



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Comparación del desempeño de métodos rápidos comerciales
para la detección de enterotoxinas en cultivos puros y alimentos
artificialmente inoculados con *S. aureus***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO (TEG)

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la bachiller Yamila Fuentes
como requisito parcial para optar al
título de Licenciado en Biología.

Tutores: MgSc. Patricia Blasco De Oro

Profa. Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA

MAYO – 2013

A Dios y a la Virgen, quienes han guiado mis pasos en momentos de luz y oscuridad, dándome la fuerza necesaria para llegar hasta este punto. Sin su bendición nunca habría alcanzado esta meta.

A mis Padres, a quienes debo mucho más que la vida. Ustedes me brindaron todas las herramientas necesarias para luchar por mis sueños, apoyándome y velando por mí cada día. Los amo.

A mis hermanas, quienes siempre han procurado enseñarme y cuidarme para evitarme tropiezos. Aunque no se los diga o demuestre frecuentemente, las amo y admiro por ser quienes son. He aprendido muchísimo de ustedes.

A mis sobrinos, por darme tanta felicidad y formar parte de mi motivación para seguir adelante. Con una sonrisa de ustedes cualquier problema se hace chiquitito. Los adoro mis traviesos.

A mi cuñados Ernesto Menkel y Mario Palacios, por todo el apoyo incondicional y cariño que me han dado durante estos años, y por su paciencia. Nunca lo olvidaré. Los quiero mucho.

A quien ha estado conmigo durante estos últimos años, demostrándome cada día que cuando se quiere se puede, o al menos se intenta con todas las ganas. Gracias por creer en mí en todo momento, por secar mis lágrimas de frustración y animarme a continuar, y por todos esos detalles pequeños y grandes capaces de devolverme la sonrisa.

AGRADECIMIENTOS

A la casa que vence las sombras, Universidad Central de Venezuela, y en especial a la Facultad de Ciencias, por haberme dejado tomar un poco de todo ese conocimiento que encierran sus muros. No sólo forman profesionales, también permiten construir su identidad y humanidad. Es indescriptible el orgullo que genera en mí el haber podido formar parte de sus aulas.

A la Dra. Adriana Bravo, Gerente de Investigación y Soporte Analítico, y a Empresas Polar C.A., por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y brindarme todo lo necesario para ello. A mis tutoras Patricia Blasco y Guillermina Alonso, a quienes respeto y admiro profundamente, por todo su apoyo y paciencia. Gracias por sus múltiples enseñanzas y consejos, pero sobre todo, por mostrarme que la mejor manera de hacer las cosas es trabajar duro por ellas y apuntar siempre a la excelencia. Si cada empresa y laboratorio de este país trabajara de la forma en que ustedes lo hacen, seríamos TITANES.

A todos los profesores que fueron responsables de mi formación académica, especialmente a Fanny Cabello, Ana Rivas, Oswaldo Vásquez, Marianela de García, Francisco Rodríguez, Rosa Moya, Beatriz Blanco, Yajaira Rodríguez, Maritza Rodríguez, Wilfredo Morales, Oscar Martínez, Antonio Sosa, Héctor Hernández, Hector Rollo, David Verilli, Carlos Camargo, Estrella Villamizar, Pedro Rodríguez, Kendy Armas, Johnny De Abreu, Giovannina Orsini, Beatriz Vera, Félix Castillo, Francisco Provenzano, Hermes Piñango, Carmen Ferreira, Mercedes Salazar, Leidi Herrera, Sheila Marques, Lourdes Suárez, Palmira Guevara, Yadira Rangel, Meris Casotto, Ana Gómez, Gunta Smits, Eva de García, Herlinda Ramos, Hector Finol, Julio Vivas, Laura Delgado, José Hernández, Marcia Toro, María Eugenia Grillet, José Rafael Bonyorno, Fernando González, Jesús Romero, Christian Calderón, Ernesto González, Jesús Alberto León, Roxana Gajardo,

Blas Dorta, Aura Falco, Giovanni Angiolillo, Mariana Eleizalde, Vincenza Cervino, María Raymúndez, Ismael Hernández, Jaime Vaals, María Lorena Márquez, Elizabeth Merentes, Antonio Gutiérrez, Ángeles Zambrano, Carolina Palomino, Zurima González, Leymaya Guevara, Andrea Menéndez, Elizabeth Gordon e Izaskun Petralanda, por su dedicación como docentes. Ustedes alimentaron mis deseos de superación, mostrándome que todo el esfuerzo que conlleva el estudio merece la pena y que el primer paso para el éxito es entender que, ante todo, debemos convertirnos en seres humanos integrales, ya que de otro modo sólo seremos profesionales incompletos.

A Lau y a Paty por su gran aporte a la elaboración de este trabajo, por haber estado siempre dispuestas a regalarme su tiempo y conocimiento, por todos sus consejos, y sobre todo por su paciencia. A los doctores Mireya Mendoza y Armando Zambrano, por haber creído en mí y brindarme la oportunidad de trabajar a su lado. Lo que aprendí de ustedes no tiene precio. A María Elena, Henry y la Sra. Blanquita, por todo su apoyo y por haber sido tan especiales conmigo. Todos ustedes estarán siempre en mi corazón.

A mis prepas Adriana y Carmen (de Matemáticas), y Adriana M., Willy, Cristina, Alejandro, Mighay, Daniel, Katherine, Joshimer, Rubén, Luis H., Arianna, María Alexandra, Floritza, Ana P., Danerys, Lenny, Arturo B., Arturo M., Miguel y Joxmer, quienes, además de contribuir a mi aprendizaje, me ayudaron siempre que lo necesité.

A toda mi familia, por su constante apoyo y preocupación. Mis abuelas, por ser mujeres valientes, independientes, luchadoras y dignas de admiración, y por ser mis ejemplos a seguir. Mis tíos Deh, Eli, Elsa, Ljubi, Pedro, Deya, Fernanda, Lucho, Marlenis, José Gregorio, mis madrinas y padrino, por todas sus bendiciones, paciencia y por haber estado allí siempre. A mi prima-hermana Neni, compañera de juegos, secretos, alegrías y tristezas. Te amo hermana. A las familias

Molina-Andarcia y Machado-Andara, Tía Ama y a la Sra. Leonarda por haberme abierto las puertas de su casa y de su corazón. Nunca podré agradecerles todo lo que hicieron por mí.

A todos los que me han demostrado que la amistad verdadera existe, y que vale la pena seguir siendo leal a ella. Maya y Neumar, más que amigos, mis hermanos del alma. Oscar, Cereza, Ñami Liz y Nash, aunque no los vea sé que están allí y que cuento con ustedes. Chiche, Neulis, Micky, Ingrita, Mariu, Edu, Esther, Any, Angelina, Phele, Maracucho, Barto, Dios Hernan y Felaco, por las veces que extendieron su mano para ayudarme, su hombro para consolarme, por sus consejos, regaños o todas las anteriores: son irremplazables. Sindirella, Viti, Tina, Katy, Luis C., Armyn, Alfredo, Liriana, Jesús, Ronald, Kim y Alecita, gracias por haber sido incondicionales. Nunca voy a olvidar los momentos que compartimos juntos.

A todos aquellos que me acompañaron durante mi tiempo de pasantías en la GSC, en especial al Sr. Manuel, Andre, Miche, Mariana, Lus, Myriam y Luisana por todas las experiencias compartidas. A las Sras. Milagritos e Irene por haber sido verdaderas madres sustitutas en el laboratorio, aconsejándome y estando siempre pendientes de mi salud. A todas las personas del Centro Tecnológico Polar, Planta Los Cortijos y el Centro Empresarial Polar por haber sido tan amables conmigo en todo momento.

Finalmente, gracias a todas aquellas personas que con un detalle mínimo, ya sea elevando una plegaria por mi o recibiendo una solicitud estudiantil, contribuyeron a que este sueño se convirtiera en realidad.

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran interés en la industria alimentaria por su capacidad de producir enterotoxinas causantes de enfermedades alimentarias en el hombre. De allí deriva la necesidad de contar con métodos de detección rápidos y efectivos para dichas toxinas, que optimicen el control de calidad en la industria y el manejo de brotes alimentarios. Existen sistemas comerciales alternativos a la metodología tradicional que permiten descartar de manera eficiente a estas moléculas como agente causal de intoxicaciones, sin comprometer en gran medida la sensibilidad. La finalidad de este estudio fue comparar el desempeño de cuatro de ellos, 3 basados en enzimoimmunoensayos (SET A-E y SET Total Ridascreen® de R-Biopharm, y Staph Enterotoxin VIA Tecra™ de 3M™) y uno que utiliza aglutinación pasiva reversa en látex (SET RPLA de Oxoid), para lo que se planteó una metodología dividida en tres fases. La primera comprendió la selección de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus*, dos de ellas aisladas en alimentos de un comedor industrial y una del cepario interno del laboratorio. En la segunda parte se probó la aptitud de varios alimentos como matrices de crecimiento para estas tres cepas, determinando el nivel de inóculo necesario en cada caso para alcanzar un recuento de 10^6 células por gramo o mililitro de matriz luego de 48h y el método de contaminación artificial más adecuado para establecer la comparación entre los sistemas. Esta última representó la etapa final, que se realizó agrupando los métodos con base a su tipo de detección y calculando o estimando algunos de sus parámetros de desempeño en cultivos puros, diluciones y alimentos artificialmente inoculados con las cepas seleccionadas. Los resultados indicaron que SET Total Ridascreen® es el más eficiente para la detección presuntiva de toxinas en alimentos, y que el serotipo puede determinarse mediante SET RPLA en el cultivo puro de la cepa responsable una vez aislada.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo.

Ag: antígeno.

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*. Asociación de químicos analíticos oficiales.

ATCC: *American Type Culture Collection*. Colección americana de cultivos tipo.

BAM: *Bacteriological Analytical Manual*. Manual analítico bacteriológico.

BHI: *Brain Heart Infusion*. Caldo cerebro corazón.

BPA: *Baird-Parker Agar*. Agar de Baird-Parker.

CASO: Caldo Tripticasa de Soya.

CVCM: Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas.

DNA: *Desoxyribonucleic Acid*. Ácido desoxirribonucleico.

DNAsa: enzima con capacidad de hidrolizar el ADN.

EIA: *Enzyme Immunoassay*. Inmunoensayo enzimático.

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas o enzimo-inmunoanálisis de adsorción.

ETAs: Enfermedades Transmitidas por Alimentos.

FDA: U. S. *Food and Drug Administration Center*. Centro para la administración de alimentos y medicamentos de los E.U.A.

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.

GSC: Gerencia de Soporte Científico, perteneciente al Centro Tecnológico de Cervecería Polar C.A., y lugar donde se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

INHRR: Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

ISO: *International Organization for Standardization*. Organización internacional para la estandarización.

LDR: límite de detección relativo.

MRSA: *Methicillin Resistant S. aureus*. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

MSA: *Mannitol Salt Agar*. Agar sal-manitol o manitol salado.

RPLA: *Reverse Passive Latex Agglutination*. Aglutinación pasiva reversa en látex.

SA: *Staphylococcus aureus*.

SEA, SEB, SEC, SED, SEE: *Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, D, E*. Enterotoxinas estafilocócicas A-E

SET: *Staphylococcal Enterotoxin*. Enterotoxina estafilocócica.

STX: *Staph Express*. Abreviatura utilizada para las placas de recuento selectivo y diferencial para *S. aureus* Petrifilm™ de 3M™.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

VIA: *Visual Immunoassay*. Inmunoensayo visual.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	4
2.1.1. <i>Reseña histórica</i>	4
2.1.2. <i>Características generales</i>	5
2.1.3. <i>Epidemiología</i>	8
2.1.4. <i>Factores de virulencia</i>	10
2.2. FAMILIA DE TOXINAS PIROGÉNICAS SUPERANTÍGENOS (PTSAG).....	12
2.2.1. <i>Enterotoxinas</i>	13
2.2.2. <i>Intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocócicas</i>	15
2.3. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS DE <i>S. AUREUS</i>	18
2.3.1. <i>Metodología tradicional</i>	18
2.3.2. <i>Métodos inmunológicos</i>	20
2.3.3. <i>Otras técnicas de detección</i>	26
III. OBJETIVOS.....	29
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	30
4.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	31
4.3. SISTEMAS COMERCIALES PARA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS Y DETECCIÓN DE TOXINAS.....	32
4.4. METODOLOGÍA.....	32
4.4.1. <i>Selección de cepas de S. aureus</i>	32
4.4.2. <i>Estandarización del método de contaminación artificial con enterotoxinas y nivel de inóculo para los alimentos empleados como matriz de crecimiento de S. aureus</i>	34
4.4.3. <i>Comparación del desempeño de los métodos rápidos en la detección de enterotoxinas utilizando distintas cepas de S. aureus</i>	35
4.4.4. <i>Selección del método de detección de SETs más eficiente</i>	36
V. RESULTADOS.....	37
5.1. SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>S. AUREUS</i>	37
5.1.1. <i>Aislamiento e identificación de cepas de S. aureus a partir de muestras tomadas en un comedor industrial</i>	37
5.1.2. <i>Selección de cepas de S. aureus previamente aisladas</i>	39
5.2.1. <i>Selección de matrices aptas para el crecimiento de S. aureus</i>	42
5.2.2. <i>Evaluación de métodos de contaminación artificial de las matrices</i>	42

Tabla.....	44
5.3. COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS RÁPIDOS EN LA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS UTILIZANDO DISTINTAS CEPAS DE <i>S. AUREUS</i>	45
5.3.1. <i>Comparación del desempeño de paquetes comerciales para la detección general de enterotoxinas estafilocócicas en cepas de S. aureus.</i>	45
5.3.2. <i>Comparación del desempeño de paquetes comerciales para la detección específica de enterotoxinas estafilocócicas.</i>	47
VI. DISCUSIÓN.	50
6.1. SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>S. AUREUS</i>	50
6.2. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL CON ENTEROTOXINAS Y NIVEL DE INÓCULO PARA LOS ALIMENTOS EMPLEADOS COMO MATRIZ DE CRECIMIENTO DE <i>S. AUREUS</i>	55
6.3. COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS RÁPIDOS EN LA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS UTILIZANDO DISTINTAS CEPAS DE <i>S. AUREUS</i>	61
6.3.1. <i>Consideraciones generales.</i>	61
6.3.2. <i>Consideraciones adicionales.</i>	66
6.4. SELECCIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO MÁS EFICIENTE PARA LA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS DE <i>S. AUREUS</i> EN CULTIVOS PUROS Y ALIMENTOS DE ACUERDO AL DESEMPEÑO OBTENIDO, COSTO Y PRACTICIDAD.	69
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	74
REFERENCIAS	77
ANEXOS	A-1

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Características bioquímicas frecuentemente utilizadas para la identificación de Estafilococos hasta el nivel de especie. Tomado y modificado de Kloos y Schleifer (1986).....	7
Tabla II. Principales antibióticos a los que se ha encontrado resistencia en cepas de <i>S. aureus</i> . Tomado y modificado de Bustos y colaboradores (2006).....	9
Tabla III. Determinantes de patogenicidad o factores de virulencia de <i>S. aureus</i> . Tomado y modificado de Fueyo (2005).	11
Tabla IV. Características generales de los serotipos de toxinas producidos con mayor frecuencia por <i>S. aureus</i> . Tomado y modificado de J. M. Jay (2000).....	14
Tabla V. Aislamiento de cepas de <i>S. aureus</i> productoras de enterotoxinas a partir de alimentos muestreados en un comedor industrial.	38
Tabla VI. Aislamiento de cepas de <i>S. aureus</i> a partir de manipuladores de alimentos y evaluación de la capacidad toxigénica de las mismas.	39
Tabla VII. Pruebas bioquímicas confirmatorias y evaluación de producción de enterotoxinas realizadas a las cepas de estafilococos disponibles en el cepario del laboratorio de la GSC.....	40
Tabla VIII. Capacidad toxigénica teórica y experimental para las cepas de referencia de la ATCC disponibles en el cepario del laboratorio de la GSC.	41
Tabla IX. Crecimiento de la cepa de <i>S. aureus</i> O4 durante 48 h en alimentos artificialmente inoculados.....	42

Tabla X. Detección de enterotoxinas en dos matrices contaminadas artificialmente con la cepa de <i>S. aureus</i> O4.....	43
Tabla XI. Crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> en matrices alimenticias luego de 48 horas de incubación.....	44
Tabla XII. Porcentaje de resultados falsos negativos obtenidos al probar cepas de <i>S. aureus</i> en dos matrices de crecimiento diferentes utilizando los sistemas comerciales SET Total Ridascreen® y SET VIA TECRA™.....	46
Tabla XIII. Límite de detección relativo de enterotoxinas para los sistemas comerciales SET Total Ridascreen® y SET VIA TECRA™ en extractos filtrados de cultivos puros de cepas de <i>S. aureus</i> ..	47
Tabla XIV. Perfil de detección de enterotoxinas en cultivos puros de distintas cepas de <i>S. aureus</i> de acuerdo a los sistemas SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm y SET RPLA de Oxoid.....	48
Tabla XV. Límite de detección relativo para los serotipos A y C utilizando los paquetes comerciales SET A-E Ridascreen® y SET RPLA Oxoid en cultivos puros de las cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y O4.	48
Tabla XVI. Resultados falsos positivos y falsos negativos detectados utilizando los sistemas SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm y SET RPLA de Oxoid en alimentos artificialmente inoculados con cepas de <i>S. aureus</i>	49
Tabla XVIII. Características de los sistemas comerciales utilizados durante este estudio.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Grupos de micrococos en forma de racimos de uva. Dibujos originales de Alexander Ogston tomados de Ogston (1881) (izquierda) y Linder (1981) (derecha).....	4
Figura 2. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> en placa con medio de cultivo sólido. Tomado de Casey Gerry Schenk Francavilla Blatt & Penfield LLP (2012).....	5
Figura 3. Células de <i>Staphylococcus aureus</i> observadas al microscopio electrónico. Tomado de Prescott (2002).	6
Figura 4. Infección causada por <i>Staphylococcus aureus</i> . 1) Absceso cutáneo (Conrad, 2011); 2) Autopsia que muestra alteraciones del tejido cervical debidas al síndrome de shock tóxico (Allen, 1984); 3) Síndrome de piel escaldada (Conrad, 2011); 4) Lesión pulmonar causada por leucocidina de Panton-Valentine asociada a MRSA (Nadeem y col., 2012).....	10
Figura 5. Diferencias entre la unión de un antígeno convencional y un superantígeno a una célula presentadora de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y a receptores de linfocitos T colaboradores (TCR). Tomado y modificado de Fueyo (2005).	12
Figura 6. Estructura tridimensional de algunas de las enterotoxinas producidas por <i>S. aureus</i> . 1) Serotipo A (Schad y col., 1995); 2) Serotipo B (Papageorgiou y col., 1998); 3) Serotipo C (Papageorgiou y col., 1995).....	13
Figura 7. Circuito de autoactivación del gen <i>arg</i> . Tomado de Novick y Geisinger (2008).	15
Figura 8. Inflamación gastrointestinal asociada a la intoxicación por enterotoxinas. Tomado de Pinchuk y colaboradores (2010).	16

Figura 9. Matrices comúnmente asociadas a brotes de intoxicación estafilocócica. 1) Alimentos crudos o manipulados luego de la cocción (Fuente anónima, 2011); 2) Leche cruda y sus derivados (AIPL, 1999); 3) Productos cárnicos (ELC, 2006).....	18
Figura 10. Método de doble difusión en lámina de gel descrito por Casman y colaboradores (1969). a) Montaje del sistema; b) Líneas de identidad obtenidas, indicando reacción Ag-Ac. Tomado y modificado de Bennett y Hait (2011).....	19
Figura 11. Estructura de una partícula de látex. Tomado y modificado de Gella y colaboradores (1991).	20
Figura 12. Esquema del ELISA tipo sandwich. Tomado y modificado de fuente anónima (2009a). .	21
Figura 13. Sistema VIDAS® SET de bioMérieux®. Tomado de Bennett y Hait (2011).	23
Figura 14. Radioinmunoensayo. Tomado de Milipore (2012).....	23
Figura 15. Esquema de una electrotransferencia. Tomado y modificado de V. R. Racaniello (2010).	24
Figura 16. Separación inmunomagnética (IMS). Tomado y modificado de Banada y Bhunia (2008).	26
Figura 17. Esquema del proceso de análisis de interacción biomolecular. Tomado y modificado de Duriez y colaboradores (2008).....	27

I. INTRODUCCIÓN.

La presencia de microorganismos es un fenómeno frecuente en todas las áreas. Innumerables bacterias, hongos y parásitos, imperceptibles en la mayoría de los casos, conviven con el resto de los seres vivos como flora nativa y en el ambiente, llevando a cabo allí todas sus funciones vitales (crecimiento, reproducción, entre otros). Sin embargo, cuando su proliferación supera ciertos límites, o cuando el agente invasor representa microbiota atípica o con capacidad patogénica, se crean situaciones de riesgo conocidas como contaminación microbiológica.

En el caso específico de microorganismos patógenos, el agravante viene dado por las complicaciones de salud y control asociadas a los mismos. Los patrones de resistencia a antibióticos, la baja efectividad en productos de acción antimicrobiana como los desinfectantes, y los diferentes factores de virulencia asociados a este tipo de microorganismos, les confieren gran importancia dentro del ámbito hospitalario y la industria farmacéutica.

Por su parte, la temprana detección de presencia de microorganismos patógenos, en materias primas y productos terminados, es de vital importancia en la industria alimenticia ya que toda empresa debe asegurar la inocuidad de sus productos. De igual forma, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) y sus brotes, originados por contaminación microbiológica del agua o los alimentos con agentes patogénicos (infección) o sustancias tóxicas derivadas de los mismos (intoxicación), constituyen uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Particularmente, los brotes ocasionan pérdidas económicas incalculables a nivel de producción y gastos médicos considerables para el gobierno, llegando a afectar significativamente la economía nacional en los países con mayor incidencia, además de las pérdidas humanas por complicaciones crónicas (Knabel, 1995).

Entre las bacterias patógenas frecuentemente vinculadas a ETAs y brotes se encuentran cepas de *Escherichia coli* enteropatogénicas, enterotoxigénicas, enterohemorrágicas, enteroinvasivas, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, cepas de *Bacillus cereus* productoras de toxinas diarreica y emética, cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicas, varias especies de los géneros *Salmonella* (principalmente *S. typhi* y *S. paratyphi*), *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. perfringens* y *C. difficile*), *Vibrio* (*V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*) y *Shigella* (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*) y miembros del grupo *Campylobacter* (IFT, 2004).

Existen protocolos unificados y avalados por organizaciones internacionales (ISO, AOAC, FDA, FAO, entre otras), para la detección de cada uno de estos microorganismos y sus toxinas, conocidos como métodos tradicionales. La sensibilidad y especificidad de cada uno de estos métodos ha sido ampliamente comprobada y certificada, y en países como Estados Unidos, Canadá, México y la Unión Europea existe una legislación estricta y unificada sobre control de calidad microbiológica en alimentos que exige el uso de los mismos de manera obligatoria (Vásquez y Cabral, 2001).

Aun así, la mayoría son bastante laboriosos y el tiempo invertido para poder obtener resultados es muy largo. Por esta razón, se han desarrollado métodos alternativos que utilizan técnicas simplificadas y apreciablemente más cortas que la metodología tradicional, sin que ello afecte en gran medida la sensibilidad de la prueba. Estos métodos se encuentran disponibles en el mercado y son comercialmente conocidos como kits. La principal ventaja es que se obtienen resultados rápidamente permitiendo realizar una identificación presuntiva del patógeno o sus toxinas, lo cual puede ser confirmado luego siguiendo la metodología tradicional. Esto resulta especialmente útil en casos de brotes alimentarios en los que el tiempo de incubación del agente causal suele ser muy rápido (Swaminathan y Feng, 1994).

Con base a lo anteriormente expuesto, resulta indispensable disponer de métodos que garanticen una detección confiable y rápida de aquellas bacterias patógenas comúnmente asociadas a matrices alimenticias y sus toxinas, para lo que se requieren estudios de investigación exhaustivos en el área como el planteado en el presente trabajo de grado. A continuación se exponen de manera detallada los objetivos y finalidad del mismo.

II. ANTECEDENTES.

2.1. *Staphylococcus aureus*.

2.1.1. Reseña histórica.

Los científicos Robert Koch y Louis Pasteur observaron estafilococos durante sus estudios en 1878 y 1880 respectivamente, pero fue el cirujano Alexander Ogston de Aberdeen quien en 1881 le dio el nombre al género (Hajmeer, 2006). Ogston realizó estudios exhaustivos del pus, siguiendo los métodos de Koch, mientras examinaba abscesos, encontrando en la mayoría de estos numerosos microorganismos en forma de cocos o micrococos (Ledermann, 2007) que con experimentos posteriores logró confirmar como causa de la supuración (Porter, 1954). Basado en sus observaciones, nombró *Staphylococcus* a los que presentaban agrupación irregular por el impacto que le generó la semejanza con los racimos de uva (British Medical Journal Obituary, 1929), tal como se muestra en la Figura 1, diferenciándolos de los estreptococos de Billroth (1874) que crecían en cadenas (Orenstein).

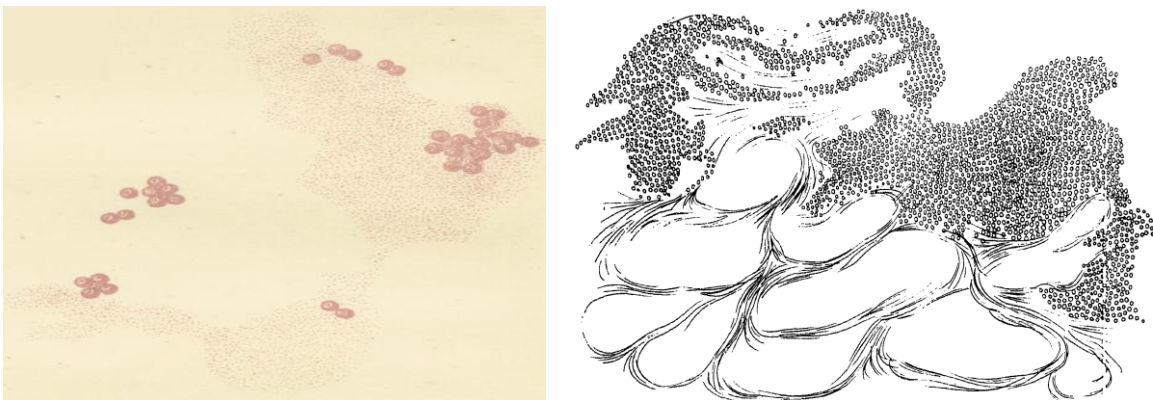


Figura 1. Grupos de micrococos en forma de racimos de uva. Dibujos originales de Alexander Ogston tomados de Ogston (1881) (izquierda) y Linder (1981) (derecha).

Posteriormente, en 1884, Rosenbach estudió las características de las colonias de estafilococos en cultivos puros y logro notar diferencias en cuanto a la pigmentación de las mismas, proponiendo así el nombre que da origen a las especies *S. aureus* (colonias amarillo-dorado, Figura 2) y *S. epidermidis* (colonias blancas) (Boquete,1996).



Figura 2. Cultivo de *Staphylococcus aureus* en placa con medio de cultivo sólido. Tomado de Casey Gerry Schenk Francavilla Blatt & Penfield LLP (2012).

2.1.2. Características generales.

S. aureus es un microorganismo procariota, ubicado dentro del grupo de bacterias con bajo contenido de G+C (30-39%) en el dominio Bacteria, phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales y familia Staphylococcaceae de acuerdo al manual de bacteriología sistemática de Bergey (Prescott, 2002). Actualmente, se han identificado más de 50 especies dentro del género *Staphylococcus*, dentro de las cuales *S. aureus* es la más importante por su patogenicidad en humanos (Hennekinne, 2009). Para esta última se han descrito 2 subespecies: *S. aureus* subsp. *aureus* y *S. aureus* subsp. *anaerobius* (Martínez y Pérez, 2001).

