



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología.

Toxinotipificación y susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN TESIS

Que para obtener el título de Químico Bacteriólogo
Parasitólogo

PRESENTA

Erika Nathaly García Martínez.

Director: Dra. Elsa Irma Quiñones Ramírez

Co director: Dr. Iván Natividad Bonifacio



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Sanitaria, en el departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Elsa Irma Quiñones Ramírez y del Dr. Iván Natividad Bonifacio.

Miembros del jurado.

Presidente

M. en C. Sergio Villalpando Guzmán.

Secretario

QBP. Sonia Gutiérrez Paredes.

1er. Vocal

Dra. Elsa Irma Quiñones Ramírez.

2do. Vocal

Dr. Iván Natividad Bonifacio

3er. Vocal

Dra. Diana Ruth Zamora Pantoja

Agradecimientos.

A mis padres Paula y Abraham:

Por siempre estar conmigo apoyándome en las buenas y en las malas. Por todo el amor que me dieron, estar conmigo y apoyarme en los momentos difíciles. Por haber apoyado la decisión de salir de casa para realizar un sueño que ahora se hace realidad. Por toda la paciencia, la confianza, el tiempo hablando por teléfono para sentirnos un poco más cerca, por ser mi fuerza y mi inspiración para lograr todo lo que me propongo.

A mis hermanos Oscar y Luis:

Por escucharme o leer los mensajes cuando tenía la necesidad de hablar con ellos, por los momentos compartidos en presencia y en la distancia, por animarme a seguir adelante y luchar por alcanzar mis metas. Por las risas y los enojos, por la confianza y todo el amor.

A mi abuelita Sara:

Por recibirme con un abrazo cuando llego a casa, y escuchar mis anécdotas así como compartir sus ideas al respecto. Por el tiempo que compartió conmigo y me demostró todo su cariño.

A mis asesores:

Por todo el apoyo que me brindaron, por la paciencia con la que me enseñaban y guiaban en el trabajo en el laboratorio. Por la comprensión que siempre me mostraron y sobre todo por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su asesoría.

A Gregorio:

Por los momentos compartidos, por los consejos, las risas y las pláticas. Por apoyarme y estar en momentos difíciles.

A Cristhian, Gabriela y Asmir:

Por siempre escucharme cuando más lo necesité, por los momentos de risas, todos los años de amistad, por todo lo que hemos aprendido juntos y por compartir la experiencia de venir a la ciudad siguiendo un sueño.

A mis amigos de generación:

Lili, Rocío, Benjamín, Tanguma y Susan que siempre nos apoyamos dentro del salón de clases, que aún afuera seguimos siendo muy buenos amigos. Por todos

los momentos de cansancio, tristeza, felicidad, risas, hasta peleas. Por formarnos juntos como QBP's.

Al laboratorio de microbiología sanitaria:

A Elizabeth, Marlenne, David, Edgar, Alex, Arturo, Sandra, por todo el apoyo y animo que me dieron durante el trabajo, por todas las risas y largas pláticas que hacían la espera más amena. A la señora Lulu por todas las pláticas que tuvimos, por las experiencias compartidas, a Marcos, Paty, Diana, Profesor Raúl, por siempre animarme a seguir con entusiasmo el trabajo y a todos los chicos tesisistas: Karla, Luis, Daniel, Laura, Zurita, Berenice, Betzabé, Paty, Reyna, Jessel, Diana que compartimos muchos momentos dentro del laboratorio de microbiología sanitaria.

Índice general.

Índice general.	vi
Índice de figuras.	viii
Índice de cuadros.	ix
Índice de anexos.	ix
Resumen.	x
1. Introducción.	- 1 -
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.	- 1 -
1.2. Características del género <i>Staphylococcus aureus</i>.	- 2 -
1.3. Reservorio y hábitat.	- 2 -
1.4. Alimentos implicados.	- 3 -
1.5. Patología.	- 3 -
1.5.1. Intoxicación alimentaria.	- 4 -
1.6. Factores de virulencia.	- 5 -
1.6.1. Enzimas.	- 6 -
1.6.2. Toxinas.	- 6 -
1.7. Susceptibilidad antimicrobiana.	- 10 -
2. Justificación.	- 12 -
3. Hipótesis.	- 13 -
4. Objetivos.	- 14 -
4.1. Objetivo general.	- 14 -
4.2. Objetivos particulares.	- 14 -
5. Material y métodos.	- 16 -
5.1. Recuperación, verificación de pureza y conservación de las cepas.	- 16 -
5.2. Extracción de ADN con el kit de purificación de ADN genómico Wizard®.	- 16 -
5.3. Identificación de <i>S. aureus</i> mediante la amplificación del gen <i>nuc</i>.	- 17 -
5.4. Enterotoxina.	- 18 -
5.4.1. Diseño de iniciadores.	- 18 -
5.4.2. Amplificación del gen <i>seA</i>.	- 18 -

5.5. Determinación de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Difusión en placa (CLSI, 2015).....	- 19 -
6. Resultados.....	- 20 -
6.1. Identificación de <i>S. aureus</i> mediante la amplificación del gen <i>nuc</i>	- 20 -
6.2. Enterotoxina	- 21 -
6.2.1. Amplificación del gen <i>seA</i>	- 21 -
6.3. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas.....	- 22 -
7. Discusión.	- 25 -
7.1. Gen <i>nuc</i>	- 25 -
7.2. Enterotoxina. Gen <i>seA</i>	- 25 -
7.3. Susceptibilidad antimicrobiana.	- 27 -
8. Conclusiones.	- 30 -
9. Bibliografía.....	- 31 -

Índice de figuras.

Figura 1. Esquema general de trabajo	15
Figura 2. Electroforesis de los productos de PCR del gen <i>nuc</i> en las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Figura 3. Electroforesis de los productos de PCR del gen <i>seA</i> de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figura 4. Susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión de placa de una cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 5. Resistencia a los antibióticos probados de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de quesos.....	24

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	5
Cuadro 2. <i>Staphylococcus aureus</i> : toxina y efecto biológico.....	6
Cuadro 3. Propiedades generales de las SE y la localización genómica de los genes que codifican para éstas.....	8
Cuadro 4. Resultados obtenidos en los ensayos genotípicos en las 50 cepas de <i>S. aureus</i> analizadas.....	22

Índice de anexos.

Anexo 1. Resultados obtenidos de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de las 50 cepas de <i>S. aureus</i>	38
--	----

Resumen.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se encuentran ampliamente extendidas y constituyen un problema prioritario de salud pública, tanto en países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo. El agente etiológico más frecuente de las intoxicaciones de origen alimentario es *S. aureus*. Esta bacteria produce toxinas estafilocócicas que presentan termorresistencia lo cual explica que no se destruyen fácilmente.

Los alimentos que se han encontrado frecuentemente involucrados con la intoxicación estafilocócica incluyen carne y productos cárnicos, aves y productos de huevo, leche y productos lácteos, ensaladas, productos de panadería, particularmente rellenos de crema, pasteles y sándwiches. En este trabajo se tuvo como objetivo detectar en 50 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de queso algunos de los factores de virulencia mediante la amplificación del gen *nuc* que codifica para una termonucleasa y el gen *seA* que codifica para la enterotoxina A. También, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana por difusión en placa. Para esto, se verificó su pureza y posteriormente se extrajo su material genético con el kit de extracción Wizard con la finalidad de realizar estudios genotípicos, la metodología empleada para llevar a cabo la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en *S. aureus* en la descrita en la CLSI 2015 .

Las 50 cepas se identificaron como *S. aureus* mediante la amplificación del gen *nuc* especie- específico. Así mismo en 31(62%) de las 50 cepas se amplificó el gen *seA* para la enterotoxina A. En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana se encontró que el 98% de las cepas presentan una multirresistencia a antibióticos.

1. Introducción.

1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) se encuentran ampliamente extendidas y constituyen un problema prioritario de salud pública, tanto en países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo (Jordá *et al.*, 2012). Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir una cantidad de toxina suficiente para causar una intoxicación. Las manifestaciones de las ETA's son generalmente de tipo gastrointestinal (Juhler *et al.*, 2015).

El agente etiológico que se ha relacionado con mayor frecuencia con las intoxicaciones de origen alimentario es *Staphylococcus aureus* (Jordá *et al.*, 2012) esto debido a sus características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por los alimentos (Zendejas *et al.*, 2014). La presencia de este microorganismo en los alimentos se asocia con la contaminación introducida por los manipuladores de alimentos, el incumplimiento de buenas prácticas de manufactura (contaminación exógena) o el uso de materia prima contaminada (contaminación endógena) (Suárez *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2009).

