



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POLIFÁSICO PARA LA
DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN MATRIZ LÁCTEA**

Por:

Daniel Flores Ruiz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Daniel Flores Ruiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Alfonso García Galaz
Director de Tesis



Dra. Luz Vázquez Moreno
Integrante del comité de tesis



Dra. Susana María Scheuren Acevedo
Integrante del comité de tesis



M.C. María del Carmen Bermúdez Almada
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Validación de un Método Polifásico para la Detección de *Staphylococcus aureus* en Matriz Láctea” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Daniel Flores Ruiz, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante el tiempo de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por aceptar y brindarme un espacio donde seguir preparándome.

Al Dr. Alfonso García Galaz, por haberme permitido pertenecer a su equipo de trabajo. Por todas y cada una de sus enseñanzas indispensables para el desarrollo y culminación de mi tesis, ¡gracias!

A los miembros de mi Comité de Tesis, las doctoras Luz Vázquez Moreno y Susana María Scheuren Acevedo y a la maestra María del Carmen Bermúdez Almada, por todo su apoyo y aportaciones a este trabajo.

A la Q.B. María Isabel Quintana Esquivel, por su invaluable apoyo técnico brindado.

Al Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Glicanos, en particular a la M.C. Ana María Guzmán Partida por su apoyo brindado.

Al L.N. Jorge Luis Piña Ruiz, por las atenciones y apoyo técnico brindado durante mi estadía en el Laboratorio de Microbiología polifásica y bioactividades.

A mi familia, padres y hermanos por su apoyo incondicional en todo momento de este trabajo.

A mis amigos de siempre, Javier, Kevin, Luis, Daniel, gracias por todo.

Al más grande de mis amigos, compañero y casi hermano, Javier Peñuñuri, que siempre está ahí cuando más necesitas de alguien, gracias por todo.

DEDICATORIA

A mis padres, Daniel y Esthela, por todo su gran apoyo y amor en este largo trayecto. A mis hermanos, porque, aunque tenemos nuestras diferencias, siempre han estado a mi lado en todo momento. Gracias por confiar en todo momento en mí y apoyarme en todas mis decisiones.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Aspectos Generales de <i>S. aureus</i>	14
2.2. Factores de Patogenicidad	14
2.2.1. Enzimas Producidas por <i>S. aureus</i>	16
2.2.2. Componentes de la Superficie Celular de <i>S. aureus</i>	16
2.2.3. Exotoxinas Producidas por <i>S. aureus</i>	17
2.3. Epidemiología de <i>S. aureus</i>	18
2.4. Detección de <i>S. aureus</i> en Alimentos.....	19
2.4.1. Método Tradicional para la Detección de <i>S. aureus</i>	20
2.4.2. Sistema API® Staph	21
2.4.3. Método de PCR para la Detección de <i>S. aureus</i>	22
2.4.4. Sistema IQ-Check (RT-PCR).....	23
2.5. Validación de Métodos Cualitativos Microbiológicos.....	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General	27
4.2. Objetivos Particulares.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1. Reactivación y Mantenimiento de Cepas	28
5.2. Estandarización del Protocolo Polifásico	28
5.2.1. Ajuste de la Concentración de los Inóculos	28
5.2.2. Selección del Medio de Cultivo de Enriquecimiento	29
5.2.3. Extracción de ADN.....	29
5.2.4. Amplificación de los Genes <i>nuc</i> y <i>coa</i> por PCR de Punto Final.....	30
5.2.5. Selección del Medio de Cultivo de Enriquecimiento	31
5.2.6. Determinación de la Sensibilidad del Método Polifásico Utilizando la Matriz Láctea	32

CONTENIDO (continuación)