A nivel microscópico se presenta como células esféricas de aproximadamente 1 μm de diámetro, con distribución irregular a modo de racimos (Figura 3), inmóviles, sin formación de cápsula en la mayoría de los casos ni esporulación (Ordás, 2006). La estructura de su pared y membrana celulares le permite retener el colorante cristal violeta durante la tinción de Gram (Black, 2005). Los cultivos en fase líquida presentan una turbidez homogénea debido al crecimiento uniforme en el mismo, observándose además una gran cantidad de sedimento correspondiente a la masa de células que se deposita en el fondo del tubo (Cowan y col., 1954).

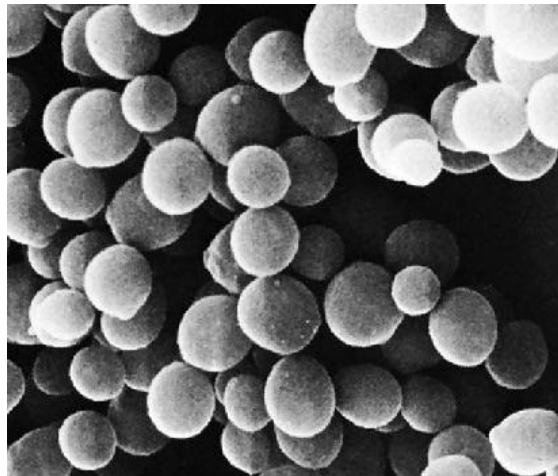


Figura 3. Células de *S. aureus* observadas al microscopio electrónico. Tomado de Prescott (2002).

En medio sólido de enriquecimiento se pueden diferenciar como colonias circulares de color amarillo o crema de aproximadamente 2-3 mm de diámetro, elevadas, húmedas, brillantes, suaves al contacto con el asa de siembra, de superficie lisa y bordes enteros. Son quimiorganotróficos, aerobios y anaerobios facultativos, no son exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales y con capaces de utilizar glucosa, maltosa, sacarosa, manitol, manosa y trehalosa como fuente de carbono tanto en aerobiosis como en ausencia de O_2 (Winn y col., 2008). Es posible identificar esta especie evaluando su metabolismo mediante pruebas bioquímicas (Tabla I).

Tabla I. Características bioquímicas frecuentemente utilizadas para la identificación de *Estafilococos* hasta el nivel de especie. Tomado y modificado de Kloos y Schleifer (1986).

Prueba		Resultado
<i>Producción de pigmentos</i>		+
<i>Crecimiento en agar con 15% de NaCl</i>		+ (débil)
<i>Crecimiento a</i>	15°C	+
	45°C	+ (débil)
<i>Producción de ácido en aerobiosis a partir de</i>	Glucosa	+
	Fructosa	+
	Manosa	+
	Maltosa	+
	Lactosa	+
	Trehalosa	+
	Manitol	+
	Xilitol	-
	Melobiosa	-
	Rafinosa	-
	Xilosa	-
	Sacarosa	+
	Metil- α D-glucopiranosido	
N-acetil-glucosamina		
Reducción de nitratos		+
Producción de acetoina		+
L-arginina		+(débil)
Ureasa		+(débil)
Oxidasa		-

S. aureus presenta un crecimiento rápido (18-24h), desarrollándose en rangos de temperatura entre 6 y 46°C, llegando a tolerar condiciones de pH entre 4 y 9.8, presión osmótica elevada (hasta 20% de NaCl) y humedad reducida ($a_w = 0.83$) (Fueyo, 2005). Es sensible a la novobiocina y resistente a

la acriflavina, polimixina (Jay, 2000) y, en algunos casos, a la vancomicina, gentamicina y meticilina (Prescott, 2002).

2.1.3. Epidemiología.

La mayoría de la población humana es portadora asintomática de *S. aureus*, encontrándose como microbiota natural a nivel cutáneo, nasal, ocular, bucal, gastrointestinal y orofaríngeo (Prescott, 2002). La bacteria, además, representa un indicador de calidad sanitaria, ya que su presencia es sinónimo de una higiene personal y/o superficial deficiente, lo que constituye el origen de contaminación más frecuente en alimentos (Bennett y Lancette, 2001).

De igual forma, en el ámbito hospitalario resulta crítica esta situación debido a la presencia de cepas multiresistentes que desencadenan infecciones entre los pacientes, o con capacidad de formación de biopelículas que dificultan su eliminación. En la Tabla II se muestran los antibióticos de uso más frecuente frente a los cuales ha desarrollado resistencia. Recientemente se han detectado cepas con capacidad de resistencia a antimicrobianos como microbiota natural en personas sanas, las cuales al encontrar un huésped adecuado han generado infecciones conocidas como “de origen comunitario” (Bustos y col., 2006).

Tabla II. Principales antibióticos a los que se ha encontrado resistencia en cepas de *S. aureus*.

Tomado y modificado de Bustos y colaboradores (2006).

Antibiótico	Mecanismo de resistencia	Gen(es) responsable(s) y localización
<i>Penicilina</i>	Hidrólisis enzimática del núcleo β -lactámico	<i>blaZ</i> : plásmidos y Tn552
β -lactámicos	Afinidad reducida al antibiótico	<i>mecA</i> : cromosoma SSCmec y Tn4291
<i>Aminoglucósidos</i>	Modificación por acetilación o fosforilación	<i>aacA-aphD</i> : cromosoma, plásmidos, Tn4001, Tn5404 y Tn5405
<i>Macrólidos, lincosamidas</i>	Metilación del rRNA 23S	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> y <i>ermC</i> : Plásmidos y Tn554
<i>Macrólidos, estreptograminas</i>	Bomba de expulsión; modificación por metilación	<i>msrA</i> , <i>vha</i> <i>vat</i> y <i>vatB</i> : plásmidos
<i>Tetraciclinas</i>	Bombas de expulsión; protección ribosomal	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> y <i>tetM</i> : plásmidos y Tn916
<i>Rifampicinas</i>	Mutación en la subunidad β de la RNA polimerasa	<i>rif</i> : cromosoma
<i>Ácido fusídico</i>	Alteración del factor de elongación G	<i>fusA</i> y <i>fusB</i> : plásmidos
<i>Quinolonas</i>	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV	<i>par</i> , <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i> : cromosoma
<i>Mupirocina</i>	Producción de una Isoleucil tRNA sintetasa modificada	<i>mupA</i> : plásmidos
<i>Trimetoprim sulfametoxazol</i>	Afinidad reducida de la dihidrofolato reductasa; sobreproducción de ácido <i>p</i> -aminobenzoico	<i>dfrA</i> : cromosoma; <i>sulA</i> : cromosoma y Tn4003
<i>Glicopéptidos</i>	Se atrapa la vancomicina en la pared celular; síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad de la vancomicina	<i>van</i> : cromosoma, plásmidos y Tn1546
<i>Oxazolidinonas</i>	Mutación en el dominio V del rRNA 23S; interfiere con la unión ribosomal	<i>rrn</i> : cromosoma
<i>Quinupristinadalfopristina</i>	Reduce la afinidad a la subunidad ribosomal 23S; modificación enzimática de la dalfopristina	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> y <i>ermC</i> : cromosoma y plásmidos; <i>vat</i> y <i>vatB</i> : plásmidos
<i>Cloramfenicol</i>	Modificación por acetiltransferasa	<i>cat</i> : plásmidos
<i>Fosfomicina</i>	Modificación en la síntesis de N-acetil murámico	<i>fosB</i> : plásmidos

Los cuadros clínicos que puede desencadenar la infección por *S. aureus* son altamente variados (Figura 4). Las manifestaciones abarcan desde forúnculos, gastroenteritis, abscesos y otitis, hasta neumonía, endocarditis aguda, osteomielitis, meningitis y septicemia, viéndose afectados distintos tejidos como la piel y los apéndices, tracto respiratorio, sistema circulatorio, tracto genito-urinario, área cervical y orofaríngea, tejido músculo-esquelético facial, tracto digestivo y sistema nervioso central (Linder, 1981).



Figura 4. Infección causada por *S. aureus*. 1) Absceso cutáneo (Conrad, 2011); 2) Autopsia que muestra alteraciones del tejido cervical debidas al síndrome de shock tóxico (Allen, 1984); 3) Síndrome de piel escaldada (Conrad, 2011); 4) Lesión pulmonar causada por leucocidina de Panton-Valentine asociada a MRSA (Nadeem y col., 2012).

2.1.4. Factores de virulencia.

A nivel estructural y bioquímico, *S. aureus* sintetiza numerosos compuestos que representan determinantes de patogenicidad utilizados por el microorganismo para evadir el sistema de defensa

del hospedador (Tabla III). Estos determinantes son principalmente componentes de la pared celular, proteínas de superficie, enzimas extracelulares y toxinas. Entre ellos, la cápsula mucoide, los ácidos teicóicos y la proteína A, la coagulasa, termonucleasa, lipasa, hialuronidasa y hemolisina, así como las citotoxinas y enterotoxinas, son de gran importancia por su papel en la adhesión, invasión, supervivencia y toxigenicidad del microorganismo dentro del huésped (Martínez y Pérez, 2001).

Tabla III. Determinantes de patogenicidad o factores de virulencia de *S. aureus*. Tomado y modificado de Fueyo (2005).

Determinante	Función	Tipo	
<i>Peptidoglicano</i>	Activación del complemento, otras	Componente de la pared celular	
<i>Ácidos teicoicos</i>	Antifagocitaria		
<i>Proteína A</i>	Antifagocitaria		
<i>Adhesinas</i>	Adherencia a células-hospedador, colonización		
<i>Cápsula mucoide y microcápsulas</i>	Adherencia y antifagocitaria	Enzimas	
<i>Coagulasa</i>	Formación de abscesos		
<i>Estafiloquinasas</i>	Destrucción de coágulos		
<i>Hialuronidasa</i>	Invasión de tejidos		
<i>Catalasa</i>	Supervivencia en fagocitos		
<i>Lipasas</i>	Invasión-colonización		
<i>Termonucleasa</i>	Hidrólisis del ADN		
<i>Hemolisinas</i>	Ruptura de membranas celulares		
<i>Leucocidinas</i>	Alteración de la permeabilidad celular		Toxinas
<i>Toxinas exfoliativas</i>	Epidermolisis		
<i>Toxina TSST-1</i>	Shock tóxico		
<i>Enterotoxinas</i>	Intoxicación alimentaria		
<i>Bacteriocinas</i>	Destrucción de otras bacterias		

2.2. Familia de Toxinas Pirogénicas Superantígenos (PTSAg).

Las PTSAg son proteínas de bajo peso molecular (22,5-28,5 kDa) constituidas en gran medida por aminoácidos hidrofílicos (Fueyo, 2005). Son capaces de generar ciertas respuestas en el huésped (Figura 5) como elevación en la temperatura corporal (pirogenicidad), inmunosupresión y gran activación inespecífica del sistema inmunológico a nivel de los linfocitos T o CD4+ (superantigenicidad), llevando a la sobreproducción de citoquinas (Hennekinne, 2009).

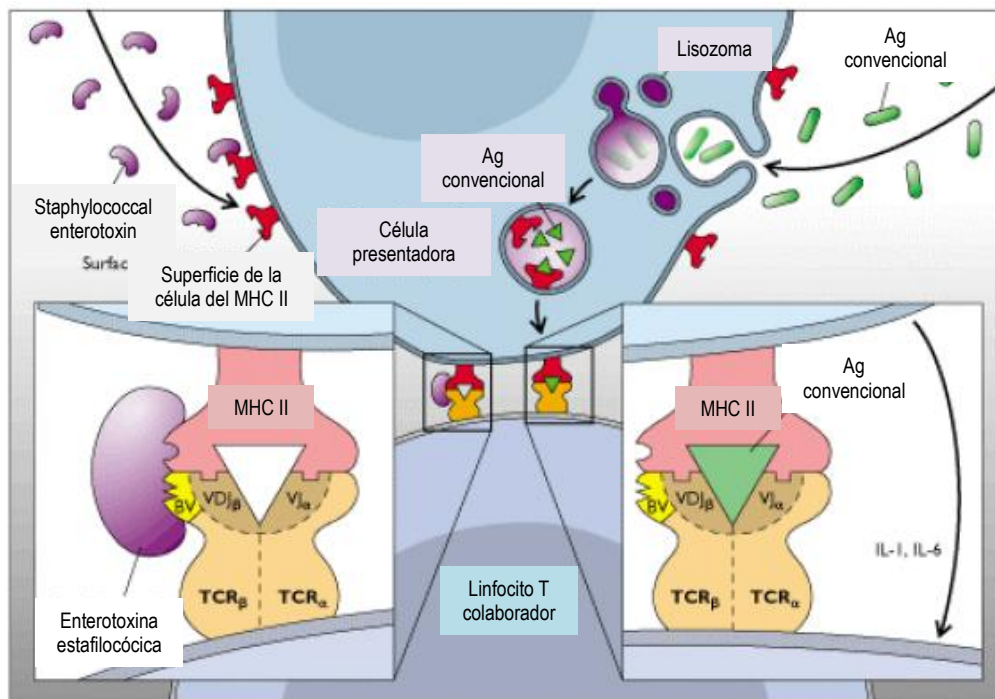


Figura 5. Diferencias entre la unión de un antígeno convencional y un superantígeno a una célula presentadora de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y a receptores de linfocitos T colaboradores (TCR). Tomado y modificado de Fueyo (2005).

Su estructura comprende básicamente numerosas láminas beta (conformación extendida), con ciertas inclusiones de alfa-hélice en las conformaciones semejantes a un muelle apretado, de modo tal que gran parte de su superficie queda expuesta para interactuar con otras moléculas en el medio

acuoso interno del organismo en que se alojan. Diferentes microorganismos como *S. aureus* y miembros del género *Streptococcus* pertenecientes al grupo A, son capaces de generar PTSAg. En el caso específico de *S. aureus*, esta bacteria produce 3 grupos diferentes de PTSAg: enterotoxinas (SETs), toxinas del síndrome del shock tóxico (TSST) y exfoliatinas (ETs) (Fueyo, 2005).

2.2.1. Enterotoxinas.

Diversos microorganismos son capaces de producir enterotoxinas. Entre ellos, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *S. aureus* son los más resaltantes (Pimbley y Patel, 1998). Las enterotoxinas de *S. aureus* son proteínas extracelulares de cadena sencilla, sin ramificaciones, que se caracterizan por su alta resistencia a la degradación mediante enzimas proteolíticas, radiación o calor (termorresistencia). Son moléculas higroscópicas, fácilmente solubles en agua y soluciones salinas (Hajmeer, 2006). La estructura tridimensional de las enterotoxinas serotipos A, B y C de *S. aureus* se muestran en la Figura 6.

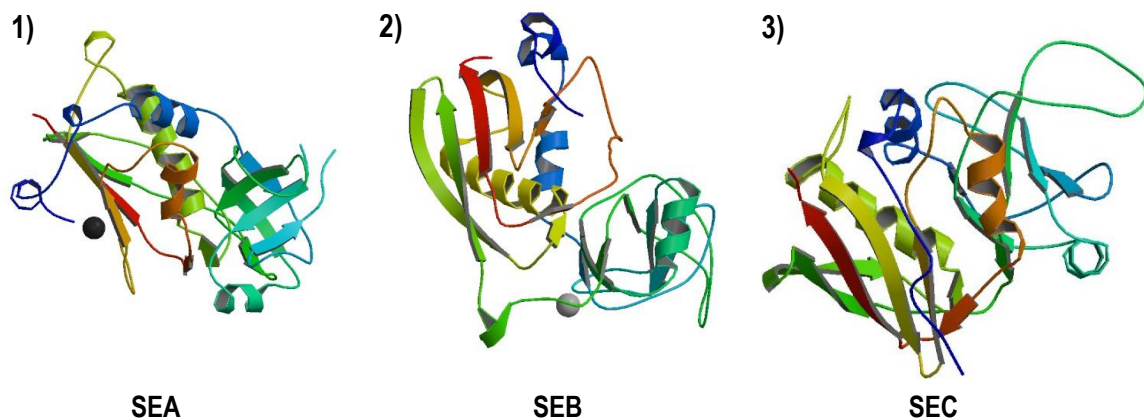


Figura 6. Estructura tridimensional de algunas de las enterotoxinas producidas por *S. aureus*. 1) Serotipo A (Schad y col., 1995); 2) Serotipo B (Papageorgiou y col., 1998); 3) Serotipo C (Papageorgiou y col., 1995).

Presentan en su estructura aminoácidos como el ácido glutámico, aspártico, tirosina y lisina, además de un bucle disulfuro en el dominio amino terminal que se cree está vinculado directamente al efecto emético. Las SETs son las más numerosas y comunes dentro del grupo de las PTSAg, encontrándose actualmente descritos 18 tipos serológicamente diferentes que incluyen las toxinas A-R y U. Los tipos J-U han sido caracterizados como toxinas semejantes a SETs (SEI) debido a que su actividad emética no ha sido demostrada. La producción de estas toxinas depende de diversos factores tanto del microorganismo (fase de crecimiento, entre otros) como del entorno (temperatura, pH, actividad hídrica, microbiota acompañante y condiciones nutricionales) (Hennekinne, 2009). En la Tabla IV se muestran las características de las principales toxinas producidas.

Tabla IV. Características generales de los serotipos de toxinas producidas con mayor frecuencia por *S. aureus*. Tomado y modificado de J. M. Jay (2000).

Característica	Serotipo						
	A	B	C1	C2	C3	D	E
<i>Dosis emética (µg/animal)</i>	5	5	5	5-10	<10*	20	10-20
<i>Contenido de nitrógeno (%)</i>	16.5	16.1	16.2	16.0	-	-	-
<i>Coefficiente de sedimentación</i>	3.04	2.8-2.9	3.00	2.9	-	-	2.6
<i>Coefficiente de difusión</i>	7.94	7.7-8.2	8.1	8.1	-	-	-
<i>Masa molecular (kDa)</i>	27800	28366	34100	34000	26900	27300	29600
<i>Punto isoeléctrico</i>	6.8	8.6	8.6	7.0	8.15	7.4	7.0
<i>λ de máxima absorción (nm)</i>	277	277	277	277	-	278	277
<i>Coefficiente de extinción</i>	14.3	14.0-14.4	12.1	12.1	-	10.8	12.5
<i>Año de identificación</i>	1960	1959	1967	1967	1965	1967	1971

*

La ubicación de los genes que codifican para la producción de las diferentes SETs es altamente variada, y abarca desde secuencias cromosómicas hasta plásmidos, profagos y transposones. El control de la transcripción de la mayoría de estos genes y otros factores de virulencia durante el crecimiento bacteriano se encuentra mediado por el gen regulador accesorio *arg* vía quórum sensing (Figura 7), encontrándose en muchos casos una baja producción de toxinas en cepas que carecen de dicho control (independientes de *arg*) (Hennekinne, 2009).

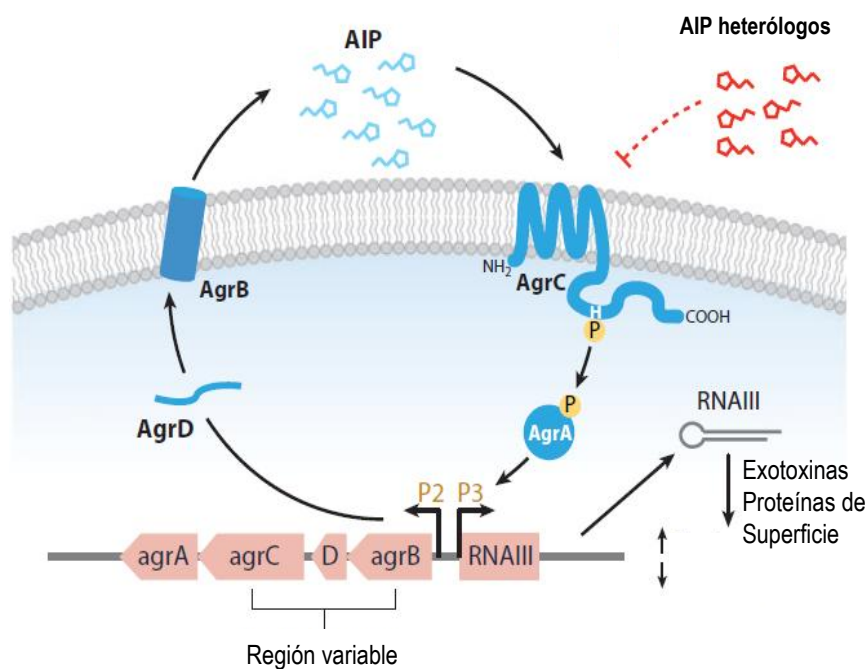


Figura 7. Circuito de autoactivación del gen *arg*. Tomado de Novick y Geisinger (2008).

2.2.2. Intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocócicas.

La intoxicación estafilocócica representa la segunda causa de ETAs más común a nivel mundial (Garthright y col., 1988; Levine y col., 1991; Bunning y col., 1997, y Archer y Young, 1998 en Di Pinto y col., 2004). El crecimiento de cepas con capacidad toxigénica en los alimentos hasta niveles mayores o iguales a 10^6 células por gramo es suficiente para desencadenar síntomas de intoxicación en el hombre. Según Mossel y colaboradores (1995), la dosis emética es de aproximadamente 0.2

microgramos por kilogramo de peso corporal en una persona adulta (SCVPH, 2003). El periodo de incubación varía entre 1-6 h, presentándose luego un cuadro clínico que incluye náuseas, vómitos, dolor abdominal, calambres, sudoración, escalofríos y diarrea profusa, que generalmente desaparece en menos de 48h (Su y Wong, 1997).

Las SETs no atacan de manera directa el revestimiento intestinal sino que actúan sobre los centros nerviosos del intestino (Figura 8), desde donde las señales son emitidas hasta el centro reflejo emético en la médula ósea a través de las vías aferentes parasimpáticas (nervio vago) y simpáticas (Prescott, 2002). A pesar de la incapacidad momentánea generada, en raras ocasiones se alcanzan complicaciones que comprometen severamente la vida del individuo, y casi nunca llega a ser fatal (Jo, 2005).

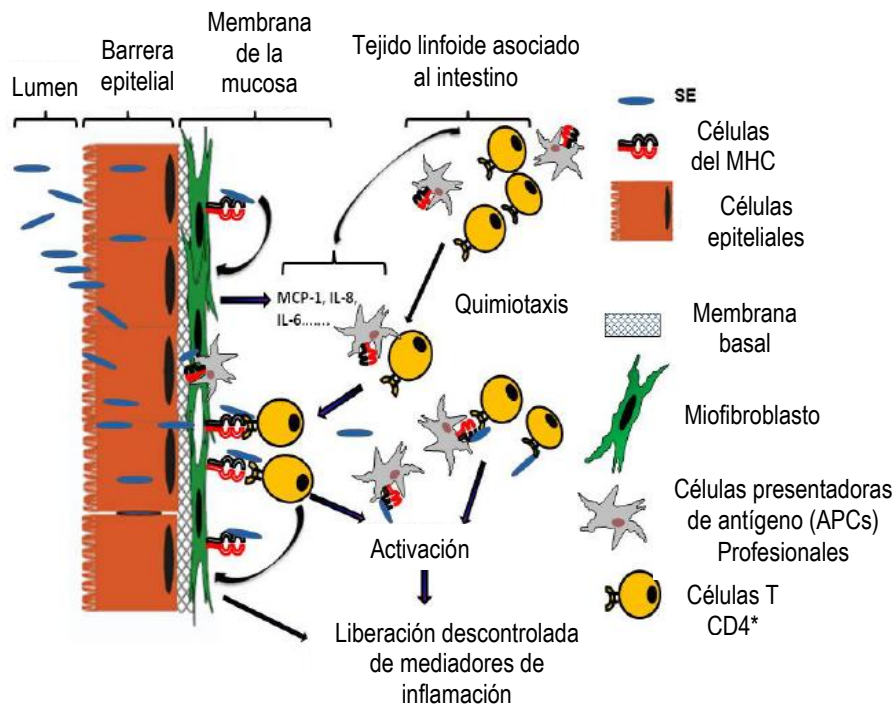


Figura 8. Inflamación gastrointestinal asociada a la intoxicación por enterotoxinas. Tomado de Pinchuk y colaboradores (2010).

Para que ocurra una intoxicación alimentaria por SETs deben existir las siguientes condiciones:

- 1) Fuente de estafilococos enterotoxigénicos;
- 2) vía de transmisión al alimento;
- 3) alimento favorable;
- 4) condiciones apropiadas para garantizar la producción de toxinas (multiplicación bacteriana, variables fisicoquímicas, entre otros) y
- 5) Ingestión de alimento suficiente para alcanzar la dosis emética (Hajmeer, 2006). La fuente del microorganismo es generalmente ovina o caprina, seguida por la humana y por último la bovina. La vía de transmisión la constituye un manipulador de alimentos o superficie con higiene deficiente que previamente estuviese en contacto con la fuente, lo que puede ocurrir al momento de la preparación del producto o luego de ello, ya sea por contaminación cruzada o por recontaminación (Hennekinne, 2009).

Entre los alimentos favorables (Figura 9) se encuentran aquellos que son manipulados posterior a la cocción (embutidos y envasados, ensaladas, cremas), fermentados con acidificación lenta (salami, natas, quesos), o cuya etapa de fabricación o almacenamiento involucra una actividad hídrica relativamente baja y temperatura favorable (leche en polvo, paté). Las condiciones óptimas que debe tener el alimento incluyen un rango de temperatura entre 35 y 40°C, un pH de 7.0-7.5 y una actividad hídrica aproximada de 0,93. El efecto de los factores nutricionales varía de acuerdo a la naturaleza y función de los mismos (Bergdoll y Lee, 2006).



Figura 9. Matrices comúnmente asociadas a brotes de intoxicación estafilocócica. 1) Alimentos crudos o manipulados luego de la cocción (Fuente anónima, 2011); 2) Leche cruda y sus derivados (AIPL, 1999); 3) Productos cárnicos (ELC, 2006).

2.3. Métodos para la detección de enterotoxinas de *S. aureus*.

Debido a su naturaleza proteica, peso molecular y a la baja concentración necesaria para lograr un efecto emético, el estudio de estas toxinas no representa un trabajo fácil. Aun así, existen diversas técnicas que permiten detectar la presencia de SETs tanto en alimentos como en el cultivo puro del microorganismo. A continuación se describen las opciones más conocidas.

2.3.1. Metodología tradicional.

En 1969, Casman y colaboradores desarrollaron la doble difusión en microplaca como primera técnica de detección de enterotoxinas en alimentos. Consiste básicamente en la formación de bandas de precipitación visibles en el gel como consecuencia de la reacción Ag-Ac entre la enterotoxina presente en la muestra y el anticuerpo correspondiente. La misma se encuentra aprobada por la AOAC y la FDA, y se recomienda como estándar para la evaluación de nuevos métodos (Su y Wong, 1997).

El principio utilizado por sus creadores se basa en la doble difusión en placa de Outcherlony (1949) y la difusión en lámina de gel de Crowle (1958) (Casman y col., 1969). Tal como se muestra en la Figura 10, sobre una lámina portaobjetos se coloca una delgada capa de agar en una superficie totalmente plana, y una vez solidificado se extraen circunferencias utilizando un molde de diámetro conocido de modo tal que se formen pocillos huecos. La distribución de los mismos se realiza de manera radial, dejando un orificio central para colocar el anticuerpo y 4 circundantes para añadir los diferentes antígenos (control y muestra) (Bennett y Hait, 2011).

La distancia entre cada uno de ellos debe ser simétrica, ya que el desplazamiento de la banda de precipitación es directamente proporcional a la concentración de Ag. en la muestra, lo que le brinda carácter cuantitativo al ensayo (Casman y col., 1969). El límite de detección de toxinas mediante esta técnica es de 30-60 ng por gramo de alimento (Bennett y Hait, 2011).

