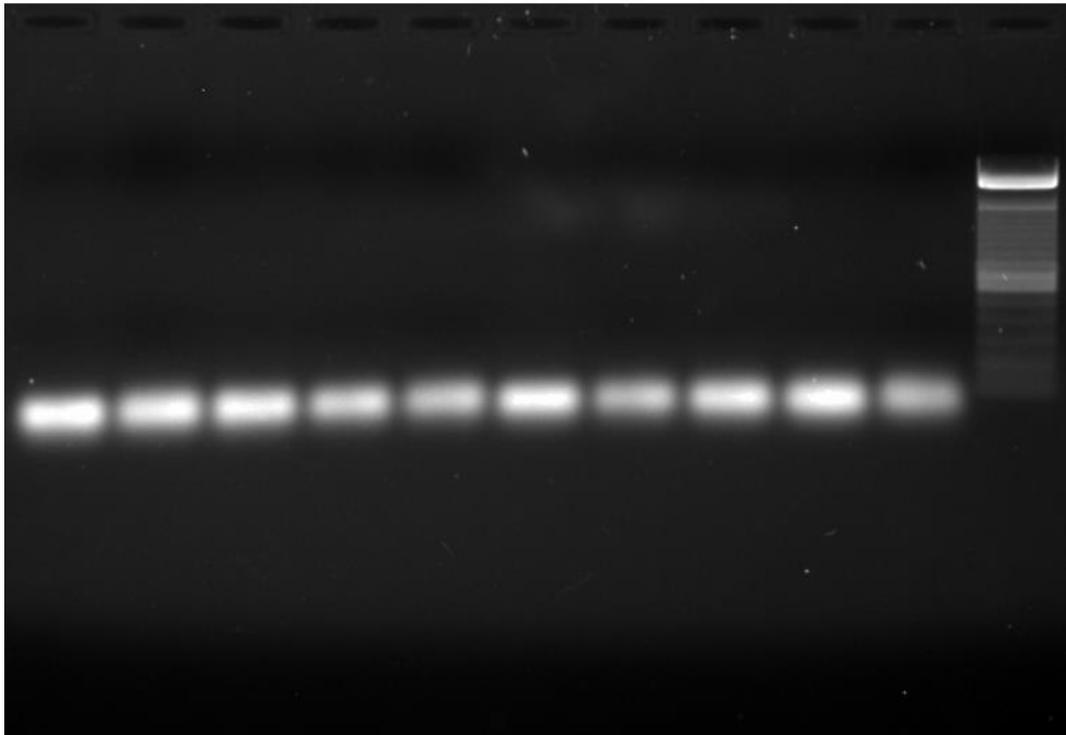


Anexo 24. Lectura de resultado de LAMP de material genético del gen *mecA* mediante electroforesis en gel agar de las muestras positivas a *S. aureus*

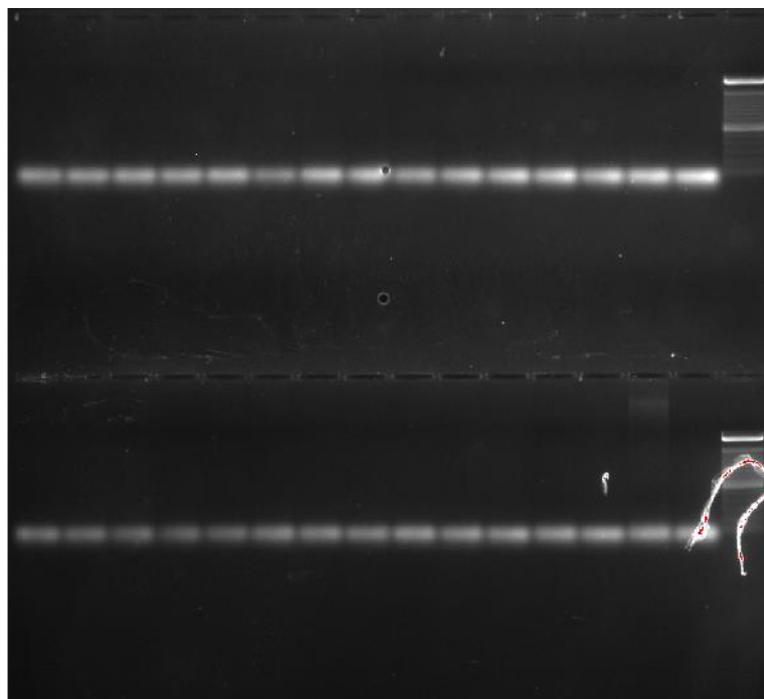




Anexo 25. Lectura de resultados de LAMP de material genético de equinos mediante electroforesis en gel agar muestra 1 - 10



Anexo 26. Resultado de LAMP de material genético de equino mediante electroforesis en gel agar de la muestra 11 – 39





Anexo 27. . Resultados sobre la presencia y ausencia de *S. aureus* mediante la prueba estadística de Mc Nemar

Estadístico	Valor	p
Mc Nemar	52.27	<0.0001
Coef. Conting. Cramer	0.00	
Kappa (Cohen)	0.00	
Coef. Conting. Pearson	0.00	

No significancia (NS) $p > 0,05$

Anexo 28. Análisis estadístico para las diferentes zonas geográfica y el tipo de hisopado de acuerdo a la presencia de *S. aureus*.

Estadístico	Valor	gl	P
Chi Cuadrado Pearson	0.00	1	>0.9999
Chi Cuadrado MV-G2	0.00	1	>0.9999
Coef.Conting.Cramer	0.00		
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0.00		

No significancia (NS) $p > 0,05$

Anexo 29. Resultados de la presencia y ausencia de *S. aureus* resistente a meticilina entre el tipo de hisopado y en las dos zonas geográficas.

Estadístico	Valor	gl	P
Chi Cuadrado Pearson	0.00	1	>0.9999
Chi Cuadrado MV-G2	0.00	1	>0.9999
Coef.Conting.Cramer	0.00		
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0.00		

No significancia (NS) $p > 0,05$



Anexo 30. Distribución de MRSA en las muestras en estudio de las dos zonas geográficas mediante los dos tipos de hisopados

	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Porcentaje
Paute MRSA Positivos	0	0	0,00%
Paute MRSA Negativos	30	0,5	50,00%
Tarqui MRSA Positivos	0	0	0,00%
Paute MRSA Negativos	30	0,5	50,00%
Total	60	1	100,00%

Chi Cuadrado Pearson ($p > 0.9999$)