5.3. Validación del Protocolo Polifásico	32
5.3.1. Verificación del Tamaño del Inoculo	33
5.3.2. Verificación de la Muestra	33
5.3.3. Sensibilidad y Factibilidad	33
5.3.4. Especificidad	34
5.3.5. Repetibilidad	34
5.3.6. Reproducibilidad	34
5.3.7. Selectividad	34
5.3.8. Verificación del Límite de Detección de Menos de 10 UFC	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1. Caracterización Fenotípica de las Cepas de Referencia	36
6.2. Estandarización del Protocolo Polifásico	37
6.2.1. Selección del Medio de Cultivo de Enriquecimiento	37
6.2.2. Determinación del Método de Extracción de Ácidos Nucleicos e Iniciadores a Utilizar en el método polifásico	38
6.2.3. Determinación de la Sensibilidad del Método Polifásico Utilizando la Matriz Láctea	40
6.3. Validación del Protocolo Polifásico	41
6.3.1. Verificación del Tamaño del Inoculo y de la Muestra	41
6.3.2. Factibilidad y Sensibilidad	41
6.3.3. Especificidad	42
6.3.4. Repetibilidad	43
6.3.5. Reproducibilidad	43
6.3.6. Selectividad	43
6.3.7. Verificación del Límite de Detección de Menos de 10 UFC	44
7. CONCLUSIONES	46
8. RECOMENDACIONES	47
9. REFERENCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Factores de patogenicidad presentes en <i>S. aureus</i>	15
2	Perfil de reacción de <i>S. aureus</i> en el sistema API Staph.....	22
3	Pasos que sigue una PCR de punto final.....	23
4	Crecimiento de <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P y 25923) en el medio Baird Parker.....	36
5	Perfil de reacción de las pruebas bioquímicas de termonucleasa y coagulasa.....	37
6	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de productos de amplificación de PCR de punto final para los amplicones de los genes <i>coa</i> y <i>nuc</i> extraídos de cepas de referencia de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P y 25923.....	38
7	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen <i>nuc</i> (270 pb), recuperado en diferentes tiempos y medios de cultivo (BHI y Giolitti Cantoni).....	39
8	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen <i>nuc</i> (270 pb), recuperado en diferentes tiempos y concentraciones de <i>S. aureus</i>	40
9	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen <i>nuc</i> (270 pb), recuperado en diferentes niveles de contaminación de las cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P y 25923 (factibilidad y sensibilidad).....	42
10	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen <i>nuc</i> (270 pb).....	44
11	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen <i>nuc</i> (270 pb), recuperado en diferentes niveles de contaminación de las cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538P y 25923.....	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Condiciones estándar para la reacción de PCR de punto final (cálculos para 25 μ L en cada microtubo).....	31

RESUMEN

Los métodos fenotípicos para la detección de bacterias en matrices alimenticias confieren la certeza de detectar a la bacteria viable utilizando medios de cultivo enriquecidos, pero la obtención de resultados se puede prolongar hasta 9 días. Por otro lado, los métodos moleculares que se basan en la amplificación de genes específicos permiten la detección de la bacteria en un periodo menor, pero se desconoce si la respuesta fue generada por un microorganismo viable. Para ello, el desarrollo de un método polifásico, que combine lo antes indicado, supondría una buena alternativa para la detección rápida de *S. aureus* viable en matrices alimenticias. Se probaron los genes *nuc* y *coa* como posibles marcadores para la detección *S. aureus* (ATCC 25923 y 6538P) por PCR convencional. Para la detección se evaluaron concentraciones desde 3 hasta 3×10^{-6} UFC/mL, utilizando como medios de preenriquecimiento BHI y Giolitti Cantoni en diferentes tiempos de incubación. Una vez determinadas las mejores condiciones, el método se evaluó utilizando la matriz alimenticia con el patógeno (3 a 3×10^{-3} UFC/mL) y con *S. epidermidis* (≥ 100 UFC/mL) como interferente. La recuperación del patógeno bajo estas condiciones fue evaluada a diferentes tiempos de incubación (2, 4, 6 y 8 h). Con el método polifásico estandarizado se realizó la validación considerando los siguientes parámetros: factibilidad y sensibilidad, especificidad, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad y límite de detección. Como resultados de la estandarización, se pudo observar que la detección fue posible en ambos medios (Medio BHI y Giolitti Cantoni) en concentración de hasta 3×10^{-6} UFC/mL, en la matriz láctea y con la presencia del interferente la concentración mínima detectada, considerando 4 horas de incubación en BHI (Medio de cultivo seleccionado), fue de 3 UFC/g. En la validación, el método demostró ser factible para 2 cepas control (ATCC 6538P y ATCC 25923), con una especificidad del 103%, así como una repetibilidad, reproducibilidad y selectividad del 100%. Con estos resultados se comprobó que el método polifásico desarrollado es más sensible y necesita un tiempo menor para su ejecución en comparación con el método fenotípico tradicional publicado en la norma NOM-210-SSA1-2014.