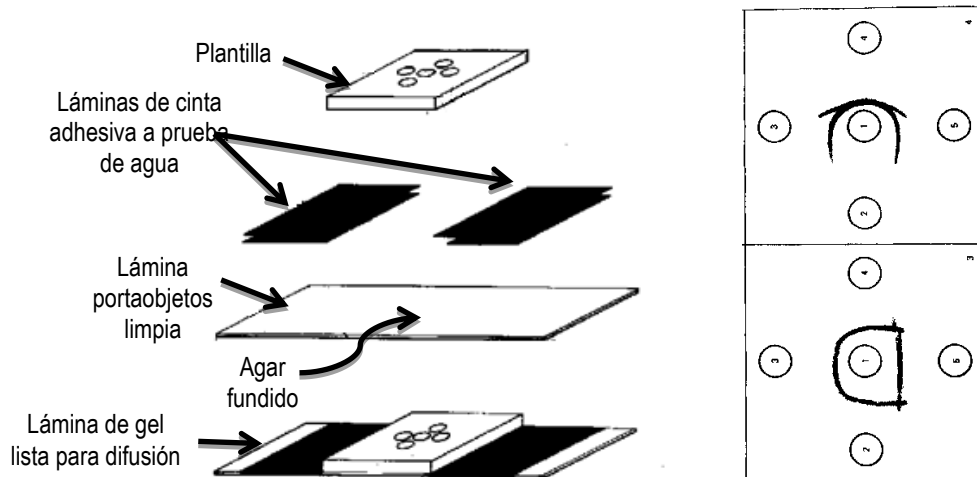


Figura 10. Método de doble difusión en lámina de gel descrito por Casman y colaboradores (1969).

a) Montaje del sistema; b) Líneas de identidad obtenidas, indicando reacción Ag-Ac. Tomado y modificado de Bennett y Hait (2011).

2.3.2. Métodos inmunológicos.

Se basan en reacciones específicas entre el antígeno, que en este caso sería la toxina, y su anticuerpo correspondiente, mono o policlonal dependiendo del caso. Entre ellos se encuentran:

- Aglutinación pasiva reversa en látex (RPLA): representa la reacción entre el anticuerpo unido a una partícula de látex (Figura 11), y el antígeno soluble presente en el alimento o cultivo, lo que se evidencia como un aglutinamiento en forma de capa difusa en la base del pozo correspondiente (Pimbley y Patel, 1998).

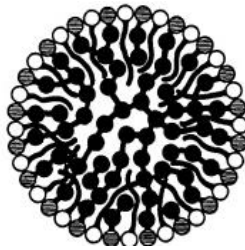


Figura 11. Estructura de una partícula de látex. Tomado y modificado de Gella y colaboradores (1991).

La casa comercial Oxoid (Basingstoke, Inglaterra) ofrece un paquete para la detección semicuantitativa de enterotoxinas basado en esta técnica (SET RPLA) cuyo límite de detección es de 4 ng/g de alimento (Brett, 1998).

- Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA) tipo sandwich: comprende la unión específica Ag-Ac acoplada a una enzima cuyo sustrato produce un compuesto coloreado, de forma tal que la intensidad de color en la muestra es directamente proporcional a su concentración antigénica (Pimbley y Patel, 1998).

Tal como se muestra en la Figura 12, el primer anticuerpo se encuentra fijado a las paredes de los pozos de la microplaca. Así, al incorporar la muestra el Ag se une al anticuerpo, quedando las

partículas adsorbidas al recipiente aun después de realizar lavados sucesivos para retirar el exceso. Seguidamente se incorpora el segundo anticuerpo acoplado a la enzima, el cual se une también al antígeno formando un complejo doble Ac-Ag-Ac o sándwich. Finalmente, se añade un compuesto que actúa como sustrato para la enzima acoplada, obteniéndose el producto coloreado (Peruski y Peruski, 2003).

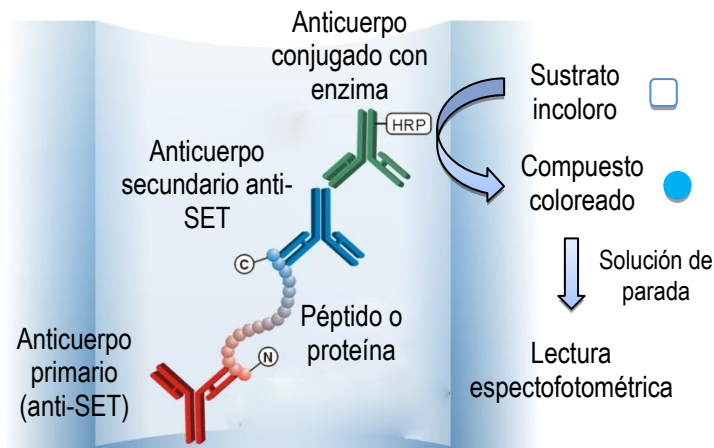


Figura 12. Esquema del ELISA tipo sandwich. Tomado y modificado de fuente anónima (2009a).

Si se parte de la suposición de que cada molécula de sustrato es convertida por una molécula de enzima, y que estas a su vez están unidas a un solo sándwich antigénico, entonces se puede decir que la cantidad de Ag es proporcional a la concentración de cromóforo en la muestra, lo que puede determinarse visualmente o realizando una medida de densidad óptica a la solución utilizando la longitud de onda de máxima absorción en el espectro de dicho cromóforo (Swaminathan y Feng, 1994).

Existen numerosos métodos rápidos en el mercado basados en este tipo de inmunoensayo. SET A-E y SET Total Ridascreen® de R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemania), son paquetes para la detección específica de enterotoxinas A-E de *S. aureus*. El primero es capaz de discriminar entre los diferentes serotipos, mientras que el segundo es general, y presentan límites de detección de

1-2 ng/g de alimento (Park y col., 1996a), y 0.25-0.375 ng/mL de extracto de muestra (R-Biopharmnews, 2010) respectivamente.

Plate SET y Tube SET (L.D.= 0.2-0.5 ng/mL de extracto) de Transia (Transia-Diffchamb S.A. Lyon, Francia), también son paquetes de detección específica de SETs A-E (Wieneke, 1991). SET-EIA de Bommeli AG (Berne, Suiza), está diseñado para la detección de enterotoxinas A-D, y su L.D. ha sido reportado entre 0.1-1 ng/g de alimento (Wieneke y Gilbert, 1987).

Staph VIA y SET VIA Tecra™ de 3M™ Company (St. Paul, E.U.A.), presentan la misma modalidad que los anteriores (general y específico para las toxinas A-E, respectivamente) y su sensibilidad es comparable (L.D = 1-3 ng/mL de extracto de muestra) (Park y col., 1996b). Sin embargo, sólo el primero se encuentra avalado por la AOAC como método de identificación presuntiva, debido a que su especificidad ha sido comprobada en numerosos estudios (Bennett y McClure, 1994). La FDA en el BAM lo sugiere como prueba confirmatoria, proponiendo al segundo como herramienta útil para la identificación del serotipo específico (Bennett y Hait, 2011).

- Fluorimetría enzimática o inmunoensayo enzimático fluorométrico (ELFA): esta técnica no es más que una modificación del ELISA convencional. El sustrato empleado en este caso es un fluoróforo en vez de cromóforo, por lo que la determinación se realiza en base a la fluorescencia emitida utilizando el lector correspondiente (Shekarchi y col., 1985).

VIDAS® Staph Enterotoxin I (SET) y II (SET2) de bioMérieux® (Marcy-l'Étoile, Francia), los cuales se presentan en la Figura 13, son sistemas automatizados disponibles comercialmente que utilizan este principio, permitiendo detectar y distinguir entre las toxinas A-E, incluyendo los tres serotipos diferentes de la C (SEC1, SEC2 y SEC3). El límite de detección reportado para ambos se encuentra entre 0.5-1 ng/g de alimento (Vernozy-Rozand, 2004). VIDAS® SET2 también ha sido aprobado por

la AOAC y recomendado por la FDA como ensayo inicial para la detección de SETs (Bennett y Hait, 2011).

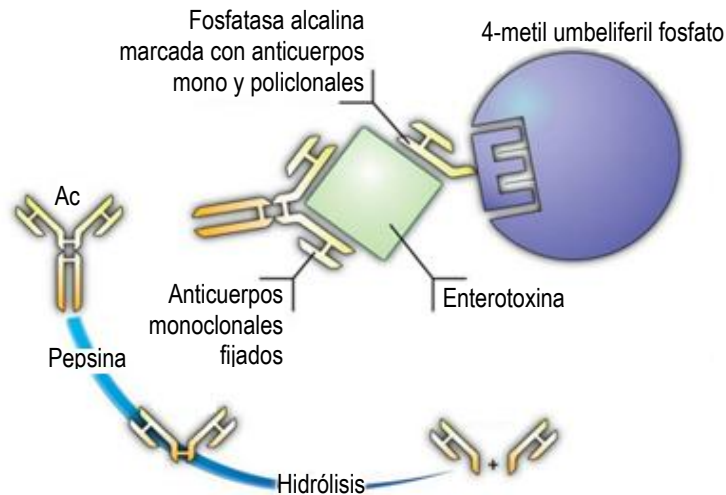


Figura 13. Sistema VIDAS® SET de bioMérieux®. Tomado de Bennett y Hait (2011).

- Radioinmunoensayo (RIA): se basa en la competencia entre estándares marcados con isótopos radiactivos y antígenos no marcados en la muestra, por los sitios de unión específicos en las moléculas de anticuerpo, tal como se muestra en la Figura 14 (Su y Wong, 1997).

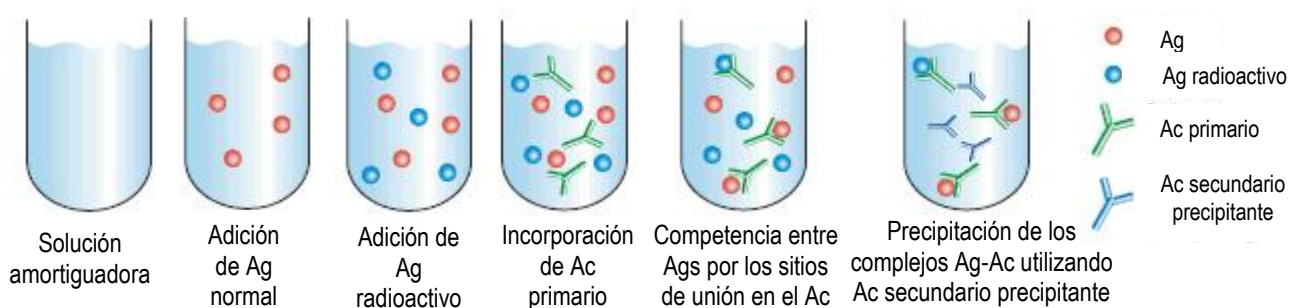


Figura 14. Radioinmunoensayo. Tomado de Milipore (2012).

Ha demostrado gran sensibilidad en matrices alimenticias, lográndose un L.D. inferior a 1 ng/mL de extracto de muestra. Sin embargo el hecho de emplear isótopos radiactivos de vida media corta y la necesidad de personal especializado y equipos de alto costo y complejidad para la lectura de

resultados le confiere una enorme desventaja respecto a otros métodos, además del riesgo potencial asociado (González, 1983).

- Electroinmunotransferencia: también conocido como método SDS-PAGE/Immunoblot, consiste en la separación de proteínas (toxina en este caso) mediante electroforesis SDS-PAGE y su posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa por Western blotting (Figura 15). La presencia de la toxina en la membrana puede ser detectada de forma directa, utilizando un anticuerpo específico contra la toxina previamente marcado con una molécula bioquímicamente detectable (fluoróforo o enzima), o indirecta, empleando un anticuerpo primario dirigido contra la toxina y otro secundario que reconoce a este último y se encuentra marcado (Rasooly, 1998).

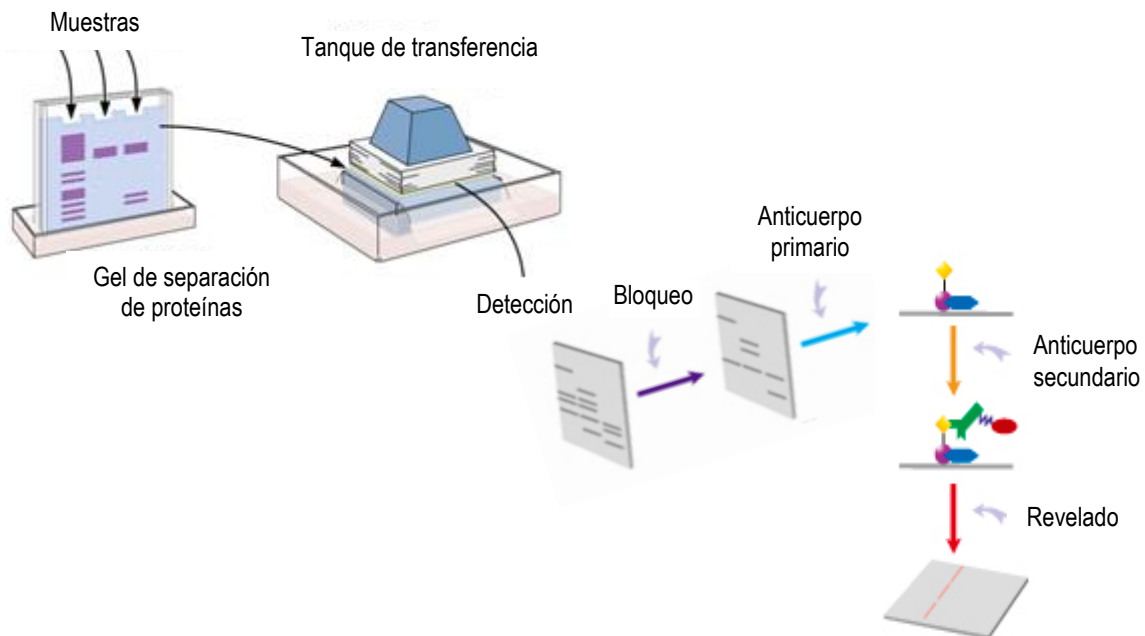


Figura 15. Esquema de una electrotransferencia. Tomado y modificado de V. R. Racaniello (2010).

La ubicación del complejo Ag-Ac corresponde al peso molecular de la toxina, y la banda obtenida se puede visualizar a través de reacciones colorimétricas (Rasooly, 1998). El nivel de detección reportado para esta técnica es de 100 pg/ml (Rasooly y Rasooly, 1998).

- InmunoPCR (iqPCR): con la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han desarrollado numerosas técnicas moleculares que han permitido la identificación y estudio de los genes que codifican las diferentes SETs, pero que por sí solas no brindan información alguna acerca de su expresión (Hennekinne, 2009). En este sentido, Rajkovic y colaboradores (2006) implementaron un novedoso método para la detección y cuantificación de la enterotoxina B de *S. aureus* (SEB).

El mismo, utiliza el principio del ELISA sándwich con la modificación de que existe un puente formado por la proteína estreptavidina entre la molécula de biotina unida al sándwich Ac-Ag-Ac y otra molécula igual acoplada al extremo 5' de una secuencia de DNA de doble cadena reportera (246 pb). Esta quimera es amplificada y cuantificada mediante PCR en tiempo real, obteniendo límites de detección de hasta 10 pg/mL, y ninguna reacción cruzada (SETs A-E) (Rajkovic y col., 2006).

- Separación inmunomagnética (IMS): utiliza perlas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos específicos capaces de reconocer al antígeno presente en la muestra, pero sólo en presencia de un campo magnético, lo que impide la interacción entre ellas por efecto de fuerzas intermagnéticas cuando se encuentran en suspensión, tal como se muestra en la Figura 16 (Banada y Bhunia, 2008).

Su aplicación en la detección de enterotoxinas de *S. aureus* no es muy amplia, aun cuando ha demostrado gran sensibilidad en ensayos realizados en conjunto con otras técnicas como por ejemplo la citometría de flujo (FCM), con un límite de detección entre 0.01 y 0.25 ng/mL de muestra (Miyamoto y col., 2003) y el inmunoensayo fluorescente (IMS-FIA) L.D.= 10ng/mL en agua (Yu, 1998), entre otras.

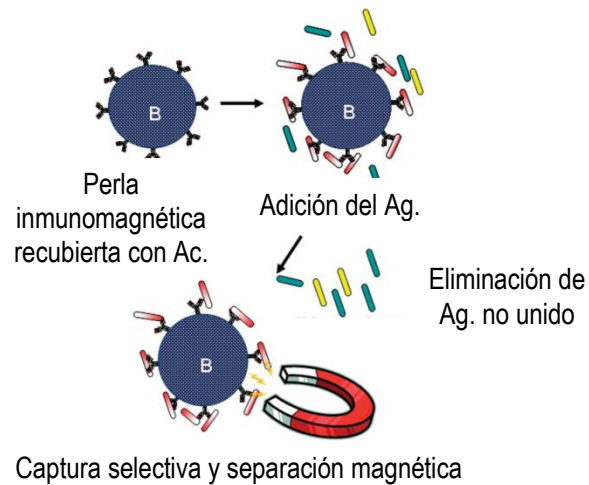


Figura 16. Separación inmunomagnética (IMS). Tomado y modificado de Banada y Bhunia (2008).

2.3.3. Otras técnicas de detección.

Se han efectuado bioensayos en animales experimentales (gatos, monos y conejillos de indias), basados en la administración intragástrica de muestras sospechosas o de toxina purificada vía intravenosa o intradérmica, para el estudio de los síntomas eméticos generados en los ejemplares como consecuencia de la intoxicación y la detección del agente causal de la misma. En algunos casos el límite de detección alcanzado es de 10 pg/mL de toxina, y representa la vía más segura para el estudio de toxinas que aún no han sido caracterizadas. Sin embargo, el largo tiempo de duración, alto costo, diferencias de susceptibilidad y variación de respuesta entre ejemplares y toxinas, y la incapacidad para diferenciar entre los diferentes serotipos son desventajas evidentes respecto a otras técnicas (Su y Lee, 1997).

Existen además técnicas fisicoquímicas como la electroforesis capilar acoplada a detección por fluorescencia, que ha sido probada en la detección de SEA en soluciones estándar obteniendo L.D. entre 8,3 y 180 ng/mL de extracto. La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC también ha resultado útil en la purificación de enterotoxinas a partir de sobrenadantes y en su detección (L.D.= 1

ng/mL de extracto) en matrices alimenticias en lo que se denomina análisis de interacción biomolecular, acoplado a la espectrometría de masas (Hennekinne, 2009). Adicionalmente, esta última se ha empleado para el análisis y detección de toxinas en sobrenadantes de cultivo y matrices alimenticias unido a técnicas de IMS (Figura 17), pero sólo a nivel cualitativo (Schlosser y col., 2007).

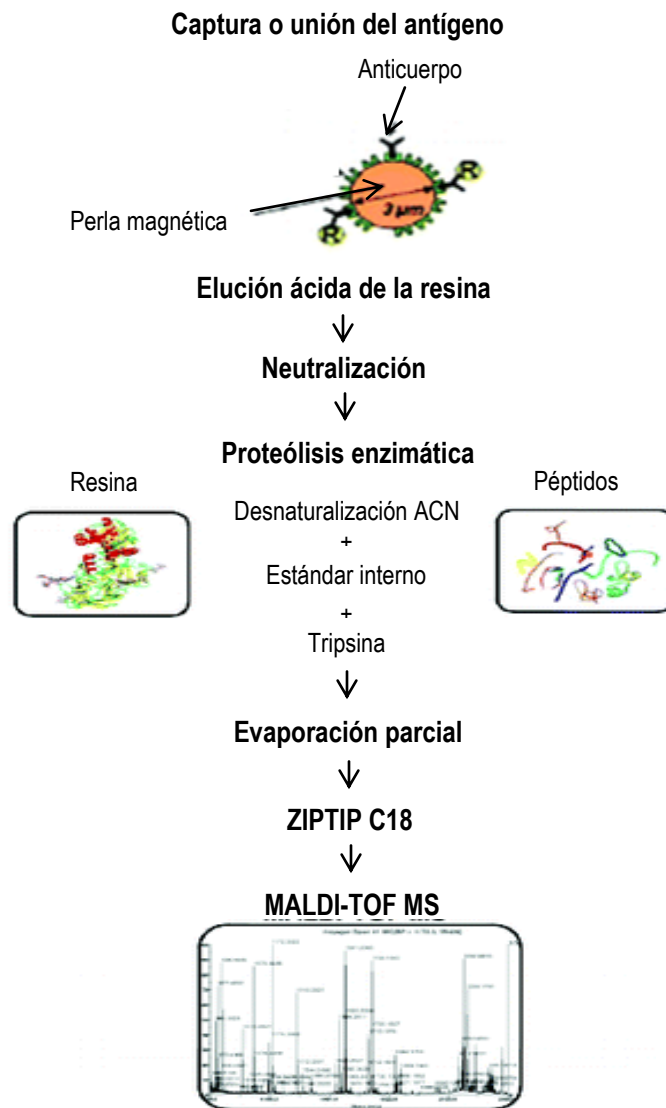


Figura 17. Esquema del proceso de análisis de interacción biomolecular. Tomado y modificado de Duriez y colaboradores (2008).

Todos estos métodos, a pesar de su gran utilidad, requieren estudios de investigación exhaustivos para comprobar su sensibilidad y especificidad. Así, técnicas que aún no han logrado ser implementadas ampliamente en los análisis microbiológicos de rutina podrían llegar a ser incluidas en el mismo. De igual forma, cada día se desarrollan nuevas metodologías que optimizan la manera de realizar investigación científica, lo que no podría lograrse sin trabajos previo en el área. Partiendo de estas premisas se elaboró el actual proyecto de investigación, cuya finalidad y objetivos se proponen en el capítulo siguiente.

III. OBJETIVOS.

Partiendo de la necesidad de probar métodos alternativos a la metodología tradicional para realizar una identificación presuntiva del agente causal en brotes alimentarios o simplemente como parte de la rutina de control de calidad a nivel industrial, se planteó como finalidad de este trabajo de investigación el contraste de resultados de paquetes comerciales diferentes para la detección de SETs en los términos que se exponen a continuación.

3.1. Objetivo general.

Comparar el desempeño de cuatro paquetes comerciales para la detección de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, a fin de seleccionar el más eficiente de ellos para realizar operaciones de control de inocuidad en una empresa de alimentos.

3.2. Objetivos específicos.

- Aislar cepas de *S. aureus* a partir de muestras de alimentos y manos de manipuladores de un comedor industrial.
- Seleccionar cepas de *S. aureus* silvestres y de referencia productoras de enterotoxinas.
- Estandarizar el método de contaminación artificial de matrices de alimentos con *S. aureus* para promover la producción de toxinas.
- Comparar el desempeño de sistemas comerciales para la detección de enterotoxinas utilizando cultivos puros de *S. aureus*.
- Comparar el desempeño de sistemas comerciales para la detección de enterotoxinas en matrices de alimentos contaminadas artificialmente de *S. aureus*.
- Seleccionar el sistema comercial más eficiente para la detección de enterotoxinas de *S. aureus*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Reactivos y soluciones.

- BHI BBLTM Becton & Dickinson.
- BPA Merck.
- Buffer Tris 0.05 M.
- CASO-Bouillon Merck.
- Etanol al 70% v/v.
- Extracto de levadura Oxoid.
- Glucosa 10% v/v.
- HCl 5 M.
- Manitol 10% v/v.
- NaCl 0,85% p/v.
- NaOH 2 M.
- Parafina estéril.
- PBS ajustado a pH 7.4.
- PCA Merck.
- Peptona bacteriológica Oxoid.
- Peróxido de hidrógeno 35%.
- Plasma liofilizado de conejo tratado con EDTA Bactident® Coagulase Merck.
- Púrpura de bromocresol.
- Yema de huevo con telurito estéril Oxoid.

4.2. Materiales y Equipos.

- Asas de siembra de platino y plástico.
- Esterilizador autoclave vertical Hirayama modelo HA-MII.
- Baño Thermo Scientific Precision Serie 280.
- Bolsas para desechos biológicos resistentes a esterilización por autoclave.
- Cámara de Neubauer.
- Campana de flujo laminar.
- Centrífuga Survall® RT6000B DuPont.
- Cronómetro.
- Filtros de membrana Minisart® y NALGENE®. Diámetro de poro = 0.2 μm .
- Incubadora Barnstead Lab-Line Imperial III (modelo 305) ajustada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Incubadora digital con agitación Lab-Line modelo 4628.
- Lector de absorbancia para microplacas ELx800 BioTek®.
- Microplacas de 96 pozos.
- Microscopio óptico y estereoscópico.
- Pipetas automáticas simples p10 y 5 ml, p1000, 200, 20 y 10 μL y multicanal p200 μL .
- Placas rehidratables Petrifilm™ Staph Express con sus discos respectivos.
- Puntas para pipetas automáticas p10 y 5 mL, y p1000, 200, 20 y 10 μL .
- Tiras indicadoras de pH Merck.
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL de capacidad.
- Tubos falcon de 15 y 50 mL de capacidad.
- Homogeneizador automático Stomacher® Seward Ltd. para bolsas de 400 mL.
- Vortex L&M modelo LE-345.

4.3. Sistemas comerciales para identificación de microorganismos y detección de toxinas.

- API® Staph de bioMérieux® (Marcy-l'Étoile, Francia)
- Gram-color de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).
- Placas rehidratables Petrifilm™ Staph Express de 3M™ con sus discos respectivos.
- SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemania).
- SET RPLA de OxoidLtd. (Basingstoke, Reino Unido).
- SET Total Ridascreen® de R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemania).
- Staph Enterotoxin VIA Tecra™ de 3M™ Company (St. Paul, E.U.A.).
- Staphylect Plus de Oxoid Ltd. (Basingstoke, Reino Unido).

4.4. Metodología.

4.4.1. Selección de cepas de *S. aureus*.

4.4.1.1. Aislamiento e identificación de cepas de *S. aureus* a partir de muestras tomadas en un comedor industrial.

4.4.1.1.1. Toma de muestras.

Se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Alimentos: se tomó una cantidad representativa de cada uno y se depositó en una bolsa plástica hermética estéril, cerrando inmediatamente para no alterar la carga microbiológica.
- Manos de manipuladores: los dedos de la mano operante de cada manipulador se pusieron en contacto directo con la superficie inferior de la película de agar en una placa Petrifilm™ STX.

Seguidamente, se bajó la pestaña superior para evitar contaminación externa, y se almacenó junto al resto en un recipiente hermético estéril.

Finalmente, todas las muestras se trasladaron de manera aséptica hasta el laboratorio para su tratamiento.

4.4.1.1.2. Análisis y tratamiento de las muestras colectadas.

- Alimentos: se siguió la metodología descrita en la normativa venezolana COVENIN en sus ediciones N° 1126-89 para el aislamiento, identificación y preparación de muestras para análisis microbiológico, y N° 1292-04 para aislamiento e identificación de *S. aureus* en alimentos.
- Manos de manipuladores: las placas se llevaron directamente a incubación a 37°C durante 24h para su posterior recuento de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.4.1.1.3. Identificación de cepas de *S. aureus*.

A todos los aislados, y a algunas cepas de estafilococos del cepario interno del laboratorio, se les aplicaron pruebas de confirmación y complementarias especificadas en la normativa venezolana COVENIN N° 1292-04 para aislamiento e identificación de *S. aureus* en alimentos. Adicionalmente, se realizó la prueba de identificación Staphylect Plus de Oxoid específica para *S. aureus*.

4.4.1.2. Detección de producción de toxinas en cepas de *S. aureus* silvestres y del cepario interno del laboratorio.

La capacidad toxigénica de las cepas identificadas y otras cepas del cepario interno del laboratorio se midió usando los cuatro sistemas comerciales de detección, siguiendo estrictamente el instructivo de cada uno.

4.4.2. Estandarización del método de contaminación artificial con enterotoxinas y nivel de inóculo para los alimentos empleados como matriz de crecimiento de *S. aureus*.

