



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA ACADÉMICA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROGRAMA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**“PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus* EN QUESOS
FRESCOS ELABORADOS EN EL ESTADO DE HIDALGO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:
P. DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS
JUANA GABRIELA BARBERENA CALVA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
M en C. SERGIO SOTO SIMENTAL

ASESOR EXTERNO: Dra. IRMA CARO CANALES

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Agosto de 2010.





Agradecimientos

Mi gratitud al M en C. Sergio Soto Simental por su colaboración y ayuda constante, por su labor de asesoría y consejos.

Al Dr. Víctor M. Martínez Juárez por su interés en la investigación y apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosalinda Acosta Salinas por el tiempo y dedicación para la revisión de este estudio.

A la M en C. Martha Gayosso Canales por su ayuda y aportes a este trabajo.

A la Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana por el tiempo y dedicación para la revisión de este estudio.

A la Dra. Irma Caro Canales por su apoyo y confianza para el inicio de este trabajo.

A Dios, por darme vida y permitirme cumplir uno de mis sueños.

A mis padres con respeto.

En especial a la persona mas importante de mi vida que es mi padre,
por estar conmigo siempre, por brindarme su confianza, apoyo y amor.

A mis hermanos, sobrinos y mi tía consentida

Y a todos aquellas personas que al igual de importantes; familia y amigos.

Gracias!!

"El azar solo favorece a los espíritus preparados" L. Pasteur

ÍNDICE

	PÁGINA
ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 Definición y clasificación de las ETA's.....	5
3.1.1 Causas de las ETA's.....	6
3.1.2 Factores que favorecen el desarrollo bacteriano.....	7
3.1.3 Agentes etiológicos.....	7
3.1.4 Síntomas.....	8
3.2 Características de género y especie del <i>Staphylococcus</i>	9
3.2.1 Antecedentes de los estafilococos.....	11
3.2.2 El <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.2.3 Efecto de las sales y otros productos químicos.....	13
3.2.4 Temperatura.....	14
3.2.5 Requisitos nutricionales para el crecimiento.....	15
3.3 Clasificación taxonómica del <i>Staphylococcus</i>	15
3.4 Características bioquímicas del <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.5 Definición de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.6 Alimentos implicados en la intoxicación estafilocócica.....	17
3.6.1 Carne y productos cárnicos.....	18
3.6.2 Productos lácteos.....	18
3.6.3 Otros alimentos.....	18
3.7 Definición del queso.....	19
3.7.1 Clasificación de los quesos.....	19

3.8 Método de identificación y pruebas más importantes para diferenciar al <i>S. aureus</i>	20
3.8.1 Fundamento.....	20
3.8.2 Identificación.....	21
3.8.2.1 Tinción de Gram.....	22
3.8.2.2 Catalasa.....	23
3.8.2.3 Prueba en portaobjetos “coagulasa ligada”.....	24
3.8.2.4 Prueba en tubo “coagulasa ligada y libre”.....	24
3.8.2.5 Prueba de la termonucleasa.....	25
3.9 Prueba confirmatorias adicionales.....	25
3.9.1 Prueba de oxidasa.....	25
3.9.2 Fermentación del Manitol.....	25
3.10 Sistemas de identificación rápida.....	26
3.11 Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas.....	27
3.11.1 Inactivación.....	30
3.11.2 Actividad biológica.....	30
3.12 Prevención de la intoxicación estafilocócica.....	31
3.13 Ensayos para enterotoxinas.....	33
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Toma de muestras.....	36
5.2 Análisis microbiológicos.....	36
5.2.1 Preparación de la muestra.....	36
5.2.2 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
5.2.3 Prueba de coagulasa.....	37
5.2.4 Prueba de termonucleasa.....	38

5.2.5 Tinción de Gram.....	38
5.2.6 Prueba de la catalasa.....	38
5.2.7 Prueba de la oxidasa.....	39
5.3 Identificación de microorganismos por el sistema Vitek®.....	39
5.4 Detección de toxinas estafilocócicas.....	40
5.4.1 Técnicas inmunológicas.....	40
5.4.2 Técnicas moleculares.....	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
6.1 Recuentos de muestras analizadas en diferentes jurisdicciones sanitarias del Estado de Hidalgo.....	44
6.2 Recuentos de diferentes tipos de quesos frescos elaborados en el Estado de Hidalgo.....	48
6.3 Pre-caracterización de bacterias aisladas en Baird Parker a partir de quesos frescos.....	50
6.4 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por el sistema Vitek®.....	52
6.5 Determinación de enterotoxina estafilocócica por el método de ELISA.....	54
6.6 Determinación de enterotoxina estafilocócica por PCR.....	55
7. CONCLUSIONES.....	58
8. GLOSARIO.....	59
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62
10. ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Especies que constituyen el género <i>Staphylococcus</i>	11
2	Especies de <i>Staphylococcus</i> que están constituidas por subespecies.....	11
3	Forma de selección de colonias de acuerdo a la NOM-115-SSA1-1994 a partir de agar Baird Parker.....	37
4	Recuentos de <i>S. aureus</i> en diversos quesos elaborados en diferentes jurisdicciones sanitarias en el Estado de Hidalgo.....	46
5	Recuentos de <i>Staphylococcus aureus</i> en diferentes tipos de queso elaborados en el estado de Hidalgo.....	48
6	Pre-caracterización de bacterias aisladas en Baird Parker a partir de diversos quesos.....	50
7	Pruebas complementarias para identificación, porcentaje, e identificación de género y especie de <i>Staphylococcus</i> por medio del sistema vitek®.....	52
8	Perfiles bioquímicos de presuntas bacterias de <i>Staphylococcus aureus</i> identificadas por el Sistema Vitek®.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Diagrama de flujo para detección de presencia de enterotoxina “A” de <i>S. aureus</i> por la técnica ELISA.....	41
2	Diagrama de flujo para detección de presencia de la enterotoxina “A” por la técnica PCR.....	43
3	Prevalencia de <i>S. aureus</i> en quesos frescos en el Estado de Hidalgo.....	47
4	Gel de agarosa donde se muestra el marcador de peso molecular y un testigo positivo al gen de la enterotoxina “A” con un amplificado de 470 pb.....	55

1. RESUMEN

En México se consume principalmente quesos frescos y elaborados de forma artesanal, en pequeñas y medianas industrias muchas de las cuales utilizan leche sin pasteurizar, a pesar que de acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, los quesos deben ser elaborados con leche pasteurizada. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* en diversos quesos elaborados en el Estado de Hidalgo. Del 2007 al 2008 se recolectaron un total de 159 muestras de quesos procedentes de diferentes municipios del Estado de Hidalgo (Pachuca, Tulancingo, Tula, Huichapan, Zimapan, Ixmiquilpan, Actopan, Meztlán, Molango, Huejutla, Apan, Tizayuca, y la región Tepehua), la presencia de *S. aureus* se realizó de acuerdo a la NOM-115-SSA1-1994. El aislamiento de *S. aureus* se realizó en Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hidalgo, 30 de estas muestras fueron características a *Staphylococcus aureus* a partir del medio de cultivo selectivo agar Baird Parker. Se aislaron colonias típicas de *S. aureus* (colonias negras, brillantes, convexas y rodeadas de un halo transparente de 2 a 5 mm de diámetro), para la identificación de las bacterias se realizaron las siguientes pruebas de precaracterización: tinción de Gram, catalasa, actividad citocromo-oxidasa, coagulasa y termonucleasa. De cada una de estas muestras se tomaron 5 colonias, posteriormente las cepas que fueron Gram-positivas, cocos, citocromo oxidasa negativas, catalasa, coagulasa y termonucleasa positivas, únicamente 60 de 150 cepas, se caracterizaron a nivel de especie con la ayuda del sistema Vitek® semiautomatizado con una tarjeta Vitek® GPI (1305 bioMérieux® S.A., F). El 81.66% de las cepas bacterianas aisladas de *Staphylococcus* fueron de la especie *S. aureus*, 13.31% de estas cepas fueron identificadas con otro tipo de especie de *Staphylococcus* y 5% de las cepas no fueron identificadas a nivel género. Por último se realizó la detección de toxinas estafilocócicas mediante técnicas inmunológicas y técnicas moleculares. Se confirmó que el gen que codifica para la enterotoxina "A" no se encuentra en las cepas de *Staphylococcus* aisladas. No debemos descartar la presencia de otros genes que producen otras toxinas diferentes. El *S. aureus* es causante de intoxicaciones alimentarias por la producción de enterotoxinas, la presencia de esta bacteria en el aislamiento indica una inadecuada manipulación del producto. Estos resultados muestran la insuficiencia de las medidas

sanitarias aplicadas a la comercialización de este alimento y la posibilidad de contener enterotoxinas que pueden ocasionar intoxicación estafilocócica representando de esta manera un riesgo para la salud pública.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, enterotoxina "A", PCR, ELISA.

2. INTRODUCCIÓN

El queso es actualmente considerado un alimento muy seguro. En particular, en el caso de los quesos elaborados con leche pasteurizada, el procedimiento de pasteurización que elimina el riesgo de organismos patógenos viables (Little *et al.*, 2008). Sin embargo, las bacterias patógenas transmitidas por los productos lácteos, incluyendo el queso, son históricamente responsables de muchos brotes de origen alimentario (De Buyser *et al.*, 2001). Investigaciones epidemiológicas han demostrado que los patógenos son bacterias responsables de estos brotes los cuales pueden contaminar al queso a través de la leche cruda, leche pasteurizada inadecuadamente o pasteurización posterior a la contaminación con microorganismos originalmente derivados de la leche cruda o entornos de fabricación (Little *et al.*, 2008).

Los patógenos microbianos en alimentos, han sido confirmados como la causa principal de las enfermedades transmitidas por estos productos, destacando las intoxicaciones por cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* e infecciones por *Salmonella*. Los síntomas característicos de la intoxicación estafilocócica son náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea; se desarrollan entre 1 y 6 horas después de haber consumido el alimento (Bergdoll, 1990). Si contienen enterotoxinas pueden ocurrir otras manifestaciones, como dolor de cabeza y disnea, pero con menor frecuencia, generalmente los síntomas no persisten más allá de las 24 horas; en casos severos puede haber deshidratación, originando descompensación electrolítica; las muertes son raras y puede ocurrir en ancianos, niños o personas débiles por alguna enfermedad (Varnam y Evans, 1991).

El *S. aureus*, es considerado omnipresente, encontrándose en las mucosas y piel de la mayoría de los animales de sangre caliente (ICMSF, 1998), en el humano el principal reservorio es la cavidad nasal, ocasionando lesiones en la piel principalmente en brazos, manos y cara; también se puede encontrar en garganta y en el tracto intestinal, pasando de estas localizaciones al aire, polvo, ropa, utensilios y equipos, llegando a contaminar los alimentos (Jay, 1994).

Las enterotoxinas de *Staphylococcus spp* pueden ser identificadas por diferentes métodos rutinarios como ELISA, ensayos de inmunodifusión, etc., (Nema *et al.*, 2007). Los resultados con estos métodos, dependen de la cantidad de toxina presente, por lo cual es posible los falsos negativos cuando es baja. La PCR ha demostrado ser una técnica específica y sensible para la detección de *Staphylococcus spp* y los genes que codifican para sus enterotoxinas (Rooney *et al.*, 2004).

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Definición y clasificación de las ETA's

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) son un síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población.

La Organización mundial de la Salud (OMS), ha definido a las ETA's como **“una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico que es causada, o que se cree que es causada, por el consumo de alimentos o agua contaminada”**. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas (OMS, 1992).

Se han descrito más de 250 enfermedades diferentes transmitidas por alimentos. Las cuales tienen muchos síntomas diferentes, por lo que no hay un “síndrome” que sea una enfermedad transmitida por los alimentos. Sin embargo el microbio o toxina se introduce en el cuerpo a través del conducto gastrointestinal y a menudo ocasiona los primeros síntomas tales como náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea, síntomas comunes en muchas enfermedades transmitidas por alimentos.

La gama de las enfermedades transmitidas por alimentos cambia constantemente. Hace un siglo, la fiebre tifoidea, la tuberculosis y el cólera eran enfermedades comunes transmitidas por alimentos. Las mejoras en la seguridad alimentaria, tales como la pasteurización de la leche, el enlatado seguro y la desinfección de los suministros de agua, han eliminado esas enfermedades. Hoy otras infecciones transmitidas por alimentos, entre ellas el parásito *Cyclospora* o la bacteria *Vibrio parahemolyticus*. Microbios recién reconocidos emergen como un problema de la salud pública por diferentes razones: los microorganismos pueden propagarse con facilidad por todo el mundo, nuevos agentes microbianos pueden evolucionar, cambios en el medio ambiente, la ecología, las prácticas de producción de los alimentos y los hábitos de consumo (OMS, 1992).

Un brote de ETA's se produce cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar luego de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad, con una posterior confirmación del laboratorio.

Las ETA's pueden manifestarse a través de:

Infecciones transmitidas por alimentos: son las enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos y/o agua contaminados que contienen organismos vivos específicos tales como bacterias (salmonelosis), virus (hepatitis viral tipo A), hongos y parásitos (toxoplasmosis), que en la luz intestinal puedan multiplicarse o liarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal, y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas. Tienen un período de incubación mucho más prolongado.

Intoxicaciones causadas por alimentos: ocurren cuando las toxinas de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como es el caso de ciertos hongos. Ejemplos: *Clostridium botulinum*, *Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

Toxi-infección causada por alimentos: es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Ejemplos: cólera (Castro, 2007).

3.1.1 Causas de las ETA's

- Enfriamiento inadecuado.
- Preparación de los alimentos con demasiada anticipación al consumo.
- Almacenamiento inadecuado.
- Conservación a temperatura ambiente.
- Cocción insuficiente (temperaturas inadecuadas de cocción).

- Higiene personal insuficiente.
- Contaminación cruzada.
- Ingredientes de origen dudoso.
- Contacto de alimentos con animales y/o sus excretas.

3.1.2 Factores que favorecen el desarrollo bacteriano

Temperatura: la mayoría de las bacterias se desarrollan con mayor rapidez a los 37 °C; sin embargo también se pueden multiplicar entre los 20-50 °C. A fin de prevenir su desarrollo en los alimentos se debe lograr que la temperatura durante la conservación sea inferior a los 5 °C y superior a los 65 °C durante su cocción.

Humedad: los microorganismos prefieren la humedad y alimentos con alto contenido proteico. Las altas concentraciones de azúcar, sal y ciertos condimentos ayudan a prevenir el crecimiento bacteriano.

Tiempo: ciertas bacterias pueden reproducirse cada 20 minutos. Por este motivo los alimentos no deberán permanecer a la temperatura de la zona de peligro más tiempo del necesario.

3.1.3 Agentes etiológicos

- Biológicos: (bacterias y/o sus toxinas, hongos, virus, parasitos)
- Químicos: productos químicos incorporados a los alimentos (plaguicidas, fertilizantes, veneno, etc.)
- Físicos: cuerpos extraños (metales, vidrio, madera, etc).

La contaminación bacteriana suele ser la que se produce con mayor frecuencia. El tiempo transcurrido hasta que se manifiesta la enfermedad y los síntomas varían de acuerdo al agente responsable de la contaminación (Jay, 1997). Las bacterias causantes de enfermedad se llaman bacterias patógenas. No todos tenemos la misma sensibilidad frente a estas bacterias. Los ancianos, las mujeres embarazadas, los niños y los enfermos son más susceptibles y en ellos los efectos pueden ser más serios. Afortunadamente, no

todas las bacterias son perjudiciales para la salud, incluso algunas de ellas son utilizadas beneficiosamente en la producción de alimentos como es el yogurt.

La contaminación se puede realizar en cualquier etapa de la cadena alimentaria, desde la obtención de la materia prima hasta el almacenamiento en casa. Las bacterias patógenas pueden estar presentes en el alimento al momento de comprarlo o llegar a él por una contaminación posterior. Los alimentos cocidos y aquellos que están listos para comer también son susceptibles a la contaminación a través de alimentos crudos (carne, pollo, pescado), jugos de alimentos crudos, manos, utensilios de cocina, tablas, etc. que se encuentren contaminados. Esta transferencia de microorganismos patógenos de un alimento a otro se denomina contaminación cruzada.

3.1.4 Síntomas

Los síntomas más comunes de las ETA's son: náuseas, vómitos, cólico abdominal y postración. En casos severos puede ocasionar dolores de cabeza, dolores musculares, alteraciones temporales de la presión sanguínea y arritmia cardíaca, dichos indicios pueden presentarse desde unas horas hasta una semana después de la ingestión del alimento contaminado. Estos síntomas pueden variar dependiendo del agente causal, cantidad del inoculó, la presencia de toxinas en el alimento, la cantidad del alimento consumido y el estado de salud de la persona, entre otros factores (González y Rojas, 2005). Para las personas inmunocompetentes, la mayoría de las ETA's son enfermedades pasajeras, que sólo duran un par de días y sin ningún tipo de complicación, pero para las personas más susceptibles como son niños, ancianos, mujeres embarazadas o los que se encuentran inmunocomprometidos pueden ser más severas, que pueden dejar secuelas o incluso provocar la muerte (Marriot, 1997).

En el periodo comprendido entre 1980 a 1989 el Laboratorio Nacional de Salud Pública realizó una revisión de las toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario en México, se confirmaron 58 brotes de los 79 estudiados (73%), el 24.1% ocurrió en reuniones, 10.3% en escuelas o guarderías, 8.6% en restaurantes y 8.6% en hospitales. El principal microorganismo implicado fue **S. aureus**, que provocó el 48.2% de

los incidentes. *Salmonella enterica* causó 34% de los brotes, siendo el serovar *typhimurium* la que se aisló con mas frecuencia. Los alimentos involucrados principalmente fueron: quesos 29.3%, pasteles 15.5%, carne cocinada 15.1%, leche 13.8%, pescados y mariscos 7.0%. Los brotes estudiados constituyen una mínima parte de los que suceden en el país, por lo que concluyeron que es necesario implementar y actualizar técnicas que permitan el diagnóstico de patógenos relacionados con la toxiinfección alimentaria (Parrilla *et al.*, 1993).