Palabras clave: *nuc*, PCR, *Staphylococcus aureus*, método polifásico, *coa*

ABSTRACT

Phenotypic methods for the detection of bacteria in food matrices allows the certainty of detecting viable bacteria using enriched culture media but obtaining results in up to 9 days. On the other hand, molecular methods based on the amplification of specific genes allow the detection of the bacterium in a shorter period, but it is unknown if the response was generated by a viable microorganism. For this, the development of a polyphasic method would be a good alternative for the rapid detection of viable *S. aureus* in food matrices. The *nuc* and *coa* genes were tested as possible markers for the detection of *S. aureus* (ATCC 25923 and 6538P) by conventional PCR. For detection, concentrations from 3 to 3×10^{-6} CFU/mL were evaluated, using BHI and Giolitti Cantoni as pre-enrichment media at different incubation times. Once the best conditions had been determined, the method was evaluated using the food matrix with the pathogen (3 to 10^{-3} CFU/mL) and *S. epidermidis* (≥ 100 CFU/mL) as the interfering agent. The recovery of the pathogen under these conditions was evaluated at different incubation times (2, 4, 6 and 8 h). With the standardized polyphasic method, the validation was carried out considering the following parameters: feasibility and sensitivity, specificity, repeatability, reproducibility, selectivity and detection limit. As a result of the standardization, it was observed that the detection was possible in both media (BHI y Giolitti Cantoni medium) at a concentration of up to 3×10^{-6} CFU/mL, in the dairy matrix and with the presence of the interfering agent, the minimum concentration detected, considering 4 hours of incubation in BHI (Selected medium), was 3 CFU/g. For validation, the technique proved to be feasible for 2 control strains (ATCC 6538P and ATCC 25923), with a specificity of 103%, as well as a repeatability, reproducibility and selectivity of 100%. With these results, it was found that the developed polyphase method is more sensitive and requires a shorter execution time compared to the traditional phenotypic method published in the norm NOM-210-SSA1-2014.

Key words: *nuc*, PCR, *Staphylococcus aureus*, polyphase method, *coa*

1. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Staphylococcus aureus* es un microorganismo caracterizado por ser anaerobio facultativo, Gram positivo y por ser productor de enzimas como la coagulasa, catalasa y una desoxirribonucleasa termoestable (Zendejas-Manzo *et al.*, 2014). Es un microorganismo patógeno capaz de causar múltiples infecciones con un amplio rango de gravedad, desde infecciones localizadas de piel hasta infecciones invasoras y potencialmente mortales como neumonía necrosante, osteomielitis y sepsis (Guillén *et al.*, 2016). Las cepas de *S. aureus* pueden expresar una amplia gama de factores de patogenicidad en las que se encuentran proteínas que le permiten evadir el sistema inmune del hospedero, pueden formar una capa polisacárida extracelular que le permite sobrevivir a condiciones adversas, son productoras de diferentes enzimas indispensables para su invasividad y son productoras de varias enterotoxinas de las cuales la enterotoxina A ha estado implicada comúnmente en los brotes de intoxicación alimentaria, ya que es extremadamente potente, y con una cantidad tan pequeña como 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación en adultos (Koneman y Allen, 2017). Debido a que *S. aureus* se encuentra colonizando la piel y mucosas en humanos, es considerado un agente etiológico recurrente de las enfermedades de transmisión alimentaria, dado que cuando un manipulador de alimentos realiza malas prácticas de higiene durante el proceso de elaboración de algún alimento, ocasiona la contaminación de dicho alimento con la bacteria (Gil, 2000). En México, la situación de infecciones ocasionadas por *S. aureus* es desconocida, ya que no existe un registro, al día de hoy, referente al número de casos asociados a infecciones y/o intoxicaciones alimentarias provocadas por este microorganismo (Normanno *et al.*, 2015). Siendo uno de los agentes etiológicos de las enfermedades de transmisión alimentaria la importancia que adquiere *S. aureus* en los alimentos es más que notable, por eso mismo una pronta y adecuada detección de esta bacteria en los alimentos es esencial. El método fenotípico tradicional descrito por la NOM-210-SSA1-2014 para la detección de *S. aureus* en matrices alimenticias, se basa en primera instancia en un aislamiento selectivo seguido de pruebas bioquímicas confirmatorias (Secretaría de Salud, 2014). Aunque este método permite el reacondicionamiento de la bacteria utilizando medios de cultivo enriquecidos, la obtención de resultados se puede prolongar hasta nueve días. Por otro lado, los métodos moleculares que se

basan en la amplificación de genes específicos mediante PCR de punto final, permiten la detección de *S. aureus* en un periodo corto (menos de 12 h), pero no se puede conocer si el microorganismo se encuentra vivo o muerto. Para ello, el desarrollo de un método polifásico (fenotípico y molecular) supondría una buena alternativa para la detección rápida de *S. aureus* viable en matrices alimenticias.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos Generales de *S. aureus*

Los microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus* son un amplio grupo de bacterias Gram positivas, se dividen en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Actualmente se han reportado 35 especies conocidas del género *Staphylococcus*, siendo la especie de mayor importancia *Staphylococcus aureus*, denominado así por sus características colonias amarillas en agar sal manitol (*aureus* = oro, dorado) (Zendejas-Manzo *et al.*, 2014). Es un microorganismo capaz de causar una multitud de infecciones con un amplio rango de gravedad, desde infecciones localizadas en la piel e intoxicaciones alimentarias, hasta infecciones invasoras y potencialmente mortales como neumonía necrosante, osteomielitis y sepsis (Guillén *et al.*, 2016). Los miembros de esta especie son anaerobios facultativos, catalasa y coagulasa positivos, productores de una desoxirribonucleasa termoestable (resiste temperaturas de 130 °C por 16.6 min), son resistentes a altas concentraciones de NaCl y crecen relativamente bien en condiciones de desecación, lo que explica en parte que puedan desarrollarse y sobrevivir en superficies ambientales y colonizar la piel y mucosas de mamíferos (Murray *et al.*, 2017).