4.4.2.1. Selección de matrices aptas para el crecimiento de *S. aureus*.

Se probaron diferentes alimentos de riesgo. La prueba consistió en contaminar 25 g de matriz sólida o 10 mL de producto líquido con un volumen de inóculo suficiente para alcanzar una carga final de 10^3 células bacterianas por gramo o mililitro de alimento. Estos se dejaron incubar a 37°C durante 48h, realizando recuentos a distintos tiempos (0, 24 y 48h) e incluyendo un control sin inóculo de cada uno. El inóculo para la contaminación se tomó de un cultivo puro de *S. aureus* de crecimiento rápido en CASO (incubado a 37°C por 24h), cuyo título bacteriano fue calculado previamente mediante recuento microscópico directo en cámara de Neubauer. El tratamiento, análisis y recuento en las matrices fue hecho de acuerdo a la normativa venezolana COVENIN N° 1126-89 y 1292-04.

4.4.2.2. Evaluación de métodos de contaminación artificial de las matrices.

Se probaron dos métodos de contaminación:

- Inoculación directa con el microorganismo: se utilizó el protocolo descrito para la selección de matrices alimenticias (punto 4.4.2.1).
- Contaminación con extracto filtrado del cultivo puro: a cada alimento se le añadieron tres volúmenes diferentes (0.1, 0.5 y 1 mL) de extracto obtenido mediante centrifugación y filtración del cultivo puro.

4.4.2.3. Estandarización del nivel de inóculo para contaminación de matrices con *S. aureus*.

Los resultados obtenidos durante la prueba de crecimiento en las matrices fueron utilizados como referencia para probar el resto de las cepas seleccionadas. Con base a esto, se estableció el orden

de magnitud que debía tener el inóculo para lograr el recuento deseado (10^6 UFC/g o mL) luego de 48h de incubación.

4.4.3. Comparación del desempeño de los métodos rápidos en la detección de enterotoxinas utilizando distintas cepas de *S. aureus*.

La comparación de los resultados obtenidos se estableció entre paquetes comerciales equivalentes (generales y específicos) empleando como matrices de crecimiento caldos de cultivo y alimentos artificialmente inoculados con las 3 cepas toxigénicas seleccionadas y la cepa de referencia ATCC 25923. La extracción de toxinas en cada caso se llevo a cabo de la siguiente forma:

- Caldo de cultivo: se partió de un cultivo en CASO de cada cepa incubado durante 24h a 37°C. El mismo, fue sometido a centrifugación a máxima velocidad y filtración estéril para obtener el extracto.
- Alimentos: las matrices fueron contaminadas directamente con la bacteria y el análisis de las matrices se llevó a cabo de la manera descrita en el apartado 4.2.2.1 (selección de alimentos), realizando recuentos sólo a las 0 y 48h de incubación, incluyendo el control sin inóculo.

Para cada sistema se calcularon los porcentajes de falsos positivos y falsos negativos como parámetros de desempeño en cada tipo de matriz de acuerdo a lo sugerido por Trullols y colaboradores (2004). Adicionalmente, se realizó una estimación de la sensibilidad de cada uno mediante la determinación del límite de detección relativo (LDR), la cual comprendió la detección de toxinas en el cultivo puro de cada cepa y 5 diluciones decimales del mismo (1/10, 1/100, 1/200, 1/500 y 1/1000).

4.4.4. Selección del método de detección de SETs más eficiente.

El criterio de selección aplicado en este caso tuvo como base la practicidad, costo y desempeño mostrado por los métodos rápidos comerciales en la detección de enterotoxinas de *S. aureus* durante el estudio.

V. RESULTADOS.

5.1. Selección de cepas de *S. aureus*.

Como se mencionó previamente en la metodología, las cepas de *S. aureus* utilizadas durante el estudio fueron seleccionadas entre los aislados obtenidos en un comedor industrial y distintos estafilococos del inventario interno del laboratorio, con base a su capacidad de producir enterotoxinas de tipo A, B, C D o E. Los resultados obtenidos en cada caso se muestran a continuación.

5.1.1. Aislamiento e identificación de cepas de *S. aureus* a partir de muestras tomadas en un comedor industrial.

Durante el muestreo realizado se tomaron 15 muestras: 10 provenientes de manos de manipuladores y 5 de alimentos. Como puede observarse en la Tabla V, se aislaron colonias presuntivas de *S. aureus* en tres de los cinco alimentos analizados, obteniéndose el mayor recuento en hojas de lechuga que no habían sido sometidas a ningún tratamiento de limpieza previo. Al aplicar diversas pruebas confirmatorias a los aislados bacterianos, incluyendo tinción Gram, fermentación de Manitol, actividad catalasa y coagulasa, se encontró que dos de ellos (P3 y O4) presentaban características típicas de *S. aureus* y producían enterotoxinas. La cepa encontrada en la avena en polvo (A17) no mostró correspondencia con el control positivo empleado (ATCC 29213) ni capacidad toxigénica, motivo por el cual fue descartada como miembro de dicha especie.

Tabla V. Aislamiento de cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas a partir de alimentos muestreados en un comedor industrial.

Cepa	Fuente	Recuento presuntivo (ufc/g) ^a	Pruebas confirmatorias					Producción de toxinas ^b
			G	Ct	Cg	M	SP	
ATCC 29213 (control positivo)	NA	NA	+	+	+	+	+	+
P3	Arroz cocido	30	+	+	+	+	-	+
A17	Avena en polvo	>100	+	+	+/-	-	-	-
O4	Lechuga sin lavar	180	+	+	+	+	+	+

^a Utilizando las placas Petrifilm™ STX de 3M™ para recuento selectivo de *S. aureus*. N.A: No aplica

(+) Resultado positivo; (+/-) Resultado no concluyente; (-) Resultado negativo.

Pruebas confirmatorias. G: Tinción Gram; Ct: Catalasa; Cg: Coagulasa; M: Manitol; SP: Staphylect Plus de Oxoid.

^b solo se consideraron positivos los resultados confirmados en al menos 3 de los 4 sistemas de detección utilizados.

En el caso de los manipuladores de alimentos (Tabla VI), seis presentaron colonias presuntivas de estafilococos en sus manos. Dos de las cepas aisladas fueron identificadas como *S. aureus* (excepto en la prueba de aglutinamiento Staphylect Plus), mientras que el resto no mostró el perfil típico de esta especie durante las pruebas confirmatorias. Ninguna de ellas fue detectada como toxigénica.

Tabla VI. Aislamiento de cepas de *S. aureus* a partir de manipuladores de alimentos y evaluación de la capacidad toxigénica de las mismas.

Cepa	Presencia de <i>S. aureus</i> ^a	Pruebas confirmatorias					Producción de toxinas ^b
		G	Ct	Cg	M	SP	
ATCC 29213 (Control positivo)	N.A.	+	+	+	+	+	+
01	+	+	+	+	-	-	-
03	+	+	+	+	+	-	-
05	+	+	+	+	-	-	-
06	+	+	+	+	+	-	-
07	+	+	+	+	-	-	-
08	+	+	+	+	-	-	-

^a Utilizando las placas Petrifilm™ STX de 3M™ para recuento selectivo de *S. aureus*. N.A.: No aplica.

(+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo.

Pruebas confirmatorias. G: Tinción Gram; Ct: Catalasa; Cg: Coagulasa; M: Manitol; SP: Staphylect Plus de Oxoid;

^b solo se consideraron positivos los resultados confirmados en al menos 3 de los 4 sistemas de detección utilizados.

5.1.2. Selección de cepas de *S. aureus* previamente aisladas.

Se sometieron a pruebas bioquímicas confirmatorias y evaluación de capacidad toxigénica 4 cepas del género *Staphylococcus* spp., provenientes del cepario del laboratorio de la Gerencia de Soporte Científico (tabla VII) y aisladas en el mismo. La identificación realizada utilizando el sistema API® Staph indicó que todas eran *S. aureus*, pero sólo la mitad de ellas fueron confirmadas por la metodología tradicional. Ninguna resultó productora de enterotoxinas.

Tabla VII. Pruebas bioquímicas confirmatorias y evaluación de producción de enterotoxinas realizadas a las cepas de estafilococos disponibles en el cepario del laboratorio de la GSC.

Colección	Fuente	Pruebas confirmatorias					Producción de toxinas ^a
		G	Ct	Cg	M	API® Staph	
GSC 003	Desconocida	+	+	+	-	<i>S. aureus</i>	-
GSC 070	Comprada al INHRR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. warneri</i>	-
GSC 071	Queso	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	-
GSC 074	Arepas	+	+	+	-	<i>S. aureus</i>	-
ATCC 29213 (control positivo)	NA	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	+

N.A: No aplica; (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo.

Pruebas confirmatorias. G: Tinción Gram; Ct: Catalasa; Cg: Coagulasa; M: Manitol; API® Staph: Sistema de pruebas bioquímicas miniaturizadas para la identificación de especies del género *Staphylococcus* (bioMérieux).

^a solo se consideraron positivos los resultados confirmados en al menos 3 de los 4 sistemas de detección utilizados.

Adicionalmente, se comparó la capacidad toxigénica teórica (reportada en trabajos previos) para cepas de referencia de la ATCC con la exhibida experimentalmente durante las pruebas de detección. Sólo dos de ellas, ATCC 49444 y ATCC 29213, resultaron toxigénicas (Tabla VIII).

Tabla VIII. Capacidad toxigénica teórica y experimental para las cepas de referencia de la ATCC disponibles en el cepario del laboratorio de la GSC.

Cepa	Fuente	CT teórica ^a	CT experimental ^b
ATCC 25923	CVCM (Fuente original: aislado clínico)	NE (Suarez y col., 2008; Brizzio y col., 2011) A (BCCM™, 2012)	-
ATCC 6538	CVCM (Fuente original desconocida)	NE (Brizzio y col., 2011) A y B (Zúñiga y col., 1999), C (Parsaeicmehr y col., 2010)	-
ATCC 29213	CVCM (Fuente original: herida)	A y B (Qiu y col., 2010; Li y col., 2011)	+
ATCC 49444*	Empresa MicroBiologics (Fuente original desconocida)	SR	+

(*) Identificada inicialmente como *S. aureus* y posteriormente confirmada como *S. pseudintermedius* por la ATCC.

^a Capacidad Toxigénica (CT) teórica. Se detalla la información disponible para cada cepa y la fuente bibliográfica correspondiente. NE: No enterotoxigénica; A: Enterotoxina A; B: Enterotoxina B; C: Enterotoxina C; SR: Sin referencia.

^b Capacidad Toxigénica (CT) experimental. (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo. Solo se consideraron positivos los resultados confirmados en al menos 3 de los 4 sistemas de detección utilizados.

5.2. Estandarización del método de contaminación artificial con enterotoxinas y nivel de inóculo para los alimentos empleados como matriz de crecimiento de *S. aureus*.

Para determinar la conveniencia de los métodos de contaminación para las matrices se confirmó la presencia de enterotoxinas en las mismas luego del tratamiento aplicado (inoculación directa con el microorganismo toxigénico o incorporación del extracto filtrado a partir de un cultivo puro del mismo). Posteriormente, se determinó la cantidad necesaria de células bacterianas a incorporar en cada alimento para lograr un crecimiento óptimo para la detección de enterotoxinas en 48 h. En los párrafos que siguen a este texto se proporcionan los resultados a detalle de cada experimento realizado.

5.2.1. Selección de matrices aptas para el crecimiento de *S. aureus*.

Antes de proceder a evaluar cualquiera de los métodos de contaminación, se realizó una prueba de crecimiento del microorganismo (cepa toxigénica O4) durante 48 h en 7 matrices diferentes. En la Tabla IX se observa que todas ellas, exceptuando el yogur y la leche completa, lograron alcanzar las 10^6 unidades formadoras de colonias por gramo de alimento partiendo de un inóculo inicial de 10^3 UFC/g luego de 24h.

Tabla IX. Crecimiento de la cepa de *S. aureus* O4 durante 48 h en alimentos artificialmente inoculados.

Matriz	Recuento (UFC/g)*		
	t = 0h	t = 24 h	t = 48 h
<i>Helado de mantecado</i>	<10	10^6	10^7
<i>Jamón cocido de pierna</i>	10^3	$>10^3$	10^8
<i>Leche líquida completa</i>	10^4	10^3	10^5
<i>Leche líquida descremada UHT</i>	<10	$>10^3$	10^9
<i>Queso cheddar fundido</i>	10	10^2	10^6
<i>Queso suizo fundido</i>	10^2	10^2	$>10^6$
<i>Yogur pasteurizado con cerezas</i>	10	<10	<10

(*) Utilizando las placas Petrifilm™ STX de 3M™ para recuento selectivo de *S. aureus*.

5.2.2. Evaluación de métodos de contaminación artificial de las matrices.

Una vez probado el crecimiento de la cepa de *S. aureus* O4 en las matrices, se prosiguió a la evaluación de los métodos de contaminación planteados. Se seleccionaron dos matrices para realizar el ensayo, jamón y leche líquida completa, manteniendo la misma cepa de prueba (O4). Al trabajar con el microorganismo se tomó en cuenta que la velocidad de crecimiento en la leche fue más baja y por ello se partió de un inóculo inicial mayor.

Como se muestra en la Tabla X, la detección de toxinas fue equivalente para los dos métodos evaluados en ambos alimentos. La muestra de leche contaminada con 1 mL de extracto de toxina fue omitida debido a que no fue posible realizar el paso de filtración previo requerido para el análisis.

Tabla X. Detección de enterotoxinas en dos matrices contaminadas artificialmente con la cepa de *S. aureus* O4.

Matriz	Método de contaminación	Nivel de contaminación	Producción de toxinas*
<i>Jamón de pierna</i>	Microorganismo	10 ² UFC/g	+
	Extracto de toxina filtrado	0.1 ml	+
		0.5 ml	+
		1 ml	+
<i>Leche líquida</i>	Microorganismo	10 ⁵ UFC/g	+
	Extracto de toxina filtrado	0.1 ml	+
		0.5 ml	+
		1 ml	NP

(*) Medida usando el sistema de detección específica SET RPLA de Oxoid.

(+) Resultado positivo. NP: no probada.

5.2.3. Estandarización del nivel de inóculo para contaminación de matrices con *S. aureus*.

Previa a la comparación se llevó a cabo una prueba de crecimiento de cada cepa seleccionada utilizando como soporte los alimentos comprobados como aptos en el apartado anterior (Tabla IX). En la Tabla XI, se observa que O4 supera en 48 horas el recuento mínimo reportado para la producción de un nivel detectable de toxinas en alimentos (10⁶ unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro de alimento) empleando un inóculo de 165 células/mL. En el caso de P3, sólo 3 de las matrices probadas superaron las 10⁶ UFC por gramo (helado y jamón) y mililitro (leche líquida). Para ATCC 25923 fue suficiente con añadir 10² células por gramo o mililitro de matriz para superar

las 10^6 UFC en helado, jamón y leche, pero en queso fundido no hubo crecimiento. ATCC 29213, al emplear un inóculo de 10^4 células por gramo de alimento sólido y de 10^5 células por mililitro de matriz líquida, logró alcanzar recuentos superiores a 10^7 UFC.

Tabla XI. Crecimiento de cepas de *S. aureus* en matrices alimenticias luego de 48 horas de incubación.

Cepa	Matriz	Inóculo inicial añadido (UFC/g o mL) ^a	Recuento final de <i>S. aureus</i> (UFC/g o mL) ^a
O4	Queso fundido untable		5.8×10^6
	Helado de mantecado	1.65×10^2	3.6×10^7
	Leche descremada UHT		$1,3 \times 10^9$
P3	Queso fundido untable		$<10^3$
	Helado de mantecado	1.3×10^3	9×10^7
	Jamón		1.71×10^9
	Leche descremada UHT	5.19×10^2	2.5×10^8
ATCC 29213	Queso fundido untable		3.33×10^8
	Helado de mantecado	8.00×10^4	4.42×10^8
	Jamón		1.31×10^8
	Leche descremada UHT	1.28×10^5	9.06×10^7
ATCC 25923	Queso fundido untable		400
	Helado de mantecado	4.14×10^2	2.3×10^7
	Jamón		2.65×10^8
	Leche descremada UHT	1.67×10^2	1.59×10^9

^a Utilizando las placas Petrifilm™ STX de 3M™ para recuento selectivo de *S. aureus*.

5.3. Comparación del desempeño de los métodos rápidos en la detección de enterotoxinas utilizando distintas cepas de *S. aureus*.

Cuatro sistemas de detección comerciales, dos generales y dos específicos, fueron probados. La base de la comparación entre ellos fue el perfil de detección de toxinas mostrado por cepas cultivadas en fase líquida y el registro de interferencias en la detección al emplear alimentos como matriz de crecimiento para las mismas. Los resultados se expresan a continuación.

5.3.1. Comparación del desempeño de paquetes comerciales para la detección general de enterotoxinas estafilocócicas en cepas de *S. aureus*.

Los sistemas comerciales SET Total Ridascreen® de R-Biopharm y SET VIA TECRA™ de 3M™, que permiten la detección general de las enterotoxinas de *S. aureus*, fueron comparados utilizando el cultivo puro de las 17 cepas de estafilococos disponibles en el cepario: 9 aisladas durante el muestreo realizado en el comedor industrial (alimentos y manipuladores), 4 aisladas en el laboratorio (GSC) y 4 de referencia (ATCC). El perfil de detección de ambos sistemas coincidió en todos los casos evaluados, registrándose resultados positivos únicamente en cepas con capacidad de producción de toxinas demostrada experimentalmente (ATCC 29213, O4, P3 y ATCC 49444).

Luego de este ensayo se sometieron a prueba 4 de las cepas mencionadas anteriormente (O4, P3, ATCC 29213 y ATCC25923), cultivándolas esta vez en los 4 alimentos que demostraron ser aptos para el crecimiento de *S. aureus* en el punto 5.2.1 (ver Tabla IX) encontrando en algunos casos resultados falsos negativos (Tabla XII) específicamente en productos lácteos (quesos, leche y helado) y en mayor proporción en el kit SET VIA TECRA™.

Tabla XII. Porcentaje de resultados falsos negativos obtenidos al probar cepas de *S. aureus*, en matrices de crecimiento diferentes, utilizando los sistemas comerciales SET Total Ridascreen® y SET VIA TECRA™.

Cepa	Sistema	Matriz de crecimiento	
		Caldo de cultivo	Alimentos
O4	Total	0%	25% ^a
	TECRA	0%	25% ^a
P3	Total	0%	67% ^{b,c}
	TECRA	0%	100%
ATCC 29213	Total	0%	0%
	TECRA	0%	25% ^a
ATCC 25923	Total	NA	NA
	TECRA	NA	NA

Tamaño de muestra: $n=16$ en caldos de cultivo; en alimentos $n=4$ (O4 y ATCC 29213) y $n=3$ (ATCC 25923 y P3).

Matrices alimenticias: ^a queso cheddar fundido; ^b helado de mantecado; ^c leche descremada UHT.

El criterio de veracidad empleado fue la capacidad toxigénica demostrada por la cepa en el cultivo puro y confirmada en al menos 3 de los 4 sistemas de detección (ver tablas V-VIII).

NA no aplica (en los casos en los que la cepa no producía la toxina en cultivo puro, no es posible que exista un resultado falso negativo).

Posteriormente, se prepararon 5 diluciones decimales del extracto filtrado del cultivo puro de las 3 cepas de *S. aureus* con capacidad toxigénica (CT) experimental (ATCC 29213, O4 y P3). Cada una de ellas se sometió a prueba utilizando los 2 sistemas comerciales de detección general para determinar la máxima dilución a la cual se obtenían resultados positivos, valor que fue definido como límite de detección relativo (LDR). SET Total Ridascreen® presentó un mayor LDR (Tabla XIII) en 2 de los casos, logrando alcanzar hasta dos diluciones por encima del LDR de SET VIA TECRA™ (cepa ATCC 29213).

Tabla XIII. Límite de detección relativo de enterotoxinas para los sistemas comerciales SET Total Ridascreen® y SET VIA TECRA™ en extractos filtrados de cultivos puros de cepas de *S. aureus*.

Cepa	LDR*	
	Total	TECRA
ATCC 29213	1/200	1/10
O4	1/1000	1/1000
P3	1/10	0 ^a

(*) Límite de detección relativo (LDR) definido como la máxima dilución del cultivo puro de la cepa en la que se detectan toxinas.

^a El valor de LDR definido como cero (0) hace referencia al cultivo puro sin diluir.

5.3.2. Comparación del desempeño de paquetes comerciales para la detección específica de enterotoxinas estafilocócicas.

Los sistemas SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm y SET RPLA de Oxoid, que permiten la detección específica de 4 y 5 serotipos de enterotoxinas respectivamente, fueron comparados de igual forma empleando el extracto filtrado del cultivo puro de las cepas O4, P3, ATCC 29213 y ATCC 25923. De estas, sólo 2 (O4 y ATCC 29213) exhibieron capacidad toxigénica según RPLA (Tabla XIV), mientras que SET A-E señaló una más (P3). Las únicas coincidencias en el perfil de detección de ambos sistemas se encontraron para la toxina C producida por la cepa O4 y la toxina A en la cepa ATCC 29213.

Tabla XIV. Perfil de detección de enterotoxinas en cultivos puros de distintas cepas de *S. aureus* de acuerdo a los sistemas SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm y SET RPLA de Oxoid.

Cepa de <i>S. aureus</i>	Sistema							
	RPLA				SET A-E			
	Serotipo				Serotipo			
	A	B	C	D	A	B	C	D
O4	-	-	+	-	-	+	+	-
P3	-	-	-	-	-	-	+	-
ATCC 29213	+	-	-	-	+	-	+	-
ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): La toxina correspondiente fue detectada; (-): No hubo detección de dicha toxina.

Considerando las coincidencias antes mencionadas, se determinó el límite de detección relativo (LDR) de cada método para estos serotipos específicos. En la Tabla XV se refleja que el desempeño de ambos sistemas en esta prueba fue comparable, alcanzándose el mismo LDR para las toxinas C (1/200) y A (1/10) de las cepas O4 y ATCC 29213 respectivamente.

Tabla XV. Límite de detección relativo para los serotipos A y C utilizando los paquetes comerciales SET A-E Ridascreen® y SET RPLA Oxoid en cultivos puros de las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y O4.

Serotipo producido	Cepa	LDR*	
		SET A-E	RPLA
A	ATCC 29213	1/10	1/10
C	O4	1/200	1/200

*Límite de detección relativo (LDR) definido como la máxima dilución del cultivo puro de la cepa en la que se detecta el serotipo de toxina indicado.

Finalmente, se utilizó el perfil de detección obtenido anteriormente para establecer el porcentaje de resultados falsos negativos y positivos en los cultivos realizados en matrices alimenticias. En la

Tabla XVI se evidencia una gran variación entre ambos sistemas para cada cepa, presentado RPLA mayor correspondencia con los resultados obtenidos para los caldos de cultivo respecto a SET A-E.

Tabla XVI. Resultados falsos positivos y falsos negativos detectados utilizando los sistemas SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm y SET RPLA de Oxoid en alimentos artificialmente inoculados con cepas de *S. aureus*.

Cepa de <i>S. aureus</i>	Sistema			
	RPLA		SET A-E	
	Falsos positivos (%)	Falsos negativos (%)	Falsos positivos (%)	Falsos negativos (%)
O4	0	75 ^{a,c,d} (C)	0	13 (B y C)
P3	33 ^d (C)	NA	0	67 ^{b,d} (C)
ATCC 29213	0	25 ^a (A)	38 (A y C)	38 (A y C)
ATCC 25923	0	NA	33 ^c (A)	NA

Tamaño de muestra empleado: $n=4$ (O4 y ATCC 29213) y $n=3$ (ATCC 25923 y P3).

Matrices alimenticias: ^a queso cheddar fundido; ^b helado de mantecado; ^c jamón de pierna cocido; ^d leche descremada UHT. Entre paréntesis se indica el serotipo específico de toxina en base al que fue calculado el resultado.

El criterio de veracidad empleado en cada caso fue la capacidad toxigénica experimental mostrada por la cepa en el cultivo puro durante las pruebas realizadas con el sistema de detección correspondiente (ver tabla XIV).

NA no aplica (en los casos en los que la cepa no producía la toxina en cultivo puro, no es posible que exista un resultado falso negativo).

VI. DISCUSIÓN.

6.1. Selección de cepas de *S. aureus*.

De las cepas aisladas a partir de alimentos se encontró una enterotoxigénica en hojas de lechuga sin lavar, lo que concuerda con lo obtenido por Thunberg y colaboradores en 2002. Estos lograron recuperar 3 cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* a partir de muestras de lechuga colectadas en mercados del área metropolitana de Washington. De igual forma, Moon y colaboradores (2007) evaluaron la producción de toxinas en 67 cepas de dicha especie provenientes de 616 vegetales distintos (incluyendo lechuga), obteniendo 49 resultados positivos.

La microbiota acompañante en vegetales frescos de consumo crudo (lechuga, repollo, entre otros) suele estar integrada principalmente por microorganismos ambientales y algunos patógenos presentes en el agua y el suelo (Johannessen y col., 2002). Sin embargo, en la larga cadena de procesamiento de este tipo de producto, pueden incorporarse por contaminación cruzada y/o manipulación, otro tipo de agentes infecciosos como *S. aureus* (Madden, 1992).

La segunda cepa enterotoxigénica aislada en los alimentos muestreados fue P3 la cual se aisló de arroz cocido (tabla V). La temperatura y el tiempo necesarios para cocinar el arroz (Suzuki y col., 1976) son suficientes como para eliminar bacterias patógenas como *S. aureus* (Wilkinson y col., 1965), por ello la detección de enterotoxinas estafilocócicas en el mismo debería atribuirse a contaminación posterior a la cocción. En este estudio, dicha contaminación pudo ocurrir por contacto con una superficie mal higienizada, ya que ninguna cepa aislada de manos de manipuladores resultó ser enterotoxigénica (Tabla VI).

La presencia de *S. aureus* en alimentos provenientes de comedores de empresas privadas ha sido reportada previamente por de Curtis y colaboradores (2000). Gubbay y colaboradores (2003) aislaron un total de 24 cepas de la especie antes mencionada en 236 alimentos distintos incluyendo arroz cocido, pero la encontrada en este último resultó negativa a la prueba de detección de SETs a diferencia de P3. En cambio, Hung y colaboradores (1993) inocularon artificialmente muestras de este alimento con 10^3 UFC de *S. aureus* por gramo, logrando detectar 0.11 nanogramos de toxina por gramo de arroz luego de 6 horas de incubación a 37°C.

La capacidad de diversas especies de estafilococos para tolerar valores de actividad de agua tan bajos como 0.82 (Grant, 2004) le permite crecer en alimentos como cereales y sus productos derivados (Bullerman y Bianchini, 2011). Este fue el caso de la muestra de avena en polvo analizada en este trabajo, en la que se aisló una cepa de *Staphylococcus* spp. en recuentos superiores a 10^2 UFC/g que posteriormente resultó ser negativa en las pruebas de producción de toxinas realizadas. Powers y colaboradores (1971) analizaron 104 muestras de distintos alimentos espaciales deshidratados (incluyendo barras de avena tostada), pero ninguno de ellos presentó estafilococos coagulasa positivos.

Debido a que el producto se encontraba sellado y no se observó ningún daño en el empaque, es posible que la incorporación del microorganismo haya ocurrido durante la etapa de elaboración. Frecuentemente se vincula la contaminación de productos procesados a equipos o superficies con higiene deficiente (Lancette y Bennett, 2001), lo que pudo representar el origen de la misma en la avena. Al ser *Staphylococcus* uno de los géneros que comúnmente producen biopelículas, su acumulación en las superficies se ve facilitada por la protección que le ofrece dicha envoltura ante los agentes de limpieza y desinfectantes (Mattila-Shandholm y Wirtanen, 1992).