Se sabe que las cepas de *S. aureus* que suelen contaminar a los alimentos son coagulasa positiva, ya que muy pocas cepas coagulasa negativa son capaces de producir enterotoxinas (intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE)) (Perdomo *et al.*, 2011). Éste microorganismo es capaz de producir una intoxicación debido a la presencia de toxina termorresistente y enzimas proteolíticas (Jordá *et al.*, 2012).

1.2. Características del género *Staphylococcus aureus*.

El nombre de estafilococos fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega *staphyle* (racimo de uvas) para describir las características de crecimiento en grupos semejantes a uvas (Velázquez, 2005).

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*. Son cocos Gram positivos, su diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras, son catalasa y coagulasa positiva, no forman esporas, no son móviles, son aerobios facultativos pero crece mejor en condiciones aerobias y no tienen cápsula. Los estafilococos crecen en medios químicamente definidos, los cuales contienen glucosa, sales, aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico. En medios suplementados crecen bien en intervalos de pH de 4.8-9.4 y a temperatura de 25 a 43°C. Sus colonias miden de 1 a 3 mm producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Sahebnasagh *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2011; Velázquez, 2005; Zendejas *et al.*, 2014).

A la fecha se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies del género *Staphylococcus* los cuales afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio (Fox *et al.*, 2007).

1.3. Reservorio y hábitat.

S. aureus es una causa común de las infecciones adquiridas en la comunidad y adquiridas en hospitales, afecta a todos los grupos de edades, principalmente se encuentra en las fosas nasales así mismo se puede encontrar en heridas quirúrgicas, quemaduras, tracto urogenital, gastrointestinal, abscesos en la piel, osteomielitis, septicemia y casi en cualquier secreción corporal (Anagaw *et al.*, 2013). Diversos estudios indican que la totalidad de la población humana podría ser portador del microorganismo en algún momento de su vida, así el porcentaje de las personas portadoras de *S. aureus* puede abarcar aproximadamente 20-50% de la población, siendo las manos de los manipuladores la principal fuente de contaminación de los alimentos (Muñoz, 2014).

1.4. Alimentos implicados.

Los alimentos que se han encontrado frecuentemente involucrados con la intoxicación estafilocócica incluyen carne y derivados cárnicos, aves y productos de huevo, leche y lácteos, ensaladas, productos de panadería, particularmente rellenos de crema, pasteles y sándwiches. Productos alimenticios salados, tales como jamón, también han sido implicados, debido a la capacidad de *S. aureus* de crecer en actividad de agua de 0.85 (Argudín *et al.*, 2010). No solo la carne de pollo es ideal para la proliferación de *S. aureus* sino también el chorizo, ya que las materias primas con que se elabora, de las que destaca la carne y la tripa, tiene excesiva manipulación por el productor. También es importante considerar la influencia de la temperatura inadecuada a la que se almacenan las materias primas o el producto (Zendejas *et al.*, 2014).

Existen reportes que evidencian la presencia de residuos antimicrobianos en leches destinadas al consumo humano en el país y esto principalmente se debe a que productores incumplen con los lapsos de tiempo en el retiro de los vacunos tratados con antibióticos, esto trae como consecuencia que la microbiota autóctona y otros microorganismos entren en contacto con esta leche, provocando una presión selectiva que favorece la aparición y proliferación de bacterias antibiótico-resistentes. Aunque la pasteurización es el proceso más utilizado para la destrucción de la biota patógena en leche, en algunos casos no es aplicada eficientemente. Esto es más perceptible en la fabricación de quesos artesanales donde este procedimiento en general, no se realiza (Rivera *et al.*, 2010).

1.5. Patología.

S. aureus es un patógeno importante tanto a nivel hospitalario como de la comunidad. En los Estados Unidos, *S. aureus* junto con *Escherichia coli* son los microorganismos que se aislaron con mayor frecuencia en procesos intra-hospitalarios; es la causa más común de neumonía hospitalaria e infección del sitio operatorio y la segunda causa de bacteriemia después de estafilococos coagulasa negativos. En la comunidad, persiste como una causa muy importante

de infección de piel y de tejidos blandos, de infecciones respiratorias y de endocarditis infecciosa (especialmente entre usuarios de drogas inyectadas). En Bogotá, durante el año 2002, *S. aureus* fue el principal microorganismo aislado en infecciones hospitalarias en 25.7% de los casos invasivos (Tibavizco *et al.*, 2007).

1.5.1. Intoxicación alimentaria.

S. aureus es importante no solo porque ocasiona infecciones en diversas partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. Esto debido a que este microorganismo secreta enterotoxinas estafilocócicas que son de las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteica, que presentan termorresistencia, lo cual explica que las toxinas no se destruyen fácilmente. La gravedad de la enfermedad depende de la cantidad de alimento y la cantidad de toxina en el alimento ingerido y la salud general del consumidor (Perdomo *et al.*, 2011). La dosis de enterotoxina para causar una intoxicación por *S. aureus* es de 100 ng (Wu *et al.*, 2016) esta concentración de toxina es alcanzada cuando la población de *Staphylococcus aureus* en el alimento exceden 100,000 UFC/g (URL 1). Después del consumo de la toxina, los síntomas aparecen rápidamente (2-8 horas) debido a que es una toxina preformada y esta intoxicación generalmente desaparece a las 24- 48 horas debido a que es una enfermedad autolimitante. Las manifestaciones clínicas abarcan náuseas, dolor abdominal, emesis, diarrea y postración, en los casos más graves puede presentar cefalea y puede requerir hospitalización, particularmente en infantes, personas de la tercera edad y pacientes inmunocomprometidos (Mghassem *et al.*, 2015; Schelin *et al.*, 2011; Zendejas *et al.*, 2014).

1.6. Factores de virulencia.

S. aureus produce una amplia variedad de exoproteínas que le capacitan para colonizar y causar enfermedades en el hospedero. Casi todas las cepas secretan enzimas que incluyen: cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales como son: la toxina del síndrome de choque tóxico, enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, H, I), toxina exfoliativa (A y B) (Molina *et al.*, 2010).

Los factores de virulencia se han clasificado en tres categorías: 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), proteína A y lipasas; 3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ (Roussel *et al.*, 2015). En el cuadro 1 se resume los principales factores de virulencia descrito en *S aureus*.

Cuadro 1. Principales factores de virulencia de *S. aureus*.

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina α (Hemolisina α)
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina β
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina γ
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina δ
	Nucleasas	Leucocidina de Pantone- Valentine (PVL)
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
	Estafilocinasa	Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

(Bustos *et al.*, 2006).

1.6.1. Enzimas.

S. aureus es capaz de producir componentes superficiales llamados toxinas y producir enzimas extracelulares. En general, estos componentes son capaces de provocar severas intoxicaciones alimentarias dependiendo de la cantidad de alimento ingerida (Argudín *et al.*, 2010).

En *S. aureus* se encuentra la colagenasa la cual le permite convertir el fibrinógeno en fibrina. La hialuronidasa que actúa sobre el cemento intercelular, este se considera un factor de diseminación, la fibrinolisina que también es llamada factor de Müeller o fibrinolisisina, las cepas que producen grandes cantidades de esta enzima pueden aparecer como coagulasa negativas, sobre todo después de largos periodos de incubación (Molina *et al.*, 2010). Otra de sus enzimas importantes es la DNAsa que es una nucleasa termorresistente, presenta propiedades de endo y exonucleasa con la que el ADN y ARN pueden ser degradados. Penicilasas también llamadas betalactamasas que son enzimas que producen la hidrólisis del anillo betalactámico lo cual conduce a la pérdida de la actividad antimicrobiana (Zendejas *et al.*, 2014).

1.6.2. Toxinas.

S. aureus es un microorganismo capaz de producir toxinas las cuales provocaran una intoxicación alimentaria, estas toxinas están divididas de acuerdo con los efectos biológicos que producen en las células (cuadro 2) (Wu *et al.*, 2016).

Cuadro 2. *Staphylococcus aureus*: toxina y efecto biológico.

Toxinas	Efecto biológico
Citotoxinas (α, β, δ y γ leucocidina de PV)	Mecanismo poro-perforador sobre las membranas de leucocitos. Eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos.

Toxina exfoliativa (ETA, ETB)	Proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis.
Enterotoxinas (A-E, G-I)	Super antígenos (estimula la proliferación de células T y la liberación de citocinas): estimula la liberación de mediadores químicos en los mastocitos, aumentando el peristaltismo.
Toxina del síndrome del choque toxico TSST-I	Super antígenos (estimula la proliferación de de células T y la liberación de citocinas): produce extravación o la destrucción de las células endoteliales.