2.2. Factores de Patogenicidad

Las cepas de *S. aureus* pueden expresar una amplia gama de factores de patogenicidad (Figura 1), incluidas las proteínas de superficie que promueven la adherencia al tejido dañado, pueden unir proteínas en la sangre para ayudar a evadir las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos y promover la captación del hierro (Koneman y Allen, 2017).

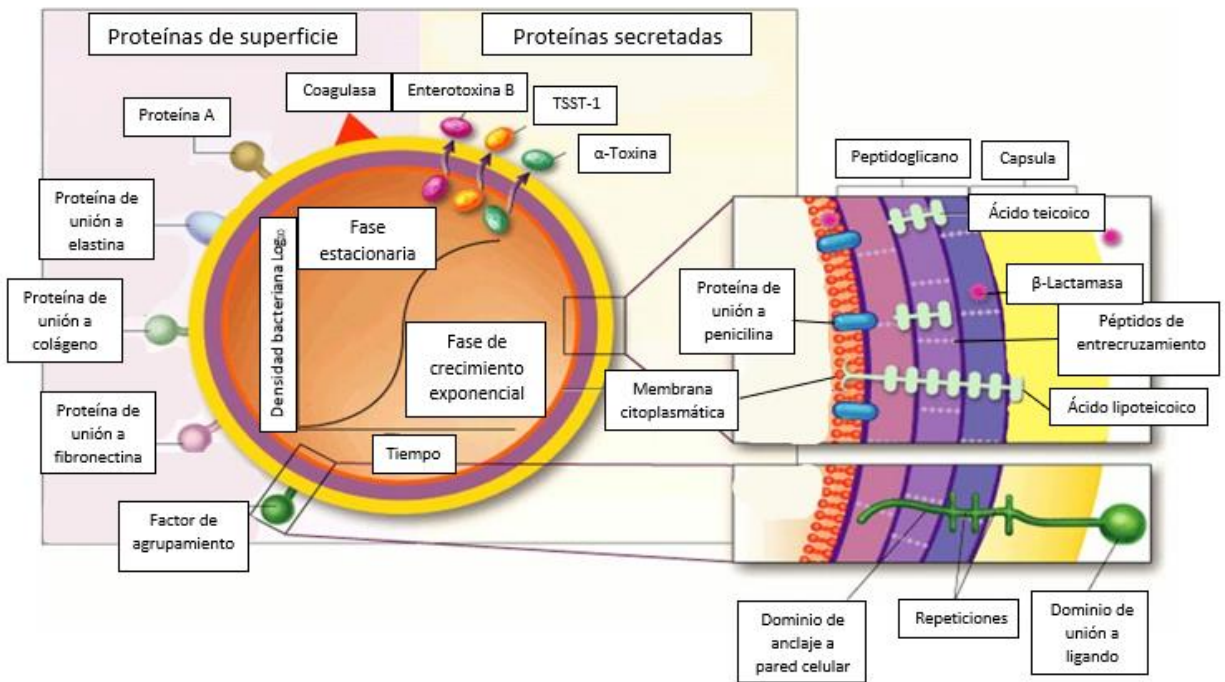


Figura 1. Factores de patogenicidad presentes en *S. aureus* (Lowy, 1998)

El microorganismo también expresa una serie de toxinas que dañan la membrana de los enterocitos y toxinas superantigénicas que pueden causar daño tisular y síntomas de shock séptico, respectivamente. Por otro lado, *S. aureus* tiene múltiples mecanismos para evadir tanto la inmunidad innata mediada por leucocitos polimorfonucleares e inmunidad adaptativa mediada por linfocitos tanto B como T (Abbas y Lichtman, 2019). Algunos factores de virulencia son expresados por genes que se encuentran en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad (p. ej., Toxina 1 del síndrome de choque tóxico y algunas enterotoxinas), bacteriófagos lisogénicos (p. ej., Leucocidina Pantón-Valentine (PVL por sus siglas en inglés)) y factores asociados a la supresión de la inmunidad innata, como la proteína inhibitoria de la quimiotaxis y la estafilocinasa, que se integran en el cromosoma bacteriano (Alibayov et al., 2014). Por otra parte, los factores de patogenicidad de mayor importancia para la invasión de *S. aureus* dentro del hospedero son enzimas, componentes de superficie celular y exotoxinas (Foster, 2004).