El aislamiento de estafilococos en manos de manipuladores del comedor industrial muestreado sugiere problemas de higiene en dichos trabajadores, ya que dicho microorganismo representa un indicador de calidad sanitaria (Bennett y Lancette, 2001). Existe una amplia bibliografía sobre la incidencia de *S. aureus* en este tipo de personal (Horwood y Minch, 1951; Ayçiçek y col., 2004; Shojaei y col., 2006; Valdiviezo y col., 2006; Alvarado-Rivas y Díaz-Rivero, 2007; Lues y Van Tonder, 2007; André y col., 2008). Sin embargo, aquellas publicaciones científicas en las que adicionalmente se reporta la producción de toxinas (detectada usando métodos rápidos comerciales) en las cepas aisladas, coinciden de forma general en que al menos un porcentaje pequeño de las mismas son enterotoxigénicas (Hatakka y col., 2000; Figueroa y col., 2002; Loeto y col., 2007; Çepoğlu y col., 2010), en contraste con lo obtenido en el presente trabajo de investigación. Esta diferencia podría estar relacionada con el tamaño de la muestra y el número de cepas aisladas, que en todos los casos consultados supera al empleado en este estudio.

En cuanto a las cepas de referencia, la diferencia entre la capacidad toxigénica exhibida experimentalmente y la reportada en diversas fuentes bibliográficas (citadas en la tabla IV) puede atribuirse al hecho de que muchos de los genes que codifican para la producción de las enterotoxinas se encuentran en elementos genéticos móviles (islotos de patogenicidad, transposones, entre otros) (Le Loir, y col., 2003). Smith y Bidochka (1998) expresan que la pérdida de la expresión de los plásmidos por inestabilidad de segregación o reducción del número de copias del mismo en ambientes no selectivos desempeña un rol importante en la evaluación de alteraciones potenciales en las propiedades genéticas de un clon mantenido o subcultivado en medio estándar.

De igual forma, es importante recordar que la evaluación experimental de la capacidad toxigénica de las cepas se realizó empleando sistemas rápidos de detección presuntiva o confirmatoria que no

reemplazan al método de referencia. Este último habría podido realizarse únicamente contando con el antígeno purificado y los anticuerpos respectivos.

A pesar de que todas las cepas aisladas en el muestreo del comedor industrial mediante el sistema Petrifilm™ STX mostraron colonias rojo-violetas, las pruebas confirmatorias sólo determinaron la presencia de 4 miembros de la especie *S. aureus*. Esto ocurre debido a que dichas placas, a pesar de ser selectivas y diferenciales para esa especie, también pueden identificar otras como *S. hyicus* y *S. intermedius* (Petrifilm™, 2009).

La prueba Staphytest Plus (SP), identificó como *S. aureus* a 2 de las 4 cepas confirmadas mediante el sistema Petrifilm™ Staph Express y la serie de pruebas confirmatorias realizadas (tinción Gram, fermentación de manitol y actividad catalasa y coagulasa), sugiriendo que su efectividad es menor (Tablas I y II). Esto probablemente se encuentra vinculado al basamento de dicha prueba, ya que existen distintos factores que afectan la reacción de aglutinamiento como por ejemplo el tamaño de inóculo tomado para emulsionar el látex de prueba. Cantidades muy pequeñas pueden ser insuficientes para evidenciarla, mientras que si el inóculo es muy grande el exceso de antígeno podría inhibir dicha reacción (Gella y col., 1991).

Autores como Personne y colaboradores (1997), Weist y colaboradores (2006) han reportado resultados falsos negativos y baja sensibilidad y/o especificidad al utilizar este sistema. De igual forma, se ha demostrado que pruebas rápidas de identificación que utilizan los mismos componentes de superficie que sirven de basamento a la anterior suelen ser menos eficientes que el método tradicional (Aldridge y col., 1984; Berke y Tilton, 1986; Ruane y col., 1986; Piper y col., 1988; Rossney y col., 1990; Tveten, 1995; Luijendijk y col., 1996; Blake y Metcalfe, 2001), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Al respecto, Alridge y colaboradores (1984) establecen que la producción de proteína A y clumping factor varía según la cepa, mientras que Kuusela y colaboradores (1994) mencionan que las cantidades de los mismos pueden ser indetectables en muchos casos. También se ha relacionado la reducción de la disponibilidad de estos componentes de superficie con alteraciones en la pared celular bacteriana que permiten la resistencia a diferentes antibióticos (Ruane y col., 1986). En cuanto a los polisacáridos capsulares, Dassy y colaboradores (1991) afirman que su síntesis puede verse disminuida cuando se subcultiva el microorganismo en medios artificiales, y que la concentración de NaCl y carbohidratos en el medio de cultivo también la afectan.

Por otra parte, el sistema API® Staph de bioMérieux® identificó a las 4 cepas de estafilococos del cepario interno como *S. aureus*, pero según la metodología tradicional sólo dos de ellas se correspondían con el perfil de dicha especie. Estos resultados sugieren que el sistema no es confiable, ya que a pesar de estar fundamentado en pruebas bioquímicas presenta limitaciones que dependen del propósito de la investigación (está diseñada principalmente para aislados clínicos) y de la pericia del investigador (preparación de la solución para inoculación, llenado de las cúpulas, tiempo de incubación, lectura de resultados, entre otros).

Marples y Richardson (1982) y obtuvieron resultados similares, señalado que sólo 93 cepas de las 502 que se sometieron a prueba presentaron una identificación aceptable. Sampimon y colaboradores (2009) lograron identificar correctamente sólo el 41% de un total de 172 cepas aisladas en leche de vaca usando este sistema, y señalan que la baja efectividad del mismo como prueba de rutina en el laboratorio puede estar vinculada al hecho de que, al igual que otros sistemas similares, fue diseñado principalmente para llevar a cabo análisis de aislados humanos.

6.2. Estandarización del método de contaminación artificial con enterotoxinas y nivel de inóculo para los alimentos empleados como matriz de crecimiento de *S. aureus*.

El primer paso para seleccionar el método de contaminación artificial a emplear en la comparación fue evaluar el crecimiento de *S. aureus* sobre matrices alimenticias, lo que requería la identificación de alimentos riesgo. Se incluyeron algunos alimentos que presentaban propiedades favorables para el crecimiento de la bacteria, otros frecuentemente vinculados a brotes y además otros de interés para la empresa donde se desarrolló el trabajo de investigación. Entre ellos se encontraban productos lácteos (leche, yogur, queso), cárnicos (salchichas, jamón), y alimentos cuya preparación o fabricación implicaba manipulación humana (ensaladas, emparedados, pastelería, productos artesanales).

En una prueba control se llevó a cabo un recuento inicial de *S. aureus* en las matrices sin inóculo para comprobar que todas las matrices se encontraban libres de este microorganismo, lo cual podía interferir con los resultados del estudio. Como resultado, se descartaron quesos blancos de pequeños productores comúnmente expendidos en los supermercados (mozzarella, búfala, tipo paisa, entre otros) que mostraron, en general, recuentos superiores a 10^3 unidades formadoras de colonias por gramo.

Existen numerosos reportes sobre la incidencia de altos niveles de *S. aureus* en quesos frescos artesanales (Arias y col., 1990; Olarte y col., 1997; Miró y Ríos, 1999; Díaz-Rivero y González, 2001; Aray, 2002; Lujan y col., 2006; Márquez y García, 2007; Vanegas y col., 2008; García y Mugaburu, 2011). Según Díaz-Rivero y González (2001), el alto contenido de humedad en este tipo de producto, el empleo de materias primas inadecuadas y la carencia de condiciones

sanitarias y hábitos de higiene en general para su manipulación, mantenimiento, envasado y transporte, facilitan el crecimiento de este tipo de microorganismo y lo convierten en vehículo de alto riesgo para la salud de los consumidores.

Seguidamente, se contaminaron artificialmente las matrices libres de carga inicial de estafilococos con una cepa de *S. aureus* de crecimiento rápido en cultivo (O4). Esto permitió determinar que todas, excepto el yogur pasteurizado con cerezas, eran aptas para el crecimiento del microorganismo (Tabla IX). En este último, el bajo pH y la presencia de ciertas sustancias de origen vegetal (flavonoides) y bacteriano (bacteriocinas) en el alimento podrían ser los principales factores que afectaron el crecimiento de *S. aureus* sobre el mismo.

Las propiedades antibacteriales de los flavonoides han sido discutidas ampliamente (Gibbons, 2008) y sus efectos sobre *S. aureus* han sido probados en trabajos previos (Tanaka y col., 2004; Otsuka y col., 2008; Radwan y col., 2009; Hirai y col., 2010; Raghukumar y col., 2010). El fruto de *Prunus avium* (cereza) produce distintos flavonoides como antocianinas, flavan-3-oles y flavonoles (Serra y col., 2010), lo que podría tener algún efecto adverso sobre el crecimiento de dicha bacteria. Un estudio realizado por Ahn y colaboradores en 2009 indicó que fracciones de flavonoides extraídas de la cereza utilizando etilacetato y butanol presentan una fuerte actividad antimicrobiana frente a distintas bacterias, entre ellas *S. aureus*.

Por otra parte, si bien es cierto que el proceso de pasteurización al que se somete el yogur destruye a las bacterias ácido-lácticas (BAL) utilizadas como cultivo iniciador, sus productos de fermentación permanecen en el alimento. Se conoce que las BAL son capaces de producir distintas bacteriocinas, algunas de las cuales presentan estabilidad al calor (Rojas y Vargas, 2008) y en investigaciones previas se ha reportado el efecto inhibitorio de las bacteriocinas contra *S. aureus* (Savadogo y col., 2004; Assefa y col., 2008). Es por ello que la inhibición de crecimiento observada en este estudio

podría atribuirse a que, luego del tratamiento térmico, estas pueden continuar ejerciendo su actividad antimicrobiana.

Por su composición (carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales) y características fisicoquímicas (pH cercano a la neutralidad, actividad de agua), la leche constituye un medio de crecimiento óptimo para una amplia variedad de microorganismos (Baró y col., 2010). Sin embargo, se registró mayor crecimiento en la leche descremada UHT respecto al obtenido en leche completa pasteurizada, lo que puede estar asociado a que el tratamiento térmico en la primera destruye la totalidad de los microorganismos contenidos en el producto dejándolo en condición estéril (Ray, 2004).

En consecuencia, la leche queda exenta de competidores que limiten o inhiban la proliferación de la bacteria en la matriz, a diferencia de lo que ocurre en el proceso de pasteurización simple donde la carga microbiana remanente sigue afectando el crecimiento de otros microorganismos (Ertola y col., 1994). Adicionalmente, la leche completa presenta un mayor contenido graso que la descremada, condición que podría facilitar el desarrollo de cierta microbiota que se vería afectada por la carencia de este nutriente en la segunda.

Al respecto, Marth y Steele (2001) señalan que los resultados de algunos estudios sobre bacterias deteriorativas en leche y crema de leche sugieren que el contenido de grasa tiene un impacto leve en la microbiología de ambas, pero que el deterioro por otros factores no microbiológicos puede variar de un producto a otro, como es el caso de la actividad de las proteasas nativas y bacterianas que parece ser mayor en leche descremada respecto a la leche completa.

El queso fundido, a pesar de ser un derivado lácteo, presenta propiedades más restrictivas al crecimiento bacteriano respecto a la leche, entre las cuales se pueden mencionar bajo pH y contenido de carbohidratos, alta cantidad de sales, especias y conservantes (Ghinee, 1993). Los recuentos obtenidos en esta matriz se pueden vincular al tratamiento de pasteurización que, como

se mencionó anteriormente, disminuye la carga microbiana natural del producto y facilita la proliferación de patógenos que en condiciones normales se verían desfavorecidos por la presencia de flora competitiva (SCVPH, 2003).

Algo similar ocurre durante el proceso de elaboración de productos cárnicos como el jamón de cerdo, donde la adición de sales y conservantes presenta el mismo efecto promotor del desarrollo de patógenos por eliminación de microorganismos competitivos (Tortora y col., 2007) unido a sus ya favorables factores intrínsecos de pH (cercano a la neutralidad), alto contenido protéico y humedad, entre otros (García-Macías y col., 2000).

En el caso del helado de mantecado, por ser un alimento de base láctea con alto contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, representa un medio de crecimiento ideal para la proliferación de microorganismos, entre ellos los patógenos (Rosales y Díaz, 2006). Aunque la temperatura de mantenimiento de este producto se encuentra muy por debajo del valor óptimo de crecimiento para *S. aureus*, la capacidad de este último para resistir los efectos de la congelación y desecación (Madrid y Cenzano, 2003), unida a la protección que ofrecen los coloides que forman los componentes de dicha matriz (Rodríguez, 2006), permiten su supervivencia por largos periodos de tiempo en esas condiciones.

Luego de seleccionar los alimentos aptos para el crecimiento de *S. aureus*, se comparó entre la producción de toxinas directamente sobre dichas matrices (inoculación directa con el microorganismo) y la adición de un volumen determinado de toxina cruda a las mismas (extracto filtrado de cultivo puro) como métodos de contaminación artificial para la evaluación del desempeño de los sistemas de detección. El queso suizo fundido, que también resultó apto como matriz, se descartó en esta fase por requerir un proceso de extracción de la toxina más complejo que el resto de los alimentos debido a su elevado porcentaje de grasa (superior a 40%).

El protocolo de validación de métodos alternativos desarrollado por la ISO (2002) recomienda el uso de alimentos naturalmente contaminados, debido a que en este tipo de matriz las células bacterianas están sometidas a condiciones muy distintas y más hostiles a las que presentan en los medios de cultivo de laboratorio, lo que genera en ellas un estado de estrés fisiológico que afecta su comportamiento (Ray, 2004). Sin embargo, incluir esta fase en el estudio implicaría una gran cantidad de análisis para evaluar la posible presencia de cepas de *S. aureus* toxigénicas en diferentes alimentos, lo que representaba una inversión adicional considerable que superaba el presupuesto disponible para el proyecto.

Por esta razón, se decidió contaminar artificialmente las matrices a emplear, método que también es aceptado por la AOAC como alternativa cuando no se cuenta con suficientes alimentos naturalmente contaminados para cubrir todas las categorías requeridas en su protocolo de validación (AOAC, 2002). Los métodos de contaminación artificial planteados fueron la inoculación directa con una concentración conocida del microorganismo, expresada en células de *S. aureus* por gramo o mililitro de alimento, y la adición de un volumen determinado de extracto de toxina parcialmente purificado. En este último caso, se probaron, además, 3 niveles diferentes de contaminación (0.1, 0.5 y 1 mL) partiendo del supuesto que a mayor volumen de extracto mayor sería la concentración de antígeno añadida.

Los resultados de este ensayo (Tabla X) mostraron que se detectaron toxinas en las diferentes matrices aplicando ambos métodos de contaminación. Adicionalmente, no hubo diferencias de detección entre los distintos niveles de contaminación con el extracto, lo que sugiere que la concentración de antígeno no variaba de forma apreciable entre las cantidades añadidas.

Distintos estudios señalan que, en un gran número de casos, el diagnóstico en situaciones de intoxicación y brotes alimentarios se lleva a cabo mediante la recuperación del microorganismo de la fuente de intoxicación (Wieneke y col., 1993; Martín y col., 2004; Kérouanton y col., 2007), lo que ha permitido que otros autores concluyan que el crecimiento y la producción de la toxina directamente sobre el alimento son las causas más frecuentes del episodio de intoxicación alimentaria (Le Loir y col., 2003; CDC, 2006) y no el contacto con otro alimento en el cual permaneciera la toxina luego de la destrucción del microorganismo por algún tratamiento térmico, mecánico, entre otros.

Tomando en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos, se decidió adoptar la inoculación directa con el microorganismo como método de contaminación artificial. Adicionalmente, las condiciones de estrés ya mencionadas a las que se encuentran sometidos los microorganismos en la naturaleza se recrean mejor si estas crecen directamente en la matriz, lo que permite obtener resultados más cercanos al método recomendado.

Finalmente, se realizaron pruebas de crecimiento a las cepas de *S. aureus* con capacidad toxigénica experimental y a la cepa de referencia ATCC 25923 en alimentos aptos (tabla XI). El objetivo de estas pruebas fue determinar el nivel de inóculo de cada cepa requerido para alcanzar un recuento igual o mayor a 10^6 UFC de *S. aureus* por gramo o mililitro de matriz luego de 48h de incubación, de acuerdo a lo reportado por varios autores como necesario para la producción de cantidades detectables de enterotoxinas (Park y Szabo, 1986; Wieneke y Gilbert, 1987; Lapeyre y col., 1988; Park y col., 1994).

En general, se estableció un nivel de inóculo de 10^2 células por gramo o mililitro de alimento para O4 y ATCC 25923, excepto en queso fundido, en el cual la última cepa no mostró crecimiento. Esta cantidad fue mantenida en P3 sólo para leche descremada UHT, ya que en las otras tres matrices la evaluación se realizó con una cantidad superior (10^3 cél/g) repitiéndose el problema de crecimiento

en queso. ATCC 29213 mostró un crecimiento lento en todos los alimentos, motivo por el cual se incrementó el tamaño de inóculo en dos órdenes de magnitud (10^4 UFC/g) respecto al utilizado en las otras cepas para poder alcanzar el recuento deseado (10^6 UFC/g o mL) en 48h.

6.3. Comparación del desempeño de los métodos rápidos en la detección de enterotoxinas utilizando distintas cepas de *S. aureus*.

6.3.1. Consideraciones generales.

Debido a las diferencias existentes entre los cuatro sistemas disponibles, se decidió agruparlos en dos grandes categorías para poder establecer la comparación según el tipo de detección. De esta manera, se clasificaron como generales aquellos que sólo indicaban presencia o ausencia de enterotoxinas en la muestra (SET Total Ridascreen® de R-Biopharm® y SET VIA TECRA™ de 3M™) y como específicos los que lograban diferenciar entre los serotipos A, B, C y D (SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm® y SET RPLA de Oxoid).

Al no contar con los medios disponibles para realizar la prueba de doble difusión sobre lámina de gel (Casman y col., 1969) establecida como referencia para el desarrollo de nuevas metodologías de detección de enterotoxinas estafilocócicas (“gold standard”) (AOAC, 1990), no fue posible determinar para los sistemas alternativos la mayoría de los parámetros de desempeño requeridos para la validación de métodos cualitativos (Trullols y col., 2004). Sólo se calcularon los porcentajes de falsos negativos y positivos en cada caso y, adicionalmente, se realizó una estimación de la sensibilidad empleando el límite de detección relativo como medida indirecta de ese parámetro.

Como material biológico se utilizaron únicamente las cepas de *S. aureus* con capacidad toxigénica, experimental y/o teórica (ver Tablas V-VIII) y, tomando en cuenta los resultados obtenidos en el

punto de estandarización (Tabla XI), se omitió para la comparación el queso como matriz de crecimiento de ATCC 25923 y P3, por lo que en esos casos el tamaño de muestra (n) fue de 3 en vez de 4.

El análisis de los cultivos en fase líquida de cada una de las 17 cepas de estafilococos disponibles en el cepario de la GSC, utilizando los sistemas generales, no presentó resultados falsos positivos o negativos de acuerdo al criterio de veracidad seleccionado (Tabla XII). En alimentos, en cambio, ambos métodos mostraron un porcentaje considerable de falsos negativos vinculados principalmente al queso cheddar fundido, aunque no se registraron falsos positivos. En cuanto al límite de detección relativo, SET Total Ridascreen® detectó producción de toxinas en diluciones mayores respecto a SET VIA TECRA™ en dos de las tres cepas enterotoxigénicas (Tabla XIII), lo que podría indicar que el primero presenta mayor sensibilidad.

De las cepas que resultaron enterotoxigénicas, todas pertenecían a la especie *S. aureus*, excepto ATCC 49444. Esta, que inicialmente ingreso a dicha colección como *S. aureus*, fue reclasificada como *S. pseudintermedius* utilizando datos moleculares, propiedades citoquímicas y características fisiológicas (Ramsey y col., 2010) motivo por el cual fue descartada para realizar las pruebas en alimentos. Sin embargo, como existen varios reportes previos de producción de toxinas en dicha especie (Gyles y col., 2010; CVMP, 2011) no se consideró el resultado en el caldo de cultivo como falso positivo. Debido a que ATCC 25923 no demostró producir toxinas en las pruebas de capacidad toxigénica experimental, el concepto de falso negativo no fue aplicable a dicha cepa (se utilizó como control negativo).

Los trabajos sobre detección de enterotoxinas utilizando el sistema SET VIA TECRA™ realizados de manera independiente por Bennett y McClure en leche, y por Park y colaboradores en jamón y

queso en el año 1994, no arrojaron falsos positivos; pero en cultivos de microorganismos de otros géneros y en algunos alimentos marinos si se han registrado estos resultados (Brett, 1998). Bennet (2005), coincidiendo con lo obtenido durante este estudio, reportó un resultado falso negativo en queso empleando este método. Respecto a SET Total Ridascreen®, sólo se encontró un estudio de validación que respalda su buen desempeño como sistema para la detección de enterotoxinas estafilocócicas en leche y queso, previa concentración de la muestra (Ostyn y col., 2011).

No se han encontrado trabajos científicos previos en los que se haya establecido una comparación directa entre estos dos métodos, pero si se ha evaluado el desempeño de ambos respecto a otros sistemas de detección. Ensayos realizados por Bennett en 2005 sugieren que SET VIA TECRA™ presenta menor sensibilidad respecto a VIDAS® SET de bioMérieux® en la detección de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos, aunque su especificidad es comparable. SET Total Ridascreen®, a diferencia del anterior, mostró ser tan sensible y específico como VIDAS® SET2 de bioMérieux® al menos en productos lácteos (Ostyn y col., 2011). Según Vernozzy-Rozand y colaboradores (2004) VIDAS® SET2 resultó ser el más eficiente entre los dos sistemas de fluorimetría enzimática.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los reportes antes mencionados, se podría concluir que SET Total Ridascreen® en efecto presenta un mejor desempeño, pero a pesar de sus problemas de especificidad (Pimbley y Patel, 1998) es SET VIA TECRA™ y no este el que cuenta con el aval de la AOAC como método oficial para la detección presuntiva de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos como leche, leche descremada, pollo, carne y productos cárnicos (Bennet y McClure, 1994). SET Total Ridascreen®, en cambio, sólo ha sido validado recientemente como método oficial de uso interno en un estudio realizado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Estafilococos Coagulasa Positivos (EU-RL for CPS) (Ostyn y col., 2011).

Para los sistemas específicos, los perfiles de detección observados en el caldo de cultivo para cada cepa enterotoxigénica fueron muy diferentes entre si, como se muestra en la Tabla XIV; por esta razón sólo se calcularon falsos positivos o negativos en matrices alimenticias, utilizando dicho perfil como criterio de contraste para validar los resultados. En general estos últimos reflejaron un mayor porcentaje de falsos negativos respecto a los métodos generales, pero a diferencia de ellos también presentaron falsos positivos (Tabla XVI). Las matrices que presentaron mayor interferencia fueron los productos lácteos (leche descremada UHT y queso cheddar fundido).

Como los perfiles de detección fueron muy distintos entre los sistemas específicos, la comparación del límite de detección relativo en ellos se realizó solamente en los casos donde ambos detectaron un mismo serotipo de toxina para una cepa común: SEC, para O4, y SEA para ATCC 29213. El LDR de SET A-E Ridascreen® y SET RPLA fue igual en las dos cepas probadas (Tabla XV), sugiriendo que su sensibilidad es comparable.

Varios autores han reportado inconvenientes al utilizar el sistema SET RPLA para la detección de enterotoxinas en matrices alimenticias. Como ejemplo se pueden mencionar reacciones inespecíficas y/o falsos positivos en productos lácteos (Park y Szabo, 1986; Haines y Stannard, 1987; Wieneke y Gilbert, 1987; Rose y col., 1989) así como también resultados falsos negativos en jamón (Wieneke, 1991; Giletto y Fyffe, 1998) y en queso cheddar (Giletto y Fyffe, 1998). De igual forma, al trabajar con extractos de cultivos puros, se han observado reacciones inespecíficas vinculadas a algunos reactivos del producto (Wieneke, 1988; Rose y col., 1989, Di Pinto y col., 2004) e interferencias en la reacción de aglutinamiento cuando hay exceso de antígeno (Wieneke, 1988).

A diferencia del anterior, no se ha reportado que el SET A-E Ridascreen® haya arrojado resultados falsos negativos (Su y Lee, 1997) pero sí ha demostrado falsos positivos por presencia de

peroxidasas endógenas en el alimento (Park y col, 1994), y por reacción cruzada entre los anticuerpos de serotipos relacionados, lo que puede pronunciarse o atenuarse por efecto de ciertas matrices (R-Biopharm, 2012).

Aunque los trabajos científicos previos en el área establecen que SET A-E Ridascreen® presenta un mejor desempeño en general respecto a SET RPLA, este estudio (en base al criterio de comparación seleccionado) podría sugerir lo contrario si se toma en cuenta que el SET RPLA fue el que tuvo menor influencia de la matriz sobre los resultados, demostrada por una mayor correspondencia con los resultados obtenidos para los caldos de cultivo. Sin embargo, vale mencionar que aunque la especificidad del método en SET A-E Ridascreen® fue menor a la de SET RPLA, el primero detectó la producción de más de un serotipo de toxina en una misma cepa (O4 y ATTC 29213) a diferencia del segundo, lo que podría sugerir que posee mayor sensibilidad.

Dado que O4 y P3 fueron aislados del ambiente y su perfil de producción de enterotoxinas no ha sido confirmado previamente, los resultados obtenidos sólo tienen carácter comparativo y no se pueden extraer conclusiones veraces. Para ello, se necesitaría contar con la verificación de los resultados a través del método tradicional de referencia que, como se explicó anteriormente, fue omitido en este estudio por carecer de los reactivos necesarios para llevarlo a cabo.

Algunos estudios publicados darían fuerza a esta última hipótesis, como por ejemplo el estudio de Wieneke y Gilbert (1987) que concluyó que la sensibilidad de SET RPLA es insuficiente respecto a la de ensayos inmunoenzimáticos para el análisis de enterotoxinas en alimentos, mientras que Park y colaboradores (1994) mencionan que SET A-E Ridascreen® podría superarla de 3 a 5 veces. Pruebas realizadas utilizando bacterias pertenecientes a otros géneros no condujeron a falsos resultados positivos en ninguno de los sistemas (Park y col., 1992; Park y col., 1994).

6.3.2. Consideraciones adicionales.

Al efectuar un análisis detallado de los resultados obtenidos destaca el hecho de que todos ellos arrojaron falsos resultados negativos, los cuales tienen mayor relevancia que los falsos positivos, ya que las consecuencias que derivan de los mismos involucran el hecho de elaborar y/o liberar (dependiendo del punto al que ocurra dentro de la línea de producción) un producto que puede llegar a comprometer seriamente la salud de los consumidores (Rosentul, 2006) generando brotes alimentarios, junto a las pérdidas económicas que ya estos suponen (Knabel, 1995).

Tomando en cuenta lo antes mencionado y lo reportado en el área por los distintos autores ya citados, resulta necesario tener en cuenta información adicional de gran importancia para comprender las discrepancias. A continuación se mencionan estos puntos:

Los falsos negativos obtenidos en cultivo pueden ocurrir en algunos casos por una baja producción de toxina(s) por parte de la cepa (Bergdoll, 1995). Este pudo ser el caso de P3, en el cual los valores de densidad óptica obtenidos utilizando los ensayos inmunoenzimáticos apenas superaban el mínimo requerido para considerar la muestra positiva (punto de corte), es decir, fueron positivos débiles.

Debido a que la sensibilidad de RPLA ha sido reportada como inferior a la de este tipo de métodos (Wieneke y Gilbert, 1987), la concentración del antígeno en el cultivo de la cepa pudo ser inferior a la de su límite de detección, explicando el resultado negativo. Esta hipótesis se reforzó al detectar mediante este sistema la toxina C (reportada por SET A-E Ridascreen®) en un alimento artificialmente inoculado con P3 (Tabla XVI).

De forma similar, O4 y ATCC 29213 presentaron valores por encima del punto de corte según SET A-E Ridascreen® para los serotipos principales producidos (C y A respectivamente) pero no para los secundarios (B y C) que, además, no fueron detectados por SET RPLA (Tabla XIV). Coincidiendo con este resultado, Park y colaboradores (1994) detectaron menor concentración de toxina del serotipo secundario en las dos cepas en las que se registró este comportamiento utilizando dicho sistema, mientras que Wieneke y Gilbert (1987) empleando SET-RPLA sólo lograron detectar la presencia del serotipo secundario en dos de las 8 cepas que lo producían.