(Zendejas *et al.*, 2014).

Las enterotoxinas estafilocócicas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas solubles en agua, poseen un peso molecular relativamente bajo que oscila entre 26 000 y 30 000 daltons (Jantra *et al.*, 2011). Estas toxinas provienen de cepas específicas; sin embargo, una cepa de *S. aureus* puede sintetizar múltiples serotipos toxigénicos. Las enterotoxinas presentan alta termoestabilidad, requieren al menos 30 min a 100°C para ser destruidas las cuales son condiciones que fácilmente destruyen al microorganismo que las produce (Balaban *et al.*, 2000). Estas enterotoxinas son sintetizadas por *S. aureus* en la fase logarítmica de crecimiento o durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria (Derzelle *et al.*, 2009)

Las enterotoxinas estafilocócicas, forman parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxina pirogénicos (PTSAgs), ya que tienen actividad biológica de pirogenicidad y superantigenicidad. Se conoce una gran variedad de estas toxinas (SE): en secuencia alfabética de SEA a SEE, de SEG a J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO, en el cuadro 3 se resumen las propiedades generales de

estas toxinas. Cuando se consumen alimentos contaminados con *S. aureus* las SE causan gastroenteritis, estimulan el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta por vómitos, los cuales acompañan a la enfermedad gastrointestinal (Johler *et al*, 2016).

Cuadro 3. Propiedades generales de las SE y la localización genómica de los genes que codifican para éstas. Nd, no determinado; ^aActividad emética demostrada en conejos pero no en primates; ^bLocalización hipotética en un profago.

Toxina.	Peso molecular (kDa)	Actividad emética.	Gene.	Elemento genético accesorio.
SEA	27.1	Sí	<i>seA</i>	ϕ Sa3ms, ϕ Sa3mw, ϕ 252B, ϕ NM3, ϕ Mu50a
SEB	28.4	Sí	<i>seB</i>	pZA10, SaPI3
SEC	27.5-27.6	Sí	<i>seC</i>	SaPI _n 1, SaPI _m 1, SaPI _m w2, SaPI _{bov} 1
SED	26.9	Sí	<i>seD</i>	pIB485-like
SEE	26.4	Sí	<i>seE</i>	ϕ Sa ^b
SEG	27.0	Sí	<i>seG</i>	<i>egc1</i> (vSa β I); <i>egc2</i> (vSa β III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i>
SEH	25.1	Sí	<i>seH</i>	MGE _m w2/mssa476 <i>seh</i> / Δ <i>seo</i>
SEI	24.9	Sí	<i>seI</i>	<i>egc1</i> (vSa β I); <i>egc2</i> (vSa β III); <i>egc3</i>
SEJ	28.5	No	<i>seJ</i>	pIB485-like; pF5
SEK	26	Sí	<i>seK</i>	ϕ Sa3ms, ϕ Sa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPI _{bov} 1, SaPI5
SEL	26	No	<i>seL</i>	SaPI _n 1, SaPI _m 1, SaPI _m w2, SaPI _{bov} 1
SEM	24.8	No	<i>seM</i>	<i>egc1</i> (vSa β I); <i>egc2</i> (vSa β III)
SEO	26.7	No	<i>seO</i>	<i>egc1</i> (vSa β I); <i>egc2</i> (vSa β III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i> ; MGE _m w2/mssa476 <i>seh</i> / Δ <i>seo</i>
SEP	27.0	No	<i>seP</i>	ϕ N315, ϕ Mu3A

(Argudín *et al.*, 2010)

Con respecto a la prevalencia, una de las toxinas que se encuentra frecuentemente implicada en los brotes de intoxicación alimentaria es la enterotoxina A, por ser extremadamente potente comparada con la toxina botulínica y con una cantidad tan pequeña como lo es 20- 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación, esto es porque existe la enorme susceptibilidad de las plaquetas y monocitos de los seres humanos a dicha toxina (Wu *et al.*, 2016; Bhatia *et al.*, 2007).

Las enterotoxinas A y D son las más frecuentemente asociadas con las intoxicaciones alimentarias, y el tipo B se detecta con mayor regularidad en infecciones intrahospitalarias (Johler *et al.*, 2016).

Otra de las toxinas que acarrea múltiples complicaciones médicas, inclusive hasta la muerte, es la toxina asociada al síndrome del choque tóxico (TSST-I) antes conocida como exotoxina pirogénica. Este síndrome se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada (Zendejas *et al.*, 2014) que es debido a que suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema retículo endotelial. La toxina actúa como superantígeno estimulando la liberación de varias citocinas, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales producen los signos y síntomas del síndrome (Bustos *et al.*, 2006).

La leucocidina es una proteína que forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula. La lisis de los leucocitos produce la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave (Dinges *et al.*, 2000). La toxina α o hemolisina α , es considerada como el prototipo de las citotoxinas formadoras de poros, es citolítica para un gran número de células, entre las que se encuentran los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales (Montallebi *et al.*, 2016). La hemolisina β tiene actividad de fosfolipasa c, la cual es específica para la esfingomielina y liso-fosfatidilcolina. La hemolisina β afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos

de mamíferos. La hemolisina δ es capaz de causar daño en la membrana de un gran número de células de mamíferos (Bustos *et al*, 2006).

1.7. Susceptibilidad antimicrobiana.

La adquisición de material genético por las bacterias susceptibles a antimicrobianos de bacterias con resistencia ocurre a través de conjugación, transformación o transducción con transposones que a menudo facilitan la incorporación de genes de resistencia múltiple al genoma o plásmido (Becerra *et al*, 2009). En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio intervalo de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes (Bustos *et al*, 2006). En la era previa a los antibióticos, la mortalidad de pacientes era del 80% al 70% y para la década de 1940, con la llegada de la penicilina, el pronóstico de los pacientes con infecciones estafilocócicas era muy alentador. Sin embargo, ya desde 1942 se identificaron cepas resistentes; primero en hospitales y después en la comunidad (Rammelkamp *et al*, 2000). Para la década de 1960, más del 80% de los estafilococos aislados eran resistentes a la penicilina. La resistencia a la penicilina está mediada por el gen *blaZ*, cuyo producto es la β -lactamasa, que hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina y lo inactiva. Así surge la meticilina, la primera penicilina semisintética resistente a la β -lactamasa, pero rápidamente se reportaron cepas resistentes a la meticilina (Becerra *et al*, 2009).

Los estafilococos son resistentes a la meticilina por diferentes mecanismos como por ejemplo producción exagerada de β -lactamas, por la presencia de una nueva proteína en la pared celular denominada PBP2a. La presencia de PBP2a está codificada por el gen *mecA*, este gen codifica para la formación de la proteína lo que le confiere una baja afinidad por la meticilina y oxacilina y por lo tanto estas cepas son resistentes al tratamiento con estos agentes antimicrobianos (Palavencino *et al*, 2002). Con la llegada de la vancomicina las cepas resistentes a meticilina se trataban con éxito pero con el tiempo aparecieron cepas resistentes. Para 1997 se reportaron cepas con una resistencia intermedia y para el 2002 cepas con resistencia completa a la vancomicina (Becerra *et al*, 2009).

Existen otros factores que dan resistencia a los antibióticos como por ejemplo la prescripción indiscriminada de drogas, la automedicación de pacientes, el uso masivo de antibióticos como aditivos a alimentos para animales. Por ello, en países Europeos se considera ilegal la presencia de residuos antimicrobianos en la leche destinada al consumo humano y penaliza con multas a quienes incurren en ello (Rivera *et al*, 2011).

2. Justificación.

S. aureus es el agente etiológico asociado con mayor frecuencia en las intoxicaciones alimentarias debido a la producción de enterotoxinas de las cuales se han descrito más de 18, siendo la enterotoxina A la que se reporta con mayor frecuencia en casos de intoxicación alimentaria. En la actualidad la resistencia de este microorganismo a antimicrobianos se ha incrementado, por lo que es posible encontrar cepas multiresistentes. En México actualmente no existen reportes que demuestren estas características en este microorganismo por lo que el presente trabajo pretende aportar información sobre la susceptibilidad antimicrobiana y toxinotipificación de cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes tipos de quesos, productos que cotidianamente pueden ser consumidos por la población.

3. Hipótesis.

Si las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos presentan el gen que codifican para la enterotoxina A y además multiresistencia a antibióticos entonces éstas representan un riesgo para el consumidor de éste producto lácteo.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Hacer la toxinotipificación y la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos.

4.2. Objetivos particulares

- Recuperar las cepas de *S. aureus* aisladas de quesos y extraer el ADN de las mismas.
- Detección del gen *nuc* en las cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Detección del gen *seA* en las cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en placa.