3.2 Características de género y especie del *Staphylococcus*

En el género *Staphylococcus* se incluyen las bacterias Gram-positivas que tienen una gran importancia en la medicina, tanto humana como veterinaria, por cuanto tienen la capacidad de causar una gran diversidad de infecciones en el ser humano y en los animales. El *S. aureus* es el prototipo del género y es reconocido desde hace decenas de años como un patógeno importante. Sin embargo, recientemente se han involucrado el grupo de *Staphylococcus* coagulasa-negativa en numerosas infecciones en seres humanos, tanto intra como extrahospitalarias, así como también en animales domésticos y salvajes (Rojas *et al.*, 2007).

El diámetro de una célula individual de *Staphylococcus* es de 0.7 a 1.2 μm . Típicamente, los *Staphylococcus* muestran una reacción positiva a la tinción de Gram. Sin embargo, células en cultivos viejos o ingeridas por fagocitos pueden mostrarse como Gram-negativos. La clásica morfología de racimos de uva es más evidente en cultivos sobre medios sólidos. Esta morfología se debe a que los *Staphylococcus* se dividen en tres planos perpendiculares sucesivos y a que las células hijas no se separan completamente. Los *Staphylococcus*, son inmóviles, carecen de flagelos y no forman esporas. Ciertas cepas tienen la capacidad de producir una cápsula extracelular de polisacáridos.

La mayoría de las especies del género *Staphylococcus* crecen relativamente bien en medios de cultivo sencillos como agar sangre, agar nutritivo, agar tripticasa soya y otros. Las colonias individuales de *Staphylococcus* crecidas sobre agar nutritivo son opacas, con bordes definidos, circulares, convexas y de 1 a 4 mm en diámetro. El clásico color amarillo

oro de las colonias de *S. aureus* es debido a la presencia de carotenoides (*aureus* en latín significa oro). Murray *et al.*, (1999) describen a este género como cocos Gram positivos, de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, pueden estar agrupados o en pares, cadenas cortas (3 a 4 células), no forman esporas, catalasa positiva, oxidasa negativa, limitan la formación de la cápsula, muchas especies son anaerobios facultativos, excepto el *S. saccharolyticus* y *S. aureus* subsp. *anaerobius*.

La pigmentación es usualmente aparente luego de 18-24 horas de incubación a 37 °C, pero es más pronunciada cuando los cultivos son mantenidos a temperatura ambiente de 24-48 horas adicionales. Esta característica es pronunciada también por la presencia de monofosfato o monoacetato de glicerol en el medio de cultivo. Es importante destacar, sin embargo, que la pigmentación colonial no es una propiedad exclusiva de *S. aureus*, sino que está también presente en otras especies del género incluyendo a *S. arlettae*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* y otras (Rojas *et al.*, 2007).

Las especies de *Staphylococcus* son metabólicamente muy activas, por lo que generalmente no requieren la adición de nutrientes específicos. Su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 35 a 37 °C aunque crecen también a temperatura ambiente. Los *Staphylococcus* son anaerobios facultativos y usualmente son productores de catalasa. Excepto por *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus*, el crecimiento de los *Staphylococcus* es rápido y abundante bajo condiciones aeróbicas. Estos dos miembros del género *Staphylococcus* no son productores de catalasa y crecen mejor en condiciones anaerobias. La cadena respiratoria de los *Staphylococcus* y de los *Micrococcus* difieren en la composición de citocromos y menaquinona. La mayoría de los *Staphylococcus* contienen citocromos tipos a y b, mientras que los *Micrococcus* tienen los tipos c y d. Las especies *S. caseolyticus*, *S. lentus* y *S. sciuri* contienen citocromos tipos a, b además de dos citocromos tipo c.

En el género *Staphylococcus* se incluyen actualmente 32 especies, cuyos nombres se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Especies que constituyen el género *Staphylococcus*.

<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. felis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. muscae</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>S. pasteurii</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. vitulus</i>

(Rojas *et al.*, 2007)

Algunas especies están constituidas por dos o más subespecies tabla 2.

Tabla 2. Especies de *Staphylococcus* que están constituidas por subespecies.

<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> , <i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> , <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>
<i>S. schleiferi</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> , <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>

(Rojas *et al.*, 2007)

3.2.1 Antecedentes de los estafilococos

La denominación *Staphylococcus* (significa racimos parecidos a los de uva) fue mencionada por primera vez por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston quién, en una serie de artículos clásicos publicados entre 1879 y 1882 describió la presencia de este organismo obtenido de abscesos humanos y demostró que causaba enfermedad. Dos años después, Rosenbach describió su crecimiento en un cultivo puro y llamó *Staphylococcus aureus* al coco que formaba colonias de color naranja (Baird Parker, 1990).

La primera observación registrada que asoció los estafilococos con la intoxicación alimentaria probablemente fué hecha por Vaughan y Sternberg quienes en 1884, describieron una investigación de un importante brote de enfermedad en Michigan que se creía que había sido causado por comer queso. Mediante examen microscópico, los citados autores descubrieron que el queso estaba contaminado con un organismo esférico al que denominaron micrococo. Mientras que Berber en el año de 1914 fue quien demostró claramente la intoxicación alimentaria estafilocócica por beber leche que se había guardado sin refrigerar, procedente de una vaca que padecía una mastitis estafilocócica. Se ha demostrado que *S. aureus* es un organismo habitual y muy distribuido que participa en las intoxicaciones alimentarias (Adams y Moss, 2000).

3.2.2 El *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* pertenece a la familia de Micrococcaceae, cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, no esporulados, inmóvil, catalasa positiva, lipasa positiva, sobrevive a la desecación, es halófilico. Organismo mesófilo que tiene su crecimiento óptimo a 37 °C, pero puede crecer en un rango de 7 a 48 °C, crece mejor en pH neutro, pero también lo puede hacer entre 4 y 10. Generalmente, crece a actividad de agua (A_w) elevada pero puede crecer en concentraciones de 25% (p/p) de cloruro de sodio ($A_w = 0.85$), esta bacteria puede resistir condiciones de secado y liofilizado, pero no al calor, tiene valores de D (tiempo de destrucción de los microorganismos para que estos se reduzcan en un 90% y también conocido como el tiempo de reducción decimal, el cual depende de la temperatura) variando desde 5 a 10 minutos a 121 °C hasta varias horas de 80 a 100 °C.

El patógeno aislado con mayor frecuencia en casos de toxi-infecciones alimentarias es *S. aureus* (Bean *et al.*, 1996) microorganismo comensal de nasofaringe, piel y mucosas de hombres y animales (ICMSF, 1996). Su presencia en los alimentos se asocia directamente al empleo de materias primas contaminadas ó una ó un inadecuado procesamiento del alimento (Bean *et al.*, 1996).

Este agente produce diversas enterotoxinas (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, H e I) causantes de toxi-infecciones alimentarias (Halpin y Marth, 1989) y que son fácilmente identificables con antisueros específicos (Dinges *et al.*, 2000), posteriormente se

describirán algunas de sus características. La producción de estas toxinas depende principalmente de la naturaleza del alimento, de los procesos a los cuales fue sometido (crudo, cocido, fermentado, etc.) y de su potencial exposición a temperaturas de abuso (Halpin y Marth, 1989; Bennett, 1992).

La detección de enterotoxinas en las cepas de *S. aureus* aisladas, generalmente no se realiza y se asume que las cepas productoras de coagulasa y termonucleasa son enterotoxigénicas (Dinges *et al.*, 2000). Sin embargo, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) establece que la sola presencia de grandes cantidades de *S. aureus* en los alimentos no constituye evidencia suficiente para incriminar un alimento como causante de toxi-infección, sino que es necesario además, evaluar la producción de enterotoxinas en los aislados (Bennett y Lancette, 1995).

Aunque la fuente de contaminación de *S. aureus* a los alimentos suele ser del hombre, en ocasiones el origen animal es bien definido. Esta bacteria es una de las causas más importantes de la mastitis en el ganado lechero a nivel mundial, ya sea subclínica, aguda o crónica (IDF, 2005). Por su parte, Matos *et al.*, (1991) indican que existen diversas fuentes de contaminación de *S. aureus* que provocan mastitis en hatos lecheros, incluyendo el alimento, las camas, las manos de los operadores, pelo, piel de los pezones, encontrando que en todas las muestras se aisló esta bacteria.

3.2.3 Efecto de las sales y otros productos químicos

Aunque el *S. aureus* crece bien en medios de cultivo sin NaCl, puede crecer bien en concentraciones de 7 a 10%, y algunas cepas pueden crecer hasta en 20%. Las concentraciones máximas que permiten el crecimiento dependen de otros parámetros tales como temperatura, pH, actividad de agua (*A_w*), y potencial de oxidación-reducción (*E_h*).

El *S. aureus* tiene un alto grado de tolerancia a los compuestos como el cloruro de mercurio, telurito, neomicina, polimixina y azida de sodio, todos los cuales han sido utilizados como agentes selectivos en medios de cultivo. *S. aureus*, pueden ser diferenciados de otras especies de estafilococos por su mayor resistencia a acriflavina.

En el caso de borato, *S. aureus* es sensible, mientras que *S. epidermidis* es resistente (Jay, 1970). Con novobiocina, *S. saprophyticus* es resistente, mientras que *S. aureus* y *S. epidermidis* no lo son. La capacidad de tolerar altos niveles de NaCl y algunos otros compuestos, es compartida por *Micrococcus* y *Kocuria*, que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se producen en los alimentos en general, en mayor número que los estafilococos, con lo que la recuperación de este último es más difícil.

3.2.4 Temperatura

El intervalo de crecimiento de *S. aureus* se encuentra entre 10 y 45 °C, aunque algunas cepas pueden crecer a temperaturas ligeramente por debajo o por encima de las señaladas. La temperatura óptima está en torno a 35 y 37 °C. La producción de enterotoxina alcanza su máximo entre 35 y 40 °C, dependiendo de la cepa de que se trate de *S. aureus*. Las temperaturas mínima y máxima para la producción de enterotoxina son respectivamente 16 y 45 °C.

Respecto a la inactivación por el calor de *S. aureus* los valores D típicos (que representan los minutos necesarios a una determinada temperatura para reducir la población microbiana en un 90%) son 2,10 a 53 °C y 1,75 a 58 °C. La exposición a temperaturas inferiores afecta a las células pero no las destruye. Las lesiones resultantes de un tratamiento térmico subletal incluyen: Daños en la membrana citoplasmática; alteraciones en la actividad metabólica y degradación del RNA ribosómico (Ordal, 1971).

Los estafilococos son bastante resistentes a la congelación, sobre todo comparándolos con algunas bacterias gram-negativas como *E. coli* y *Salmonellas*. Minor y Marth (1972) han demostrado que la congelación de este germen en caldo tripticasoja, seguida de un almacenamiento a -30 °C durante 24 horas y una posterior descongelación no tienen efecto sobre la viabilidad de este microorganismo.

3.2.5. Requisitos nutricionales para el crecimiento

Los estafilococos al igual que otras bacterias Gram-positivas requieren de ciertos compuestos orgánicos para su nutrición. Los aminoácidos son necesarios como fuentes de nitrógeno, y la tiamina y ácido nicotínico como fuentes de vitaminas del complejo B. Cuando se cultiva en condiciones anaerobias, parecen requerir de uracilo. En un medio mínimo para el crecimiento aeróbico y la producción de enterotoxina, el glutamato monosódico actúa como C, N, y fuentes de energía. Este medio contiene sólo tres aminoácidos (arginina, cistina, y fenilalanina) y cuatro vitaminas (pantotenato, biotina, niacina y tiamina), además de sales inorgánicas (Miller y Fung, 1973). La arginina parece ser esencial para la producción de enterotoxina B (Wu y Bergdoll, 1971).

3.3 Clasificación taxonómica del *Staphylococcus*

El Manual de Bergey's lo considera dentro de la familia *Micrococcaceae*, al lado de los géneros *Micrococcus* y *Planococcus* (Holt *et al.*, 1994). Este último curiosamente es móvil mediante uno o dos flagelos. Algunos microbiólogos piensan que el género *Staphylococcus* debería separarse de estos otros y formar la familia *Staphylococcaceae* (ICMSF, 1996). La hibridación de ADN ribosomal y análisis comparativo de oligonucleótidos del 16S ribosomal han demostrado que los estafilococos es un grupo coherente a nivel de género, se diferencian de otros miembros de la familia debido a su bajo contenido de G + C entre 30 y 40% mol (Muto y Osawa, 1987).

3.4 Características bioquímicas del *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos obtienen la energía por medio de la glicólisis, la ruta de hexosa monofosfato y el ciclo del ácido tricarboxílico (Minor y Marth, 1976). El funcionamiento de estas rutas depende de las condiciones del cultivo. La glucosa es metabolizada tanto aeróbica como anaeróticamente para formar piruvato.

Durante el crecimiento en anaerobiosis el piruvato puede: Reducirse a lactato por el lactato deshidrogenasa; sufrir una dismutación, por la que una molécula de piruvato se reduce a lactato y la otra se oxida a acetato y dióxido de carbono ó formar acetoína a partir

del ácido α -acetoláctico por condensación de acetaldehidrodifosfotiamina con piruvato, seguida de una descarboxilación del ácido. En algunas circunstancias, la acetoina puede reducirse a 2,3-butanodiol u oxidarse a diacetilo.

Los productos finales del metabolismo anaeróbico son: lactato (73 a 94% de los productos finales), acetato (4.7%) y trazas de piruvato. Durante el crecimiento en condiciones aeróbicas, el piruvato se oxida a acetato, el cual puede oxidarse de nuevo para entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico a través del acetyl-CoA. Los principales productos finales del metabolismo aeróbico son: acetato, dióxido de carbono y lactato.

Este microorganismo puede usar como fuente de carbono y energía diversos carbohidratos como son; glucosa, lactosa, maltosa y manitol, los cuales son transformados en ácido pirúvico. Sí las condiciones de crecimiento son más aeróbicas que anaeróbicas puede utilizar más carbohidratos que los citados como fuente de energía y de carbono, como por ejemplo muchas hexosas, pentosas, disacáridos y polioles originándose ácido.

A partir de la arabinosa, celobiosa, dextrina, inositol, rafinosa, ramnosa y xilulosa no se produce ácido a pesar de que también son utilizados. La esculina y el almidón no son hidrolizados por esta bacteria. Reduce los nitratos y produce amoníaco a partir de la arginina por acción de la arginina dehidrolasa. Puede producir también cantidades inapreciables de sulfuro de hidrógeno a partir de la cisteína. El ácido glutámico y la lisina no son descarboxilados por este germen.

Durante el crecimiento de *S. aureus* se sintetizan varias enzimas y proteínas como: proteasas, lipasas, fosfolipasas, lipoproteínas, esterasas y liasas. La mayoría de las cepas de *S. aureus* son capaces de hidrolizar proteínas nativas (hemoglobina, fibrina, clara de huevo y caseína) y polipéptidos (gelatina). También pueden hidrolizar lípidos, Tweens, Spans y fosfolipoproteínas liberando ácidos grasos. Algunas cepas producen lecitinasa C, mientras que otras sintetizan ácido hialurónico que degrada los mucopolisacáridos.

3.5 Definición de *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* microorganismo que se desarrolla en medios de cultivo selectivo y diferencial, que es capaz de dar positiva la prueba de coagulasa y termonucleasa (NOM-115-SSA1-1994).

Razones para determinar el *Staphylococcus aureus* en Alimentos (NOM-115-SSA1-1994):

- Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.
- Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico.
- Demostrar la contaminación post-proceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.
- Los alimentos sujetos a contaminación post-proceso con tipo enterotoxigénico de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas.
- Este tipo de alimentos se vuelven más peligrosos, sí además son sujetos a un inadecuado manejo o son mantenidos a temperaturas de conservación inapropiadas.
- Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica.

3.6 Alimentos implicados en la intoxicación estafilocócica

Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica. Los alimentos vegetales, rara vez, son responsables de la intoxicación, a no ser que el alimento en su conjunto sea una mezcla que contenga uno o

más ingredientes de origen animal y en este caso lo más fácil es que sean éstos los que la provoquen.

3.6.1 Carne y productos cárnicos

Las carnes frescas se contaminan con estafilococos durante el sacrificio o durante la manipulación posterior. Las carnes que se encuentran en el comercio están entre un 20 y 100% contaminadas con estafilococos (Minor y Marth, 1976). Lo mismo que ocurre con la leche, los estafilococos en la carne no crecen bien a causa de la flora competidora. Cuando ésta se elimina parcial o completamente, como ocurre en las semiconservas cárnicas, los estafilococos, siempre que el resto de los factores sean favorables pueden crecer y producir toxina. Las sales del curado no inhiben a este microorganismo y en las carnes maduradas el pH debe ser de 4.8 o inferior para que se produzca una inhibición. El ahumado en caliente puede inactivar el *S. aureus* por efecto del calor más que por el propio humo. El ahumado frío, que se emplea en algunos embutidos, puede incluso favorecer el crecimiento de este microorganismo (Minor y Marth, 1976). El envasado al vacío favorece la inhibición del *S. aureus* en los productos cárnicos.

3.6.2 Productos lácteos

Los estafilococos enterotoxigénicos se encuentran en leches de animales que sufren mastitis producidas por *S. aureus*. El ambiente que rodea a los animales y los ordeñadores son otras fuentes a tener en cuenta. Aunque los estafilococos pueden crecer y producir toxina, en condiciones adecuadas, en leche cruda; la leche pasteurizada es mejor sustrato ya que en la mayoría de los microorganismos competidores han sido eliminados (Minor y Marth, 1976). Con aplicación de prácticas higiénicas adecuadas, un control en los procesos de fabricación y la utilización de cultivos iniciadores apropiados en los productos fermentados se puede conseguir eliminar casi por completo el riesgo de intoxicación estafilocócica por estos alimentos.