En cuanto a la producción de toxinas en matrices alimenticias, estas presentan características muy diferentes a los medios de crecimiento que se utilizan normalmente para su mantenimiento, lo que puede retrasar el proceso de formación de dicho compuesto evitando que se alcancen niveles detectables (Bergdoll, 1995). Este hecho podría explicar ciertos casos en los cuales los métodos detectaron toxinas en el cultivo puro de una cepa pero no en el alimento inoculado con ella (ver cepa P3 en la Tabla XII y O4 en las Tablas XIV y XVI).

En el caso particular del queso cheddar fundido, sólo uno de los cuatro sistemas empleados (SET Total Ridascreen®) logró detectar toxinas en esta matriz, y únicamente en una de las dos cepas toxigénicas evaluadas (Tablas XII y XVI). Esta situación se podría atribuir a un resultado falso positivo del método rápido o, como se mencionó en el párrafo anterior, a un posible efecto negativo ejercido por uno o varios componentes del alimento sobre la concentración de toxinas producidas por las cepas.

La sal, por ejemplo, al presentarse en cantidades elevadas, disminuye considerablemente el agua disponible en el alimento para ser utilizada por la bacteria (*aw*) y afecta directamente la biosíntesis de diversos compuestos (SCVPH, 2003) incluyendo las enterotoxinas (Genigeorgis y col., 1971) pero

no presenta el mismo efecto sobre su crecimiento. Smith y colaboradores (1982) señalan que el efecto de ciertos componentes sobre la producción de enterotoxinas y su concentración suele ser mayor al que originan estos mismos factores sobre el crecimiento de *S. aureus*. Por otra parte, C. E. Park en sus trabajos sobre detección de enterotoxinas en alimentos (incluyendo queso cheddar) junto a Szabo (1986) y junto a Ahkter y Rayman (1994), utilizando los métodos específicos probados en este estudio, coincide en que el límite de detección de estos varía de acuerdo al tipo de alimento y al serotipo de toxina.

La detección de toxina en jamón para la cepa ATCC 25923 por parte de uno de los métodos específicos (SET A-E Ridascreen®) fue considerada como falso positivo en base al criterio de veracidad seleccionado (ver Tabla XVI). Esto podría ser justificado como resultado de la reacción cruzada entre el sustrato y peroxidasas endógenas presentes en el alimento, debido a que existen reportes de que estas enzimas pueden mantener su actividad en productos cárnicos aún después de la cocción (Alpers y col., 2008).

También podría considerarse el caso contrario, tomando en cuenta que no todas las cepas que poseen los genes que codifican para la producción de enterotoxinas los expresan en todo momento (Atanassova y col., 2001), y que existen bacterias estimuladoras dentro de los microorganismos frecuentemente aislados del jamón (McCoy y Faber, 1966) que pudieron facilitar la producción de toxinas en esa matriz en particular. Sin embargo, esta última hipótesis es menos probable.

Otros falsos positivos que arrojó SET A-E Ridascreen® fueron serotipos adicionales a los mostrados en cultivo por ATCC 29213 en queso cheddar, helado y jamón. En trabajos previos la cepa ha sido reportado como productora de SEA en conjunto con SEB (Qiu y col., 2010; Li y col., 2011), motivo por el cual no se debe descartar este hecho como una posibilidad real. Bergdoll (1995) establece que

existen factores intrínsecos en la matriz que afectan directamente el proceso formación de toxinas y la cantidad producida, lo que se evidencia particularmente en los tipos B y C. Para la otra toxina, SED, no se encuentra una explicación satisfactoria, pero podrían aplicar las mismas hipótesis formuladas para ATCC 25923 en el párrafo anterior.

El efecto de interferencia en las matrices por reacciones cruzadas entre serotipos relacionados, reacciones inespecíficas con otros microorganismos presentes en estos alimentos o con metabolitos secundarios normalmente producidos durante el crecimiento de la bacteria, también podría sugerirse como explicación a los falsos positivos obtenidos en los sistemas específicos, aunque trabajos previos han descartado los dos últimos (Park y col., 1992; Park y col., 1994).

Todas las posibles explicaciones antes mencionadas constituyen hipótesis de lo que pudo generar los problemas de detección encontrados en los diferentes sistemas de detección evaluados en este estudio. Para determinar si en realidad determinado efecto observado se puede atribuir a cierta causa particular, se requieren pruebas estadísticas de comprobación que vinculen ambos hechos (Rosentul, 2006).

6.4. Selección del método alternativo más eficiente para la detección de enterotoxinas de *S. aureus* en cultivos puros y alimentos de acuerdo al desempeño obtenido, costo y practicidad.

Los resultados obtenidos durante este estudio sugieren que el método más eficiente en cuanto a desempeño es SET Total Ridascreen® de la casa comercial R-Biopharm® (Darmstadt, Alemania), ya que presentó el menor porcentaje de falsos negativos y ningún falso positivo (ver Tabla XII). Para conocer el tipo de toxina presente en la matriz, en cambio, lo más recomendable es aislar el

microorganismo que la origina y aplicar el sistema SET-RPLA en el extracto filtrado del cultivo puro de la cepa.

Si el análisis no es riguroso y se cuenta con un presupuesto limitado pueden emplearse cualquiera de los inmunoensayos enzimáticos generales, ya que traen muchas más pruebas que los específicos y la lectura de resultados se realiza de forma visual. Si se desea conocer el serotipo específico y, además, contar con una aproximación de la cantidad de toxina que puede estar presente en la muestra sin invertir una suma considerable de dinero, lo más recomendable sería utilizar la prueba de aglutinamiento. Esta última es económica y no requiere equipo especializado.

En casos de emergencia sanitaria, en los que la cantidad de muestra es reducida y se requieren numerosas pruebas antes de determinar el agente causal, SET RPLA también es útil porque sólo requiere 125 µL de muestra, aunque se extiende el tiempo del ensayo. Sin embargo, si se necesita conocer la concentración exacta de dicha toxina y el presupuesto no es escaso, o si el factor limitante en este caso es el tiempo, SET A-E ofrece la alternativa de convertirse en un ensayo cuantitativo (construyendo previamente una curva de calibración con el antígeno purificado de la toxina) y toma menos de 3 horas.

Tabla XVIII. Características de los sistemas comerciales utilizados durante este estudio.

Sistema	SET Total Ridascreen®	SET VIA TECRA™	SET A-E Ridascreen®	SET RPLA
<i>Costo (Brett, 1998)</i>	NR	Bajo ^a	Alto	Medio
<i>Número de pruebas por paquete</i>	96	48	12	20
<i>Toxinas detectadas</i>	A-E	A-E	A-E	A-D
<i>Tipo de análisis</i>	Cualitativo	Cualitativo	Cualitativo ^b	Semi-cuantitativo
<i>Cantidad de muestra</i>	100	200	700	125

<i>requerida (μL)</i>				
<i>Duración del ensayo^c (h)</i>	2.75	3.5	2.5	24
<i>Requerimientos adicionales</i>	_ d	_ d	Espectrofotómetro para microplacas	Microplacas ^e

NR: no reportado en la literatura consultada.

^a El precio indicado por el autor es para 44 pruebas, a diferencia de las 48 que incluía el paquete con el que se realizó el estudio.

^b Puede convertirse en cuantitativo si se emplea una curva de calibración del antígeno construida usando la toxina purificada.

^c No se toma en cuenta el tiempo de preparación de la muestra previo al ensayo.

^d El ensayo puede realizarse de manera visual, utilizando la tarjeta de colores incluida en el sistema, o se puede llevar a cabo la lectura de densidad óptica de las muestras empleando un espectrofotómetro para mayor precisión

^e Se puede emplear un microscopio estereoscópico para que la lectura sea más precisa.

CONCLUSIONES

- ⇒ El muestreo realizado en un comedor industrial permitió obtener 3 aislados bacterianos en alimentos y 7 en manos de manipuladores, de los cuales 2 fueron identificados mediante la metodología tradicional como *Staphylococcus aureus* en cada caso. El sistema Staphylect Plus de Oxoid presentó un desempeño inferior a la metodología anterior, identificando únicamente al 50% de estos aislados como miembros de dicha especie.
- ⇒ Durante el proceso de identificación de los 4 aislados de estafilococos disponibles en el cepario interno del laboratorio el sistema API Staph® indicó que todos ellos podían considerarse como *S. aureus*, mientras que la metodología tradicional confirmó sólo dos de esos resultados.
- ⇒ Dos aislados de *S. aureus*, O4 y P3, y una cepa de referencia del cepario interno del laboratorio (ATCC 29213) resultaron ser enterotoxigénicas en al menos 3 de los sistemas de detección probados. ATCC 49444 (identificada como *S. pseudintermedius*) también mostró esta cualidad, lo que confirma que aunque la mayoría de las cepas toxigénicas de este género son *S. aureus* no es una cualidad limitada a esa especie.
- ⇒ Como métodos de contaminación artificial de alimentos, la adición de la toxina extraída a partir del cultivo puro (cepa toxigénica) o su síntesis directamente sobre la matriz por inoculación con el microorganismo toxigénico funcionan igualmente bien, permitiendo la detección de estos compuestos por parte de los sistemas alternativos. Sin embargo, la última técnica se asemeja más a lo que ocurre de manera natural en los alimentos en casos de intoxicación y brotes, y representa una mejor aproximación del protocolo recomendado para la validación de métodos alternativos de este tipo.

- ⇒ El inóculo inicial necesario para alcanzar, luego de 48h, el recuento mínimo al que se registra un nivel detectable de toxinas en alimentos, fue de aproximadamente 10^2 , 10^3 y 10^4 células por gramo o mililitro en O4 y ATCC 25923, P3 y ATCC 29213 respectivamente.
- ⇒ SET Total Ridascreen® de R-Biopharm fue, de los sistemas de detección generales, el que mostró mejor desempeño debido a su mayor sensibilidad con respecto al sistema SET VIA TECRA™, evidenciada por el mayor límite de detección relativa (LDR).
- ⇒ Los sistemas de detección específica de enterotoxinas, SET RPLA de Oxoid y SET A-E Ridascreen®, parecen tener un mejor desempeño en cultivos puros del microorganismo, ya que al analizar alimentos se obtienen resultados altamente variables que podrían estar asociados a un efecto de interferencia ejercido por la matriz.
- ⇒ SET A-E Ridascreen® evidenció la producción de serotipos de toxinas adicionales a los detectados por SET RPLA para O4 y ATCC 29213, lo que podría indicar que el primero es más sensible. Sin embargo, no se pudo confirmar esta hipótesis por carecer de reactivos para realizar el método tradicional de doble difusión en lámina de gel estandarizado.
- ⇒ Los resultados obtenidos sugieren que el sistema de detección SET Total Ridascreen® de R-Biopharm es el más eficiente para realizar análisis de rutina en la empresa donde se llevó a cabo el trabajo de investigación, ya que muestra buen desempeño tanto en cultivos puros como en alimentos, requiere una cantidad mínima de muestra, puede realizarse de manera visual y ofrece resultados en corto tiempo.

RECOMENDACIONES

- Las placas rehidratables Petrifilm™ Staph Express de 3M™ permiten la recuperación de estafilococos a partir de distintos medios. Sin embargo, para lograr una identificación del microorganismo hasta el nivel de especie, deben aplicarse pruebas confirmatorias adicionales de actividad enzimática (catalasa, coagulasa, termonucleasa) y metabolismo de carbohidratos (fermentación de manitol, trehalosa, sacarosa, entre otros), tal y como lo establece la norma venezolana COVENIN N° 1292-04.
- Los sistemas Staphylect Plus de Oxoid y API Staph® de bioMérieux no son totalmente confiables para identificar cepas de *S. aureus*, por lo que sus resultados siempre deberán respaldarse con pruebas confirmatorias adicionales como las mencionadas anteriormente.
- Para la detección de presencia de enterotoxinas de *S. aureus* en alimentos mediante alguno de los sistemas rápidos evaluados durante este estudio se recomienda, siempre que sea posible, aislar el microorganismo y posteriormente determinar la capacidad toxigénica en el cultivo puro del mismo, pues todos los sistemas evaluados mostraron un mejor desempeño en esta matriz del que se obtuvo durante el análisis de alimentos.
- Si no se logra recuperar el microorganismo, o si la cantidad de muestra disponible es mínima, se recomienda utilizar los sistemas generales para realizar la detección directa en el alimento, preferiblemente SET Total Ridascreen® de R-Biopharm. De ser necesaria la identificación del serotipo específico de toxina, la misma puede hacerse mediante los sistemas SET-RPLA de Oxoid o SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm aislando y purificando previamente la toxina para evitar interferencias de la matriz.

- Se deben utilizar en principio alimentos naturalmente contaminados para establecer la comparación entre sistemas comerciales, tal y como lo establece el protocolo de validación de métodos alternativos de la ISO, y debe realizarse un análisis previo mediante el método de doble difusión en lámina de gel de Casman y Bennett (1969) (“gold standard”), como criterio de referencia.
- Dependiendo del basamento de los métodos a validar, si utilizan o no un sistema de peroxidasas o fosfatasas como responsables del desarrollo de la reacción colorimétrica, se debe realizar una comprobación del contenido endógeno de estas enzimas en los alimentos antes de la comparación, ya que pueden conducir a falsos positivos.
- Las características fisicoquímicas, composición, fuente de origen y detalles de elaboración del alimento (si aplica) son aspectos fundamentales para comprender el comportamiento del microorganismo en el mismo. Por ello se debe procurar obtener la mayor cantidad de información en cuanto a este tema y realizar las determinaciones respectivas siempre que sea posible.
- Si la comparación involucra también extractos de sobrenadantes de cultivos, las cepas a seleccionar deben provenir preferiblemente de colecciones de microorganismos, de tal manera que sus características hayan sido estudiadas a profundidad y se cuente con amplia documentación sobre su comportamiento en estudios similares.
- En caso de tener que utilizar microorganismos aislados recientemente o cuya capacidad toxigénica no haya sido evaluada, se deben realizar estas determinaciones con la metodología tradicional o alguno de los métodos avalados y/o recomendados por organizaciones internacionales (AOAC, MFLP, NZDB, FDA, entre otras).

- Para determinar los parámetros de desempeño de los métodos alternativos, especialmente el límite de detección, es de vital importancia contar con diversos serotipos de toxina purificados y de concentración conocida. Esto permitirá, adicionalmente, la construcción de curvas de calibración del antígeno que permitan cuantificar la concentración exacta de enterotoxinas en los alimentos y cultivos de cepas, dándole un mayor alcance al análisis.
- Debe garantizarse homogeneidad en las condiciones y el tratamiento al que se somete el material biológico a utilizar para establecer la comparación, a fin de que no existan diferencias más que las atribuidas al tipo de método seleccionado.
- Finalmente, la preparación de las muestras, extracción de la toxina y el ensayo en general, debe realizarse siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante del sistema comercial para que la comparación sea válida.

REFERENCIAS

3M. 2008. Sistema de detección de enterotoxinas de estafilococos SET VIA TECRA™. Instructivo de uso. 3M Company. St. Paul, E.U.A.

3M Microbiology. 2009. Sistema de recuento Petrifilm™ Staph Express. Instructivo de uso. 3M Company. St. Paul, E.U.A.

Ahn, L., Ryu, H., Kang, D., Jung, I., Sohn, H. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prunus avium* L. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 37(4):371-376.

Animal Improvement Programs Laboratory (AIPL). 1999. "Kid's Corner". Facts about dairy products. Animal Improvement Programs Laboratory, Animal & Natural Resources (ANRI), Beltsville Agricultural Research Center (BARC), Beltsville, E.U.A. <http://www.aipl.arsusda.gov/kc/dairy.html>
[Consulta: 15 de Agosto de 2012]

Allen, L. 1984. Public Health Image Library (PHIL): Photographs, Illustrations, Multimedia Files. Nº 5132. Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services, Atlanta, E.U.A. <http://phil.cdc.gov/Phil/quicksearch.asp> [Consulta: 08 de Julio de 2012]

Alpers, D., Stenson, W., Taylor, B., Bier, D. 2008. Manual of nutritional therapeutics. Lippincott Williams & Wilkins, Quinta Edición, Filadelfia, E.U.A.

Alridge, K.E., Kogos, C., Sanders, C.V., Marier, R.L. 1984. Comparison of rapid identification assays for *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 19(5):703-704.

Alvarado-Rivas, C., Díaz-Rivero, C. 2007. Evaluación sanitaria de una cantina escolar. *Rev. Fac. Farm.* **49**(1):17-23.

American Type Culture Collection (ATCC). 2011. Product details. Strain number ATCC® 49444™. Manassas, E.U.A.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=49444&Template=bacteria> [Consulta: 17 de Mayo de 2011]

André, M., Hidalgo, M., Jayme, L., Kipnis, A., Pimenta, F., Serafini, A. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control* **19**(2):200-207.

Aray, C. 2002. Calidad Microbiológica del queso blanco venezolano tipo "Telita". Tesis de Especialización, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

Arias, M., Antillón, F., Montoya, A. 1990. Análisis bacteriológico de helados, quesos y empanadas de venta ambulante. *Rev. Cost. Cienc. Med.* **11**(3, 4):7-11.

Assefa, E., Beyene, F., Santhanam, A. 2008. Isolation and characterization of inhibitory substance producing lactic acid bacteria from ergo, Ethiopian traditional fermented milk. *Livestock Research for Rural Development* Volumen 20, Tema 3, Artículo 44. <http://www.lrrd.org/lrrd20/3/asse20044.htm> [Consulta: 09 de Julio de 2012]

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC International, Décima quinta Edición, Washington, E.U.A.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2002. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. Apéndice X. Manual de Programas OMA. AOAC Internacional, Washington, E.U.A.

Atanassova, V., Meindl, A., Ring, C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **68**:105-113.

Ayçiçek, H., Aydoğan, H., Küçükaraaslan, A., Baysallar, M., Başustaoğlu, A. 2004. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control* **15**(4):253-259.

Banada, P., Bhunia, A. 2008. Antibodies and immunoassays for detection of bacterial pathogens, Págs. 567-601 en: M. Zourob, S. Elwary y A. Turner (eds.), Principles of bacterial detection: Biosensors, recognition, receptors and microsystems. Springer Science+Bussines Media LLC, Primera Edición, Nueva York, E.U.A.

Baró, L, Lara, F., Corral, E. 2010. Leche y derivados lácteos, Págs. 1-26 en: A. Gil y M. Ruiz (eds.), Tratado de Nutrición, Tomo II. Editorial Médica Panamericana, Segunda Edición, Madrid, España.

Bean, F., Griffin, P. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, vehicles and trends. *J. Food Protect.* **3**:804-817.

Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM™). 2012. Bacteria catalogue. Strain LMG 8224. Budapest, Belgium.
http://bccm.belspo.be/db/lmg_strain_details.php?NUM=8224&COLTYPE= [Consulta: 15 de Junio de 2012]

Bennett, R. W., McClure, F. 1994. Visual screening with immunoassay for staphylococcal enterotoxins in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **77**:357-364.

Bennett, R. W., Lancette, G. A. 2001. *Staphylococcus aureus*. Bacteriological Analytical Manual, Capítulo 12. Food and Drug Administration (FDA), Octava Edición, Silver Spring, E.U.A. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm> [Consulta: 15 de Febrero de 2011]

Bennett, R. W., Hait, J. M. 2011. Staphylococcal enterotoxins: Micro-slide double diffusion and ELISA-based methods. Bacteriological Analytical Manual, Revisión A, Capítulo 13a. Food and Drug Administration (FDA), Octava Edición, Silver Spring, E.U.A. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm073674.htm> [Consulta: 31 de Marzo de 2011]

Bennett, R. W. 2005. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *J. Food Protect.* **68**(6):1264-1270.

Bergdoll, M. S. 1995. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. *Zbl. Bakt.* **282**:1-6.

Bergdoll, M. S., Lee, A. C. 2006. Staphylococcal intoxication. Págs. 523-552 en: D. O Cliver, M. Potter y H. Riemann (eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*. Elsevier Academic Press, Tercera Edición, San Diego, E.U.A.

Berke, A., Tilton, R. 1986. Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **23**(5): 916-919.

bioMérieux. 2009. API® Staph. Sistema de identificación de estafilococos, micrococos y géneros relacionados. bioMérieux S.A. Marcy-l'Etoile, Francia.

Black, J.G. 2004. Microbiology: Principles and Explorations. John Wiley & Sons, Sexta Edición, New York, E.U.A.

Blake, J., Metcalfe, M. 2001. A shared noncapsular antigen is responsible for false-positive reactions by *Staphylococcus epidermidis* in commercial agglutination tests for *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**(2):544-550.

Boquete, M. T. 1996. Aplicación de marcadores epidemiológicos en la evaluación microbiológica de aislamientos de *Staphylococcus sp.* coagulasa negativos en hemocultivos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Brett, M. M. 1998. Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *J. Appl. Microbiol.* **84**:110-118.

Brizzio, A., Tedeschi, F., Zalazar, F. 2011. Descripción de un brote de intoxicación alimentaria estafilocócica ocurrido en Las Rosas, provincia de Santa Fe, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **43**:28-32.

Bullerman, L., Bianchini, A. 2011. The microbiology of cereals and cereal products. Food Quality magazine. Febrero/Marzo 2011.

http://www.foodquality.com/details/article/1023787/The_Microbiology_of_Cereals_and_Cereal_Products.html?tzcheck=1# [Consulta: 15 de Julio de 2012]

Bustos, J. A., Hamdan, A., Gutiérrez, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed.* **17**:287-305.

Casey Gerry Schenk Francavilla Blatt & Penfield LLP. 2012. *Staphylococcus aureus*. San Diego, E.U.A. http://www.cglaw.com/apg_pg51p10_Staphylococcus_Aureus.html [Consulta: 05 de Junio de 2012]

Casman, E.P., Bennett, R.W., Dorsey, A.E., Stone, J.E. 1969. The micro-slide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Lab. Sci.* **6**:185-198.

Centers for Disease Control Prevention (CDC). 2006. Staphylococcal food poisoning. Disease listing. Atlanta, E.U.A. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/staphylococcus_food_g.htm [Consulta: 18 de Marzo de 2012]

Çepoğlu, H., Vatanserver, L., Bilge, N. 2010. Isolation of staphylococci from food handlers and investigation of their enterotoxigenicity and susceptibility to some antibiotics. *Kafkas Univ. Vet. Fac. Derg.* **16**(Suppl-A):S1-S5.

Clavell, L., Pedrique, M., De Castro, N, Gutierrez, S. 2011. Selección de pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos. Fermentación de carbohidratos. Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/carbohidratos.pdf [Consulta: 09 de Agosto de 2012]

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1989. Norma Venezolana №1126-89: Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Primera Revisión. Comité técnico CT-10 Productos alimenticios, FONDONORMA, Caracas, Venezuela.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 2004. Norma Venezolana №1292-89: Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Primera Revisión. Comité técnico CT-10 Productos alimenticios, FONDONORMA, Caracas, Venezuela.

Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). 2011. Reflection paper on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Londres, Reino Unido.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/02/WC500102017.pdf [Consulta: 27 de Marzo de 2012]

Conrad, M. 2011. Staph infection pictures slideshow: Symptoms, causes, treatment and prevention tips. MedicineNet Inc., WebMD LLC., Atlanta, E.U.A.
http://www.medicinenet.com/staph_infection_pictures_slideshow/article.htm [Consulta: 12 de Enero de 2012]

Cowan, S.T., Shaw, C., Williams, R.E.O. 1954. Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *J. Gen. Microbiol.* **10**:174-176.

Dassy, B., Stringfellow, W.T., Lieb, M., Fournier, J.M. 1991. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1155-1162.

Dassy, B., Hogan, T., Foster, T., Fournier, J. 1993. Involvement of the accessory gene regulator (*agr*) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1301-1306.

de Curtis, M., Franceschi, O., De Castro, N. 2000. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. *ALAN* **50**(2):177-182.

Di Pinto, A., Forte, V. T., Ciccarese, G., Conversano, M.C., Tantillo, G. M. 2004. Comparison of reverse passive latex agglutination test and immunoblotting for detection of staphylococcal enterotoxin A and B. *J. Food Safety* **24**:231-238.

Díaz-Rivero, C., González, B. 2001. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León (*Respyn*). Volumen 2, número 3, Julio-Septiembre 2001. <http://www.respyn.uanl.mx/ii/3/articulos/saureus-1.html> [Consulta: 10 de Abril de 2012]

Duriez, E., Fenaille, F., Tabet, J., Lamourette, P., Hilaire, D., Becher, F., Ezan, E. 2008. Detection of ricin in complex samples by immunocapture and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr8003437> [Consulta: 23 de Febrero de 2012]

Ertola, R., Yantorno, O., Mignone, C. 1994. Microbiología Industrial. Organización de Estados Americanos (OEA). Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, E.U.A.

Federation of European Specialty Food Ingredients Industries (ELC). 2006. Stabilisers & More. Stabilisers, thickeners and gelling agents. Federation of European Specialty Food Ingredients Industries, Bruselas, Bélgica. <http://www.elc-eu.org/html/pfstabilisers.html> [Consulta: 18 de Agosto de 2012]

Figueroa, G., Navarrete, P., Caro, M., Troncoso, M., Faúndez, G. 2002. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. *Rev. Med. Chil.* **130**(8):859-864.

Fuente anónima, 2009a. Polyclonal Antibodies. Mimotopes, The Peptide Company, Melbourne, Australia. <http://www.mimotopes.com/knowledgeBaseDocument.asp?did=67> [Consulta: 13 de Diciembre de 2011]

Fuente anónima. 2009b. Prueba de catalasa: Distinguir *Staphylococcus* de *Streptococcus*. Telmeds.org, Número 10, Año 2009. Club de Informática Médica y Telemedicina, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá, Panamá. <http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/cocos-gram-positivos-piogenos-de-importancia-medica/prueba-de-catalasa-distinguir-staphylococcus-de-streptococcus/> [Consulta: 10 de Noviembre de 2011].

Fuente anónima. 2009c. Selección de medios de cultivo y sistemas miniaturizados para la identificación de microorganismos. Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. <http://www.ucv.ve/organizacion/facultades/facultad-de-farmacia/programas-academicos/pregrado/catedras/catedra-de-microbiologia/material-de-apoyo/seleccion-de-medios-de-cultivo-y-sistemas-miniaturizados.html> [Consulta: 5 de enero de 2012]

Fuente anónima. 2011. Bacterial food poisoning. Health and Physical Educational Teacher. <http://www.healthandphysicaleducationteacher.com/health-care/nutritional-diseases/bacterial-food-poisoning.html> [Consulta: 04 de Septiembre de 2012]

Fueyo, J.M. 2005. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

Fujikawa, H., Igarashi, H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2345-2348.

García, M., Mugaburu, G. 2011. Reducción de la incidencia de la intoxicación estafilocócica asociado al consumo de queso elaborado con leche cruda de oveja en la CAPV. *Sustrai* **95**:74-77. [Consulta: 20 de Julio de 2012]

Gella, F., Serra, J., Gener, J. 1991. Latex agglutination procedures in inmunodiagnosis. *Pure & Appl. Chem.* **63**(8):1131-1134.

Genigeorgis, C., Foda, M., Mantis, A., Sadler, W. 1971. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl. Microbiol.* **21**(5):862-866.

Ghinee, T., Fox, P. 1999. Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects, Págs. 257-303 en: P. Fox (ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Volumen 1. Aspen Publishers, Segunda Edición, Gaithersburg, E.U.A.

Gibbons, S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance: strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* **74**:594-602.

González, G. 1983. Obtención de enterotoxinas B y C de *Staphylococcus aureus* e implementación de técnicas inmunoenzimáticas para su detección en productos lácteos. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Grant, W. 2004. Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **359**(1448):1249-1267.

Gyles, C., Prescott, J., Songer, G., Thoen, C. 2010. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley-Blackwell, Cuarta Edición, Iowa, E.U.A.