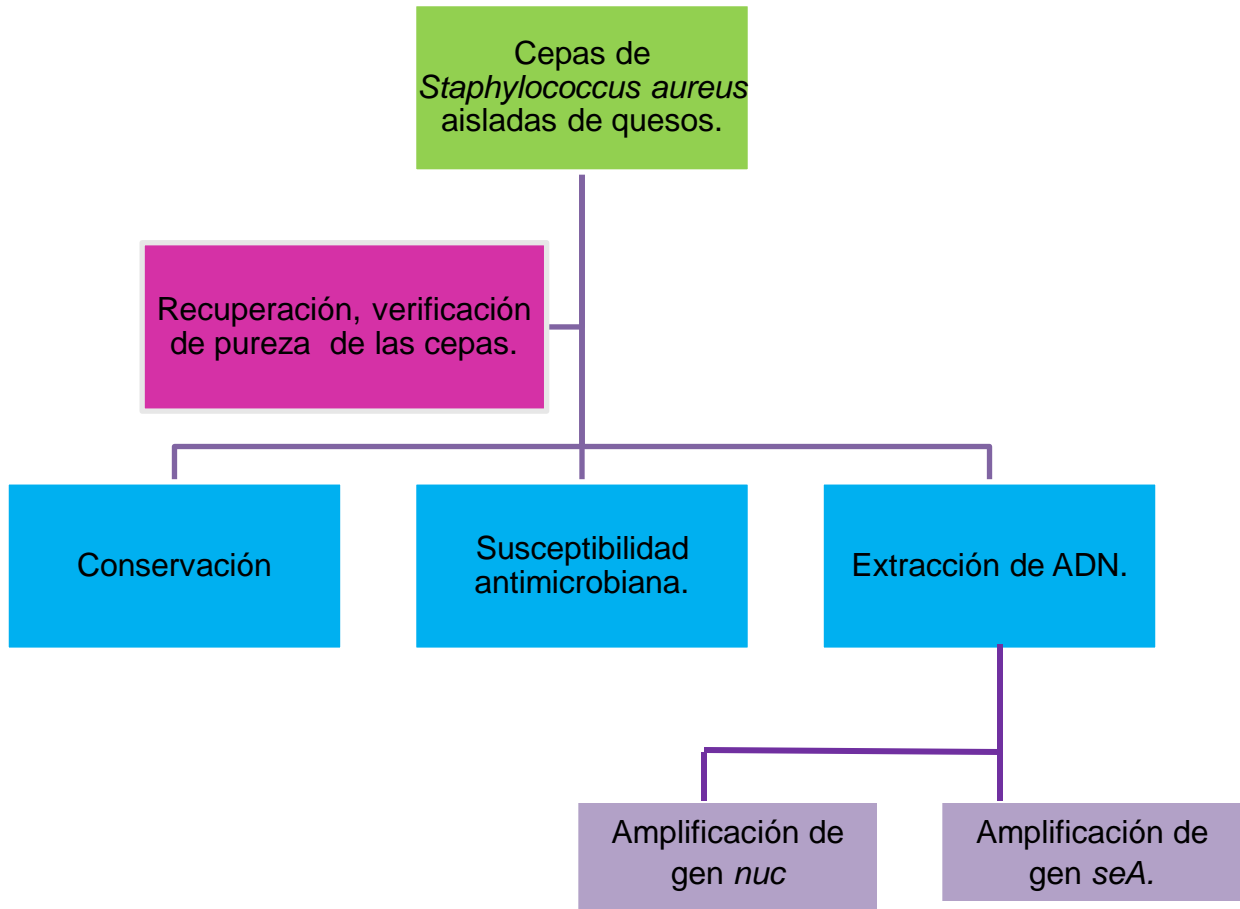


Figura 1. Esquema general de trabajo.

5. Material y métodos.

A partir de una colección de cepas de *S. aureus* provenientes de quesos artesanales (queso Oaxaca, doble crema, rayado, panela), se recuperaron 50 cepas, de las cuales se evaluó su pureza y la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en placa descrita por la CLSI 2015.

5.1. Recuperación, verificación de pureza y conservación de las cepas.

Se descongelaron las cepas de *S. aureus* previamente aisladas e identificadas a partir de quesos. Se verificó su pureza al ser sembrado en agar sal y manitol.

Se seleccionaron colonias aisladas con halos de color amarillo originado por la fermentación del manitol que contiene el medio, se realizó tinción de Gram para verificar su pureza.

Se sembró la colonia que cumplió con los criterios de selección en caldo BHI y se incubó por 24 h a 37°C. Posterior a esto se sembró en agar BHI por estría cerrada y se incubó por 24 h a 37°C. Se adicionó 1 mL de caldo BHI con glicerol al 20%, se lavó hasta obtener todo el cultivo. Se pasó la suspensión a un tubo tipo Eppendorf y se congeló a -70°C.

5.2. Extracción de ADN con el kit de purificación de ADN genómico Wizard®

A partir de un cultivo de 24 horas de *S. aureus* en caldo BHI se transfirió 1.5 mL del cultivo a un tubo tipo Eppendorf. Se centrifugó a 13,000-16,000 × g durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió con 100µL de lisozima (10mg/mL).

Se incubó a 37 ° C durante 40 minutos. Se centrifugó durante 2 min a 13,000-16,000 × g y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 600µL de la solución de lisis.

Se incubó a 80 ° C durante 5 min; se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 1.5µL de la solución de RNasa.

Se incubó a 37 ° C durante 40 minutos. Se enfrió la muestra a temperatura ambiente. Se agregó 200µL de la Solución de precipitación de proteínas. Se mezcló en Vortex y se incubó la muestra en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 13,000-16,000 × g durante 3 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL limpio que contenía 600µL de isopropanol. Se centrifugó a 13,000-16,000 × g durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y se añadió 600µL de etanol al 70%. Se centrifugó a 13,000-16,000 × g durante 2 min. Se decantó el tubo para retirar el etanol.

El precipitado se secó al aire durante 20 minutos. Se añadió 50 µL de solución de rehidratación de ADN y se permitió la hidratación a 4°C toda la noche. Se guardó el ADN a -20° C (URL 2)

5.3. Identificación de *S. aureus* mediante la amplificación del gen *nuc*.

La identificación se realizó mediante PCR empleando los siguientes iniciadores forward, 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'; reverse, 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC -3' (Louie *et al.*, 2002).

La mezcla de reacción contenía 2 µL de la solución que contenía el ADN (aprox 100ng), 2 µL de cada uno de los iniciadores (10µM), 12.5 µL de Master mix 2X y 6.5 µL de agua. Las amplificaciones se hicieron en un termociclador Major science utilizando las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos seguido de 25 ciclos de amplificación (un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 15 seg, alineamiento a 55°C durante 30 seg y la extensión a 72°C durante 30 seg), y un ciclo de extensión final de 72°C durante 10 min. El control positivo empleado fue la cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

Posteriormente, se preparó el gel de agarosa al 1.5% (p/v). Se mezclaron 5 µL de los amplicones obtenidos con 2.5 µL de regulador de carga. Para la electroforesis se utilizó el regulador Tris-Ácido acético glacial-EDTA (TAE), aplicando un voltaje de 60 V por 40 min. Posterior al tiempo del corrimiento electroforético se reveló el gel en un transiluminador (Strommenger *et a.*, 2003).

5.4. Enterotoxina.

5.4.1. Diseño de iniciadores.

Las secuencias del gen *seA* que codifica para la toxina *A* de *S. aureus* se descargaron en formato FASTA de la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) y mediante el programa Clustal® versión 0(1.2.1) se seleccionó la secuencia Forward y Reverse para el diseño “in silico” de los iniciadores. La especificidad de los iniciadores diseñados se comprobó con la plataforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en la página de la NCBI. Este procedimiento se realizó con el Forward y el Reverse. El programa bioinformático en línea IDT (Integrated DNA Technologies) versión 3.1 se empleó para evaluar las características fisicoquímicas de las secuencias Forward y Reverse como el porcentaje de G y C, la temperatura de fusión (T_m) y peso molecular (MW).

5.4.2. Amplificación del gen *seA*.

La identificación se realizó mediante PCR empleando los siguientes iniciadores forward, 5'- GGT AGC GAG AAA AGC GAA G -3'; reverse, 5'- CGT CTT GCT TGA AGA TCC A -3'.