2.2.1. Enzimas Producidas por *S. aureus*

La patogenicidad de *S. aureus*, como típica bacteria Gram positiva, depende de un conjunto de proteínas asociadas a la pared celular y extracelular (catalasa, coagulasa, termonucleasa, hemolisinas y enterotoxinas) (Figura 1), por lo tanto, la patogenicidad estafilocócica es multifactorial. La enzima que caracteriza a *S. aureus* y le permite diferenciarse de las demás especies es la coagulasa, la cual es capaz de convertir directamente, sin intervención de factores plasmáticos, el fibrinógeno en fibrina, produciendo la coagulación del plasma, facilitando el desarrollo de sepsis y abscesos. Su importancia en la patogenia radica en la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico localizando la infección y con ello se evita la fagocitosis de la bacteria.

La catalasa es otra enzima que degrada el peróxido de hidrógeno dándole protección al microorganismo contra la fagocitosis, mientras que la hialuronidasa degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo facilitando la diseminación de la infección. Por último, *S. aureus* produce una fosfodiesterasa con propiedades endo y exonucleasas capaces de cortar tanto el ADN como el ARN teniendo la característica de ser una enzima resistente a temperaturas de 130 °C por 16.6 min (Singh *et al.*, 2010). Cabe destacar que varios de estos rasgos son utilizados actualmente por diferentes normas nacionales e internacionales para la detección fenotípica de *S. aureus* en matrices alimenticias.

2.2.2. Componentes de la Superficie Celular de *S. aureus*

Algunas cepas de *S. aureus* producen una capa polisacárida extracelular denominada biofilm o biopelícula. Ésta es una red extracelular que ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies. La producción de la biopelícula se describió por primera vez en *Staphylococcus coagulasa negativa* en el año 2002, y fue implicada en la colonización y persistencia de la bacteria en instrumentos y equipos empleados en la elaboración de matrices alimenticias (Koneman y Allen, 2017).

Otro factor importante en *S. aureus* es la cápsula polisacárida denominada slime o cápsula mucoide, que facilita la adherencia de las bacterias a diversas células, además de tener capacidad antifagocitaria. Se han identificado 11 serotipos capsulares, de los cuales los tipos 1 y 2 producen grandes cantidades de polisacárido, dándole a la bacteria apariencia mucoide en los medios de cultivo. Los polisacáridos capsulares de *S. aureus* incrementan el desarrollo de la biopelícula, aumentando su adhesividad y por ende mayor probabilidad de producir infecciones (Watts *et al.*, 2005).

Existe otro componente que se encuentra en la superficie de la bacteria conocido como proteína A, que puede unir la fracción Fc de las inmunoglobulinas del isotipo G a la capa externa del peptidoglicano mediante enlaces covalentes, por lo que previene la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos inhibiendo la opsonización y la fagocitosis (Singh *et al.*, 2010).

2.2.3. Exotoxinas Producidas por *S. aureus*

Una de las características importantes de *S. aureus* es su capacidad para secretar toxinas que dañan las membranas de las células del hospedero. Las toxinas citolíticas forman poros β -barril en las membranas citoplásmicas, provocando la liberación del contenido y la muerte de la célula. *S. aureus* secreta diversas toxinas formadoras de poros, entre las que se encuentran la α -hemolisina, β -hemolisina, γ -hemolisina, leucocidina y la leucocidina PVL (Cervantes-García *et al.*, 2014).

Otro tipo de exotoxinas producidas por *S. aureus* son un grupo de proteínas inmunoestimuladoras implicadas en el síndrome de choque tóxico y gastroenteritis. Estas proteínas son resistentes a la desnaturalización por calor y al efecto de proteasas. Otra característica de la toxina de choque toxico es su capacidad para reaccionar con moléculas conocidas como complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Koneman y Allen, 2017), la formación del complejo induce intensa proliferación de linfocitos T de una forma independiente de antígeno, lo que resulta en una producción y liberación masiva de citosinas que favorecen el daño epitelial. Se considera que la función primaria de los superantígenos se enfoca en debilitar el sistema inmune del hospedero lo suficiente para que el patógeno pueda propagarse y conducir a la progresión de la enfermedad.

Ejemplos de ellos son las enterotoxinas estafilocócicas y la proteína TSST-1, responsable del síndrome de choque tóxico (Foster, 2004).

Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas en el 30 a 50% de las cepas de *S. aureus*. Hasta el momento se han descrito 15 diferentes enterotoxinas: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, siendo el serotipo A el más frecuente. Cabe resaltar que la enterotoxina A ha estado implicada comúnmente en los brotes de intoxicación alimentaria, ya que es extremadamente potente y con una cantidad tan pequeña como 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación en adultos (Alejo-Riveros *et al.*, 2011).