Gubbay, L., Galanternik, L., Galan, G., Cabrera, J., Galas, M., Degrossi, C. 2003. *Staphylococcus aureus*: Sensibilidad antibiótica y detección de enterotoxinas de cepas aisladas de alimentos y

manos de manipuladores. II Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. Santa Fé, Argentina.

Hajmeer, M. 2006. *Staphylococcus aureus*. California Department of Food and Agriculture (CDFA), California, E.U.A. http://www.cdffa.ca.gov/ahfss/Animal_Health/PHR250/2006/S%20aureus.pdf
[Consulta: 12 de Octubre de 2011]

Hardy Diagnostics. 2012. Rapid ID test kits. Staphytest Plus, latex slide agglutination test for the differentiation of *Staphylococcus aureus*. Santa Maria, E.U.A. https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/CatNav.aspx?oid=8329&navpath=1917,8308&prodoid=DR850M [Consulta: 25 de Agosto de 2012]

Hatakka, M., Björkroth, K., Asplund, K., Mäki-Petäys, N., Korkeala, H. 2000. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J. Food Protect.* **63**(11):1487-1491.

Hennekinne, J.A. 2009. Nouvelles approches pour la caracterisation des toxi infections alimentaires a staphylocoques a coagulase positive. Tesis Doctoral, Instituto de Ciencias e Industrias de la vida y del ambiente (Agro Paris Tech), Paris, Francia.

Hirai, I., Okuno, M., Katsuma, R., Arita, N., Tachibana, M., Yamamoto, Y. 2010. Characterisation of anti- *Staphylococcus aureus* activity of quercetin. *Int. J. Food Sci. Tech.* **45**:1250–1254.

Horwood, M., Minch, V. 1951. The numbers and types of bacteria found on the hands of food handlers. *J. Food Sci.* **16**:133-136.

Hung, S., Huang, T., Ko, H. 1993. Detection of staphylococcal enterotoxins in rice using enzyme immunoassay kits. *J. Food Drug Anal.* **1**(3):297-304.

Institute of Food Technologists (IFT). 2004. Bacteria associated with foodborne diseases: Scientific status summary. Chicago, E. U. A. <http://www.ift.org/Knowledge-Center/Read-IFT-Publications/Science-Reports/Scientific-Status-Summaries/Bacteria-Associated-with-Foodborne-Diseases.aspx>. [Consulta: 18 de Septiembre de 2011]

Jay, J. M. 2000. *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers, Sexta edición, Maryland, E.U. A.

Jo, A.I. 2005. Detección de las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* en alimentos de las cafeterías de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos, San Carlos, Guatemala.

Johannessen, G., Loncarevic, S., Kruse, H. 2002. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* **77**:199-204.

Kérouanton, A., Hennekinne, J., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* **115**:369-375.

Kloos, W., Schleifer, K. 1986. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18^{AL}, (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958, 153), Págs. 1013-1035 en: P. Sneath, N. Mair, M. Sharpe y J. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volumen 2. Williams & Wilkins, Primera Edición, Baltimore, E.U.A.

Knable, S.J. 1995. Enfermedades transmitidas a través de los alimentos. Papel que juegan las prácticas usadas en el manejo de los alimentos en el hogar.

<http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1001315>. [Consulta: 30 de Septiembre de 2011]

Kuusela, P., Hilden, P., Savolainen, K., Vuento, M., Lyytikäinen, O., Vuopio-Varkila, J. 1994. Rapid detection of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains not identified by slide agglutination tests. *J. Clin. Microbiol.* **32**(1): 143-147.

Lancette, G., Bennett, R. 2001. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins, Págs. 387-403 en: F. Downes y K. Ito. (eds.), Compendium of methods for the microbiological examination in foods. American public health association, Cuarta edición, Washington, E.U.A.

Lapeyre, C., Janin, F., Kaveri, S. 1988. Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C₁ and D in food samples. *Food Microbiol.* **5**:25-31.

Lebeau, C., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R., Etienne, J. 1994. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulated by an *arg*-dependent mechanism. *Joun. Bact.* **176**:5534-5536.

Ledermann, W. 2007. Una historia personal de las bacterias. Sociedad Chilena de Infectología, RIL editores, Primera Edición, Santiago de Chile, Chile.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Review. *Genet. Mol. Res.* **2**(1): 63-76.

Li, J., Dong, J., Qiu, J., Wang, J., Luo, M., Li, H., Leng, B. y colaboradores. 2011. Peppermint oil decreases the production of virulence-associated exoproteins by *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **16**:1642-1654.

Linder, F. 1981. Alexander Ogston, Págs. 1-8 en: A. Macdonald y G. Smith (eds.), The staphylococci: Proceedings of the Alexander Ogston centennial conference. Aberdeen University Press, Primera Edición, Aberdeen, Gran Bretaña.

Loeto, D., Matsheka, M., Gashe, B. 2007. Enterotoxigenic and antibiotic resistance determination of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Gaborone, Botswana. *J. Food Prot.* **70**(12):2764-2768.

Lues, J., Van Tonder, I. 2007. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control* **18**(4):326-332.

Luijendijk, A., Van Belkum, A., Verbrugh, H., Kluytmans, J. 1996. Comparison of five tests for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **34**(9):2267-2269.

Luján, D., Valentin, M., Molina, M. 2006. Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima-Perú. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León (*Respyn*). Volumen 7, número 2, Abril-Junio 2006. http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos_frescos-1.htm [Consulta: 30 de Agosto de 2012]

Madden, J. 1992. Microbial pathogens in fresh produce – the regulatory perspective. *J. Food. Prot.* **55**:821-823.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2003. Brock. Biología de los Microorganismos. Pearson Prentice Hall, Décima Edición, México D.F., México.

Madrid, A., Cenzano, I. 2003. Helados: Elaboración, análisis y control de calidad. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, Primera edición, Madrid, España.

Marples, R.R., Richardson, J.F. 1982. Evaluation of a micromethod gallery (API Staph) for the identification of staphylococci and micrococci. *J. Clin. Pathol.* **35**:650-656.

Márquez, J., García, C. 2007. Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **27**:108-111.

Marth, E., Steele, J. 2001. Applied Dairy Microbiology. Segunda edición. Marcel Dekker Inc. Nueva York, E.U.A.

Martín, R. 2010. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos, Págs. 67-98 en: Sanz B. (ed.), Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros. Editorial Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, Primera Edición, Madrid, España.

Martín, M., Fueyo, J., González-Hevia, M., Mendoza, M. 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **94**:279-286.

Martínez, A., Pérez, J. 2001. Estafilococos, Págs. 153-163 en: A. Llop, M. Valdés-Dapena, y J. Zuazo, Microbiología y Parasitología Médicas, Tomo II. Editorial Ciencias Médicas, Primera Edición, La Habana, Cuba.

Mattila-Shandholm, T., Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: A review. *Food Rev. Int.* **8**(4):573-603.

McCoy, D., Faber, J. 1966. Influence of food microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. *Appl. Microbiol.* **14**(3):372-377.

Merck, 1997. Gram-color staining set for microscopy. Instructivo de uso. Merck KGaA., Darmstadt, Alemania.

Milipore. 2012. Panels & Kits. Radioimmunoassay (RIA). EMD Milipore Corporation, Billerica, E.U.A. http://www.millipore.com/bmia/flx4/bmia_kits&tab1=3&tab2=3#tab2=3:tab1=3 [Consulta: 29 de Agosto de 2012]

Miró, A., Ríos, M. 1999. Calidad microbiológica de los quesos blancos venezolanos, analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*. **30**:14-20.

Miyamoto, T., Kamikado, H., Kobayashi, H., Honjoh, K.I., Iio, M. 2003. Immunomagnetic Flow Cytometric Detection of Staphylococcal Enterotoxin B in Raw and Dry Milk. *J. Food Protect* **66**:1222-1226.

Moon, J., Lee, A., Jaw, S., Kang, H., Joo, Y., Park, Y., Kim, M., y colaboradores. 2007. Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity and coagulase genotype among

Staphylococcus aureus isolated from animal and vegetable sources in Korea. *J. Food. Protect.* **70**(11): 2541-2548.

Nadeem, M., Grealley, P., Elnazir, B. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Panton-Valentine leucocidin) cavitating pneumonia in a healthy child. *Arch. Dis. Child* Junio 2012. <http://adc.bmj.com/sci-hub.org/content/early/2012/06/25/archdischild-2012-302242.short> [Consulta: 20 de Agosto de 2012]

Novick, R., Geisinger, E. 2008. Quorum sensing in Staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* **42**:541-564.

Ogston, A. 1881. Report upon Micro-organisms in surgical diseases. *Brit. Med. J.* 369-375.

Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, A., Torre, P. 1997. Control higiénico-sanitario del queso de carneros y detección de puntos de contaminación microbiana en superficies y equipos. *Aliment.* **5**(3):41-44.

Ordás, C.B. 2006. Epidemiología de la resistencia a metilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

Orenstein, A. The discovery and naming of *Staphylococcus aureus*. <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.asp>. [Consulta: 04 de Septiembre de 2011]

Ostyn, A., Guillier, F., Pruger, A., Papinoud, I., Messio, S., Krys, S., Lombard, B., y colaboradores. 2011. Intra-laboratory validation of Ridascreen® SET Total kit for the detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**(5):468-474.

Oxoid. 2003. SET RPLA staphylococcal enterotoxin test kit. Instructivo de uso. Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra.

Oxoid. 2005. Staphytest Plus. Instructivo de uso. Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra.

Shanghai Qianchen Biotechnology Company. 2006. Oxoid special agents. Rapid test kits. Shanghai Qianchen Biotechnology Company, Shanghai, China. <http://www.qcbio.com/oxoid/detection.htm>

[Consulta: 16 de Septiembre de 2011]

Papageorgiou, A., Acharya, K., Shapiro, R., Passalacqua, E., Brehm, F., Tranter, H. 1995. Crystal structure of the superantigen enterotoxin C2 from *Staphylococcus aureus* reveals a zinc-binding site. *Structure*. **3**(8):769-779.

Papageorgiou, A., Tranter, H., Acharya, K. 1998. Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors. *J. Mol. Biol.* **277**(1):61-79.

Park, C., Szabo, R. 1986. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D in foods. *Can. J. Microbiol.* **32**:723-727.

Park, C., Akhtar, M., Rayman, M. 1992. Non-specific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in food. *Appl. Environ. Microb.* **58**:2509-2512.

Park, C., Akhtar, M., Rayman, M. 1994. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods. *Appl. Environ. Microb.* **60**(2):677-681.

Park, C., Warburton, D., Laffey, P. 1996a. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins in foods by an enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN®). *Int. J. Food Microbiol.* **29**:281-295.

Park, C., Warburton, D., Laffey, P., Akhtar, M., Catherwood, K., Crawford, C. 1996b. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins with an enzyme immunoassay kit (TECRA). *J. Food Protect.* **59**:390-397.

Parsaeimehr, M., Akhondzadeh A., Radmehr, B., Misaghi, A., Abbasifar, A., Karim, G., Rokni, N., y colaboradores. 2010. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, nisin, and their combination on the production of enterotoxin C and α -hemolysin by *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**:299-305.

Personne, P., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Brun, Y., Etienne, J. 1997. Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **35**(5): 1138-1140.

Peruski, A. H., Peruski, L.F. 2003. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**:506-513.

Pimbley, D.W., Patel, P.D. 1998. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. *J. Appl. Microbiol.* **84**:98-109.

Pinchuk. I., Beswick, E., Reyes, V. 2010. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins.* **2**:2177-2197.

Piper, J., Hadfield, T., McCleskey, F., Evans, M., Friedstrom, S., Lauderdale, P., Winn, R. 1988. Efficacies of rapid agglutination test for identification of methicillin-resistant staphylococcal strains as *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **26**(9):1907-1909.

Pisabarro, A.G. 2005. Interacción con los microorganismos, tema 5 en: Curso de Microbiología Clínica. Primera Diplomatura en Enfermería. Grupo de Investigación de Genética y Microbiología. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España. <http://www.unavarra.es/genmic/> [Consulta: 09 de Enero de 2011]

Porter, I.A., 1954. Nova et Vetera. Alexander Ogston - Bacteriologist. *Brit. Med. J.* **2**:355-356.

Powers, E., Ay, C., el-Bisi, H., Rowley, D. 1971. Bacteriology of dehydrated space foods. *Appl. Microbiol.* **22**(3):441-445.

Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2002. Microbiology. Mc Graw-Hill, Quinta Edición, New York, E.U.A.

Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J. y colaboradores. 2010. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and α -hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE* **5**:e9736. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0009736> [Consulta: 21 de Abril de 2012]

Racaniello, V. R. 2010. Virology toolbox: The western blot. Viral detection. <http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/> [Consulta: 09 de Enero de 2012]

Radwan, M., Rodriguez-Guzman, R., Manly, S., Jacob, M., Ross, S. 2009. Sepicanin A-A new geranyl flavanone from *Artocarpus sepicanus* with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytochem. Lett.* **2**(4):141–143.

Raghukumar, R., Vali, L., Watson, D., Fearnley, J., Seidel, V. 2010. Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenylflavanones. *Phytother. Res.* **24**:1181–1187.

Rajkovic, A., El Moulaj, B., Uyttendaele, M., Brolet, P., Zorzi, W., Heinen, E., Foubert, E. y colaboradores. 2006. Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods. *Appl. Environ. Microb.* **72**:6593-6599.

Ramsey, K., Carter, E., McKee, M., Beck, B. 2010. Reclassification of the Listeria-CAMP test strain ATCC 49444 *Staphylococcus aureus* as *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Food Prot.* **73**(8):1525-1528.

Rasooly, A. 1998. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in food by western electrophoretic and immunoblot analysis of staphylococcal enterotoxins in food. Bacteriological Analytical Manual, Revisión A, Capítulo 13b. Food and Drug Administration (FDA), Octava Edición, Silver Spring, E.U.A.
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm073685.htm> [Consulta: 27 de Enero de 2011]

Rasooly, A., Rasooly, R. 1998. Detection and analysis of staphylococcal enterotoxin A in food by western immunoblotting. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:205-212.

Ray, B. 2004. Fundamental food microbiology. CRC Press, Tercera Edición, Boca Raton, E.U.A.

R- Biopharmnews II-2010. Food and Feed Analysis: Ridascreen® SET Total. Editado por R-Biopharm, Darmstadt, Alemania. <http://www.r-biopharm.com/rbiopharmnews/pdf/II-10%20engl.pdf>. [Consulta: 24 de Octubre de 2011]

R-Biopharm®. 2011a. Ridascreen® SET Total. Instructivo de uso. R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania. http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=4477&product_class_one=TWljcm9iaW9sb2d5IC8gSHlnaWVuZQ==&product_class_two=U3RhcGh5bG9jb2NjYWwgZW50ZXJveGluChTRVQp&product_classes_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis& [Consulta: 31 de Octubre de 2011]

R-Biopharm®. 2011b. Ridascreen® SET A-E. Instructivo de uso. R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania. http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=250&product_class_one=TWljcm9iaW9sb2d5IC8gSHlnaWVuZQ==&product_class_two=U3RhcGh5bG9jb2NjYWwgZW50ZXJveGluChTRVQp&product_classes_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis& [Consulta: 27 de Octubre de 2011]

Redway, K. 2012. Microbial taxonomy. Universidad de Westminster, Reino Unido. [http://www2.wmin.ac.uk/~redway/lectures/Taxonomy & ID.htm](http://www2.wmin.ac.uk/~redway/lectures/Taxonomy_%20&ID.htm) [Consulta: 13 de Julio de 2012]

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). 2012. Protein Data Bank (PDB). E.U.A. <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?grid=AEB97451&tabtoShow=Current> [Consulta: 06 de Mayo de 2012]

Rodríguez, J. 2006. Los riesgos de contaminación en helados blandos. Mundo Lácteo y Cárnico. Septiembre/Octubre. Págs. 25-27.

http://www.mundolacteoycarnico.com/desplegar_notas.asp?did=2614 [Consulta: 02 de Mayo de 2012]

Rojas, C., Vargas, P. 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha* 21(2):9-16.

http://www.tec.ac.cr/sitios/Vicerrectoria/vie/editorial_tecnologica/Revista_Tecnologia_Marcha/pdf/tecnologia_marcha_21-2/21-2%209-16.pdf [Consulta: 12 de Mayo de 2012]

Rosales, Y., Díaz, C. 2006. Evaluación de la calidad microbiológica de helados caseros en Mérida, Venezuela. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León (*Respyn*). Volumen 7, número 3, Julio-Septiembre 2006.

<http://www.respyn.uanl.mx/vii/3/articulos/helados.htm> [Consulta: 29 de Abril de 2012]

Rose, S., Bankes, P., Stringer, M. 1989. Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reverse passive latex agglutination (SET RPLA) kit. *Int. J. Food Microbiol.* 8:65-72.

Rosentul, D. 2006. Estudio comparativo de diferentes métodos rápidos con el método tradicional para la detección de *Salmonella* en alimentos. Tesis de Pregrado, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Rossney, A.S., English, L.F., Keane, C.T. 1990. Coagulase testing compared with commercial kits for routinely identifying *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Pathol.* 43(3): 246-252.

Ruane, P.J., Morgan, M.A., Citron, D.M., Mulligan, M.E. 1986. Failure of rapid agglutination methods to detect oxacilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 24(3):490-492.

Sampimon, O.C., Zadoks, R.N., De Vliegher, S., Supré, K., Haesebrouck, F., Barkema, H.W., Sol, J. y colaboradores. 2009. Performance of API Staph ID 32, Staph-Zym for identification of coagulase negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol.* **136**(3-4):300-305.

Savadogo, A., Ouattara, C., Bassole, I., Traore, A. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition* **3**(3):174-179.

Schad, E., Zaitseva, I., Zaitsev, V., Dohlsten, N., Kalland, T., Schlievert, P., Ohlendorf, E., y colaboradores. 1995. Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. *EMBO J.* **14**(14):3292-3301.

Schlosser, G., Kačer, P., Kuzma, M., Szilágyi, Z., Sorrentino, A., Manzo, C., Pizzano, R. y colaboradores. 2007. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Environ. Microb.* **73**:6945-6952.

Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH). 2003. Opinion on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. Adoptada el 26-27 de Marzo de 2003. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf. [Consulta 12 de Noviembre de 2011]

Shekarchi, I., Sever, J., Nerurkar, L., Fuccillo, D. 1985. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with enzyme-linked fluorescence assay with automated readers for detection of rubella virus antibody and herpes simplex virus. *J. Clin. Microbiol.* **21**:92-96.

Shojaei, H., Shooshtaripoor, J., Amiri, M. 2006. Efficacy of simple hand-washing in reduction of microbial hand contamination of Iranian food handlers. *Food Res. Int.* **39**(5):525-529.

Smith, J., Buchanan, R., Palumbo, S. 1982. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis. *J. Food Protect.* **46**:545-555.

Smith, M., Bidochka, M. 1998. Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can. J. Microbiol.* **44**: 351–355.

Su, Y., Lee, A. 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Food Protect.* **60**:195-202.

Suarez, 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 termonucleasa. *Arch. Latinoam. Nutr.* **58**:59-63.

Suzuki, U., Kubota, K., Omichi, M., Hosaka, H. 1976. Kinetic studies on cooking of rice. *J. Food Sci.* **41**(5):1180-1183.

Swaminathan, B., Feng, P. 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:401-426.

Tanaka, H., Sato, M., Oh-Uchi, T. 2004. Antibacterial properties of a new isoflavonoid from *Erythrina poeppigiana* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine* **11**:331–337.

Technopath. 2011. Petrifilm staph express count system. Food & Water, 3M. Technopath, Ballina, Irlanda.

<http://www.techno-path.ie/FoodAndWater-3M/Petrifilm%20Staph%20Express%20count%20System.aspx> [Consulta: 03 de Mayo de 2011]

TECRA. 2004. Staphylococcal enterotoxin visual immunoassay. Product information. TECRA International Pty Ltd, Frenchs Forest, Australia. http://www.iul-instruments.de/pdf/staphylococcal_enterotoxin_via.pdf [Consulta: 20 de Mayo de 2012]

The British Medical Journal Obituary. 1929. Sir Alexander Ogston K.C.V.O., M.D., C.M., LL.D. *Brit. Med. J.* 1:325-327.

Thermo Fisher Scientific. 2012. Oxoid Microbiology Products. SET RPLA. Thermo Fisher Scientific Inc. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=TD0900&c=UK&lang=EN [Consulta: 8 de Mayo de 2012]

Thunberg, R., Tran, T., Bennett, R., Mathews, R., Belay, N. 2002. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. *J. Food. Prot.* 65(4):677-682.

Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2007. Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana, Novena Edición, Buenos Aires, Argentina.

Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, F. 2004. Validation of qualitative analytical methods. *Trends Anal. Chem.* 23(2):137-145.

Tveten, Y. 1995. Evaluation of new agglutination test for identification of oxacilin-susceptible and oxacilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 33(5): 1333-1334.

Valdiviezo, N., Villalobos, L., Martínez, R. 2006. Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores en Cumaná-Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 26(2):389-395.

Vanegas, M., González, L., Martínez, A., Buitrago, F. 2008. Aislamiento y caracterización de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos en Bogotá. *Rev. MVZ Córdoba*. **13**(2):1288-1293.

Vásquez, J., Cabral, A. 2001. La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. Págs. 4-15 en: FAO. Alimentación, nutrición y cultura, N° 28. Dirección de alimentación y nutrición. <http://www.fao.org/docrep/003/y0600m/y0600m02.htm>. [Consulta: 05 de Septiembre de 2011]

Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Richard, Y. 2004. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**:490-494.

Weist, K., Cimbal, A., Lecke, C., Kampf, G., Rüden, H., Vonberg, R. 2006. Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *Joun. Med. Microb.* **55**:283-290.

Wieneke, A. A., Gilbert, R.J. 1987. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **4**:135-143.

Wieneke, A. A. 1988. The detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by strains of *Staphylococcus aureus* with commercial RPLA kits. *Int. J. Food Microbiol.* **7**:25-30.

Wieneke, A. A. 1991. Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxins in foods from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **14**:305-312.

Wieneke, A., Roberts, D., Gilbert, R. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* **110**(3):519-531.

Wilkinson, R., Mallmann, W., Dawson, M., Irmiter, T., Davidson, J. 1965. Effective heating processing for the destruction of pathogenic bacteria in turkey rolls. *Poult. Sci.* **44**(1):131-136.

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schrenckenberger, P., Woods, G. 2008. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. Editorial Médica Panamericana, Sexta Edición, Buenos Aires, Argentina.

Yu, H. 1998. Use of an immunomagnetic separation-fluorescent immunoassay (IMS-FIA) for rapid and high throughput analysis of environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* **376**:77-81.

Xue, T., You, Y., Shang, F., Sun, B. 2012. Rot and Arg system modulate fibrinogen-binding ability mainly by regulating *clfB* expression in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *Med. Microbiol. Immunol.* **201**: 81-92.

Zúñiga, A., Sánchez, M., Mota, L., Ortigoza, J. 1999. Behavior of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in milk fermented with a yogurt starter culture. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **41**:5-10.

ANEXOS

1. Protocolo para identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico (COVENIN, 1989).

1.1. Identificación de la muestra.

Incluir los siguientes datos:

- a) Fechas de llegada, toma de la muestra, fabricación y vencimiento.
- b) Nombre y tipo de producto.
- c) Marca comercial.
- d) Fabricante y/o distribuidor.
- e) Número de lote de fabricación.
- f) Contenido neto del envase.
- g) Ingredientes.
- h) Cualquier otra de importancia para el análisis.

Seguidamente, asignar código de identificación y tomar nota de ciertos aspectos concernientes a las condiciones de recepción de la muestra tales como:

- a) Temperatura (muestras refrigeradas o congeladas).
- b) Apariencia del envase.
- c) Apariencia del producto antes (de ser visible) y en el momento de realizar el análisis, haciendo referencia a su color, olor y textura.

1.2. Conservación de las muestras.

- a) Analizar las muestras dentro de las 36 horas posteriores a su llegada al laboratorio.
- b) Almacenar muestras congeladas a -20°C , refrigeradas entre 0 y 4.4°C y no perecederas a temperatura ambiente en un lugar libre de humedad.

1.3. Preparación de las muestras.

- a) Garantizar la asepsia del lugar donde se realizará el análisis, y preparar los equipos y materiales (previamente identificados) necesarios para el mismo.
- b) Evitar contaminación al momento de abrir la muestra, lavando y secando antes los recipientes cerrados como latas y jarras.
- c) Si la envoltura del producto es blanda o de papel, desinfectar primero la superficie (especialmente la abertura) utilizando etanol al 70% v/v para eliminar restos de polvo y minimizar la contaminación.

1.4. Tratamiento de las muestras según su estado físico.

- a) Alimentos sólidos: tomar porciones de diferentes sitios para lograr una muestra representativa.
- b) Alimentos líquidos en envases pequeños: agitar el envase 25 veces hasta homogeneizar el contenido.
- c) Alimentos líquidos congelados (helado): procederá tomar la muestra sin descongelar.

1.5. Homogeneización y preparación de las diluciones.

Muestras sólidas:

- a) Pesar 25 g de la muestra en una bolsa estéril previamente tarada.
- b) Realizar una dilución 1/10 de la misma empleando 225 mL de agua peptonada al 0.1% p/v.
- c) Homogeneizar la mezcla en Stomacher® por 1 minuto a 8000 r.p.m., dejando reposar luego por 2 o 3 minutos más hasta que desaparezcan los rastros de espuma.

Muestras líquidas:

- a) Medir 10 mL de la muestra con una pipeta y realizar una dilución 1/10 en un frasco con 90 mL de agua peptonada al 0.1% p/v.
- b) Los líquidos con alto grado de viscosidad deben ser pesados.
- c) Agitar la muestra 25 veces.

Diluciones (sólidos y líquidos):

- d) A partir de la primera dilución realizada, preparar tantas diluciones decimales sucesivas como requiera el alimento o microorganismo, sin olvidar homogeneizar siempre la solución respectiva antes de pasar a la siguiente.
- e) No exceder el tiempo de siembra de las muestras en los medios de cultivo por más de 20 minutos posteriores a la preparación de las diluciones.

2. Protocolo para el aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en alimentos (COVENIN, 2004).

2.1. Aislamiento y recuento directo de *S. aureus* utilizando como método alternativo placas rehidratables Petrifilm™ Staph Express de 3M™ (3M Microbiology, 2009).

- a) Ubicar la placa ya identificada y fechada sobre una superficie plana y nivelada.
- b) Tomar una alícuota equivalente a 1 mL de la muestra previamente tratada, levantar la película superior de la placa y descargar el líquido en el centro de la placa colocando la pipeta en posición perpendicular.
- c) Bajar la película superior con cuidado, evitando la formación de burbujas o el derrame de la alícuota de muestra.
- d) Colocar el lado plano del difusor sobre el centro de la placa ya cubierta y aplicar al instante una presión leve, sin mover el mismo, para permitir que la muestra se esparza de manera uniforme en el espacio rayado sin desbordarse hacia el hule espuma.
- e) Dejar reposar la placa al menos un minuto para que solidifique el gel, y luego de ello incubar en posición horizontal (no invertida) a 37°C durante 24h. Guardar en pilas de hasta 20 placas.
- f) Culminado el tiempo de incubación, observar el color de las colonias presentes en la placa. Si sólo hay colonias rojo-violetas, proceder directamente al recuento.
- g) De estar presentes colonias de otros colores, levantar la película superior de la placa e insertar en el centro el disco de O-toluidina que incluye el sistema, cubriendo totalmente la región rayada y dejando la lengüeta hacia el exterior.

- h) Cerrar nuevamente la placa y aplicar una leve presión con el dedo para garantizar el contacto entre las superficies y evitar la formación de burbujas.
- i) Incubar de 1 a 3h a 37°C, verificando la aparición de zonas de color rosado. Si no se observa tal coloración, no considerar las colonias para el recuento.
- j) Realizar el recuento tomando en cuenta todas las colonias rojo-violetas ubicadas en el centro de la placa. No considerar para el recuento aquellas colonias que se extiendan a la región de hule espuma. En el caso del disco, cuantificar todas las zonas rosas haya o no colonias asociadas a ellas.