La mezcla de reacción contenía 2 µL de la solución que contenía el DNA (aprox. 100ng), 2 µL de cada uno de los iniciadores (10µM), 12.5 µL de Master mix 2X y 6.5 µL de agua. Las amplificaciones se hicieron en un termociclador Major science utilizando las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de amplificación (un ciclo de desnaturalización

a 94°C durante 30 seg, alineamiento a 55°C durante 45 seg y la extensión a 72°C durante 45 seg), y un ciclo de extensión final de 72°C durante 10 min. El control positivo empleado fue la cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

Posteriormente, se preparó el gel de agarosa al 1.5% (p/v). Se mezclaron 5 µL de los amplicones obtenidos con 2.5 µL de regulador de carga. Para la electroforesis se utilizó el regulador Tris-Ácido acético glacial-EDTA (TAE), aplicando un voltaje de 60 V por 40 min. Posterior al tiempo del corrimiento electroforético se reveló el gel en un transiluminador (Strommenger *et a.*, 2003).

5.5. Determinación de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Difusión en placa (CLSI, 2015)

De la placa con agar sal y manitol previamente obtenida se seleccionó una colonia la cual se sembró en caldo BHI se incubó a 37°C por 24 horas. Se tomó una alícuota del cultivo y se pasó a caldo BHI hasta obtener una suspensión equivalente a un estándar de 0.5 McFarland. Se sembró con hisopo estéril por estría cerrada una placa con agar Muller-Hinton por cepa.

Se colocó en antibiograma con los antibióticos ceftazidima (30µg), Eritromicina (15µg), Ampicilina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Trimetoprim-sulfametoxazol (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Gentamicina (10 µg), Cefuroxima (30 µg), Dicloxacilina (1 µg) y penicilina (10U) en la placa ya inoculada. Se incubó a 37°C por 24 horas.

Posterior a esto se mide el diámetro del halo y se clasifica en resistentes y sensibles de acuerdo a los criterios que establece la CLSI 2015.

6. Resultados.

6.1. Identificación de *S. aureus* mediante la amplificación del gen *nuc*.

A partir del ADN genómico de las 50 cepas de *S. aureus*, se procedió a hacer la amplificación del gen *nuc*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en esta especie es decir, es especie-específico; por lo cual se utiliza como blanco para su identificación (Karmakar *et al.*, 2016) encontrando que en un 100% de las cepas se amplificó el gen *nuc* (figura 2).



Figura 2. Electroforesis de los productos de PCR del gen *nuc* en las cepas de *S. aureus*. Carril 1: marcador de 100 pb. Carril 2: Control positivo (DNA de *S. aureus* ATCC 29213). Carriles 3-16: cepas problema.

6.2. Enterotoxina

6.2.1. Amplificación del gen *seA*.

El gen *seA* que codifica para la enterotoxina *A* se amplificó en el 62% (31/50) de las cepas de *S. aureus*. En la figura 3 se observa la presencia del fragmento de 470 pb el cual corresponde al amplicón esperado.

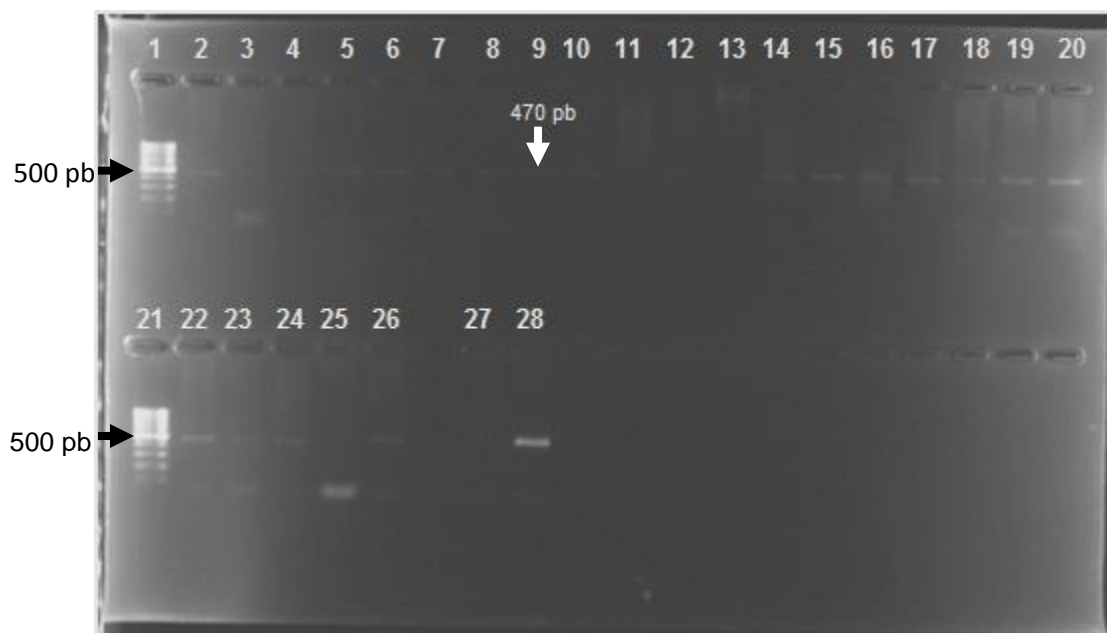


Figura 3. Electroforesis de los productos de PCR del gen *seA* en las cepas de *S. aureus*. Carril 1y 21: marcador de 100 pb. Carril 28: Control positivo (DNA de *S. aureus* ATCC 29213). Carriles 2-20 y 22-27: cepas problema.

Cuadro 4. Resultados obtenidos en los ensayos genotípicos en las 50 cepas de *S. aureus* analizadas.

cepa	Gen <i>nuc</i>	Gen <i>seA</i>	cepa	Gen <i>nuc</i>	Gen <i>seA</i>
2	+	+	68	+	+
3	+	-	69	+	-
4	+	+	70	+	-
5	+	+	71S	+	-
6	+	+	71F	+	-
7	+	+	72	+	+
8	+	+	73	+	+
9	+	+	74	+	-
10	+	+	75	+	+
18	+	-	77F	+	+
19	+	+	78	+	-
30	+	-	80	+	-
32	+	+	81	+	-
34	+	+	82F	+	-
36	+	+	83	+	+
37	+	+	84	+	-
38	+	+	85	+	-
40	+	+	86F	+	+
46	+	+	88F	+	-
47	+	+	89F	+	-
48	+	+	90F	+	+
63F	+	+	97F	+	+
64	+	-	101F	+	-
65	+	+	102F	+	+
66	+	-	ATCC 29213	+	+
67F	+	+			

6.3. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas.

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en placa (figura 4), se tuvo que el 100% de las cepas mostró resistencia para los antibióticos penicilina, dicloxacilina y ceftazidima, para ampicilina un 98% de

resistencia, un 34% de resistencia para cefuroxima, un 20% de resistencia para cefotaxima, un 16%, 14% y 14% para tetraciclina, eritromicina y gentamicina respectivamente y un 8% de resistencia para trimetoprim-sulfametoxazol (figura 5). En el anexo 1 se encuentran los resultados de halo de inhibición que se obtuvieron en el estudio con las cepas de *S. aureus*)

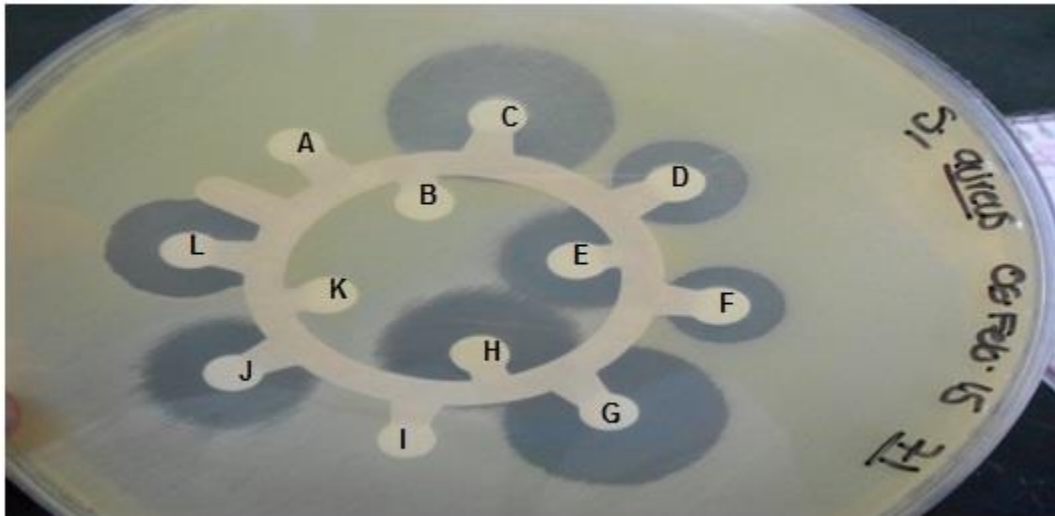


Figura 4. Susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en placa de una cepa de *Staphylococcus aureus*. A, penicila; B, dicloxacilina; C, pefloxacino; D, cefuroxima; E, gentamicina; F, cefotaxima; G, trimetoprim-sulfametoxazol; H, tetraciclina; I, ampicilina; J, Eritromicina; K, ceftazidima; L, cefalotina.