2.3. Epidemiología de *S. aureus*

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son causadas por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas. Los alimentos son de gran importancia para la adquisición de una ETA, ya que las personas deben tener contacto directo con ellos para poder contaminarlos. Dicho contacto lo llevan a cabo los manipuladores de alimentos que se definen como: “todas aquellas personas que, por su actividad laboral, tienen contacto directo con los alimentos durante su preparación, fabricación, transformación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, venta, suministro y servicio”. Los manipuladores de mayor riesgo son aquellos cuyas prácticas de trabajo o acciones en ciertos procesos de producción pueden ser determinantes en relación con la inocuidad de los alimentos (Zendejas-Manzo *et al.*, 2014). Cada año a nivel mundial las ETA afectan a 550 millones de personas, cerca de 230 000 personas mueren, de éstas 96 000 son niños menores de 5 años. Aproximadamente el 50% de los casos a nivel mundial de las ETA son provocadas por 31 microorganismos, de los cuales *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* no tifoidea y *S. aureus* son los que provocan la mayor incidencia (OMS, 2015).

Staphylococcus aureus es un agente patogénico ubicuo que es considerado como parte de la microbiota del hombre, se encuentra en la piel de individuos sanos, pero en ocasiones cuando las defensas que se encuentran en la piel se debilitan pueden causar enfermedad (Gil, 2000). El principal grupo de riesgo son los pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil

millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo. Los seres humanos son un reservorio natural de *S. aureus*. Entre el 30 y el 50% de los adultos sanos están colonizados, y entre el 10 y el 20% se mantienen colonizados persistentemente. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal del humano y tiene colonización selectiva en fosas nasales (20-40% en adultos), pliegues intertriginosos, perineo, axilas y vagina, no obstante, las personas colonizadas tienen un riesgo mayor de sufrir infecciones (Ryan *et al.*, 2016). Se ha determinado una incidencia de 38.5% de *S. aureus* en productos lácteos (Hummerjohann *et al.*, 2014), siendo los quesos artesanales la matriz láctea más contaminada por *S. aureus*, debido a que se utilizan temperaturas inferiores a la pasteurización, permitiendo la viabilidad de la bacteria y a sus toxinas presintetizadas, según reportes emitidos por las entidades epidemiológicas en Italia (Normanno *et al.*, 2015). En México, la situación de infecciones ocasionadas por *S. aureus* es desconocida, ya que no existe un registro referente al número de casos asociados a infecciones y/o intoxicaciones alimentarias provocadas por este microorganismo.

2.4. Detección de *S. aureus* en Alimentos

El control de los microorganismos causantes de ETA, por parte de las autoridades sanitarias de las plantas procesadoras de alimentos, es multifactorial y depende primeramente de la implementación adecuada de herramientas como las Buenas Prácticas de manejo y manufactura, Planes de higiene y Saneamiento implementados en las procesadoras, entre otros. Adicionalmente dentro de los métodos de control están las evaluaciones microbiológicas de producto en diferentes etapas de proceso, áreas de contacto con el producto, agua de lavado e ingrediente, etc. Donde dependerá en gran medida del método analítico que se utiliza para su detección. La detección y la investigación de los brotes de ETA constituye uno de los principales retos para el Sistema de Salud Pública, pues requiere obtener, de manera oportuna y eficaz, información médica y análisis de laboratorio de los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en su elaboración e incluso, de las manos del personal involucrado en la manipulación del alimento. Siendo uno de los agentes etiológicos de las ETA, la importancia que adquiere *S. aureus* en los alimentos es más que notable, por eso mismo una rápida y adecuada detección de esta bacteria en los alimentos es esencial.

Los métodos tradicionales utilizados en la actualidad para la detección de *S. aureus*, se basan en determinaciones fenotípicas, donde el microorganismo es aislado en un medio de cultivo que contiene sustancias inhibitorias de la microbiota acompañante y por último dichos aislamientos son sometidos a pruebas bioquímicas confirmatorias. Aunque este método permite el reacondicionamiento de la bacteria utilizando medios de cultivo enriquecidos, la obtención de resultados se puede prolongar hasta 9 días (Secretaría de Salud, 2014).

El desarrollo de métodos alternativos para la detección de *S. aureus*, como la amplificación de genes por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), permite acortar el tiempo de obtención de resultados y aumenta la especificidad y sensibilidad con respecto al método de referencia fenotípico, siendo necesario la validación de dichos métodos, para asegurar la obtención de resultados válidos y confiables en la detección del microorganismo.