3.6.3 Otros alimentos

El pescado recién capturado normalmente está libre de estafilococos, sin embargo, se puede contaminar posteriormente a partir de los manipuladores, durante su

conservación en hielo, fileteado y otras operaciones. En el pescado los estafilococos pueden crecer y producir toxina siempre que la microflora natural haya sido eliminada parcial o totalmente (Minor y Marth, 1976).

En carne de pollo es similar al de otras carnes, únicamente es preciso señalar que los pollos asados en barbacoa pueden suponer un problema especial si el calentamiento, almacenamiento y manipulación son inadecuados.

En los huevos frescos los estafilococos no suelen penetrar ni crecer, sin embargo, en los cocidos, si se enfrían utilizando aguas contaminadas, pueden hacerlo y además producir toxina, ya que las propiedades antimicrobianas del huevo desaparecen por ebullición.

Los pasteles son también alimentos peligrosos si la nata y la crema con que se fabrican están contaminadas con *S. aureus* y si las condiciones de manejo permiten su crecimiento y la producción de toxina. En cremas sintéticas no es fácil que se desarrolle a no ser que se altere la composición de las mismas por estar en contacto con la pasta.

Las ensaladas que a menudo contienen ingredientes que son cortados y mezclados con las manos, son alimentos en los que la presencia de *S. aureus* es frecuente, no suele producir problema si se controla correctamente su pH y temperatura. La contaminación de alimentos se da por fallas en la higiene personal y la manipulación inadecuada en los alimentos (Adams, 2009).

3.7 Definición del queso

El término latino de la palabra queso es “caseus”, la FAO lo ha definido de la siguiente manera: “Queso, es un producto fresco o madurado obtenido por drenaje (del líquido) tras la coagulación de la leche, nata, leche desnatada total o parcialmente, grasa láctea o una combinación de estos componentes” (Scott, 1991).

3.7.1 Clasificación de los quesos

Frescos

- Frescales: Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.
- De pasta cocida: Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.
- Acidificados: Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel.

Madurados

- Madurados prensados de pasta dura: Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito.
- Madurados prensados: Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergja, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsøe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.
- De maduración con mohos: Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.

Procesados

- Fundidos y
- Fundidos para untar.
- Otros quesos: frescos, madurados y procesados no considerados, deberán observar lo dispuesto en este ordenamiento. (NOM-121-SSA1-1994)

3.8 Método de identificación y pruebas más importantes para diferenciar al *S. aureus*.

3.8.1 Fundamento:

Según la NOM-115-SSA1-1994 Este método permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa. Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por gramo.

Método microbiológico. Se utilizan diversos medios para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, que desempeña un papel muy importante en los casos de intoxicación por alimentos e infecciones clínicas humanas. La fórmula del presente agar Baird-Parker fue publicada en (1962) por Baird-Parker. Se utiliza ampliamente y se incluye en numerosos procedimientos estándar para el análisis de alimentos, cosméticos o agua de piscinas con el fin de detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* (Lancette y Bennett, 2001). Así mismo, puede utilizarse para el aislamiento de *S. aureus* a partir de muestras clínicas y también se denomina agar huevo-telurito-glicina-piruvato (ETGPA) (Chapin y Laudercale, 2003).

El agar Baird-Parker es un medio parcialmente selectivo, contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico (capacidad de los estafilococos de reducir el telurito a telurio) actúan como agentes selectivos. La yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y, además, la actividad de lipasa. Los estafilococos producen colonias de color gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito; los estafilococos que producen lecitinasa descomponen la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes. Es posible que se forme una zona de precipitación debido a la actividad de lipasa. El medio no debe utilizarse para el aislamiento de estafilococos diferentes de *S. aureus*.

Los estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus*) producen colonias brillantes, convexas, de color gris oscuro a negro, con o sin una zona transparente alrededor de las colonias. Los estafilococos con coagulasa negativa producen crecimiento débil o nulo, con colonias de color gris a negro, habitualmente sin zonas transparentes ni opacas. A menudo se inhiben los organismos diferentes de los estafilococos. Si se produce crecimiento, las colonias pueden adquirir un color de marrón a gris o volverse incoloras, sin zonas transparentes ni opacas. La identificación presuntiva que se obtiene de este medio debe confirmarse con pruebas adicionales (Mac Faddin, 1985).

3.8.2 Identificación

Las pruebas más utilizadas esenciales y obligatorias a realizar para diferenciar al *S. aureus* de otros estafilococos es la tinción de Gram (se utiliza para diferenciar las bacterias Gram positivas de las Gram negativas), la prueba de la catalasa (enzima que protege a las células frente al peróxido de hidrógeno producido en el metabolismo del oxígeno), la prueba de la coagulasa (coagulación del plasma sanguíneo, característica más confiable para la identificación de *S. aureus*), la prueba de la termonucleasa (destrucción del DNA por nucleasas que han resistido la ebullición).

3.8.2.1 Tinción de Gram

La tinción de Gram o coloración Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa. En este método las bacterias se tiñen en primer lugar con cristal violeta, tratándolas posteriormente con solución de yodo. A continuación se tratan las extensiones bacterianas con etanol o acetona, con lo cual se elimina por completo el tinte violeta de las bacterias Gram negativas, pero no de las bacterias Gram positivas. Como colorante de contraste se puede emplear fucsina fenicada diluida o safranina, con el fin de teñir las bacterias Gram negativas.

Con este método se produce una división de las bacterias en dos clases:

1. Gram positivas: incluyen especies tanto móviles (vía flagelos) como inmóviles con forma de bacilo (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) o coco (*Staphylococcus*, *Streptococcus*); con gruesas paredes celulares o sin ellas (*Mycoplasma*).
2. Gram negativas: incluyen especies como *Pseudomonas* y *Escherichia* (Harrigan y Mc Cance, 1979).

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de su pared celular. La pared de la célula bacteriana sirve para dar tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula Gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80-90% de la pared de la célula Gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula Gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas. Sólo 10 a 20% de la pared de la célula Gram-negativas es peptidoglicano.

3.8.2.2 Catalasa

Los estafilococos y los micrococos se diferencian de los estreptococos, los enterococos y las bacterias “tipo-estreptococos” por la prueba de la catalasa. Esta prueba detecta la presencia de enzimas citocromo oxidasas (Koneman *et al.*, 2008). La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo; la excepción principal es el *Streptococcus*. Por lo general, los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrogeno.

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno bajo la fórmula $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H₂O₂, que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares.

A) Utilizada originariamente para diferenciar entre los géneros:

- *Streptococcus* (-) del *Micrococcus* (+) y/o *Staphylococcus* (+).

- *Bacillus* (+) del *Clostridium* (-).

- *Listeria monocytogenes* (+) y/o *Corynebacterium* (+) del *Erysipelothrix* (-). Excepciones: a) *Corynebacterium pyogenes* (-); b) *Corynebacterium haemolyticum* (-).

B) Ayudar a la diferenciación de especies:

- *Moraxella bovis* (v) y *Moraxella kingii* (-) de otras especies de *Moraxella* (+) (Mac Faddin, 1985).

La prueba de la coagulasa convencional se puede realizar mediante los siguientes procedimientos:

3.8.2.3 Prueba en portaobjetos “coagulasa ligada”

La mayoría de las cepas de *S. aureus* tienen un término coagulasa o “factor de aglutinación” en la superficie de la pared celular. Este factor reacciona en forma directa con fibrinógeno en plasma y causa una aglutinación celular rápida. La prueba se puede realizar con un cultivo en agar sangre, agar CNA u otro medio nutritivo no selectivo, pero no debe efectuarse en medios con alto contenido salino (p.ej. agar manitol sal) porque éste provoca la aglutinación de algunas cepas de *S. aureus*. Las cepas que son negativas en la prueba de la coagulasa en portaobjetos deben confirmarse con una prueba de la coagulasa en tubo, porque las cepas deficientes en factor de aglutinación por lo general producirán coagulasa libre. Algunas cepas de las especies de *S. lugdunensis* y *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* también producen factor de aglutinación y pueden ser positivas con la prueba en portaobjetos (Koneman *et al.*, 2008).

3.8.2.4 Prueba en tubo “coagulasa ligada y libre”

El principio de esta prueba es comprobar la facultad de un organismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. La prueba de la coagulasa se utiliza de manera específica en la diferenciación de especies pertenecientes al género *Staphylococcus*: *S. aureus* (reacción +), *S. epidermidis* (reacción -). Por lo general una prueba de coagulasa positiva es el criterio diagnóstico final para la identificación del *Staphylococcus*. Frecuentemente esta prueba es utilizada como índice de virulencia o patogenicidad.

La coagulasa, enzima producida por el *S. aureus*, es relativamente termoestable, ya que resiste temperaturas de hasta 60° C durante 30 min. Probablemente es de naturaleza

proteica y es fácilmente inactivada por las enzimas proteolíticas (Mac Faddin, 1985). La coagulasa detectada por este método se segrega de forma extracelular y reacciona con una sustancia en el plasma llamada factor de reacción coagulasa (CRF) para formar un complejo que, a su vez, reacciona con el fibrinógeno para formar fibrina (formación del coágulo) (Koneman *et al.*, 2008).

3.8.2.5 Prueba de la termonucleasa

Prueba de la Desoxirribonucleasa (DNasa)

Algunas cepas de *S. aureus* pueden producir reacciones de coagulasa en tubo equívocas o débiles y los aislamientos raros pueden ser en efecto coagulasa negativos. En estos casos, puede ser útil realizar otras pruebas que se correlacionen bastante con la producción de coagulasa. *S. aureus* produce DNasa y una nucleasa termoestable que tienen actividades endonucleolíticas y exonucleolíticas (Langlois *et al.*, 1989). Ambas enzimas hidrolizan ácido nucleico (ácido desoxirribonucleico, DNA). La DNasa puede ser detectada por la inoculación en motas grandes de varias colonias del microorganismo en un medio de prueba DNasa que contenga el colorante metacromático azul de toluidina.

3.9 Pruebas confirmatorias adicionales

3.9.1 Prueba de oxidasa

La prueba de la oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor de hidrógeno final, produciendo a partir del hidrógeno agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana y su sistema enzimático.

3.9.2 Fermentación del Manitol

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las colonias sospechosas, se resiembran en un medio sin exceso de cloruro de sodio para posteriormente, realizar la prueba de la coagulasa. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol. Esta propiedad se utiliza en estudios epidemiológicos para detectar *S. aureus* en el suelo, heces y en la selección de portadores nasales del microorganismo (Koneman *et al.*, 2008).

3.10 Sistemas de identificación rápida

Para facilitar la identificación en el laboratorio de rutina o clínica, se han desarrollado equipos para la identificación rápida de especies por sistemas automatizados que requieren sólo unas pocas horas a un día para la realización de estas pruebas. La identificación de un número de la especie *Staphylococcus* se puede hacer con una precisión de 70 a 90% utilizando los sistemas comerciales (Kloos y Bannerman, 1994).

Desde su introducción, estos sistemas se han mejorado y ampliado para incluir más especies. Su fiabilidad seguirá aumentando como resultado de una creciente base de datos y la adición de las pruebas más exigentes. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* y *S. intermedius* se pueden identificar de manera fiable por la mayoría de los sistemas comerciales disponibles. Para algunos sistemas, la fiabilidad depende de las pruebas adicionales según lo sugerido por el fabricante, existen kits comerciales miniaturizados para la identificación de *S. aureus*: Medio rápido Kit API Rapidec Staph. Se basa en la detección de la enzima coagulasa

preformada y permite la detección de *S. aureus* y otras especies en 2 horas; Kit API Staph Ident (diferencia *S. aureus* de *S. hyicus*); ATB 32 Staph. Este sistema sirve para la identificación completa de especies de *Staphylococcus*, se basa en pruebas convencionales, o bien, en pruebas convencionales y en la determinación de enzimas específicas. El sistema ATB 32 Staph identifica totalmente gran número de especies de *Staphylococcus* y *Micrococcus*. Los resultados se obtienen después de 24 horas de incubación; Staphilase (detecta el factor de coagulación). Se utilizan en la prueba partículas de látex coloreadas, que ayudan al reconocimiento de las cepas coagulasa positivas. El kit lleva un control coagulasa negativo; Staphaurex (detecta la coagulación y la proteína A). La prueba se hace sobre una plantilla especial que permite reconocer fácilmente reacciones positivas y negativas; El sistema Vitek® es un sistema rápido y automatizado diseñado por bioMerieux para la identificación de distintos grupos de bacterias y levaduras. El sistema consta de las tarjetas bioquímicas (GPI) y de un complejo equipo informático. Este incluye un módulo de llenado a vacío de las tarjetas, un incubador-lector, una computadora que utiliza un software que analiza los datos obtenidos y una impresora. La tarjeta se llena automáticamente por un sistema de vacío a partir de una suspensión del medio de cultivo puro con solución salina al 0.45%, la turbidez que se debe obtener está indicada en el colorímetro según el microorganismo a determinar (GPI o GNI). Se deposita el tubo en una gradilla especial que viene adaptada para colocar también la tarjeta. Mediante un tubo de transferencia se conectan la gradilla y el tubo. Se introduce todo en una cámara que aplica vacío a través de la plaquita, ésta capta la suspensión de las células, se tiene que comprobar que los pocillos están perfectamente llenos y sin burbujas. Este proceso tarda alrededor de un minuto. Una vez llena la tarjeta, la incubación normalmente se realiza a 35 °C durante 6 a 8 horas. Se han descrito otros métodos alternativos para la identificación de *S. aureus* (Isigidi *et al.*, 1989).

3.11 Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas

Las enterotoxinas estafilocócicas son metabolitos excretados en el medio de cultivo, alimentos u otro medio en el transcurso del crecimiento de *S. aureus* enterotoxigénico. Una misma cepa puede producir, simultáneamente, 2 a 3 tipos de toxina. Las enterotoxinas de *S. aureus* son un grupo heterogéneo de proteínas globulares de cadena simple. Son

termoestables, solubles en agua y con un peso molecular que oscila entre 28,000 y 35,000 daltons. Se reconocen actualmente 9 enterotoxinas estafilocócicas serológicamente distintas: A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, F y G. Se identifican cada una de ellas en contacto con sus anticuerpos correspondientes. Las enterotoxinas estafilocócicas se caracterizan por ser altamente resistentes al calor y a los rayos gamma. A 121 °C se destruyen en el transcurso de 5 a 10 minutos y perduran durante horas a 80° C. Su termorresistencia varía en función del serotipo, grado de pureza, concentración y naturaleza del medio, principalmente. A veces, las enterotoxinas no se inactivan completamente en condiciones normales de cocción o pasteurización en prácticas culinarias.

Se ha indicado que son producidas por el organismo por lo menos en dos formas diferentes. La producción de los tipos B y C se halla bajo control plasmídico/cromosómico y son producidas principalmente al final de la fase estacionaria del crecimiento como metabolitos secundarios; los tipos A y E se hallan bajo control cromosómico (el tipo D bajo control plasmídico) y son producidos durante toda la fase logarítmica del crecimiento (Bergdoll, 1979; ICMSF, 1998).

Estas diferencias están reflejadas en la formación de los diferentes tipos en los alimentos. La mayoría de los brotes de intoxicación alimentaria implican a las enterotoxinas A y D, que se forman en los alimentos en una gama de valores de pH, Aw y de Eh mucho más amplia, por ejemplo, que la correspondiente a las enterotoxinas B y C. Los biotipos humanos de *Staphylococcus aureus* producen enterotoxinas más frecuentemente que los biotipos aviares y que los biotipos animales (Isigidi *et al.*, 1992; ICMSF, 1998).

Por lo que se refiere a la incidencia de la enterotoxigenicidad, el 75% de las cepas humanas de *S. aureus* estudiadas por Hajek y Marsalek y el 28% de las aisladas de animales domésticos, producían los tipos A, B, C de enterotoxina. Este porcentaje contrasta con sólo el 1.2% de 490 aislamientos que pertenecían a otros tipos animales de *S. aureus*. Esto parece indicar que las cepas de *S. aureus* que proceden de fuentes humanas producen las enterotoxinas A, B o C con mayor frecuencia que las cepas patógenas para animales. Sin embargo, a la hora de interpretar estos datos, se requiere

cautela. Muchas cepas de *S. aureus* producen más de un tipo de enterotoxina. Con todo, todavía está pendiente la atribución de la producción de las enterotoxinas D, E, F y G a los biotipos humanos y animales (Mossel *et al.*, 2003).

Las cepas de *S. aureus* de origen humano producen enterotoxina A más frecuentemente. Tales estafilococos también son las causas predominantes de la estafiloenterotoxicosis humana. Wienecke averiguó en 1974 que las enterotoxinas producidas más frecuentemente por 120 cepas asociadas con brotes de intoxicación alimentaria eran de los tipos A (73%), D (40%), C (15%) y B (1.7%). Otras razones de esta elevada incidencia de las toxinas A y D son el hecho de que son producidas bajo una serie más amplia de condiciones intrínsecas y extrínsecas y también el de que en el ciclo de crecimiento son producidas antes que las demás toxinas.

La originalmente descrita enterotoxina F ha sido identificada como la toxina productora del síndrome de shock tóxico (TSST-1) en mujeres y en ocasiones en hombres. Se trata de una enfermedad multisistémica caracterizada por el comienzo súbito de fiebre, vómitos y diarreas, hipotensión, enrojecimiento conjuntival, "lengua de fresa" y exantema (con posterior descamación). Investigaciones actuales indican que la producción de TSST-1, elaboradas por cepas de *S. aureus*, mantiene una relación directa con algunos serotipos toxigénicos que provocan brotes de intoxicación alimentaria, en estudios que se han realizado en cepas aisladas en humanos, alimentos y animales domésticos. Los alimentos más asociados con los brotes de intoxicación alimentaria son las ensaladas frías, productos avícolas (principalmente ensalada de pollo), dulces de crema, productos lácteos (principalmente quesos) y el jamón sobre todo el cocido o alimentos elaborados con éste (Bécquer *et al.*, 1996).