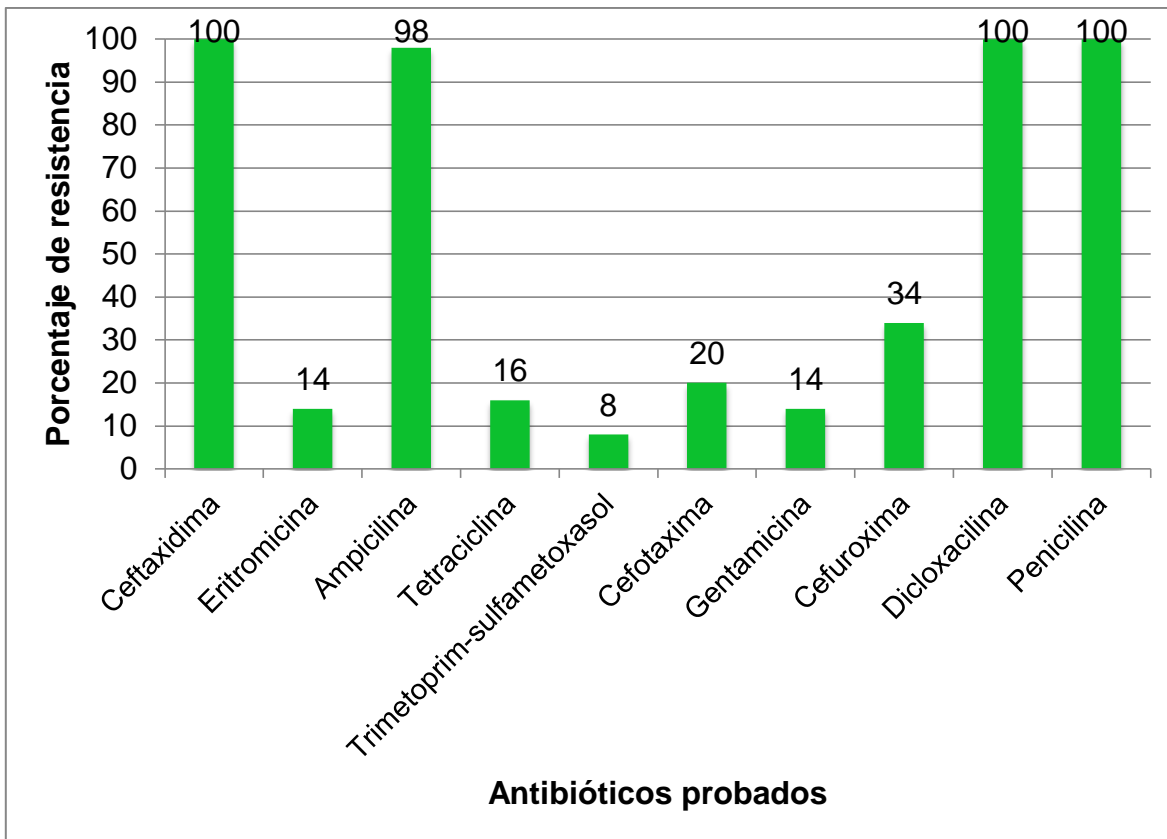


Figura 5. Resistencia a los antibióticos probados de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos.

7. Discusión.

7.1. Gen *nuc*.

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena, de amplia distribución en la naturaleza, asociada con infección general y brotes alimentarios, los cuadros de origen alimentario son muy frecuentes. Esta bacteria es capaz de producir gran cantidad de toxinas extracelulares y factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad (Suárez *et al.*, 2008)

El gen *nuc* de *S. aureus* codifica para una nucleasa termoestable que tiene propiedades endo y exonucleolíticas que es capaz de degradar DNA y RNA hasta nucleotidos, ésta actividad enzimática puede resistir 100°C por alrededor de una hora (Karmakar *et al.*, 2016; Louie *et al.*, 2000; Sahebnaasagh *et al.*, 2014).

De las 50 cepas analizadas, en el 100% se detectó este gen, por lo cual se corrobora que las cepas de trabajo son *S. aureus* ya que el gen *nuc* tiene secuencias especies-específicas (Karmakar *et al.*, 2016)

7.2. Enterotoxina. Gen *seA*.

Dentro de los factores de virulencia de *S. aureus* se encuentra las enterotoxinas, de las cuales se han descrito principalmente cinco de ellas. La enterotoxina A está codificada en el gen *seA* y causa en el ser humano gastroenteritis, estimula el peristaltismo intestinal y ejerce un efecto en el sistema nervioso central lo cual se manifiesta en vómito (Bustos *et al.*, 2006). En este estudio se detectó en el 62% de las cepas de trabajo este gen, lo que nos indica que la mayoría de las cepas son productoras de la toxina, en estudios anteriores se ha obtenido que la enterotoxina A es la que se encuentra con mayor frecuencia (Argudín *et al.*, 2010) como por ejemplo, en un estudio hecho en Francia a 33 cepas aisladas de alimentos como quesos y pollo, fue detectado el gen *seA* en un 69.7% en el año 2002 (Kérouanton *et al.*, 2007). En Austria los brotes de intoxicaciones alimentarias afectaron a 40 niños en 2007 y se identificó principalmente el gen *seA* en leche de sabor que consumían los infantes (Schmid *et al.*, 2007). En Brasil

también se reportó un alto porcentaje de presencia de la enterotoxina en productos lácteos de donde se aislaron e identificaron 30 cepas de *S. aureus* de las cuales 21 (38%) amplificó el gen *seA* (Veras *et al.*, 2008). En Korea se analizaron alimentos lácteos que estuvieron involucrados en intoxicaciones alimentarias teniendo 318 aislamientos de *S. aureus* de las cuales en 303 (95%) el gen *seA* se amplificó (Cha *et al.*, 2006). Esto concuerda con los datos obtenidos en este trabajo ya que se encontró un alto porcentaje de presencia del gen *seA*, esto es por arriba del 50% lo que nos muestra que esta enterotoxina es la mayormente relacionada con los brotes de intoxicación alimentaria.

En Europa, la European Food Safety authority (EFSA) en el año 2009 reportó un total de 5550 brotes de intoxicación, afectado alrededor de 44 000 personas y causando 46 muertes. De esto 293 brotes fueron causados por toxinas de *S. aureus* y el alimento que fue el vehículo de éste microorganismo fue el queso. (Schelin *et al.*, 2011).

La prevalencia de esta intoxicación puede ser debida a que en la actualidad la demanda de alimentos que estén listos para el consumo ha incrementado, por lo que la industria alimenticia ha desarrollado nuevas técnicas de procesamiento y almacenamiento de alimentos como por ejemplo, comida semipreparada, alimentos refrigerados lo que ofrece un ambiente adecuado para el desarrollo del microorganismo. Es importante tomar en cuenta que las enterotoxinas son sintetizadas por *S. aureus* en la fase logarítmica de la multiplicación de la bacteria (Argudín *et al.*, 2010) lo que nos sugiere que el microorganismo necesita un ambiente propicio para su multiplicación y consigo la producción de la toxina.

Es bien sabido que la principal fuente de contaminación de alimentos por *S. aureus* son los manipuladores de éstos, ya que llevan al microorganismo como microbiota en la piel y mucosas (Argudín *et al.*, 2010) es importante que se pueda evitar los brotes de intoxicaciones por este microorganismo dando instrucciones precisas a todas estas personas que están encargadas de la elaboración, almacenamiento y transporte de alimentos de cómo cumplir con sus funciones evitando en lo mayor posible el riesgo de contaminación.

7.3. Susceptibilidad antimicrobiana.

El surgimiento de cepas de *S. aureus* multirresistentes representa una respuesta secuencial a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana (Velázquez, 2005).