2.4.1. Método Tradicional para la Detección de *S. aureus*

El método tradicional de detección fenotípica de *S. aureus* en matrices alimenticias se basa en la norma NOM-210-SSA1-2014. Este método nos ofrece resultados cuantitativos y cualitativos de la bacteria empleando 25 g de alimento.

Después de la preparación de la muestra, se realiza su inoculación en un medio selectivo y diferencial (agar Baird Parker), donde el cloruro de litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos inhibiendo el crecimiento de la microbiota acompañante (Becton and Dickinson Company, 2016). Las bacterias en los alimentos se encuentran generalmente en una situación de estrés o lesión, por lo tanto, en esta fase las bacterias logran reacondicionarse en el medio de cultivo, que es necesario para continuar con el proceso de detección. Después del enriquecimiento y aislamiento, se realiza la confirmación de las presuntas colonias de *S. aureus* mediante pruebas bioquímicas que constan en primera instancia en la realización de la prueba de la catalasa, que nos permite separar el género *Staphylococcus* de las demás bacterias Gram positivas. Después se realiza la confirmación mediante la prueba de coagulasa y termonucleasa, criterios indispensables para la detección de *S. aureus*. Para finalizar la detección se realiza como métodos auxiliares la tinción Gram y la fermentación de glucosa y manitol, para diferenciar a *S. aureus* del género *Micrococcus*.

Este procedimiento es el más utilizado en los laboratorios clínicos y de análisis de alimentos, pero una de sus desventajas es el tiempo para la obtención de resultados, que puede ser de hasta 9 días (Secretaría de Salud, 2014).

2.4.2. Sistema API® Staph

El sistema API® Staph es un método estandarizado que permite detectar especies de *Staphylococcus* y de *Micrococcus* mediante reacciones bioquímicas en microtubos. Este sistema incluye 20 microtubos con sustratos fermentables y otros analitos contenidos en un medio de cultivo con un indicador de pH. El microorganismo al utilizar uno de estos sustratos, generando un cambio de color en el medio por la variación en el pH, debido a los productos del metabolismo bacteriano. El perfil de reacciones (Figura 2) es comparado en una base de datos para la identificación de cada microorganismo, donde este sistema está validado en más de 2104 cepas del microorganismo, con una probabilidad de detección del 92.49%. Aunque se pueden obtener resultados con mayor rapidez (aproximadamente 72 h) en comparación al método de detección tradicional, este método es dependiente de un aislamiento previo en un medio de cultivo selectivo (agar sal manitol, agar Staph 110, agar Baird Parker, etc.), incrementando el costo del análisis (Jamali *et al.*, 2014).

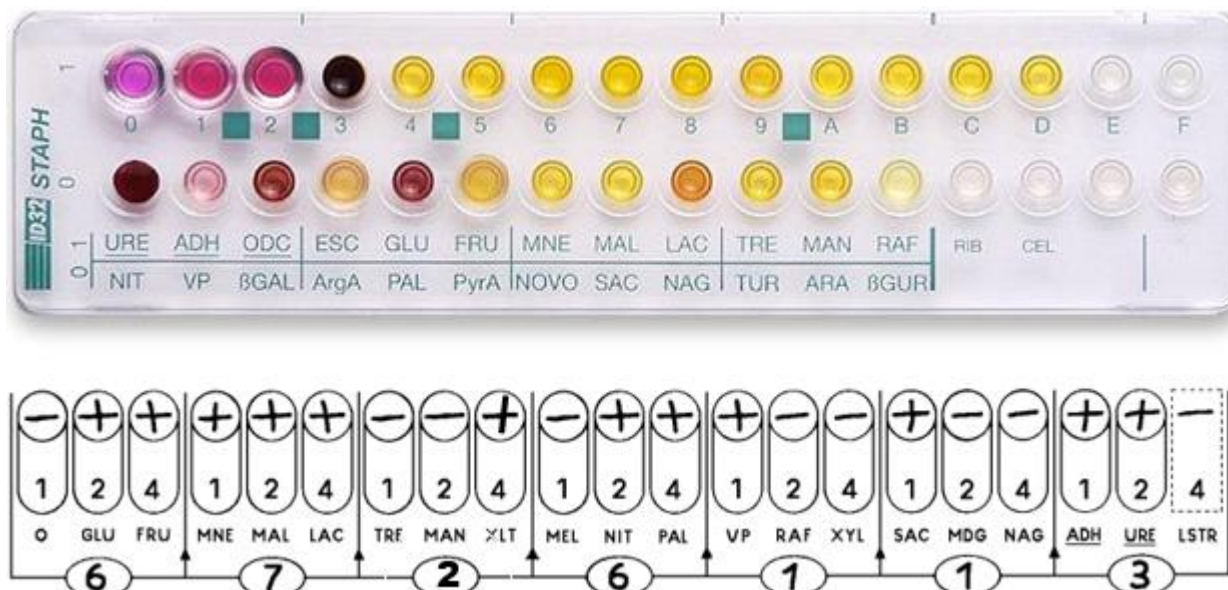


Figura 2. Perfil de reacción de *S. aureus* en el sistema API Staph (Jamali *et al.*, 2014)