La cantidad de toxina que causa la enfermedad depende del peso y de la sensibilidad individual, pero generalmente se coincide en que 0,1 a 1 µg/kg causará la enfermedad en una persona (Everson *et al.*, 1988). En los animales, la exposición reiterada a un determinado tipo antigénico de toxina origina un aumento de la tolerancia (ICMSF, 1998). Las enterotoxinas se diferencian entre sí por las siguientes propiedades químicas y

físicas: a) peso molecular; b) punto isoeléctrico; c) coeficiente de extinción; d) coeficientes de sedimentación y difusión; e) viscosidad, y f) densidad. Los pesos moleculares oscilan entre 28,000 y 35,000 daltons (27,800 para la enterotoxina A y 34,100 de la C₁). Los puntos isoeléctricos oscilan entre 7.0 a 8.6. Los aminoácidos principales son: Lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, tirosina. Las enterotoxinas B y C también contienen metionina (Marth, 1969).

3.11.1 Inactivación

Las enterotoxinas son extraordinariamente resistentes al calor y también a la irradiación γ . Los valores D para la destrucción térmica dependen del tipo de toxina y de las condiciones de la prueba, variando desde aproximadamente 5-10 minutos a 121 °C hasta varias horas de 80-100 °C. La inactivación de las enterotoxinas por el calor representada gráficamente como valores D en función de la temperatura de calentamiento muestra un modelo de curva campaniforme. Este comportamiento se interpreta como el efecto de la agregación de enterotoxina, especialmente de 79-80 °C, que es reversible a temperaturas más elevadas. La resistencia de las enterotoxinas a valores ácidos del pH es menor que a valores neutros. Con respecto a la transradiación γ , en diversos alimentos han sido determinados valores de D de 27 a 93 kGy (Mossel *et al.*, 2003).

3.11.2 Actividad biológica

A diferencia de las enterotoxinas producidas por *V. cholerae*, *E. coli* y *Clostridium perfringens*, las enterotoxinas estafilocócicas no actúan directamente sobre el revestimiento del tracto intestinal. No causan acumulación de líquido en las asas intestinales ligadas. Su acción se ejerce sobre el sistema nervioso central, activando los centros del vómito en el cerebro. Se dispone de pocos resultados cuantitativos acerca de la dosis mínima necesaria para desencadenar los síntomas de la intoxicación alimentaria en las personas. Un estudio extenso realizado en América obtuvo un valor correspondiente a la dosis emética₅₀ de 0.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal humano para las enterotoxinas A, B y C. A partir de estos datos, se puede deducir que una persona adulta tendría que ingerir aproximadamente 10-20 μg de enterotoxina para padecer los síntomas de la intoxicación alimentaria. Muchos autores consideran que esta dosis es excesivamente elevada; con base a los estudios epidemiológicos, es posible que una dosis tan insignificante como 1 μg

de enterotoxina pueda causar los síntomas de la intoxicación en los individuos sensibles (Mossel *et al.*, 2003).

3.12 Prevención de la intoxicación estafilocócica

La mayoría de los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica son producidos por carnes cocidas frías, especialmente la de las aves, los lácteos como en los quesos y productos cárnicos curados como el jamón cocido. Los alimentos implicados a veces incluyen productos tales como los pasteles rellenos de nata, alimentos marinos (camarones) y, menos frecuentemente, conservas vegetales y de pescado, éstas contaminadas por la manipulación, a través de las microfugas u orificios existentes en las latas.

Existen muy buenas razones de por qué la intoxicación alimentaria estafilocócica implica principalmente a estos tipos de productos. En primer lugar, porque generalmente sólo contienen un número escaso de otros microorganismos contaminantes. En este caso, *S. aureus* es capaz de crecer rápidamente, por no ser inhibido por microorganismos antagonistas, a los que es muy sensible, y de alcanzar niveles tóxicos antes de que tenga lugar la alteración. En segundo lugar, la A_w de muchos de los productos implicados es suficientemente reducida como para impedir el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas y de algunas Gram positivas, eliminando aún más o reduciendo la competencia. En tercer lugar, es posible que la mayoría de estos alimentos sean manipulados antes de ser servidos, con lo que se contamina el alimento que, es posible que después se deje a temperaturas ambientales durante algunas horas antes de ser consumido permitiendo con ello que tenga lugar la multiplicación de los microorganismos y la formación de las toxinas.

Los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica por productos cárnicos fermentados (salami, chorizo y otros embutidos) se presentan como resultado del crecimiento de estafilococos enterotoxigénicos en la masa sin embutir o ya embutida; éstos producen enterotoxinas antes de que el pH de la carne baje suficientemente como consecuencia de la fermentación láctica, de la que es responsable la propia flora láctica de la carne o la constituida por los cultivos iniciadores añadidos. El *S. aureus* es, a veces,

causa de un importante problema si la fermentación inicial no ha sido correcta, el *S. aureus* desaparece totalmente de los productos cárnicos fermentados durante la fase de maduración, pero su ausencia o presencia en escaso número en el producto terminado no significa seguridad si ha fallado de algún modo la fermentación. Es aconsejable que la industria realice en embutidos fermentados acabados la prueba de termonucleasa (TNasa) para determinar la posible presencia de enterotoxinas. En carnes cocidas se puede encontrar *S. aureus* en pequeño número ($1 \times 10^2/g$). Niveles más altos indican una manipulación posterior a su elaboración poco cuidadosa, o que el control de refrigeración ha sido inadecuado. Estas carnes (jamón cocido, pollo asado, etc.) consumidas en frío pueden ser causa de intoxicación estafilocócica que se suele desencadenar en pequeños brotes.

El *S. aureus* se puede aislar en escaso número en productos lácteos fermentados. La posible intoxicación estafilocócica está asociada solamente a algunos tipos de queso duro, como el cheddar y similares. En este tipo de queso, el drenaje del suero se realiza a una temperatura y un tiempo apropiados para el crecimiento del germen antes de someter al producto a salazón. Si existen *S. aureus*, cabe la posibilidad de que se multipliquen y, si es enterotoxigénico, que elabore toxinas. Algún caso de intoxicación estafilocócica por consumo de queso elaborado con leche pasteurizada, ha sido consecuencia del acantonamiento de *S. aureus* enterotoxigénico tipos A y D en las válvulas de la maquinaria utilizada en la elaboración del queso. Si se contamina el producto, se forma la toxina durante su maduración.

Las enterotoxinas estafilocócicas no son inactivadas por los tratamientos de la pasteurización comercial, esto es aplicable a algunos de los tratamientos que se utilizan para esterilizar productos enlatados, si la materia prima está colonizada intensamente por *S. aureus*. La mayoría de los casos de intoxicación alimentaria estafilocócica que implican a productos enlatados han sido consecuencia de la contaminación por fugas durante la manipulación después del tratamiento térmico y no como consecuencia de que la toxina haya permanecido activa a pesar del tratamiento aplicado.

La prevención de la intoxicación estafilocócica debe basarse en lo siguiente:

- uso de materias primas e ingredientes de buena calidad;
- higiene adecuada a lo largo de las líneas de tratamiento o procesado para evitar la contaminación;
- en alimentos crudos fermentados (embutidos y queso) el control se debe realizar en la fase de fermentación;
- cuando los productos no poseen las propiedades antimicrobianas intrínsecas adecuadas, evitar su colonización, manteniendo las temperaturas de los alimentos por debajo de 7 °C, ya que el *S. aureus* es un organismo termotrofo (Mossel *et al.*, 2003).

3.13 Ensayos para enterotoxinas

Hay varios procedimientos, como los ensayos con animales, inmunológicos, de biología molecular, etc; biosensores para detectar enterotoxinas estafilocócicas. La producción de enterotoxina necesita un largo tiempo de incubación (20 h). Algunos de los factores que afectan el período de incubación son el pH, la actividad del agua y los sustratos utilizados.

Métodos de amplificación de ADN (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) pueden mostrar la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica antes de la expresión de enterotoxinas en la base de las secuencias de genes específicos y de esta manera detectar la posible fuente de contaminación. La ventaja de los métodos de la PCR es que es capaz de detectar los genes que codifican la producción de enterotoxina estafilocócica también de un tratamiento térmico de los alimentos, porque el ADN se mantiene sin cambios (Tsen y Chen, 1992), (Holeckova *et al.*, 2002). Entre las pruebas serológicas utilizadas para la detección de enterotoxinas estafilocócicas durante años, han tenido preferencia las de gel difusión en agar, como el método microslide. Este procedimiento, además de no ser muy sensible (su sensibilidad es de 100 ng/ml de cultivo) tampoco es fácil de ejecutar. La sensibilidad en alimentos es de 5 ng/g, cantidad escasa para la detección de enterotoxinas en estos productos. Otro inconveniente es que necesita una extracción a partir de una muestra importante de alimento (100 g). Las técnicas de

aglutinación látex detectan entre 0.1-10 ng de enterotoxina en 1 ml de extracto de alimento (Rose *et al.*, 1989). Son más fáciles de usar que los métodos ELISA, pero menos sensibles. Ambos métodos, ELISA y Látex, son apropiados en la rutina de laboratorio; no obstante, hay que tener en cuenta que, aun con el más desarrollado ELISA, pueden aparecer algunos falsos positivos y negativos (Park *et al.*, 1992; Becker, 1994).

Numerosos métodos se basan en la evidencia de las enterotoxinas directamente en el alimento (ELISA, aglutinación en látex inversión pasiva y otros), con la posibilidad de detectar cantidades en nanogramos de enterotoxinas en un gramo o en un mililitro de alimento (Sharma *et al.*, 2000); (Burdova *et al.*, 1994); (Gouloumes *et al.*, 1996); (Strachan *et al.*, 1997). Los kits ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) basados para la detección de enterotoxinas estafilocócicas están comercialmente disponibles. Todos los kits son capaces de detectar SEA, SEB, SEC, SED, y ver en los niveles de menos de 1 ng/g de alimento.

En el método OSP (Optimum Sensivity Plates) se usan filtrados del cultivo que se va a probar para ver si existen enterotoxinas cuando se les enfrenta con enterotoxinas estándar. Se trata de una reacción de precipitación y su sensibilidad es de 100 ng/ml. Es una modificación del método original de gel difusión. La técnica de aglutinación RPHA (Reversed Passive Haemagglutination) se ha utilizado también para la detección de enterotoxinas estafilocócicas, no obstante, algunos autores han encontrado en ella mucha menos sensibilidad que la que se consideraba que tenía en un principio y, por otra parte, produce un alto nivel de reacciones cruzadas no específicas. La RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) ha sustituido a la anterior. Su sensibilidad es de 0.25 ng/ml. Los resultados se obtienen a las 16 horas. Para realizar esta prueba existe un kit comercial: Denka-Serken; Unipath. Su sensibilidad es análoga a ELISA y RIA. Da falsos positivos. Se necesita partir de un extracto del alimento. A pesar de la buena aceptación del kit comercial utilizado para el método RPLA, la mayoría de los esfuerzos han derivado hacia las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA), que se consideran fáciles y de alta sensibilidad y especificidad. Existen kits comerciales para la detección de enterotoxinas estafilocócicas basados en pruebas enzimoimmunoensayo (ELISA): Polystyrene Ball Assay

(Laboratory Diagnostic, Dr. W. Bommeli); Ensayo en placa minititer de TECRA. El último método citado es más sencillo y los resultados se pueden leer visualmente; se detectan 0.1 ng/g en alimentos en 48 horas y 0.3 ng/ml en cultivos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* y enterotoxina “A” en quesos frescos elaborados en diferentes jurisdicciones sanitarias en el Estado de Hidalgo.

4.2 Objetivos Específicos

- Aislar *S. aureus* de quesos frescos elaborados en el Estado de Hidalgo, así como identificar esta bacteria por medio de pruebas bioquímicas tradicionales y mediante el sistema de identificación microbiana Vitek®.
- Identificar la presencia de enterotoxina “A” por medio de la técnica de inmunoensayo visual “TECRA®” y por la presencia del gen que codifica para la enterotoxina “A” por medio de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Toma de muestras

Se analizaron 159 muestras de quesos frescos elaborados en el estado de Hidalgo. Estas muestras analizadas se obtuvieron del LESP, las cuales provienen de diferentes jurisdicciones sanitarias como son; Pachuca, Tulancingo, Tula, Huichapan, Zimapan, Ixmiquilpan, Meztlán, Molango, Huejutla, Apan, Tizayuca y Tepehua, de acuerdo al muestreo que realiza dicha dependencia. Se seleccionaron 30 muestras de queso con presencia de presuntos de *Staphylococcus aureus* como lo establece la NOM-115-SSA1-1994 posteriormente se seleccionaron 60 cepas para realizar la pruebas de identificación bioquímica y presencia de enterotoxina "A".

5.2 Análisis microbiológicos

5.2.1 Preparación de la muestra

En el área de trabajo de Microbiología de Agua y Alimentos del LESP bajo un ambiente estéril, se pesaron 10 g de cada muestra de queso fresco en una bolsa estéril para Stomacher (Nasco) en la cual se adicionó 90 ml de solución reguladora de fosfatos (Reproquifin) y se llevó al homogeneizador Stomacher-400 circulator (Seward) por 2 minutos a una velocidad media; la cual formaba la dilución 10^{-1} . Después se realizaron diluciones seriadas tomando 10 ml de la bolsa y se depositó en frasco de vidrio que contenía 90 ml de solución reguladora de fosfatos. Este paso se repitió hasta la dilución 10^4 como lo menciona la norma NOM-110-SSA1-1994.

5.2.2 Determinación de *Staphylococcus aureus*

Para el conteo y aislamiento de *S. aureus* se utilizó agar Baird Parker (Bioxon), para lo cual se utilizaron cuatro placas con agar por muestra, identificadas con número y dilución correspondiente, a partir de cada dilución se depositó el inoculó de 0.1ml en el agar por cada una de las diluciones realizadas por muestra, se distribuyó sobre la superficie del agar con varillas de vidrio esteriles en forma “L” utilizando una para cada placa, se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

Posteriormente, se seleccionaron placas que tuvieran colonias típicas de *S. aureus*, que presentarán una coloración negra, circulares, brillantes, convexas, lisas con diámetro de 1 a 2 mm, con presencia de una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia. De acuerdo a la tabla 3 mencionada en la NOM-115-SSA1-1994, se seleccionaron el número correspondiente según al conteo inicial de cada caja, estas colonias características de *S. aureus* se sembraron por método de estría en agar BHI (Oxoid) y se incubaron a 37 °C de 18 a 24 horas, para realizar posteriormente las pruebas de precaracterización.

Tabla 3. Forma de selección de colonias de acuerdo a la NOM-115-SSA1-1994 a partir de agar Baird Parker.

No. de colonias sospechosas en placa	No. de colonias por probar
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

Las colonias seleccionadas, se sembraron en tubos de 13 x 100 con 1 ml de caldo BHI (Fluka) e incubaron a 35 °C durante 24 horas. Después de este período de incubación con una pipeta de 1 ml se pasó 0.3 ml de cada cultivo a un tubo estéril de 13 x 100 para la prueba de termonucleasa y en otro tubo de 13 x 100 estéril 0.2 ml de cada cultivo para la prueba de coagulasa. Con el fin de realizar la identificación de la especie de *S. aureus*.

5.2.3 Prueba de coagulasa

Los tubos que contenían 0.2 ml del cultivo anterior se agregó 0.2 ml de plasma de conejo (Microlab) diluido 1:1 v/v con solución salina estéril al 0.85% a cada uno. Se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 24 horas y se observó si existía formación del coágulo considerando como prueba positiva, si no hay formación de éste, como prueba negativa.

5.2.4 Prueba de termonucleasa

Los tubos que contenían 0.3 ml del cultivo de BHI se calentaron durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo, se preparó una laminilla con medio para DNasa que contiene colorante azul de toluidina (Sigma), con la punta de una pipeta Pasteur limpia y estéril se hicieron orificios sobre el agar, se adicionó una gota de cada uno de los cultivos, se incubó a 37 °C en cámara húmeda durante 24 horas, la aparición de un halo de color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se consideró prueba positiva.

Apartir del crecimiento bacteriano de agar BHI se realizaron las pruebas de precaracterización siguientes:

5.2.5 Tinción de Gram

De las colonias sospechosas aisladas en el medio, se realizó la identificación de morfología microscópica por tinción de Gram como lo describe (Harrigan y McCance, 1979), con el fin de identificar si las bacterias eran Gram positivas o Gram negativas.

De cada una de las colonias se tomó con una asa bacteriológica y se colocó en un portaobjetos limpio con una gota de agua destilada, se mezcló y dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se fijó con calor, se cubrió con colorante de violeta de Genciana (Hycel) durante 1 min, se escurrió el colorante, y sin enjuagar se cubrió con solución Gram yodo (Hycel) durante 1 min se lavó con una mezcla de alcohol-acetona (Hycel) hasta decolorar y se escurrió, posteriormente se cubrió con colorante de safranina (Hycel) durante 1 min, se enjuagó con agua repetidas veces hasta que no se observaron restos de

colorante y se dejó secar a temperatura ambiente, la preparación se observó en un microscopio óptico marca Leitz con el objetivo 100X utilizando aceite de inmersión.

5.2.6 Prueba de la catalasa

Se realizó prueba de catalasa a temperatura ambiente con el método del portaobjetos procedimiento (Harrigan y McCance, 1979); con la punta del asa bacteriológica se tomó del centro de una colonia pura de 18 a 24 horas y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio, agregando una gota de H₂O₂ al 30%, la liberación de gas en forma de burbujas que se observa de manera inmediata se considera como una prueba positiva.