En la actualidad en muchos países el tratamiento contra *S. aureus* se basa principalmente en la administración de oxacilina (500mg), penicilina (1,000,000 U) y algunos otros antibióticos β -lactámicos como la ampicilina, ceftaxidima, cefotaxima, cefuroxima (Wilson *et al.*, 2007). Sin embargo, muchas de las cepas de este microorganismo son resistentes a estos antibióticos debido a la producción de la enzimas β -lactamasa (Jamali *et al.*, 2015) se reportan cepas con una resistencia a la penicilina del 80% - 93%. (Bustos *et a.*, 2006)

En este trabajo los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en algunos otros estudios en donde trabajaron con 2650 muestras de leche cruda de vaca obteniendo 328 aislamientos de *S. aureus* las cuales más del 50% indicaron una multirresistencia (Jamali *et al.*, 2015). En el trabajo realizado por Rivera *et al.*, 2011 se trabajó con 25 cepas provenientes de quesos en donde encontraron que se tenía una resistencia total a penicilina, oxacilina, tetraciclina, eritromicina y amikacina. En este estudio se puede ver que la ceftaxidima y la ampicilina presentan una resistencia del 100% y 98% respectivamente, lo cual nos sugiere que los antimicrobianos ya no son efectivos contra las infecciones que puede provocar el microorganismo.

El alto nivel de resistencia de *S. aureus* también ha sido reportado para tetraciclina, meticilina, kanamicina, gentamicina y estreptomina, indicando un alto potencial de desarrollo a la resistencia a agentes antimicrobianos (Jamali *et al.*, 2015). Esto también se observó en los resultados obtenidos ya que se presentó un 100% de resistencia a la dicloxacilina siendo este antibiótico de la familia de las tetraciclinas, en cambio se observó una resistencia del 14% en gentamicina, la diferencia del porcentaje de resistencias a los antimicrobianos puede deberse a

varias razones, uno de las principales es que los microorganismos suelen tener diferentes mecanismos de resistencia, (Matsuoka *et al.*, 2002)

En el caso de los aminoglucosidos *S. aureus* tiene un gen que codifica para una enzima bifuncional que confiere la resistencia a antibióticos como a gentamicina, para los macrólidos el microorganismo es capaz de metilar una adenina en la posición 2058 de 23S rRNA y para las tetraciclinas se modifica los ribosomas del microorganismo (Strommenger *et al.*, 2003).

Otro motivo puede ser que desde 1960, se ha reportado la pérdida espontánea de genes que confieren resistencia, como por ejemplo, se ha estudiado la pérdida del gen *mecA* en cepas de *S. aureus* que se han observado durante su almacenamiento en cultivos por largos tiempos de incubación a temperaturas favorables en medios libres de antibióticos (Katayama *et al.*, 2000), esto nos puede ayudar a visualizar un poco más el por qué antibióticos de la misma familia suelen tener diferencias en cuanto a la resistencia en una misma cepa.

En este estudio se observó claramente que existen cepas que son resistentes a uno o dos antibióticos pero también se observan cepas que son resistentes a más de dos antibióticos y los cuales son llamadas “multidrogoresistentes”, es bien sabido que *S. aureus* puede tener un amplio intervalo de resistencia a antibióticos debido a la transferencia horizontal de genes que son transportados por elementos génicos móviles como lo son plásmidos, transposones y secuencias de inserción (Bustos *et al.*, 2006) esto genera que las cepas puedan adquirir material genético para resistencia a antibióticos que anteriormente no tenían.

Hoy en día es de gran importancia encontrar el porqué de la multirresistencia de este microorganismo a los antibióticos para poder reducir este suceso. Es bien sabido que esto puede estar asociado a la facilidad de compra de antibióticos sin prescripción médica (Miranda, 2011) ya que hasta hace poco se podía comprar antimicrobianos indiscriminadamente. Así mismo es importante considerar que en algunos casos los mismos pacientes suspenden tratamientos médicos ya que tiene una mejoría notable antes de cumplir con el tiempo indicado por el médico,

esto puede provocar que los microorganismos no se eliminen totalmente y adquieran resistencia al antibiótico utilizado.

En este trabajo se reporta que existe un alto porcentaje de resistencia a antibióticos, al mismo tiempo se observa un alto porcentaje de cepas que albergan el gen *seA*, lo cual es bastante importante ya que, en la actualidad no se puede diferenciar una intoxicación alimenticia y una infección al momento que el paciente presenta los síntomas lo cual obliga a dar terapia antimicrobiana y esto a su vez puede provocar que exista una adquisición de resistencia por el microorganismo al tener un uso indiscriminado de estos antibióticos.

Ahora que se tienen bastantes estudios sobre la resistencia antimicrobiana es importante planificar esquemas de antibióticos que garanticen que se elimine el microorganismo que está causando alguna afección al ser humano. En el año 2011 se realizó un estudio que reveló que la conjugación de antibióticos como dicloxacilina+amikacina y la cefalotina+amikacina mostró una gran actividad sinérgica favorable para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *S. aureus* (Miranda *et al.*, 2006) esto nos indica que los esquemas empíricos son necesarios cuando hay multirresistencia que requieren vigilancia y planificación anticipada con opciones, alternativas y criterio de prescripción. En México no hay suficiente información sobre la práctica de prescripción de antibióticos por lo que no se puede establecer estrategias para reducir la resistencia no solo de *S. aureus* sino de muchos otros microorganismos (Miranda, 2011)

8. Conclusiones.

- Todas las cepas que previamente se aislaron de quesos, fueron identificadas genotípicamente como *Staphylococcus aureus* con la amplificación del gen *nuc*.
- El 62% de las cepas de *S. aureus* presentan el gen *seA*, que es un factor de virulencia que ha estado involucrado en las intoxicaciones alimentarias.
- Este estudio confirmó que el 98% de las cepas de *S. aureus* aisladas de quesos muestran una multirresistencia. La importancia de estos datos radica en que se reconoce no solo en el país sino a nivel mundial la incidencia de cepas multirresistentes como causante de un problema de salud pública.

9. Bibliografía.

- Anagaw B, Shiferaw Y, Biadglegne F, Moges F, Kassu A, Unakal C, Mulu A. (2013) Frequency of Methicillin-resistant *S. aureus* isolates from Clinical specimens in Gondar University Hospital, Northwesr Ethiopia. Asian Journal of med Scienc. 5(3): 59-64
- Argudin MA., Mendoza MC., Rodicio MR. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxin. 2: 1751-1773.
- Asao T., Kumeda Y., Kawai t., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. (2003) An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol. Infect. 130: 33-40.
- Balaban, N. Rasooly, A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. Journal Food Microbiol. 61: 1-10.
- Becerra G, Plascencia A, Luévanos A, Dominguez M, Hernández I. (2009) Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. Enf inf microbiol. 29(2): 649-662.
- Bhatia A, Zahoor S. (2007) *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. Journal Clin Diag Res. 3(1): 188-197.
- Bustos Martínez JA, Hamdan Partida A, Gutiérrez Cárdenas M. (2006) *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed . 17:287-305.

- Cha J., Lee JK., Jung YH., Yoo JI., Park YK., Kim BD., Lee YS. (2006) Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl. Microbiol.* 101: 864-871.
- Derzalle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V. (2009) Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol.* 26: 896-904.
- Dinges, M., Orwin, P., and Schlievert, P. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Rev Clin Microbiol.* 13: 16-34.
- Fox J, Barthold S, Davisson M, Newcomer C, Quimby F, Smith A. (2007) The mouse in biomedical research: Diseases. 2nd Ed. New York. 2: 321-326
- Jamali, Mohammadjavad P, Beharad R, Ismail S. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food control.* 54: 383-388.
- Jantra, J., Kanatharana, P., Asawatreratanakul, P., Wongkittisuksa, B., Limsakul, C., Thavarungkul, P. (2011). Detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at picogram level by a capacitive immunosensor. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 46:560–568.
- Jordá GB, MArucci R, Guida AM, Pires PS, Manfredi E, (2012) Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos, *Rev Argentina de Microbiol.* 44: 101-104.

- Johler S, Weder D, Bridy C, Huguenin MC, Luce R , Hummerjohann J, Stephan R. (2015) Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.* 98: 2944–2948.
- Karmakar A, Dua P, Ghosh C. (2016). Biochemical and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from hospitalized patients. *J of infect. Diseases.* 1-7
- Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. (2000) A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 44(6): 1549-1555.
- Kérouanton A., Letertre C., Petit L., Chesneau O.,Brisabois A., Buyser D.,(2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks un France. *Int J food Microbiol.* 110: 369-375.
- Louie L., Goodfellow J., Mathieu P., Glatt A., Louie M., Simor AE. (2002) Rapid Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci from Blood Culture Bottles by Using a Multiplex PCR Assay. *Journal Of Clin Microbiol.* 40(8): 2786–2790
- Louie L., Matsumura S., Choi E., Louie M., Simor AE.(2000) Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin Microbiol.* 38(6): 2170-2173.