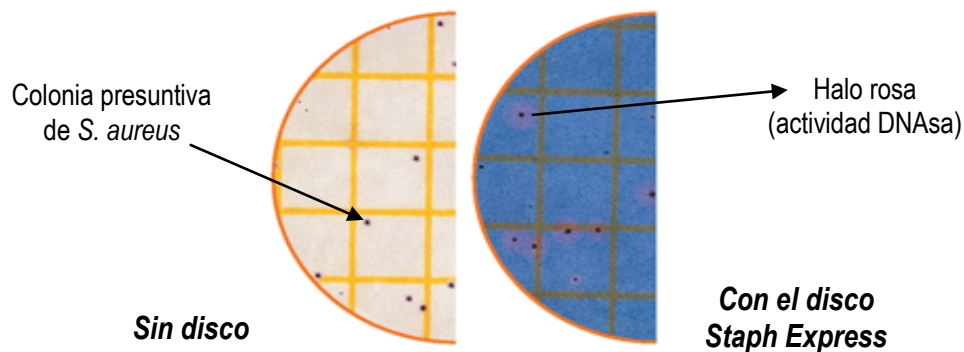


Figura A1. Sistema Petrifilm™ Staph Express de 3M™. Tomado y modificado de Technopath (2011).

2.2. Pruebas confirmatorias.

Coloración de Gram utilizando el sistema Gram-color de Merck (Merck, 1997):

- a) Sobre una lámina portaobjetos limpia, seca e identificada con el código de la muestra, realizar una suspensión a partir de una colonia presuntiva proveniente de agar nutritivo y una gota de solución salina estéril.
- b) Dejar secar la muestra sobre la lámina unos minutos, procurando que la capa formada no sea gruesa.

- c) Exponer la parte inferior de la lámina a la llama del mechero, procurando hacer pases rápidos para evitar sobrecalentamiento y alteración de la estructura celular.
- d) Al enfriarse la lámina, colocarla en posición horizontal y añadir unas gotas de la solución #1 (colorante cristal violeta) diluida 1/5 con agua destilada hasta cubrir el área de la muestra, dejando reposar la preparación aproximadamente 90 segundos.
- e) Seguidamente, retirar el colorante con agua por 30 segundos y agregar la solución #2 (lugol). Descartar 3 minutos después utilizando agua destilada por 20 segundos.
- f) Eliminar la coloración utilizando la solución #3 (decolorante) entre 5 y 10 segundos, y retirar el exceso de este último con agua destilada por 30 segundos.
- g) Incorporar la solución #5 (colorante de contraste), dejando actuar alrededor de 60 segundos y descartando luego con agua destilada durante el mismo tiempo.
- h) Finalmente, dejar secar la lámina y proceder a la observación de la muestra al microscopio utilizando el objetivo de inmersión.

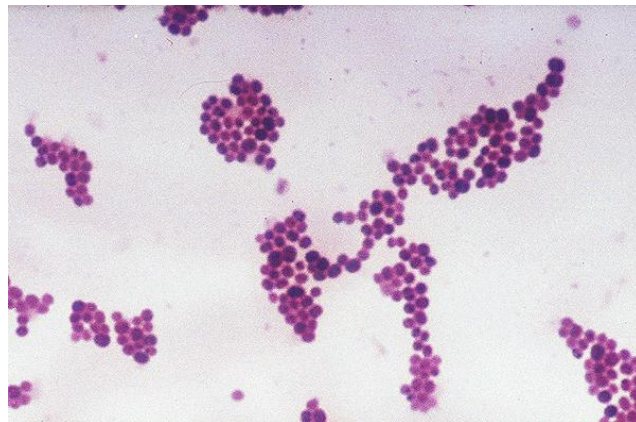


Figura A2. Células de *Staphylococcus aureus* observadas al microscopio óptico luego de aplicarles una coloración de Gram. Tomado de Redway (2012).

Prueba de la coagulasa:

- a) Una vez confirmada la morfología microscópica de la muestra, preparar un cultivo en infusión cerebro-corazón (incluyendo controles positivo y negativo) dejando incubar a 37°C durante 24h.
- b) Colocar una alícuota de 300 µL de cultivo en un tubo eppendorf identificado e incorporar 100 µL de plasma de conejo.
- c) Incubar a 37°C durante 24h, realizando revisiones a las 2, 4 y 6h previas a la culminación de este periodo.
- d) Para la revisión, inclinar los tubos ligeramente para observar la presencia de coagulos y determinar el grado de coagulación de acuerdo a la figura mostrada a continuación.

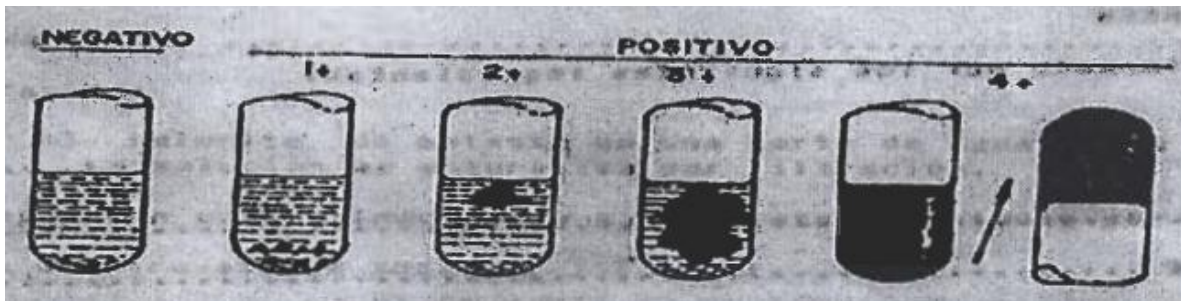


Figura A3. Reacciones a la prueba de coagulasa. Tomado de COVENIN (2004).

- e) Considerar como positivas aquellas muestras que presenten grado de coagulación de 3+ o 4+.
- f) Aplicar pruebas complementarias para confirmar muestras con un grado de coagulación inferior.

2.3. Pruebas complementarias.

Prueba de la catalasa:

- Tomar una lámina portaobjetos limpia y seca e identificarla con el código de la muestra.
- Colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 30% y emulsionar en ella una colonia presuntiva proveniente de agar nutritivo.
- Observar la formación de burbujas en la lámina.



Catalasa +



Catalasa -

Figura A4. Reacciones a la prueba de coagulasa. Tomado y modificado de fuente anónima (2009b).

Fermentación anaeróbica de carbohidratos (Glucosa y Manitol):

- Preparar tubos con medio de fermentación de carbohidratos suplementado con 0.5% del azúcar correspondiente y debidamente identificados.
- Inocular el medio con una colonia de la muestra, incluyendo controles positivo y negativo.
- Cubrir con aproximadamente 1 mL de parafina estéril para crear condiciones de anaerobiosis.
- Incubar a 37°C durante 5 días y observar la coloración producida.

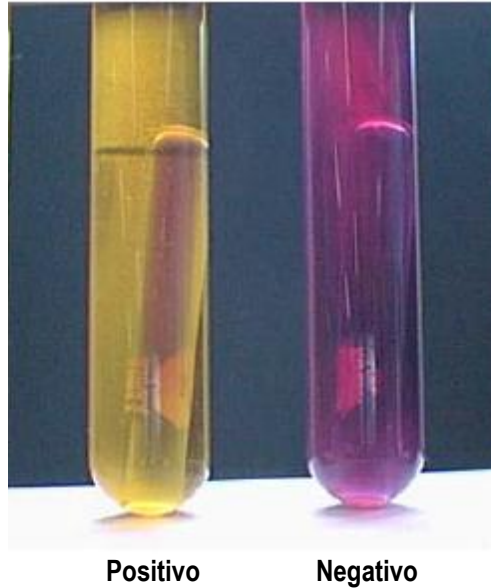


Figura A5. Prueba de fermentación de manitol. Tomado de Cavell y colaboradores (2011).

3. Pruebas comerciales de identificación alternativas la metodología tradicional.

3.1. Staphylect Plus de Oxoid (Oxoid, 2005).

- a) Dejar atemperar los reactivos e identificar en la tarjeta de reacción la cepa a emplear y los espacios correspondientes a cada tipo de látex (prueba y control.)
- b) Colocar una gota de látex control en un espacio y una de látex de prueba en el espacio siguiente e inmediatamente emulsionar en ellas, de forma simultánea, una colonia de la muestra (y los controles respectivos) proveniente de agar nutritivo.
- c) Esperar 10 segundos y observar si existe evidencia de aglutinamiento en alguno de los espacios. Considerar positivas las cepas que muestren signos de aglutinamiento sólo en el espacio correspondiente al látex de prueba.

- d) Si alguna de las muestras exhibe aglutinamiento con el látex control, tomar la reacción como inespecífica y repetir la prueba utilizando una cantidad menor de la cepa. Aplicar pruebas complementarias en los casos donde ocurra aglutinamiento luego de 10 segundos.

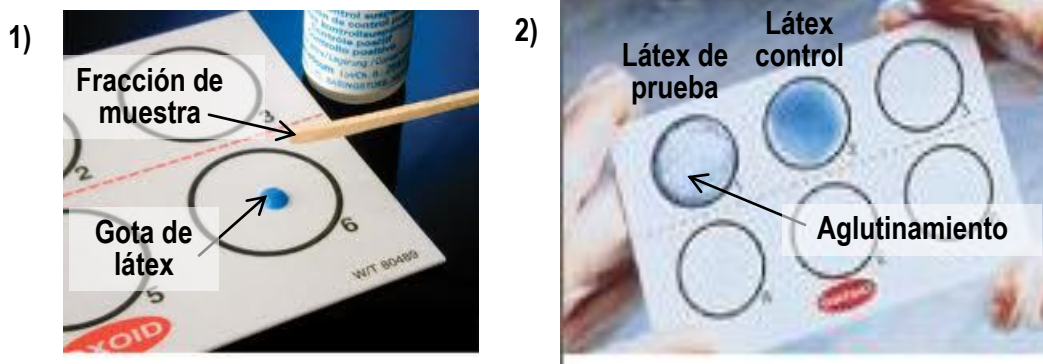


Figura A6. Sistema comercial Staphylect Plus de Oxoid. 1) Montaje de la prueba y 2) Reacción de aglutinamiento. Tomado y modificado de 1) Hardy Diagnostics (2012);
2) Shanghai Qianchen Biotechnology Company (2006).

3.2. API® Staph de bioMérieux® (bioMérieux, 2009).

- Realizar un precultivo de la cepa (s) de interés en agar Columbia con sangre o agar P dejando incubar la placa a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por espacio de 18-24 h.
- Preparar una suspensión bacteriana en el medio de reconstitución API® Staph, utilizando un inóculo suficiente de la cepa precultivada para alcanzar un grado de turbidez equivalente a 0.5 en la escala de Mc Farland.
- Colocar la galería dentro de una cámara hermética de plástico identificada y humedecida con agua destilada para evitar la evaporación del medio durante el periodo de incubación.
- Incorporar la suspensión al interior de cada microtubo para resuspender el reactivo (ver tabla 1A), evitando rellenar la cúpula o formar de burbujas durante el proceso.

- e) Mantener las condiciones de anaerobiosis en los microtubos correspondientes a las pruebas URE y ADH rellenando los mismos con aceite de parafina estéril hasta observar la formación de un menisco recto o convexo en la superficie de la entrada respectiva.
- f) Cerrar la cámara e incubar a 37°C durante 24h.
- g) Observar los cambios de color registrados en cada prueba (tabla 2A) y registrar el perfil obtenido en la hoja de resultados incluida en el paquete comercial.
- h) Si el cambio de color no resulta contundente y el resultado obtenido es dudoso, compararlo con la carta de color disponible en la base de datos (física o digital) del sistema.
- i) Determinar el perfil numérico de siete cifras correspondiente a los valores obtenidos para cada prueba según la hoja de resultados.
- j) Realizar una búsqueda en la base de datos utilizando el perfil numérico obtenido como código para hallar la especie a la que corresponde la identificación realizada y el porcentaje de coincidencia respectivo.

Tabla 1A. Contenido y descripción de las pruebas bioquímicas correspondientes al sistema API®

Staph. Tomado y modificado de bioMérieux (2009).

Prueba	Reactivo	Descripción de la prueba	Interpretación de resultados
0	-	Control negativo	Control negativo
GLU	D-glucosa	Producción de ácido a partir del metabolismo de glucosa. Control positivo	Control positivo
FRU	D-fructosa	Producción de ácido a partir del uso de fructosa como fuente de carbono	Directa
MNE	D-manosa	Producción de ácido a partir del uso de manosa como fuente de carbono	Directa
MAL	D-maltosa	Producción de ácido a partir del uso de maltosa como fuente de carbono	Directa
LAC	D-lactosa	Producción de ácido a partir del uso de lactosa como fuente de carbono	Directa
TRE	D-trehalosa	Producción de ácido a partir del uso de trehalosa como fuente de carbono	Directa
MAN	D-manitol	Producción de ácido a partir del uso de manitol como fuente de carbono	Directa
XLT	Xilitol	Producción de ácido a partir del uso de xilitol como fuente de carbono	Directa
MEL	D-melibiosa	Producción de ácido a partir del uso de melibiosa como fuente de carbono	Directa
NIT	Nitrato de potasio	Reducción del nitrato hasta nitritos	Adición de reactivos NIT1 y NIT2 + 10 min.
PAL	β-nafti fosfato	Liberación de fenolftaleína por acción de la enzima fosfatasa sobre el difosfato de fenolftaleína (PDP)	Adición de reactivos ZYM A y ZYM B + 10 min.
VP	Piruvato de sodio	Producción de acetil-metil-carbinol a partir de la fermentación de glucosa por vía butanodiolica	Adición de reactivos VP1 y VP2 + 10 min.
RAF	D-rafinosa	Producción de ácido a partir del uso de rafinosa como fuente de carbono	Directa
XYL	D-xilosa	Producción de ácido a partir del uso de xilosa como fuente de carbono	Directa
SAC	D-sacarosa	Producción de ácido a partir del uso de sucrosa como fuente de carbono	Directa
MDG	metil-αD-glucopiranosido	Producción de ácido a partir del metabolismo de metil-αD-glucopiranosido	Directa
NAG	N-acetil-glucosamina	Producción de ácido a partir del metabolismo de N-acetil-glucosamina	Directa
ADH	L-arginina	Actividad de la enzima arginina dihidrolasa	Directa
URE	Urea	Formación de amoniaco por efecto hidrolítico de la enzima ureasa sobre la urea	Directa
LSTR ^a	Lisostafina	Capacidad de crecimiento de la cepa en presencia de la enzima (resistencia o susceptibilidad a la misma)	Directa

^a Prueba no incluida en la galería. Se realiza extendiendo una suspensión bacteriana de 10⁷ cél/mL sobre agar P, dejándola secar de 10 a 20 min. a 37°C, colocando una gota de lisostafina (200µg/mL) e incubando a la misma temperatura por 24h.

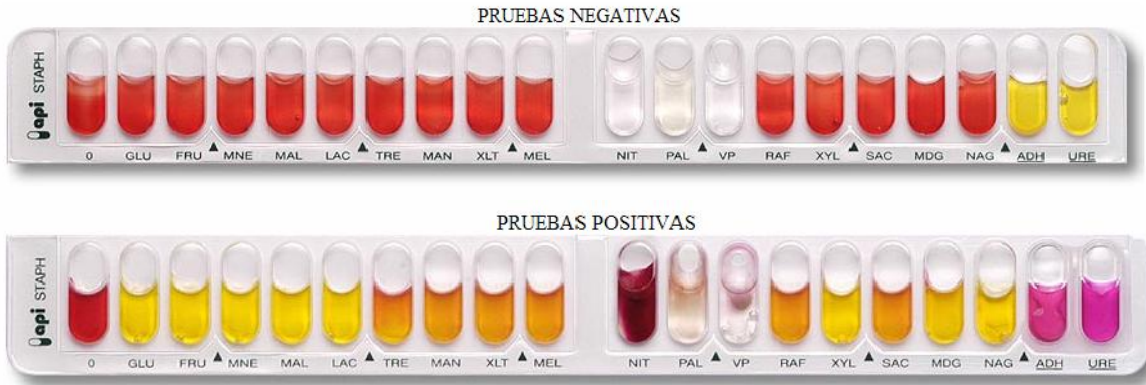


Figura A7. Carta de colores que evidencia resultados positivos y negativos para las 20 pruebas que incluye el sistema. Tomado de fuente anónima (2009c).

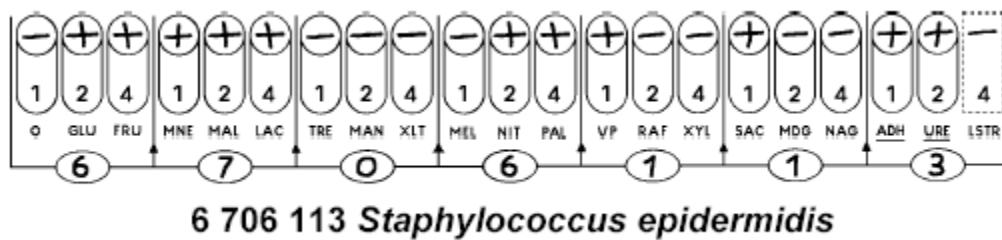


Figura A8. Hoja de resultados y perfil numérico obtenido para una cepa de *S. epidermidis*. Tomado de bioMérieux (2009).

4. Protocolo para la detección de enterotoxinas estafilocócicas utilizando métodos alternativos.

4.1. SET Total Ridascreen® de R-Biopharm® (R-Biopharm, 2011a).

- Realizar el montaje del sistema colocando en la base de plástico incluida en el paquete comercial dos pozos para los controles y un pozo para cada cepa a analizar debidamente identificados.

- b) Añadir a cada pozo 100 μ L de cada extracto filtrado de muestra, y disponer la misma cantidad de control positivo y negativo en los pozos correspondientes.
- c) Cubrir la placa con una tapa para evitar la evaporación de las muestras y llevar a incubación a 37°C por espacio de 60 minutos.
- d) Descartar el líquido de los pozos por inversión y eliminar cualquier remanente golpeando sobre una superficie plana cubierta con papel absorbente. Realizar 5 lavados sucesivos con 300 μ L de solución salina amortiguadora o PBS (previamente ajustada a concentración 1X con agua destilada) por pozo.
- e) Disolver cualquier cristal formado en la solución de lavado antes de proceder a su uso, sumergiéndolo en un baño de calentamiento fijado a 37°C.
- f) Agregar 100 μ L del conjugado 1 a cada pozo y llevar la placa tapada a incubación a 37°C por 60 minutos más. Transcurrido este tiempo, proceder al descarte y lavado del modo mencionado en el paso d.
- g) Incorporar 100 μ L de conjugado 2 a cada pozo e incubar a la misma temperatura sólo 30 minutos.
- h) Eliminar nuevamente el líquido y lavar de acuerdo al paso d.
- i) Adicionar 100 μ L de reactivo sustrato/cromógeno a cada pozo, incubando por última vez durante 15 minutos a la misma temperatura pero en oscuridad.
- j) Finalizado el proceso, se puede realizar la lectura de resultados de manera visual o utilizando un espectrofotómetro.
- k) En el caso visual, se debe observar el color de los controles negativo y positivo, los cuales deben encontrarse rosa a azul pálido y azul muy oscuro respectivamente para poder validar los resultados. Las muestras cuyo color sea más intenso al del control negativo serán consideradas positivas.

- l) Para la determinación espectrofotométrica, añadir 100 μL de solución de parada a cada pozo y colocar la placa en un lector de absorbancia a 450 nm. Los valores de los controles negativo y positivo deben ser <0.1 y mayor a 1.0 respectivamente para considerar el ensayo como válido. Únicamente las muestras cuya absorbancia sea igual o mayor al punto de corte (valor del control negativo + 0.15) serán consideradas positivas.



Figura A8. Sistema SET Total Ridascreen® de R-Biopharm®. Tomado de R- Biopharmnews (2010).

4.2. SET VIA TECRA™ de 3M™ (3M, 2008).

- a) Atemperar los reactivos del sistema.
- b) Seleccionar e identificar dos pozos para los controles y uno por cada muestra a analizar.
- c) Colocar los pozos en la base de plástico incluida en el sistema y humedecer las cavidades rellenando con solución de lavado (previamente preparada a partir del concentrado), dejando reposar 10 minutos.
- d) Descartar por inversión y eliminar el remanente de líquido dentro de los pozos golpeando sobre una superficie plana cubierta con papel absorbente.
- e) Añadir 200 μL de cada muestra (con aditivo) y controles en los pozos correspondientes e incubar la placa tapada a 37°C durante 120 minutos.

- f) Desalojar el líquido de las cavidades y lavar 4 veces de la forma señalada en el punto d.
- g) Incorporar 200 μ L de conjugado reconstituido a cada pozo y dejar incubando la placa tapada a temperatura ambiente.
- h) Repetir el paso f con un lavado adicional.
- i) Adicionar 200 μ L de sustrato reconstituido a cada pozo e incubar en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente.
- j) Comprobar el color de los controles utilizando la carta de colores suministrada por el fabricante. El negativo debe ser menor a #2 para validar el resultado, mientras que el positivo debe corresponderse o superar el #4.
- k) Interpretar los resultados visualmente, tomando como positivas las muestras de color más intenso al control negativo.
- l) Para la interpretación espectrofotométrica, establezca la longitud de onda del lector para placas a 414 ± 10 nm y compruebe el valor de absorbancia de los controles (< 0.2 para el negativo y ≥ 1.0 en el positivo) para validar los resultados. Considerar positiva cualquier muestra de valor ≥ 0.2 .



Figura A9. Sistema SET VIA TECRA™ de 3M™. Tomado de TECRA (2004).

4.3. SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm® (R-Biopharm, 2011b).

- a) Ubicar tiras de ocho pozos, una por cada muestra, en el soporte plástico suministrado por el fabricante e identificarlas
- b) Colocar 100 μL de muestra en cada pozo hasta llegar al G (ver figura A11). Añadir en el H 100 μL de control positivo.
- c) Incubar la placa cubierta a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- d) Descartar el líquido contenido en los pozos por inversión, y realizar 3 lavados sucesivos con 250 μL de solución salina amortiguadora ajustada a concentración 1X a partir del concentrado que incluye el sistema.
- e) Eliminar el remanente de líquido golpeando la placa sobre una superficie plana cubierta con papel absorbente.
- f) Agregar 100 μL de conjugado a cada pozo y repetir los pasos c, d y e.
- g) Incorporar en cada pozo 50 μL de sustrato y el mismo volumen de cromógeno, tapar la placa e incubarla por sólo 30 minutos en oscuridad.
- h) Adicionar 100 μL de solución de parada, agitar un poco para homogeneizar el color y realizar la lectura de densidad óptica de la placa en el espectrofotómetro a 450 nm en un tiempo no mayor a 30 minutos.
- i) Comprobar que el valor de densidad óptica promedio entre los controles negativos (F y G) no supere las 0.3 unidades y que en el control positivo sea igual o mayor a 0.5 unidades. De otro modo, invalidar los resultados obtenidos.
- j) Tomar como positivas las muestras cuya absorbancia supere el promedio entre los controles negativos en al menos 0.15 unidades.



Figura A10. Sistema SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm®. Tomado de R-Biopharm (2011b).

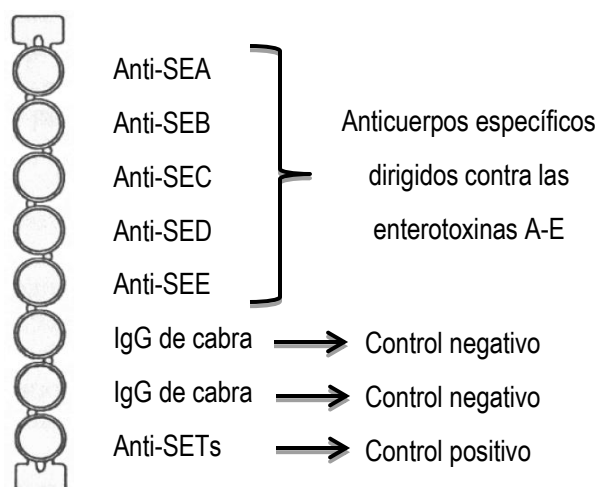


Figura A11. Tiras de microplaca incluidas en el sistema SET A-E Ridascreen® de R-Biopharm®.

Tomado de R-Biopharm (2011b).

4.4. SET RPLA de Oxoid (Oxoid, 2003).

a) Tomar microplacas de poliestireno con sus tapas respectivas e identificar en cada una el código asignado a la cepa. Incluir 5 líneas por muestra y tomar otras cuatro para los controles positivos, colocando en cada línea el serotipo detectado.

b) Añadir en todos los pozos 25 µL de solución diluyente.

- c) Incorporar 25 μ L de muestra en el primer pozo de cada línea (excepto las correspondientes a los controles) y homogeneizar la solución con la pipeta por movimientos sucesivos de carga y descarga.
- d) Tomar nuevamente 25 μ L del primer pozo, agregarlos al segundo y repetir la homogeneización de la forma descrita.
- e) Continuar realizando diluciones entre pozos adyacentes de la forma descrita hasta llegar al séptimo de ellos. Parar en ese momento y descartar el volumen sobrante (25 μ L), dejando al octavo pozo sólo con diluyente.
- f) Proceder de la misma manera con los controles, añadiendo cada serotipo en la línea correspondiente.
- g) Al culminar con los antígenos, incorporar el complejo látex-anticuerpo específico para cada serotipo en la línea correspondiente, adicionando el látex control al final del proceso.
- h) Agitar suavemente la(s) placa(s) para homogeneizar el contenido y dejar incubando a temperatura ambiente durante 24h sobre una superficie lisa, libre de humedad y movimiento.
- i) Comparar los resultados de las muestras con los controles para el serotipo específico y determinar el grado de aglutinamiento en los pozos de acuerdo al modelo suministrado por el fabricante (figura A11).

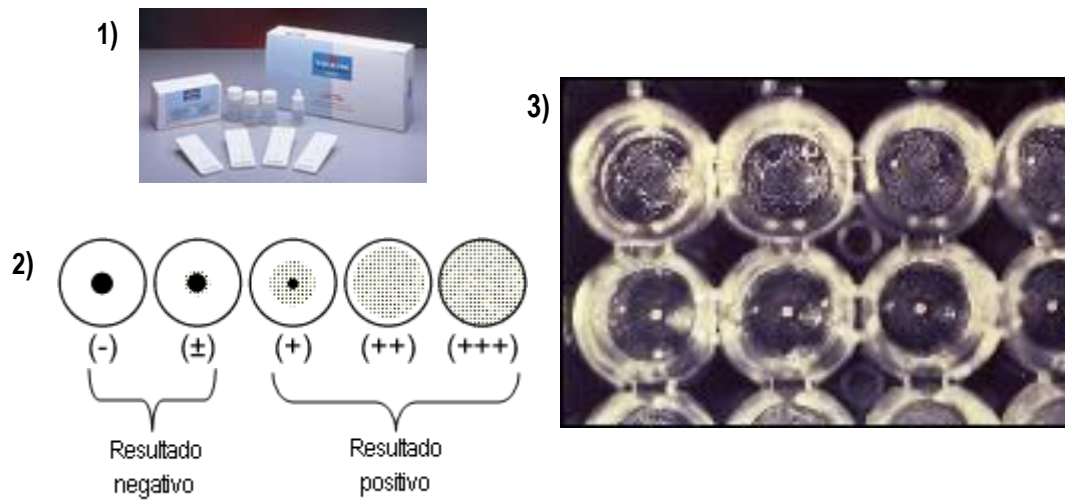


Figura A12. 1) Sistema SET RPLA de Oxoid; 2) Criterio comparativo de referencia ofrecido por el fabricante y 3) Pozos evidenciando aglutinamiento (primera línea) y resultados negativos (segunda línea). Tomado de Thermo Fisher Scientific (2012).