5.2.7 Prueba de la oxidasa

La prueba de oxidasa (BBL Dry Slide) es un procedimiento cualitativo para determinar la presencia o ausencia de la actividad de la citocromo C oxidasa en bacterias. Esta actividad depende de la presencia de un sistema intracelular de citocromo oxidasa que cataliza la oxidación de citocromo C por el oxígeno molecular, que entonces actúa como el aceptor terminal de electrones del sistema de transporte de electrones del organismo.

Los organismos que contienen citocromo C en la cadena respiratoria son oxidasa positivos y cambian el color del reactivo a morado; los organismos que no contienen citocromo C en la cadena respiratoria no producen la oxidación del reactivo y no cambian el color del reactivo dentro de los límites temporales de la prueba, siendo oxidasa negativa.

Se realizó la prueba de oxidasa (BBL Dry Slide) en un portaobjetos desechable que tiene zonas de reacción de papel filtro que contiene N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamino dihidrocloruro y ácido ascórbico como agente reductor y estabilizante. De la colonia pura antes mencionada se tomó una asada que se extendió en la zona de reacción del BBL Dry Slide sobre un círculo de 3-4 mm de diámetro, la ausencia de cambio de color se considera como prueba negativa.

5.3 Identificación de microorganismos por el sistema Vitek®

Del cultivo puro de las cepas aisladas sospechosas de ser *Staphylococcus* (cocos Gram-positivas, catalasa, coagulasa y termonucleasas positivas, citocromo oxidasa negativas) se caracterizaron a nivel de especie en el equipo sistema Vitek® semiautomatizado con una tarjeta Vitek® GPI (1305 bioMérieux® S.A., F), tarjeta recomendada para bacterias Gram positivas, en las cuales se incluyen ciertas pruebas bioquímicas para su identificación como son; BAC, Bacitracina; OPT, Optoquina; HCS, Hemicelulosa; 6NC, Cloruro de sodio al 6%; 10B, 10% Bilis; 40B, 40% Bilis; ESC, Esculina; ARG, Arginina; URE, Urea; TZR, Rojo de tetrazolium; NOV, Novobiocina; DEX, Dextrosa; LAC, Lactosa; MAN, Manitol; RAF, Rafinosa; SAL, Salicina; SOR, Sorbitol; SUC, Sacarosa; TRE, Trehalosa; ARA, Arabinosa; PYR, Piruvato; PUL, Pullulan; INU, Inulina; MEL, Melibiosa; MLZ, Melezitosa; CEL, Celobiosa; RIB, Ribosa; XYL, Xilosa.

El informe de resultados que el equipo realiza sobre las pruebas bioquímicas, incluye un porcentaje de proximidad con las especies más cercanas, en el caso de que la identificación no haya sido posible, puede recomendar la realización de alguna prueba adicional.

5.4 Detección de toxinas estafilocócicas

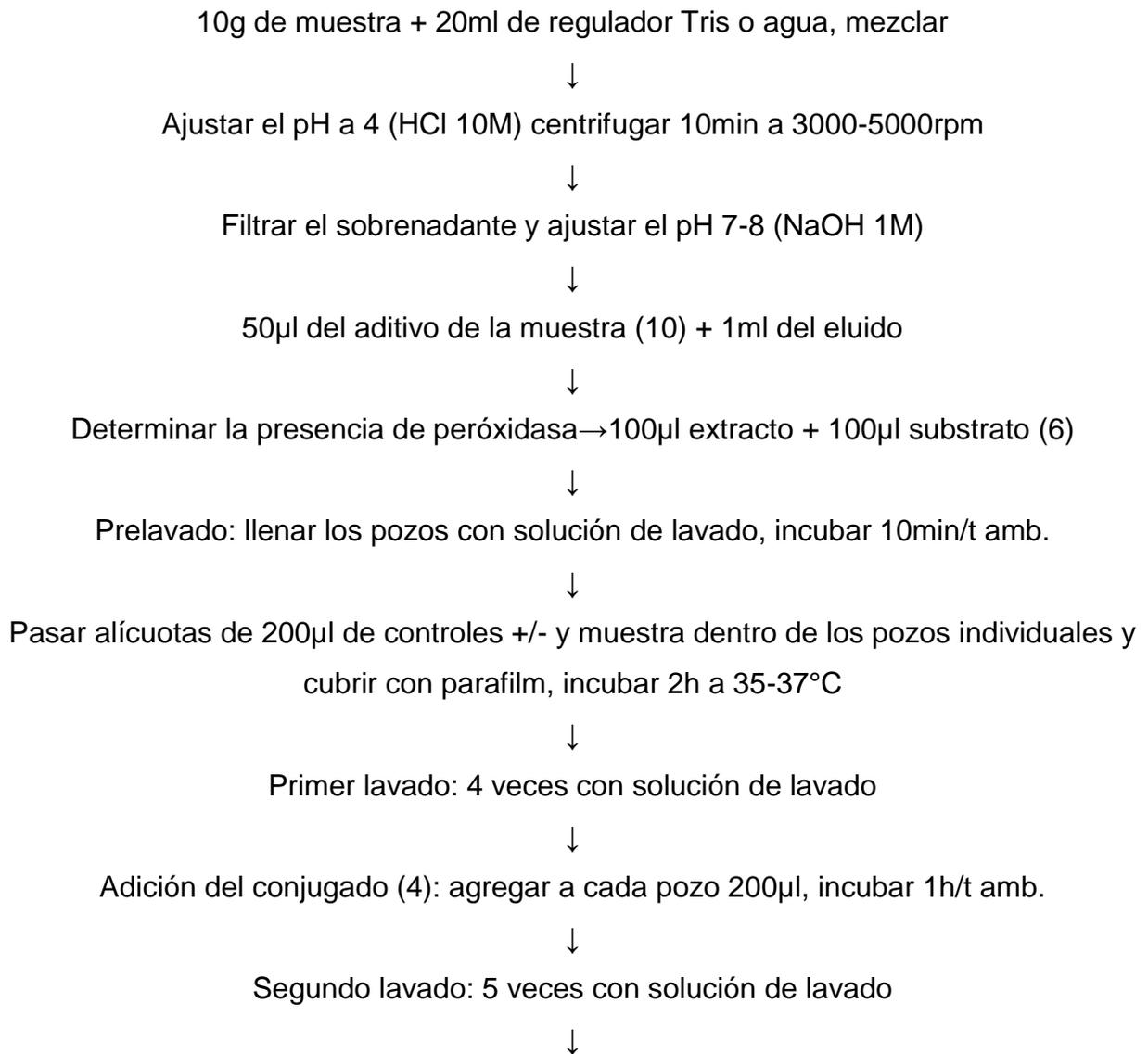
La presencia de enterotoxinas en los alimentos se determinó mediante técnicas inmunológicas y técnicas moleculares.

5.4.1 Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas más utilizadas para la detección de presencia de enterotoxinas producidas por *S. aureus* son las técnicas ELISA y la técnica de aglutinación con partículas de látex, que es capaz de detectar 0.1-10 ng de enterotoxina en 1 ml de extracto del alimento (ICMSF, 1998). Aunque la prueba de ELISA es más sensible que la prueba con partículas látex son de ejecución menos fácil.

Se realizó un estudio de inmunoensayo visual de enterotoxina estafilocócica de acuerdo a la NOM-184-SSA1-2002 por el método de ELISA (Tecra®) y se llevó a cabo de acuerdo al siguiente diagrama de flujo (Figura 1).

Los resultados pueden leerse visualmente usando la Tarjeta de Colores provista (Anexo) o un lector de placas.



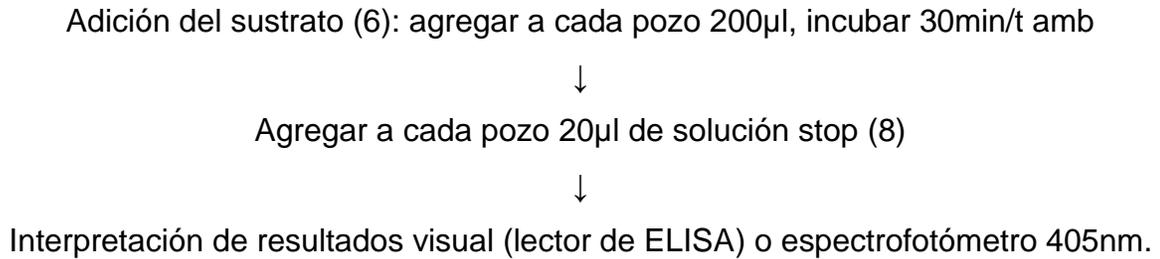


Figura 1. Diagrama de flujo para detección de presencia de enterotoxina “A” de *S. aureus* por la técnica ELISA.

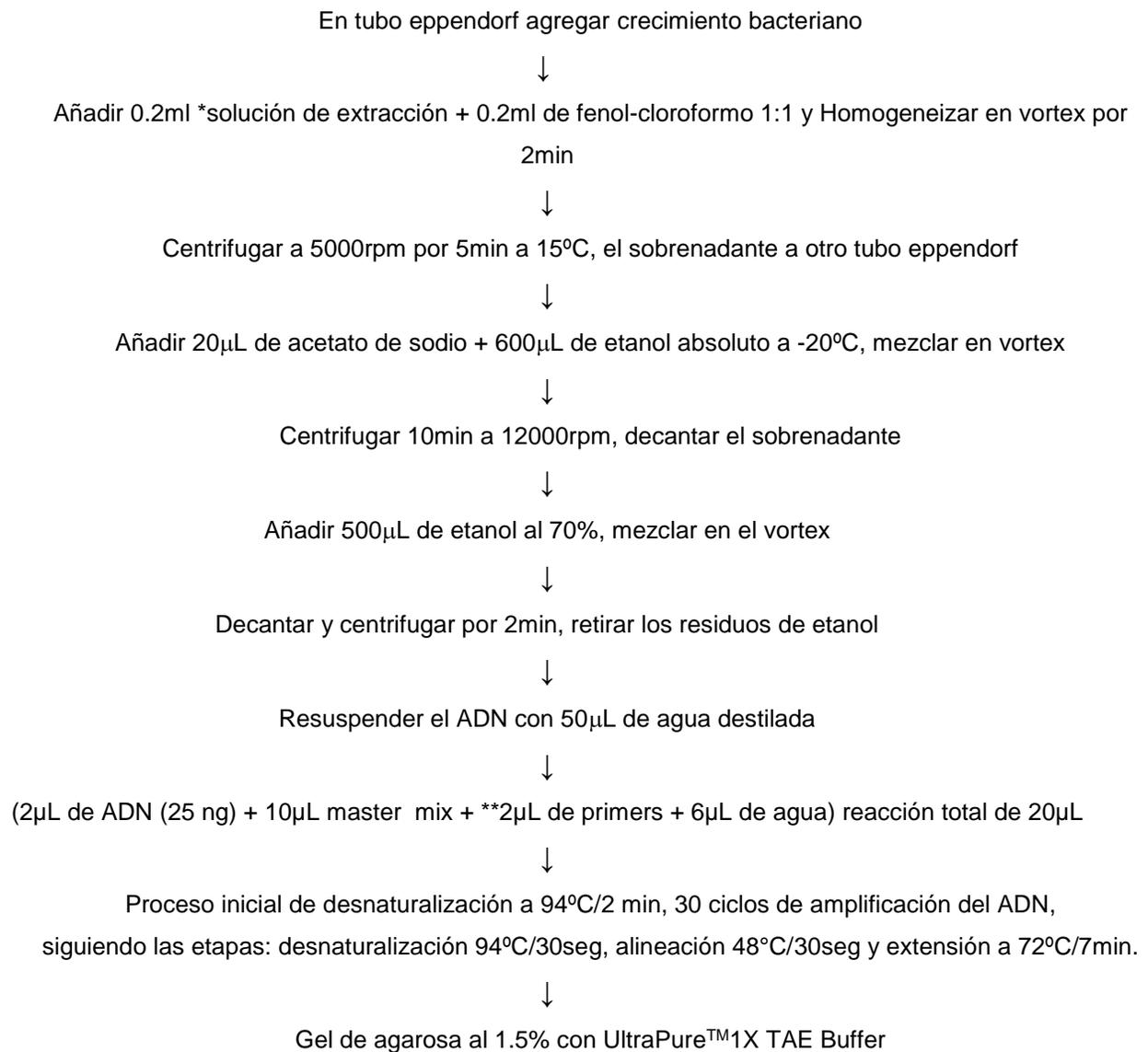
5.4.2 Técnicas moleculares

Una de las técnicas moleculares para la detección de las enterotoxinas producidas por *S. aureus* es la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La cuál fue utilizada para detectar el gen *sea* que codifica la producción de enterotoxina “A”, esta ha sido descrita por diversos autores (Betley y Mekalanos, 1988; Bohach y Schlievert, 1987; Bayles y landolo, 1989; Couch *et al.*, 1988; Munson *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1998).

Presencia de enterotoxina “A” por la tecnica de PCR

La extracción ADN se realizó a partir del crecimiento bacteriano en agar BHI siguiendo las recomendaciones de Hoffman y Winston (1987), la preparación, condiciones y visualización de los fragmentos de ADN para la PCR se muestran en la figura 2.

La Cepa de trabajo utilizada fue: del género ***Staphylococcus*** especie ***aureus*** **ATCC 25923**



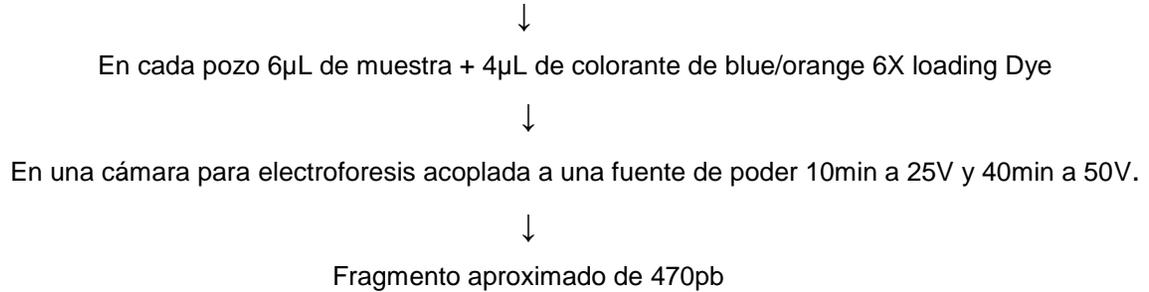


Figura 2. Diagrama de flujo para detección de presencia de la enterotoxina “A” por la técnica PCR.

* (NaCl 100mM, EDTA 1mM, Tris 10mM pH 8.0, SDS 1%, Tritón 2%)

** SEAF 5'(TAA GGG AGG TGG ATA TAA TGA GTT)3', SEAR 3'(AGG GCA ATG AAT AAA AGT AAT GTA A)5' que se encuentran en el gen SEA que codifica la producción de enterotoxina “A”.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *Staphylococcus aureus* está relacionado en intoxicación alimentaria por su habilidad de producir gran variedad de toxinas extracelulares Borges *et al.*, (2008). Dinges *et al.*, (2000) mencionan que las exotoxinas de *S. aureus* cuando son ingeridas con el alimento pueden provocar náuseas, vómitos y calambres abdominales en aproximadamente 4 horas después de la ingestión de los alimentos. Considerando que las enterotoxinas estafilocócicas son importantes por ser los principales agentes de intoxicación de origen bacteriana para el hombre por lo que su detección es esencial para un diagnostico preciso y vigilancia de los alimentos Fueyo, (2005).

6.1 Recuentos de muestras analizadas en diferentes jurisdicciones sanitarias del Estado de Hidalgo.

En la tabla 4, se indica la procedencia de cada una de las diferentes muestras analizadas, así como el promedio de unidades formadoras de colonias de *S. aureus* obtenidas de agar Baird Parker.

De los quesos aislados de las diversas jurisdicciones antes mencionadas se obtuvieron cultivos positivos en casi todas las jurisdicciones con excepción de Meztitlán, Apan y Tepehua, las jurisdicciones con mayor frecuencia relativa de aislamientos que

alcanzó hasta un 50% fue Huejutla, en donde se obtuvo un aislamiento promedio de 6.28 ufc/g de queso analizado, esta alta incidencia podría ser debido a que generalmente no se emplean buenas practicas de fabricación y en esta zona las condiciones medio ambientales se caracterizan por temperaturas altas lo cual favorece el crecimiento de este microorganismo y la producción de enterotoxinas. Díaz y Gonzalez, (2001) mencionan que en Venezuela, el queso blanco fresco es uno de los alimentos de mayor consumo, encontrándose una cantidad importante del producto comercializado en el mercado, procedente de pequeños productores, quienes sin preparación técnica alguna, se aventuran a realizar esta actividad, es probable que estas condiciones imperen en la jurisdicción sanitaria de Huejutla. Entre los errores que se cometen, destacan el empleo de materia prima inadecuada y sin ningún tratamiento de higienización, condiciones sanitarias inapropiadas durante el proceso, deficiente refrigeración en el producto terminado, y ausencia de un empaque acorde. Simeão do Carmo *et al.*, (2002) mencionan que en Minas Gerais, Brasil, el análisis de quesos y leche no pasteurizada en un brote de *S. aureus* mostró que estaba presente en 2.4×10^3 – $> 2.0 \times 10^8$ ufc/g y además producían enterotoxinas. Parrilla *et al.*, (1993) mencionan que en México se ha reportado como agente causal al *S. aureus* en el 45% de los brotes lo cual ocasionó 792 casos y 5 defunciones. Los alimentos que actuaron como vehículo fueron básicamente productos lácteos (11 quesos, 4 leche). El tipo de toxina que se encontró frecuentemente fue la "A" (38.5%). En el 35% de los incidentes no se identificó la toxina. Márquez y García, (2007) señalan que el 48% de las muestras en quesos telita elaborados en los estados venezolanos Aragua y Miranda presentaron niveles mayores a 10^5 ufc/g de *S. aureus*. Así mismo, los más altos niveles ($> 10^7$ ufc/g) se encontraron en 44 y 64% de las muestras provenientes de los estados Bolívar y Guárico, respectivamente. Lo cual pudo deberse posiblemente a una mala manipulación, este tipo de queso fresco es considerado como un producto de riesgo alimentario debido a sus características intrínsecas, así como también, a que se elabora sin ningún tratamiento térmico previo, lo que facilita el crecimiento de microorganismos patógenos como el *S. aureus* a niveles que permiten la formación de enterotoxinas.