- Matsuoka M., Inoue M., Nakajima Y., Endo Y.(2002) New *erm* gene in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 46(1): 211-215.
- Miranda Novales M. (2011) Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 68(4): 242-249.
- Moghassem H, Hosseinzadeh S. Shekarforoush S. Poormontaseri M, Derakhshandeh A. (2015). Association between the enterotoxin production and presence of *Coa*, *Nuc* genes among *Staphylococcus aureus* isolated from various sources, in Shiraz. *Iranian J of Veter Research*. 16(4): 381-384
- Motallebi M, Jabalameli F, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M. (2016). Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains with staphylococcal cassette chromosome *mec*type IIIA isolated from burn patients. *Microbial Pathogenesis*. 97; 34-38
- Moore P., Lindsay JA. (2001) Genetic variation among Hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol*. 39(8): 2760-2767.
- Muñoz AB.(2008) La infección nosocomial y los trabajadores de la salud portadores de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente. *Semillas Rev Invest*. 59-62
- Palavencino E, (2002) Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*,

Staphylococcus coagulasa negativa: nuevos puntos de corte e interpretación de resultados. Rev chil infect. 19: 119-124.

- Perdomo IL, Melendez P. (2011) Determinación de aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* enterotoxigénicos a partir de alimentos, Rev col cienc Quim Farm. 33(1): 59- 69
- Quisberth Barrera SR.(2008) Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en niños menores de 5 años, en el hospital del niño “Dr. Ovidio Aliaga Uria” Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias Farmacéuticas y bioquímicas. Universidad mayor de San Andrés. La Paz Bolivia.
- Rammelkamp CH, Maxon T. (2000) Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. Exp biol Med. 51: 386-389.
- Rivera Salazar J, Mujica de Fernandez I, Aranaga Natera V, Navarro Ocando C, Zabala Díaz I, Atenacio Bracho L.(2010) *Staphylococcus aureus* Procedentes de quesos: susceptibilidad a antimicrobianos y su relación con plásmidos. Rev cient. 21(3): 202-210.
- Roussel S, Felix B, Vingadassalon N, Grout J, Hennekinne JA, Guillier L, Brisabois A, Auvray F (2015). *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France: comparison of different molecular typing methods, including MLVA. Front. Microbiol. 6(882). 1-12
- Sahebhasagh R, Saderi H, Owlia P. (2014). The prevalence of resistance to methicillin in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients by PCR method for detection of *mecA* and *nuc* genes. Iranian J Publ Health. 43(1): 84-92

- Schelin J., Carlquist N., Thorup M., Lindqvist R., Barker G., Radstrom P. (2011) The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2(6); 580-592.
- Schmid D, FRetz R., Winter P., Mann M., Hoger G., Stoger A., Ruppitsch W., Ladstatter J., Mayer N., Martín A., Allerberger F. (2009) Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products. 121:125-131.
- Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *S. aureus*. 41(9): 4089-4094.
- Suarez Marrero A, (2007) Manual de formación básica para manipuladores de alimentos. Control canario de calidad y seguridad y FECAO. Ediciones federación Empresarial canaria de Ocio y Restaurantes.
- Tibavizco D, Rodríguez JY, Silva E, Cuervo SI, Cortés JA. (2007) Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Biomédica*. 27(2): 294-307.
- Tortora GJ, Funke BR. Introducción a la microbiología (2007). Editorial Médica Panamericana. Buenos aires, Argentina.
- Velázquez Meza ME.(2005) Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Publica Mex*. 47:381-387.
- Veras J.F, do Carmo L.S, Tong L.C, Shupp J.W, Cummings C, Dos Santos D.A, Cerqueira M.M, Cantini A, Nicoli J.R, Jett M. (2008) A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive

staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis*, 12: 410–415

- Wilson M., Otth C., Medina G., Otth L., Fernandez H, Arce M., Zaroc A., Lizama V., Gil M., Von A. (2007) Genotypes of *Staphylococcus aureus* straining with meticillin resistant phenotype. *Rev Med Chile*. 135: 596-601.
- Wong H., Louie L.,¹ Reggie Y., Simor A. (2010) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with a partial or complete absence of Staphylococcal cassette chromosome elements. *J Clin Microbiol*. 48(10): 3525- 3531.
- Wu S, Duan N , Gu H, Hao L, Ye H, Gong W, Wang Z. (2016). A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. 8(176): 1-20.
- Zendejas Manzo GS, Avalos Flores H, Soto Padilla MY. (2014) Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*. 25(3): 129-141

URL's citados.

- Sanidad, inocuidad y calidad de los alimentos (22 de agosto de 2009) ETA's: envenenamiento por *Staphylococcus aureus*. Recuperado de <https://sanidadealimentos.com/2009/08/22/etas-envenenamiento-por-staphylococcus-aureus/>. Accesado el 25 de junio de 2016.
- Technical manual (Diciembre de 2014) Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20protocol.pdf>. Accesado el 30 de junio de 2016.

ANEXO 1.

Resultados obtenidos de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de las 50 cepas de *S. aureus*. S, sensible; I, intermedio; R, resistente.

Cepa	Ceftazidima (30µg) mm			Eritromicina (15µg) mm			Ampicilina (10 µg) mm			Tetraciclina (30 µg) mm			Trimetoprim - sulfametoxazol (25 µg) mm			Cefotazidima (30 µg) mm			Gentamicina (10 µg) mm			Cefuroxima (30 µg) mm			Dicloxacilina (1 µg) mm			Penicilina (10U) mm					
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Inter-valor de referencia	≥ 3	28 - 34	≤ 2	≥ 2	14 - 22	≤ 1	≥ 3	28 - 34	≤ 2	≥ 1	15 - 18	≤ 1	≥ 16	11 - 15	≤ 10	≥ 3	26 - 30	≤ 2	≥ 1	13 - 14	≤ 1	≥ 3	28 - 34	≤ 2	≥ 6	13 - 15	≤ 1	≥ 2	13 - 15	≤ 1	≥ 2	-	≤ 2
2	0			21 (I)			0			25			27			25			20			26			0			0					
3	0			18			9			20			25			20			18			23			0			0					
4	0			23			16			28			30			24			11			30			0			11					
5	0			22			12			26			30			27			27			30			0			0					
6	0			28			0			25			32			20			0			20			0			0					
7	0			25			0			21			23			0			19			0			0			0					
8	0			26			0			25			30			23			15			16			0			0					

9	0	25	0	24	28	21	14	12	0	0
10	0	24	0	23	30	26	15	12	0	0
18	0	22	0	9	26	23	22	26	0	0
19	0	20	0	9	25	21	18	24	0	0
30	0	19	26	22	26	22	13	25	0	0
32	0	23	0	28	34	20	16	15	0	0
34	0	21	0	26	31	22	22	23	0	0
36	0	21	9	24	30	21	23	27	0	0
37	0	20	0	23	28	21	18	23	0	0
38	0	23	0	25	32	25	28	27	0	0
40	0	20	0	22	30	23	20	25	0	0
46	0	24	0	26	32	22	20	25	0	0
47	0	20	0	24	26	21	20	25	0	0
48	0	19	0	23	29	23	22	27	0	0
63F	0	25	0	25	32	20	15	13	0	0
64	0	23	21	28	31	21	19	28	0	0
65	0	26	10	29	31	27	22	29	0	0
66	0	21	0	28	31	18	22	22	0	0
67F	0	30	19	30	30	25	23	26	0	14
68	0	23	0	27	27	22	20	23	0	0

69	0	17	30	25	0	0	0	0	0	0
70	0	26	10	11	22	20	20	25	0	0
71S	0	23	0	25	30	16	14	0	0	0
71F	0	0	0	25	40	0	20	0	0	0
72	0	23	15	24	30	22	20	26	0	0
73	0	25	0	26	30	24	16	14	0	0
74	0	0	0	11	31	12	13	15	0	0
75	0	24	0	27	29	23	21	23	0	0
77F	0	23	10	22	33	21	21	25	0	0
78	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	21	0	10	27	21	19	25	0	0
81	0	26	14	31	32	22	25	24	0	0
82F	0	0	0	13	32	11	21	13	0	0
83	0	25	28	27	30	25	20	30	0	0
84	0	0	0	20	31	20	16	15	0	0
85	0	23	0	25	29	18	12	23	0	0
86F	0	21	0	9	27	22	21	27	0	0
88F	0	21	0	26	25	22	18	25	0	0
89F	0	23	0	29	32	19	21	22	0	0
90F	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0

97F	0	21	0	25	27	12	18	23	0	0
101F	0	23	0	25	28	19	23	24	0	0
102F	0	11	0	23	0	0	0	0	0	0
% de resisten cia	100	14	98	16	8	20	14	34	100	100