Tabla 4.- Recuentos de *S. aureus* en diversos quesos elaborados en diferentes jurisdicciones sanitarias en el Estado de Hidalgo.

Jurisdicción Sanitaria	No. de muestras analizadas	Frecuencia relativa		Recuento de muestras positivas log ufc/g
		<100 ufc/g	>100 ufc/g	
Pachuca	26	84.61	15.38	4.00
Tulancingo	36	83.33	16.66	5.578
Tula	7	71.42	28.57	4.301
Huichapan	24	95.83	4.16	5.041
Zimapan	7	85.71	14.28	5.913
Ixmiquilpan	9	77.77	22.22	5.847
Actopan	6	66.66	33.33	4.115
Meztitlán	3	100	0	
Molango	6	50	50	4.884
Huejutla	24	45.83	54.16	6.278
Apan	2	100	0	
Tizayuca	3	66.66	33.33	4.041
Tepehua	4	100	0	
Otro	2	50	50	
Total	159			

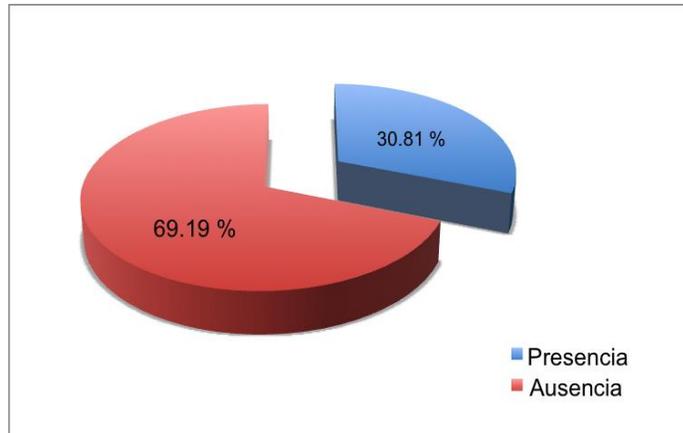


Figura 3. Prevalencia de *S. aureus* en quesos frescos en el Estado de Hidalgo.

En la figura 3 se muestra el porcentaje de aislamiento de *S. aureus* en quesos frescos provenientes de diversas jurisdicciones sanitarias en el Estado de Hidalgo. El 30.81% de las muestras analizadas fueron positivas a este microorganismo. Borbolla *et al.*, (2004) reportan una prevalencia en el Estado de Tabasco para esta bacteria del 11% en alimentos para consumo humano, de las cuales 27 muestras fueron de diferentes tipos de queso. Vanegas *et al.*, (2008) encontraron que las 13 muestras de quesos distribuidos en tiendas, plazas de mercado y ventas callejeras todas presentaron *S. aureus* coagulasa positivo y enterotoxigénicas debido a que se encontró la presencia del gen que codifica para la enterotoxina "A". Vasek *et al.*, (2004) mencionan que *Estafilococos* coagulasa positiva se presentaron en el 37% de los quesos, y solamente en el 8%, los niveles fueron preocupantes ($>10^5$ ufc/g). Sin embargo, por el amplio rango de hallazgo (10^2 - 10^6 ufc/g), su origen tanto humano como animal (por ubres enfermas con mastitis subclínica) y su persistencia en quesos (Psoni *et al.*, 2003) no debería descartarse una concientización de los manipuladores durante la elaboración del producto. Lujan *et al.*, (2006) mencionan que de las 30 muestras analizadas en tres distritos de Lima-Perú, 24 (80%) presentaban conteos de *S. aureus* por encima de 10^2 ufc/g límite máximo establecido por la Norma Técnica Peruana (NTP) 202.087 para el queso fresco producido de manera artesanal se observó que el 53.3% de las muestras presentaba un valor $\geq 10^5$ ufc/g, así mismo el valor promedio de la carga bacteriana hallado fue de 3.5×10^5 ufc/g. La NTP establece requisitos microbiológicos no mayores de 10 a 10^2 ufc/g para *S. aureus*. Esto indica el alto grado de contaminación alcanzado por este alimento proveniente del contacto con la piel, boca y fosas nasales de quienes manipularon el alimento.

6.2 Recuentos de diferentes tipos de quesos frescos elaborados en el Estado de Hidalgo.

En este estudio, los quesos analizados son alimentos de amplio consumo en la población, que debido a la riqueza de sus nutrientes y consumo rápido se contaminan fácilmente con *S. aureus* generalmente debida a portadores durante el procesamiento o manipulación (Park *et al.*, 1994).

En la tabla 5, se muestra la distribución de aislamientos y cuentas de (ufc/g) de *S. aureus* por tipos de queso. De estos resultados queda claro que el queso tipo fresco tiene mayor promedio de recuento positivos (ufc/g) a *S. aureus* esto nos indica que la mayoría de las industrias no pasteurizan la leche para la elaboración del queso, práctica que de acuerdo con la NOM-121-1994 debería ser llevada a cabo.

Tabla 5.- Recuentos de *Staphylococcus aureus* en diferentes tipos de queso elaborados en el estado de Hidalgo.

Tipo de queso	No. de muestra	Frecuencia relativa		Recuento de muestras positivas (ufc/g)
		<100 ufc/g	>100 ufc/g	
aro	8	50	50	1395000
artesanal	1	100	0	0
asadero	1	100	0	0
botanero	3	100	0	0
canasto	26	92.3	7.69	220500
de cabra	12	91.66	8.33	110000
de vaca	1	100	0	0
doble crema	3	100	0	0
fresco	28	57.14	42.85	1578500
manchego	5	100	0	0
Oaxaca	55	70.9	29.09	283604.37
panela	12	91.66	8.33	11000
ranchero	3	100	0	0
sierra	1	100	0	0
Total	159			

La NOM-115-SSA1-1994. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, establece que los valores por arriba de 100 ufc/g se convierten en un riesgo para la salud de los consumidores, por lo que los quesos analizados mencionados en la tabla anterior frescos (1 600 000 ufc/g) y aro (50% aislamientos) se encuentran fuera de norma. Por su parte, Araya *et al.*, (2008) mencionan que en una evaluación bacteriológica en queso de cabra distribuidos en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica, el recuento de *S. aureus*, 3 (20%) de las muestras presentaron valores superiores a los permitidos por la norma, no obstante, estos valores no llegan al límite inferior necesario para la producción de enterotoxina. Díaz y Gonzalez, (2001) mencionan que en la determinación de *S. aureus* detectaron en 50 (69.44%) de las 72 muestras estudiadas, con un promedio de 1.5×10^5 ufc/g y un rango de < 100 a 5.0×10^6 ufc/g. El 41.67 % estuvo por encima de 10^3 y el 8.34% sobre 10^5 . Lo cual indica cargas de *S. aureus*, entre 100 000 y por encima de 1 000 000 ufc/g (8.34%), representan un peligro inminente para los consumidores, por tener mayor posibilidad de contener enterotoxinas, pues se ha corroborado que los alimentos implicados en intoxicaciones, contienen poblaciones elevadas del microorganismo. Delgado y Torres, (2003) mencionan que se analizó la carga microbiana en quesos frescos artesanales comercializados en Lima Perú, lo cual los resultados obtenidos del porcentaje de muestras que no cumplían con la norma, 53.4% tenían recuentos superiores a 10^5 ufc/g, lo que evidencian que los quesos comercializados en los mercados estudiados presentan condiciones higiénicas deficientes y no cumplen lo establecido en las normas y regulaciones sanitarias y esto podría implicar la posible presencia de enterotoxinas estafilocócicas capaces de provocar intoxicaciones alimentarias.

6.3 Pre-caracterización de bacterias aisladas en Baird Parker a partir de quesos frescos.

En la tabla 6, se pueden observar los resultados obtenidos para las pruebas preliminares de diferenciación de las bacterias aisladas en Baird Parker a partir de diferentes tipos de quesos frescos elaborados en el Estado de Hidalgo.

Se aislaron un total de 150 cepas de las cuales el 91%, 40%, 100%, 34%, 34% fueron cocos Gram positivas, catalasa positiva, oxidasa negativa, coagulasa y termonucleasa positiva respectivamente, por lo que sólo 60 de 150 cepas aisladas fueron sospechosas de ser *S. aureus* (bacteria cocos Gram positivos, catalasa positiva, oxidasa negativa, coagulasa y termonucleasa positiva), de estos aislamientos preliminares tenemos un 40% de cepas que posiblemente sean *S. aureus* de acuerdo a la descripción de Mac FADDIN, etc.

Tabla 6.- Pre-caracterización de bacterias aisladas en Baird Parker a partir de diversos quesos

	Frecuencias
Gram + cocos	136/150
Catalasa +	60/150
Oxidasa -	150/150
Coagulasa +	51/150
Termonucleasa +	51/150
Gram + cocos / Catalasa + / Oxidasa - / Coagulasa + / Termonucleasa +	50/150

Estas bacterias fueron utilizadas para las pruebas de identificación y especie, aproximadamente el 33% de las cepas estudiadas correspondieron a las características típicas de *Staphylococcus aureus* cocos Gram positivos, catalasa positiva, oxidasa negativa, coagulasa y termonucleasa positiva. Buchanan y Gibbons, (1974) menciona que el *S. aureus* tiene un diámetro de 0.8 a 1 micrómetro, aparece agrupado en racimos irregulares y a veces en pares o de uno en uno. Es una bacteria Gram positiva, excepto en cultivos de más de 48 horas, donde pueden aparecer cocos Gram negativos. Es inmóvil.

No produce esporas y a veces algunas cepas producen cápsula. El manual de bacteriología sistemática de *Bergey's* menciona que el género de *Staphylococcus* se subdividen en más de 23 especies y subespecies. Muchos de estos contaminan a los alimentos. Dentro de estas especies de *Staphylococcus* se pueden aislar coagulasa positiva y coagulasa negativa (enzima la cual se asocia con la producción de la toxina), son cocos Gram positivos, aislados en pares, o en racimos de uvas de tamaño variable. Catalasa positiva, oxidasa negativa, no forman esporas, son aerobios a anaerobios facultativos, no poseen cápsula, e inmóviles.

6.4 Identificación de *Staphylococcus aureus* por el sistema Vitek®.

En la tabla 7 se incluyen las pruebas de precaracterización requeridas antes de analizar las cepas por el sistema (morfología, catalasa, oxidasa así como la prueba específica importante para identificación de *S. aureus*; como es coagulasa), los resultados de identificación, % de especie, bionúmero, y una prueba también importante como es la fermentación del azúcar manitol.

Tabla 7. Pruebas complementarias para identificación, porcentaje, e identificación de género y especie de *Staphylococcus* por medio del sistema vitek®.

Especie	cocos Gram	Catalasa	Oxidasa	Coagulasa	Manitol	% de especies	Bionúmero
<i>S. cohnii</i>	Positivos	Positiva	Negativa	Negativa	Negativo	1.66	57123020040
<i>S. aureus</i>	Positivos	Positiva	Negativa	Positiva	Positivo	81.66	77017030041
<i>S. warneri</i>	Positivos	Positiva	Negativa	Negativa	Negativo	6.66	76731034040
<i>S. simulans</i>	Positivos	Positiva	Negativa	Negativa	Positivo	3.33	77537030040
<i>S. haemolyticus</i>	Positivos	Positiva	Negativa	Negativa	Positivo	1.66	76525020040
ND	Negativos	Positiva	Negativa	Negativa	Negativo	5	
ATCC 25923	Positivos	Positiva	Negativa	Positiva	Positivo	-	76135011041

Pruebas recomendadas por el proveedor para completar la identificación del sistema vitek®:

Probabilidad normalizada en porcentaje de la fiabilidad de identificación proporcionada por el sistema vitek®.

ND: No determinado (No identificado por el sistema vitek®).

Los *staphylococcus* deben ser diferenciados inicialmente por su morfología colonial (en este estudio el 95% de las cepas aisladas mostraron cocos Gram positivos, solo 3 cepas presentaron cocos Gram negativos la cual, no fueron identificados por el sistema vitek®), producción de diversas enzimas (catalasa +, oxidasa -, coagulasa +, en este caso las diferentes especies aisladas corresponden con las características mencionadas por la literatura, cabe mencionar que al *S. aureus* lo único que lo diferencia con otras especies es la coagulasa positiva), resistencia a ciertos antibioticos y la presencia de rutas metabólicas para la utilización de ciertos carbohidratos (manitol, existen especies en las cuales el 11 al 89% de las cepas dan reacción positiva como son; *S. aureus*, *S. simulans* y *S. haemolyticus*, el *S. cohnii* y *S. warneri* su reacción es variable) (Rojas, 2007).

Tabla 8. Perfiles bioquímicos de presuntas bacterias de *Staphylococcus aureus* identificadas por el Sistema Vitek®

	<i>S. aureus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S.simulans</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	N D	ATCC 25923
PB	+	+	+	+	+	+	+
BAC	+	+	+	+	-	+	+
OPT	+	+	+	+	+	+	+
HCS	+	-	+	-	+	+	-
6NC	+	+	+	+	+	+	+
10B	+	+	+	+	+	+	+
40B	-	+	+	+	+	+	+
ESC	-	+	-	-	-	+	-
ARG	-	+	+	+	-	+	-
URE	+	+	+	-	-	-	+
TZR	-	+	+	+	+	+	+
NOV	-	-	-	-	-	-	-
DEX	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	-	+	-	+	+	-
MAN	+	-	+	+	-	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-
SAL	-	-	-	-	-	+	-
SOR	-	-	-	-	-	+	-
SUC	+	+	+	-	-	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-
PYR	-	-	-	-	-	+	+
PUL	-	-	-	-	-	-	-
INU	-	+	-	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-	-	-
CEL	-	-	-	-	-	+	-
RIB	-	-	-	-	-	+	-
XYL	-	-	-	-	-	-	-
CAT	+	+	+	+	+	+	+
BH/CO	+	-	-	-	-	+	+

PB, Base de peptona; BAC, Bacitracina; OPT, Optoquina; HCS, Hemicelulosa; 6NC, Cloruro de sodio al 6%; 10B, 10% Bilis; 40B, 40% Bilis; ESC, Esculina; ARG, Arginina; URE, Urea; TZR, Rojo de tetrazolium; NOV, Novobiocina; DEX, Dextrosa; LAC, Lactosa; MAN, Manitol; RAF, Rafinosa; SAL, Salicina; SOR, Sorbitol; SUC, Sacarosa; TRE, Trehalosa; ARA, Arabinosa; PYR, Piruvato; PUL, Pullulan; INU, Inulina; MEL, Melibiosa; MLZ, Melezitosa; CEL, Celobiosa; RIB, Ribosa; XYL, Xilosa; CAT, Catalasa; BH/CO, Coagulasa.

(+) Presencia de actividad o crecimiento (-) Ausencia de actividad o crecimiento

6.5 Determinación de enterotoxina estafilocócica por el método de ELISA.

Los resultados obtenidos de las cepas analizadas para identificación de enterotoxina estafilocócica por este método de ELISA (NOM-184-SSA1-2002) fueron NEGATIVOS, lo cual nos indica que no está presente esta enterotoxina. La cantidad de toxinas que puede estar presente en un alimento puede ser mínima (50 ng de alimento). No obstante en los alimentos que provocan brotes de intoxicación alimentaria, la presencia de éstas oscila entre 1 y 5 mg/g de alimento Tranter y Rossalyn, (1990). La detección de la toxina por el método inmunoenzimático (ELISA), el cual detecta iguales concentraciones con similar consumo de tiempo que el RIA, es el más factible en muchos laboratorios por la multiplicidad de determinaciones que pueden realizarse, aunque en ocasiones presenta algunos inconvenientes en lo referente a los componentes de algunos alimentos (rábanos y vegetales escabechados contienen altos niveles de actividad peroxidasa residual), que en ocasiones interfieren y producen pérdidas en lo concerniente a la especificidad y la sensibilidad Bécquer *et al.*, (1996).

6.6 Determinación de enterotoxina estafilocócica por PCR.

En la figura 4 se muestra el marcador de peso molecular y una muestra control (ATCC 25923) positiva al gen de la enterotoxina “A” (470 pb).

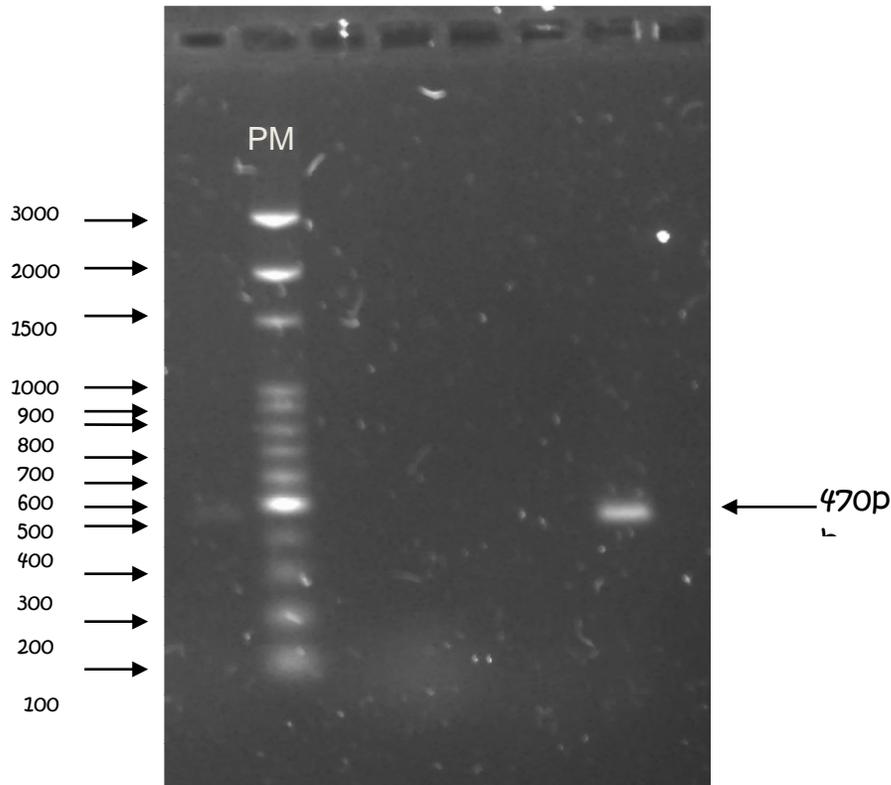


Figura 4. Gel de agarosa donde se muestra el marcador de peso molecular y un testigo positivo al gen de la enterotoxina “A” con un amplificado de 470 pb.

Todas las cepas caracterizadas de *S. aureus* no presentaron amplificación, se puede decir que corresponden a cepas no enterotoxigénicas o pueden corresponder a otras enterotoxinas con genes distintos para los que no se utilizó los primers correspondientes, tal como lo reportan algunos estudios, de aislamientos realizados en alimentos, existen cepas de *S. aureus* que poseen genes que codifican nuevas enterotoxinas Bécker *et al.*, (1998); Blaiotta *et al.*, (2004); Kwon *et al.*, (2004); Omoe *et al.*, (2002); Poli *et al.*, (2007).

La investigación de Bania, (2006) estudió el genoma de los *S. aureus*, ha permitido la identificación de nuevos genes que codifican enterotoxinas como superantígenos (SEIs) algunas de estas se consideran implicadas en intoxicación alimentaria estafilocócica, reportando que de 50 cepas de *S. aureus* analizadas, 27 mostraron ser enterotoxigénicas, de las cuales solo 9 presentan los genes para enterotoxinas comunes (SEA-SEE) y 18 cepas son SEA-SEE negativas; por tanto detectó la presencia de nuevos genes productores de enterotoxina, se demostró así mismo que el gen que codifica la enterotoxina H (SEIH) fue el más frecuentemente detectado (n=14), mientras que genes que codifican SEII junto con SEIG fueron detectados en tres cepas. Así también Poli *et al.*, (2007) reporta que en cepas de *S. aureus* aislados de quesos los genes de enterotoxinas más predominantes fueron los genes SER, SED, SEG, y SEM. Estos resultados al igual que el de este estudio apoyan la necesidad de trabajos adicionales sobre la detección de nuevos genes enterotoxigénicos y su papel en la intoxicación alimentaria o en su defecto controlar su presencia en *S. aureus* aislados de alimentos.

Según estudios niveles de contaminación superiores a 10^5 ufc/g pueden favorecer la producción de enterotoxinas estafilocócicas en condiciones ambientales adecuadas tal como lo reporta Bécquer *et al.*, (1997); Filho y Filho, (2000); Martínez, (1991) quienes mencionan que existe una relación directa entre el número de unidades formadoras de colonia por gramo y la probabilidad de la presencia de alguna de las enterotoxinas de *S. aureus*, así también Dinges *et al.*, (2000) refiere que algunas cepas de *S. aureus* cuando están presentes en cantidades elevadas en un alimento ($>10^5$ ufc/g) en condiciones adecuadas de temperatura, pH, aw y oxígeno producen una o más enterotoxinas estafilocócicas en los alimentos. En tanto que Borges *et al.*, (2008) menciona que la ocurrencia de enterotoxinas estafilocócicas parece estar relacionada a la habilidad de las cepas en producir enterotoxinas más que al grado de contaminación por *S. aureus* debido a que investigaciones evidenciaron la producción de la enterotoxina por debajo de los 10^5 ufc/g en quesos y lo contrario, recuentos mayores a 10^5 ufc/g no fueron detectadas enterotoxinas.

Según Bécquer *et al.*, (1997) la termonucleasa se puede detectar en alimentos que contengan concentraciones de microorganismos en el orden de 10^6 ufc/g. Por tanto puede ser alternativa adecuada la búsqueda de termonucleasa (TNasa) en los alimentos ya que sirve como un indicador de la presencia de la toxina a niveles elevados. En nuestro estudio se detectó termonucleasa en el 34% de muestras de *S. aureus* analizadas pero ninguna de ellas se encontró el gen de la enterotoxina "A". Este resultado es comparable al de Soares *et al.*, (2008) quienes estudiaron la posible correlación de la presencia del gen de enterotoxina "A" con la producción de las enzimas coagulasa y termonucleasa demostrando que no existe correlación entre las tres variables, por tanto no es confiable utilizar pruebas presuntivas o indirectas para determinar la enterotoxigenicidad en cepas de *S. aureus*.

7. CONCLUSIONES

- El *Staphylococcus aureus* no es el único indicador para una evaluación higiénica de los alimentos, ni tampoco es el único que puede ocasionar ETA's.
- La jurisdicción sanitaria con mayor presencia de *Staphylococcus aureus* fue Huejutla con el 50% de aislamiento en los quesos muestreados.
- El 81.66% de las cepas bacterianas aisladas de *Staphylococcus* fueron de la especie *S. aureus*.
- Otras especies de *Staphylococcus* aisladas fueron *S. warnery* (6.66 %), *S. simulans* (3.33 %), *S. haemolyticus* (1.66 %), *S. cohnii* (1.66 %) y No Determinado (5 %).
- No se identificó enterotoxina "A" por el método de ELISA en las cepas de *S. aureus* aisladas de los quesos estudiados, sin embargo no se puede descartar la presencia de otras enterotoxinas. Por medio de la técnica de PCR se confirmó que el gen que codifica para la enterotoxina "A" no se encuentra en las cepas de *Staphylococcus* aisladas.
- La información generada en este estudio puede ser útil para los programas de control de calidad, sistemas de análisis sanitarios y vigilancia epidemiológica para aplicar medidas preventivas y oportunas que permitan el control y prevención de este microorganismo.

8. GLOSARIO

Alimentos potencialmente peligrosos. Aquellos que en razón de su composición o sus características físicas, químicas o biológicas pueden favorecer el crecimiento de microorganismos y la formación de sus toxinas, por lo que representan un riesgo para la salud humana. Requieren condiciones especiales de conservación, almacenamiento, transporte, preparación y servicio; éstos son: productos de la pesca, lácteos, carne etc.

Baird Parker. Agar para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positivos en los alimentos (*Staphylococcus aureus*).

Brote. Es una clasificación usada en la epidemiología para referirse a la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico.

Catalasa. Enzima oxidante que descompone el agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) en agua y oxígeno atómico.

Coagulasa. Es un producto extracelular que cataliza la reacción: Plasminógeno ---> Plasmina. Se estudia en tubo a 37°C con plasma de conejo con EDTA.

Cocos. Tipo morfológico de una bacteria con forma más o menos esférica.

Entero-toxina. Son la causa del Síndrome de intoxicación alimentaria, son proteínas termoresistentes, y su producción está codificada en plásmidos, en el cromosoma o en fagos temperados.

Estafilococos. Género de bacterias inmóviles, esféricas y Gram positivas.

Incidencia. Número de casos nuevos de enfermedad o accidente que aparecen durante un período, dividido entre la media de la población durante ese período.

Inocuo. Aquello al que no hace o que no causa daño.

Intoxicación Alimentaria. es la manifestación clínica de toxicidad consecuente a la exposición a sustancias tóxicas vehiculizadas por los alimentos tanto sólidos como líquidos. Esta ocurre tras la ingestión de alimentos que están contaminados con sustancias orgánicas o inorgánicas perjudiciales para el organismo, tales como: venenos, toxinas, agentes biológicos patógenos, metales pesados, etc.

Mastitis. Infección aguda, sobreaguda o crónica de la ubre, motivada por la invasión bacteriana de los conductos lácteos, ascendente a partir del pezón, de lo que resulta la alteración de la leche.

Microorganismo. Un microorganismo, también llamado microbio u organismo microscópico, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio.

Oxidasa. Es una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular (O_2) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H_2O) o a peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Pasteurización. Al tratamiento térmico al que se someten los productos, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos.

Patógeno. Es aquel capaz de producir una enfermedad o daño.

Queso. El producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

Termonucleasa. Es una exonucleasa que destruye el ADN, se caracteriza por producir termonucleasa, o sea DNAsa termoestable.

Toxina. Sustancia elaborada por bacterias o microbios que actúa como veneno en el organismo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, M. (2009). *Staphylococcus aureus* and other pathogenic Gram-positive cocci. In: Foodborne Pathogen – Hazards, Risk Analysis and Control. Eds. C.W. Blackburn and P.J. Mc Clute. 2nd edition. Woodhead Publishing. Cambridge, UK.
- Adams, M. R., Moss, M. O. (2000). Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. pp. 184–270.
- Araya, V., Gallo L., Quesada C., Chaves C. y Arias M. (2008). Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica., Revista ALAN. volumen 58, No. 2
- Baird Parker, A. C. (1990) “The staphylococci – an introduction”, Journal of Applied Bacteriology, Symposium Suppl., 1S-8S
- Bania, J.; Dabrowska, A.; Bystron, J.; Korzekwa, K.; Chrzanowska, J.; Molenda, J. (2006). Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. International Journal of Food Microbiology, 108(1):36-41,
- Bayles, K. W. and Landolo, J. J. (1989) Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. J, Bacteriol. 171, 4799-4806
- Bean, N.; Goulding, J. S.; Lao, C.; Angulo, F. J. (1996). Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1988-1992. Morbid Mortal Weekly Rep. *CDC Surveill. Summ*; 45: 1-66
- Bécker, K; Roth, R.; Peters G. (1998). Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. Journal of Clinical Microbiology. 36(9) 2548-2553
- Bécquer, A.; V. Leyva.; Lara. C.; L. Mota De La Garza. L. (1997). *Staphylococcus aureus*, actividad termonucleasa y enterotoxinas en alimentos. Rev. Cubana Aliment. Nutr.; 11(2)
- Bécquer, L. A; Mota de la Garza, L; Lara, O. C; (1996). Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. Revista Cubana Aliment. Nutr. 10(2). Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

- Bennett, R. W. (1992). The biomolecular temperament of Staphylococcal enterotoxin in thermally processed foods. *J AOAC Int*, 75: 6-12.
- Bennett, R. W; Lancette, G. A. (1995) AOAC 8th ed. Washington, D. C. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 12.
- Berber, M. A. (1914) "Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udders of cow", Philippine Journal of science, Section B9:515-19.
- Bergdoll, M. S. (1979) "Staphylococcal intoxications", in Riemann, H. and Bryan, F.L. (eds) Food-borne Infections and Intoxications (2nd ed.), New York: Academic Press:444-90.
- Bergdoll, M. S. (1989) "*Staphylococcus aureus*", in Doyle, M.P. (ed) Food-borne Bacterial Pathogens, New York: Marcel Dekker:464-525.
- Bergdoll, M. S. (1990). Staphylococcal Food Poisoning. En: Cliver, D.O. Foodborne Diseases. Academic Press.USA. 85-106 pp.
- Betley, M. J. and Mekalanos, J. J. (1988) Nucleotide sequence of the type A Staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol* 170, 34-41
- Blaiota, G.; Ercoline, D.; Pennacchia, C.; Fusco, V.; Casaburi, A.; Pepe, O.; Villani, F. (2004). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus spp.* strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*. 97(5) p. 719-730
- Bohach, G. A. and Schlievert, P. M. (1987). Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet* 209, 15-20
- Borbolla, S. M. E; Vidal P. Ma del R; Piña G. O. E; Ramírez M; Vidal, V. J. J. (2004). Contaminación de los Alimentos por *vibrio cholerae*, Coliformes fecales, *Salmonella*, Hongos, Levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003, Salud en Tabasco, enero-agosto, año/vol. 10, número 1-2, Secretaria de Salud del Estado de Tabasco, Villahermosa, México pp. 221-232
- Borges, M. F.; Froeder, E.; J. L. Pereira.; T. Feitosa; Kuaye. Y. (2008). *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: Revisão. *Boletim do CEPPA, Curitiba* . 26(1) p.71-86,

- Borges, M. F; Nassu, R. T; Pereira, J. L; De Andrade, C.; Kuaye, A. Y. (2008). Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural*, Santa Maríá, .38(.5) p.1431-1438
- Buchanan, R. E.; Gibbons, N. E. (1974). *Bergey`s Manual of determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Burdova, O; Dudrikova, E; G. A. Incova; E, Pleva J. (1994). Determination of hylococcal enterotoxins in milk and milk products by three methods. *Archivum Veterinarium Polonicum*; 34: 69-74
- Castro, A. (2007). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos y su Prevención*. Unidad Nacional de salud Ambiental. MINSAP/UNICEF. Ciudad de la Habana.
- Chapin, K. C.; Lauderdale, T. L. (2003). Reagents, stains, and media: bacteriology. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Couch, J. L.; Soltis, M. T.; Betley, M. J. (1988). Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene, *J. Bacteriol* 170, 2954-2960.
- De Buyser, M. L.; Dufour, B.; Maire, M.; Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food- borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 1–17.
- Delgado, R. L. Cristóbal and Torres, Dora J. M. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Rev Panam Salud Publica* [online]., vol.14, n.3, pp. 158-164. ISSN 1020-4989. doi: 10.1590/S1020-49892003000800002.
- Diaz, R. C. y González, G. B. (2001). *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *RESPYN*. 2(3):
- Dinges, M.; Orwin, P; P. M. Schlievert. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(01)p.16-34
- Everson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S., and Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal

- food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* 7:311 – 316.
- Filho, A. S.; Filho, N. A. (2000). Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”, *Revista de Saúde Pública*. São Paulo, V.34, n.6, p.578-580,
- Fueyo, M. J. M. (2005). Frecuencia y tipos de toxinas super antígenos *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.
- González, F. T. y Rojas, H. R. A. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*. 45(5):338-339.
- Gouloumes, C.; Bes, M.; Renand, F.; Lina B, Reverdy ME, Brun Y, Fleurette J. (1996). Phenotypic and genotypic (pulsed- field gel electrophoresis) characteristics of enterotoxin A producing *S. aureus* strains. *Res Microbiol*; 147: 263- 271
- Halpin-Dohnalek MI, Marth EH. (1989). *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods. A review. *J Food Prot*; 52: 267-82.
- Harrigan, W. F., McCance, M. E. (1979). Métodos de laboratorio en microbiología de los alimentos y productos lácteos, Academia, León, España. p, 9-10, 72-73.
- Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Kalinacova V, Gondol J, Grolmus J. (2002). Occurrence of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Food. *Ann Agric Environ Med*; 9: 179-182
- Holt, J. G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., et al. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA
- I.C.M.S.F. (1996). *Microorganismos de los Alimentos : Ecología microbiano de los productos alimentarios*. Acribia, Zaragoza, España
- I.C.M.S.F. (1998). *Microorganismos de los Alimentos : Ecología microbiano de los productos alimentarios*. Acribia, Zaragoza, España. p, 351-352.
- IDF. (2005). Economic consequences of mastitis. *Bull. Int. Dairy Fed*. 394. IDF, Brussels, Belgium.
- Isigidi, B. K., Devriese, L. A., Croegaert, T, and Hoof, J. (1989) A highly selective two- stage isolation method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *J. Appl. Bacteriol*. 66, 379-384.

- Isigidi, B. K., Mathieu, A. M., Devriese, L. A, Godard, C. and van Hoof, J. (1992) 'Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants'. *Journal of Applied Bacteriology* 72:16 – 20.
- Jay, J. M. (1970). Effect of borate on the growth of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci. *Infect. Immun.* 1:78–79.
- Jay, J. M. (1994). *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Ed. Acribia. España. 537-563.
- Jay, J. M. (1997). *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall, New York.
- Kloos, W. E., and T. L. Bannerman. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:117–140.
- Koneman, M. D; Elmer W, Winn Washington C, Janda William M, Schreckenberger Paul C, Woods MD Gail L. (2008). *Diagnostico microbiológico: texto y atlas en color*, 6ª ed. Buenos Aires Editorial Medica panamericana.
- Kwon, S. H. Kim, K. T. Park, W. K. Bae, J. Y. Kim, J. Y. Lim, J. S. Ahn, K. S. Lyoo, J. M. Kim, W. K. Jung, K. M. Noh, G. A. Bohach, Y. H. Park. (2004). Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. *International Journal of Food Microbiology* v.97 Pag. 137-145,
- Lancette, G. A., and R.W. Bennett. (2001). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. *In: Downes, F. P., and K. Ito (ed.)*. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th edition. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.
- Langlois, B. E.; Harmon R. J.; Akers K, (1989). Comparison of methods for determining DNase and phosphatase activities by staphylococci. *J Clin Microbiol* 27: 1127-1129.
- Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., & McLauchlin, J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25, 304–312.
- Luján D, Valentín M, Molina M. (2006). Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales e tres distritos de Lima-Perú. Instituto de Investigación Nutricional, Laboratorio de Microbiología (Lima – Perú). *Revista de Salud Pública y Nutrición*, Volumen 7 No. 2
- Mac Faddin, J. F. (1985). *Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical*

- bacteria. Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London
- Márquez, J. G. y Garcia R, C. E. (2007). Microflora patógena del queso blanco " telita" elaborado en cuatro estados de Venezuela. *An Venez Nutr*, jun. 2007, vol.20, no.1, p.17-21. ISSN 0798-0752.
- Marriot, N. G. (1997). Microorganism. In: Essentials of Food Sanitation. Chapman and Hall. New York, NY. USA.
- Marth, E. H. (1969). *Salmonella* and *salmonellosis* associated with milk and milk products. A review. *J. Dairy Sci.* 52:283-315
- Martinez, O. N. (1991). Enterotoxigenicidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de Jurel (*Trachurus simetricus murphy*) y 48 Merluza (*Merlucius gayii peruanus*) congelados y comercializados en los Mercados de Lima. Tesis UNAM- Lima.
- Matos, J. S., D. O. White, R. J. Harmon, and B. E. Langlois. (1991). Isolation of *Staphylococcus aureus* from Sites Other than the Lactating Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 74:1544-1549.
- Miller, R. D., and Fung D. Y. C. (1973). Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.* 25:800–806.
- Minor, T. E. and Marth, E. H. (1972). *Milk Food Technol*, 35, 548.
- Minor, T. E. and Marth, E. H. (1976). *Staphylococci and Their significance in foods*, Elsevier, Amsterdam.
- Mossel, D. A. A.; Moreno, B.; Struijk, C. B. (2003). *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda edición*, ed. Acibia, S.A. Zaragoza España.
- Munson, S. H.; Tremaine, M. T.; Betley, M. J. & Welch, R. A. (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*66, 3337–3348
- Murray, R. P.; Baron, E. J.; Pfaller, A. M.; Tenover, F. C.; Tenover, H. R.; (1999). *Manual of Clinical Microbiology* American society for microbiology 7th edition.
- Muto, A. y S. Osawa. (1987). The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 84:166-169.

- Nema, V.; Agrawal. R.; Kamboj, D. V.; Goel, A. K.; Singh, L. (2007). Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. Int J Food Microbiol, 117(1): 29-35.
- NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
- NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, formula Láctea, y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.
- Omoe, K.; Ishikawa, M.; Yu, S.; Hu, D. L.; Ueda, S.; Shinagawa, K. (2002). Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productive of S. aureus isolates harboring seg,seh, or sei genes. Journal of Clinical Microbiology,40 (3) p. 857-862
- OMS. (1992). Informe final del Primer Seminarios Internacional sobre Catering Aéreo e Inocuidad de Alimentos para Viajeros. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Lima, Perú
- Ordal, Z. J., (1971). Milk Food Technol, 34, 548
- Park, C. E., Akhtar, M, and K. Rayman (1994). Evaluation of a Commercial Enzyme Inmunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A; B, C, D, and E in Foods. Applied and Enviromental Microbiology. 60(2) p. 677-681
- Park, C. E.; M, Akhtar, M. K. Rayman. (1992). Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl Environ
- Parrilla, C. M. C, Vázquez C. J. L, Saldade C. E. O, Nava F. L. M. (1993). Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario Salud Publica Méx; 35:456-463.
- Poli, A.; Guglielmini, E.; Sembeni, S.; Spiazzi, M.; Dellaglio, F.; F. Rossi and Torriani. S. (2007). Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in

- Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 45 p. 529-534.
- Psoni, L.; N. Tzanetakis and E. Litopoulou-Tzanetaki, (2003). Microbiological characteristics of Bat-zos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiol.*, 20: 575-582.
- Ren, K., Bannan, J. D., Pancholi, V.; Cheung, A. L.; Robbins, J. C.; Fischetti, V. A. & Zabriskie, J. B. (1994). Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. *J Exp Med* 180, 1675–1683
- Rojas, N., Chaves E., Garcia F. (2007). *Manual de Bacteriología Diagnostica*. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. pp. 69-77
- Rooney, R. M.; Cramer, E. H.; Mantha, S.; Nichols, G.; Bartram, J. K.; Farber, J. M.; Benembarek, P. K. (2004). A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: evidence for risk management. *Public Health Rep*, 119(4): 427-434.
- Rose, S. A.; Bankes, P.; Stringer, M. F. (1989). Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit. *International Journal of Food Microbiology*, v. 8, p. 65-72.
- Scott, R. (1991). *Fabricación de quesos*. Acribia. Zaragoza.
- Sharma, N. K.; Rees, CED, Dood CER. (2000). Development of a single-reaction multiplex PCR toxotyping assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl Envir Microbiol*; pp. 1347-1353
- Simeão do Carmo L, R. Souza Dias, V. Roberto Linardi, M. José de Sena, D. Aparecida dos Santos, M. Eduardo de Faria, E. Castro Pena^f M. Jett and L. Guilherme Heneine (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Laboratorio de Enterotoxinas, Rua Conde Pereira Carneiro 80, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Suares, M. J; Arias, M. L; Gamboa, M. (2008). Detección de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su correlación con las pruebas de coagulasa y term nucleasa. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 58(1) p. 59-63.

- Tranter, H. S.; Rossalyn, D. B. (1990). Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxin. *Appl Bacteriol Simp Supplement*; 109-122.
- Tsen, H. Y.; Chen, T. R. (1992). Use of polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl Microbiol Biotechnol*; 37: 685-690
- Vanegas, L. M.; González, G. L.; Aida Martínez L, Buitrago, F. (2008). Aislamiento y Caracterización de Cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos en bogota. Universidad de los Andes, Laboratorio de ecología microbiana y alimentos – LEMA, Bogotá, Colombia.
- Varnam, A. H. and M.G. Evans (1991). Foodborne pathogens. Wolfe Publishing. London. 235-265 pp.
- Vasek, M. Olga.; Cabrera, R.; Coronel, G. J.; Giori, G. S. y Fusco, A. J. V. (2004). Análisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de corrientes (argentina). *Facena*, Vol. 20, pp. 13-22.
- Wu, C. H., and M. S. Bergdoll. (1971). Stimulation of enterotoxin B production. *Infect. Immun.* 3:784–792.
- Zhang, S.; Iandolo, J. J.; & Stewart, G. C. (1998). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol Lett* 168, 227–233

10. ANEXOS

- **Medio de Baird-Parker**

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Medio base	95.0 ml
Solución de telurito de potasio	1.0 ml
Emulsión de yema de huevo	5.0 ml

Preparación:

Cuando el medio base esté a 45 °C, agregar los demás ingredientes y mezclar. Colocar de 15-20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 horas a temperatura de 0-5 °C.

- **Medio base de Baird-Parker**

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Glicina	12.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Piruvato de sodio	10.0 g
Agar	20.0 g
Agua	1.0 l

Preparación:

Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121 °C ±1 durante 15 min. Enfriar y mantener el medio a 45 °C.

- **Solución de telurito**

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Telurito de potasio	1.0 g
Agua	100.0ml

Preparación:

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0-5°C.

- **Emulsión de yema de huevo**

Preparación:

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000).

Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril.

En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril.

Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica.

Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión.

Filtrar a través de gasa.

Las placas deben utilizarse dentro de las 48 horas siguientes a su preparación.

- **Solución salina isotónica**

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0.85 g
Agua	100.0 ml

Preparación:

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121 °C ±1 durante 15 min.

- **Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)**

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200.0 ml
Infusión de corazón de res	250.0 ml
Peptona de gelatina	10.0 ml
Cloruro de sodio	5.0 ml
Fosfato disódico dodecahidratado	2.5 ml
Glucosa	2.0 ml
Agua	1.0 l

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario. Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121 °C ±1.

- **Agar DNA-Azul de toluidina.**

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
DNA timo de ternera	0.03 g
Agar bacteriológico	1.0 g
Cloruro de calcio anhidro (0.01 M)	0.10 ml
Cloruro de sodio	1.0 g
Azul de toluidina (0.1 M)	0.3 ml
Tris (0.05 M, pH=9)	100.0 ml

Preparación:

Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina, agitando hasta completar la disolución del DNA y calentar a ebullición.

Agregar el azul de toluidina una vez que estén disueltos todos los ingredientes y que haya disminuido la temperatura, homogeneizar hasta la incorporación completa del colorante.

Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar.

Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie. Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur. Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

- **Solución de cloruro de calcio anhidro 0.01 M**

Cloruro de calcio PM = 110.99

Disolver 0.1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

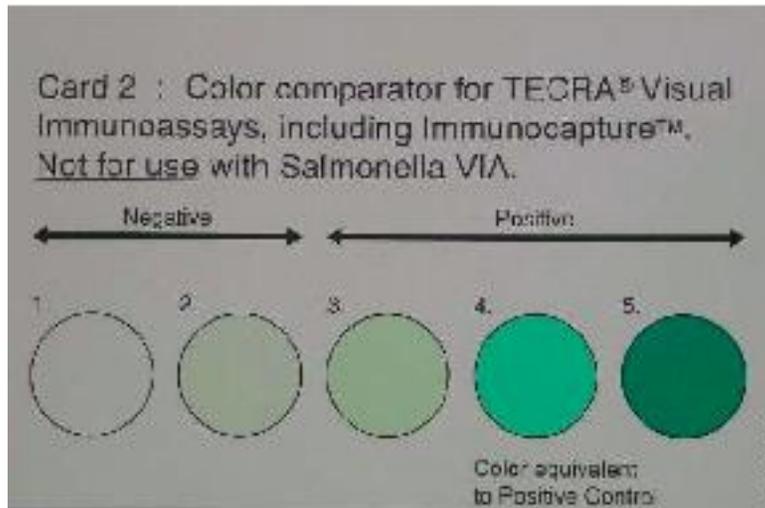
- **Solución de azul de toluidina 0.1 M**

Disolver 3.05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

- **Solución amortiguadora 0.05 M Tris-(Hidroximetil Amino Metano)**

Disolver 6.055 g de Tris en 100 ml de agua, ajustar el pH=9; preparar al momento del uso.

- **Tarjeta de colores para la interpretación visual (lector de ELISA)**



Especificaciones del uso de tarjetas GPI

Basé de datos en el sistema vitek para bacterias Gram positivas.

uso previsto

FICHA TÉCNICA GPI

Uso previsto

IMPORTANTE: *Para uso diagnóstico in vitro*

La tarjeta GPI (identificación de gram positivos) VITEK está diseñada para ser utilizada con el sistema VITEK para la identificación automatizada de estreptococos clínicamente significativos, estafilococos y un grupo seleccionado de bacilos gram positivos.

El sistema identifica las siguientes bacterias:

- *Aerococcus* spp.
- *Arcanobacterium haemolyticum*
- *A. Actinomyces pyogenes*
- *Corynebacterium xerosis* y *Especies de Corynebacterium*
- *Enterococcus avium*
- *E. casseliflavus*
- *E. durans*
- *E. faecalis*
- *E. faecium*
- *E. gallinarum*
- *E. hirae*
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- *Gemella morbillorum*
- Estreptococos grupo G
- *Especies de Listeria*
- *Staphylococcus aureus*
- *S. auricularis*
- *S. capitis*
- *S. cohnii*
- *S. epidermidis*
- *S. haemolyticus*
- *S. hominis*
- *S. hyicus*
- *S. intermedius*
- *S. lentus*
- *S. saprophyticus*
- *S. sciuri*
- *S. simulans*
- *S. warneri*
- *S. xylosus*
- *Streptococcus acidominimus*
- *S. agalactiae*
- *S. anginosus*
- *S. anginosus (Strep. milleri)*
- *S. bovis*

Uso previsto

IMPORTANTE: *Para uso diagnóstico in vitro*

La tarjeta GPI (identificación de gram positivos) VITEK está diseñada para ser utilizada con el sistema VITEK para la identificación automatizada de estreptococos clínicamente significativos, estafilococos y un grupo seleccionado de bacilos gram positivos.

El sistema identifica las siguientes bacterias:

- *Aerococcus* spp.
- *Arcanobacterium haemolyticum*
- *A. Actinomyces pyogenes*
- *Corynebacterium xerosis* y *Especies de Corynebacterium*
- *Enterococcus avium*
- *E. casseliflavus*
- *E. durans*
- *E. faecalis*
- *E. faecium*
- *E. gallinarum*
- *E. hirae*
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- *Gemella morbillorum*
- Estreptococos grupo G
- *Especies de Listeria*
- *Staphylococcus aureus*
- *S. auricularis*
- *S. capitis*
- *S. cohnii*
- *S. epidermidis*
- *S. haemolyticus*
- *S. hominis*
- *S. hyicus*
- *S. intermedius*
- *S. lentus*
- *S. saprophyticus*
- *S. sciuri*
- *S. simulans*
- *S. warneri*
- *S. xylosum*
- *Streptococcus acidominimus*
- *S. agalactiae*
- *S. anginosus*
- *S. anginosus (Strep. milleri)*
- *S. bovis*

Tabla 16-1: Ejemplo de fórmula de bionúmero GP

POCILLO N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
TEST	P	B	O	H	6	1	4	E	A*	A	U	T	N	D	L	M	R	S	S	S	T	A	P	P	I	M	M	C	R	X	C	B	
	B	A	P	C	N	O	O	S	N	R	R	Z	O	E	A	A	A	A	O	U	R	R	Y	U	N	E	L	E	I	Y	A	H	
	C	T	S	C	B	B	C	C	G	E	R	V	X	C	N	F	L	R	C	E	A	R	L	U	L	Z	L	B	L	T			
V T K	Valor de test positivo	1	2	4	1	2	4	1	2	-	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
S O F T W A R E	Reacción de la muestra	+	-	4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Valor de muestra de test	1	0	4	1	2	4	1	0	4	1	2	4	1	2	4	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Bionúmero de la muestra	5			7				5		7			7			0			3		1			0			0			1		
* Control negativo de decarboxilasa																																	

Notas del informe de identificación GPI

El informe de identificación GPI de vez en cuando se refiere a las Notas 1 a 12, explicadas en esta sección.

La sección Descripciones de los tests para Taxones GPI con GCMS, en este capítulo, define los tests complementarios mencionados en esta sección.

Nota 1: *Staphylococcus aureus*

Ciertas cepas de *Staphylococcus aureus* producen resultados bioquímicos similares a los producidos por *S. intermedius* en la tarjeta GPI. Utilizar los siguientes tests para obtener una identificación definitiva a nivel especie.

Tabla 16-12: Pares de organismos GPI con GCMS

Organismo	Test 1	Test 2	Test 3
<i>Staphylococcus capitis</i> • <i>Staph. simulans</i>	NAG - +	PYR - +	
<i>Staphylococcus capitis</i> • <i>Staph. warneri</i>	TRE - +	MAN + -	UREA - +
<i>Staphylococcus cohnii</i> • <i>Staph. epidermidis</i>	NOV + -	PXB - +	
<i>Staphylococcus cohnii</i> • <i>Staph. haemolyticus</i>	NOV + -	PYR - +	ARG - +
<i>Staphylococcus cohnii</i> • <i>Staph. hominis</i>	UREA - +	NOV + -	
<i>Staphylococcus cohnii</i> • <i>Staph. saprophyticus</i>	SUC - +	TUR - +	
<i>Staphylococcus cohnii</i> • <i>Staph. simulans</i>	NO3 - +	NOV + -	SUC - +
<i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staph. haemolyticus</i>	PXB + -	TRE - +	PYR - +
<i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staph. hominis</i>	ANA GR + -	A-PHO + -	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staph. saprophyticus</i>	NOV - +	NO3 + -	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staph. simulans</i>	MLT + -	MAN - +	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staph. warneri</i>	PXB + -	TRE - +	

Tabla 16-12: Pares de organismos GPI con GCMS

Organismo	Test 1	Test 2	Test 3
<i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Staph. hyicus</i>	VP + -	B-HEM + -	
<i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Staph. intermedius</i>	VP + -	ONPG - +	
<i>Staphylococcus auricularis</i> • <i>Staph. capitis</i>	MAN - +	PYR + -	
<i>Staphylococcus auricularis</i> • <i>Staph. cohnii</i>	NOV - +		
<i>Staphylococcus auricularis</i> • <i>Staph. epidermidis</i>	UREA - +		
<i>Staphylococcus auricularis</i> • <i>Staph. haemolyticus</i>	VP - +	B-HEM - +	
<i>Staphylococcus auricularis</i> • <i>Staph. hominis</i>	UREA - +		
<i>Staphylococcus capitis</i> • <i>Staph. cohnii</i>	NOV - +	TRE - +	
<i>Staphylococcus capitis</i> • <i>Staph. epidermidis</i>	A-PHO - +	PXB - +	UREA - +
<i>Staphylococcus capitis</i> • <i>Staph. haemolyticus</i>	B-HEM - +	MLT - +	TRE - +
<i>Staphylococcus capitis</i> • <i>Staph. hominis</i>	UREA - +	MAN + -	
<i>Staphylococcus capitis</i> • <i>Staph. saprophyticus</i>	NOV - +	TRE - +	MANS + -

Tabla 16-12: Pares de organismos GPI con GCMS

Organismo	Test 1	Test 2	Test 3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> • <i>Staph. hominis</i>	UREA - +	B-HEM + -	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> • <i>Staph. saprophyticus</i>	NOV - +	ARG + -	UREA - +
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> • <i>Staph. simulans</i>	UREA - +	ONPG - +	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> • <i>Staph. warneri</i>	UREA - +		
<i>Staphylococcus hominis</i> • <i>Staph. saprophyticus</i>	NOV - +		
<i>Staphylococcus hominis</i> • <i>Staph. simulans</i>	ONPG - +	MLT + -	
<i>Staphylococcus hominis</i> • <i>Staph. warneri</i>	ANA GR - +	NAG + -	
<i>Staphylococcus hyicus</i> • <i>Staph. intermedius</i>	ONPG - +		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> • <i>Staph. simulans</i>	NOV + -	PYR - +	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> • <i>Staph. warneri</i>	NOV + -		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> • <i>Staph. xylosus</i>	MAN - +	XYL - +	
<i>Staphylococcus simulans</i> • <i>Staph. warneri</i>	NO3 + -	VP - +	