2.4.3. Método de PCR para la Detección de *S. aureus*

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, empleando iniciadores sintéticos (oligonucleótidos) que son secuencias cortas de ADN (20-30 pares de bases). Estos iniciadores se unen por complementariedad a ambas cadenas del ADN, por lo que es necesario conocer regiones específicas que flanqueen el gen de interés para el diseño de los iniciadores “forward” y “reverse”. De esta manera se pueden utilizar genes que codifiquen factores de virulencia o proteínas que caractericen a la bacteria de interés. Los genes que se utilizan actualmente para detectar *S. aureus* en matrices alimenticias son los que codifican para las enzimas coagulasa (Goh *et al.*, 1992), term nucleasa (Brakstad *et al.*, 1992) y para la bomba de expulsión multidrogas (Trnčíková *et al.*, 2013). De forma general esta técnica consiste en ciclos repetitivos de:

1. Desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario.
2. Unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos, utilizados como iniciadores, al ADN de interés.

3. Extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los iniciadores utilizando ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones Mg^{2+} .

En cada ciclo se duplica el material genético, hasta llegar a los 30-40 ciclos para obtener una cantidad suficiente del amplicón para realizar la detección del microorganismo de interés. La Figura 3 ilustra las tres fases principales del proceso de amplificación por PCR.

Una desventaja al utilizar PCR para la detección de patógenos en matrices alimenticias, es la de poder amplificar los genes bacterianos a pesar de no encontrarse viable el microorganismo, esto se debe a que algunos alimentos pasan por un proceso de descontaminación previa a su comercialización (como es el caso de la pasteurización), esto genera la lisis de la bacteria liberando su genoma en la matriz alimentaria, pudiendo detectar a la bacteria no viable (Dada *et al.*, 2014).

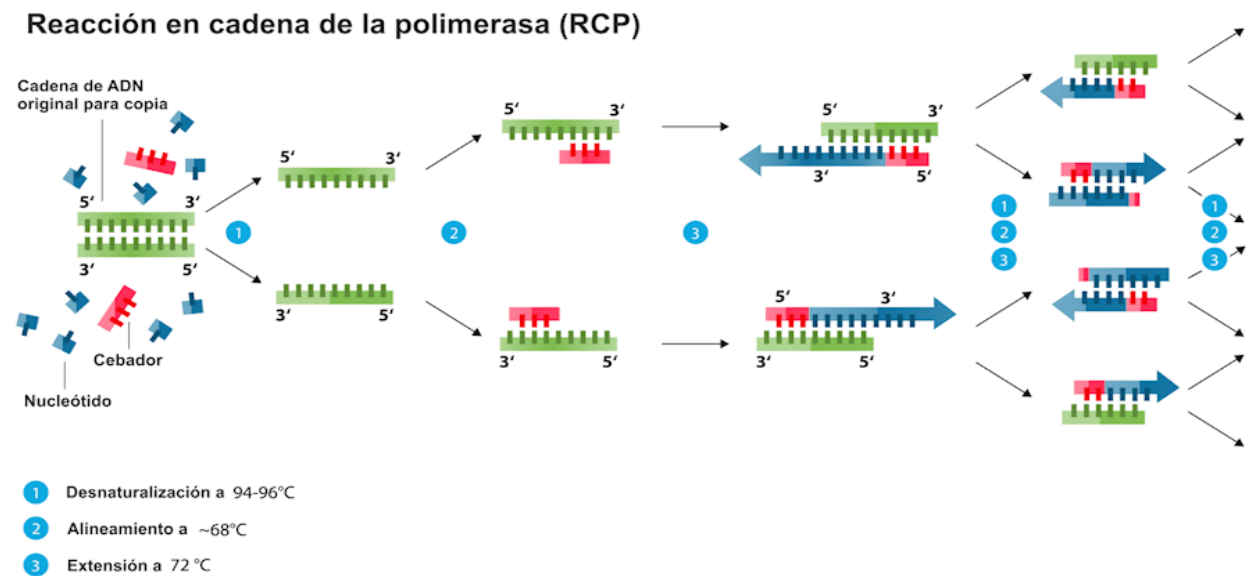


Figura 3. Pasos que sigue una PCR de punto final (Dada *et al.*, 2014)

2.4.4. Sistema IQ-Check (RT-PCR)

Este sistema automatizado de detección está basado en la amplificación genética a través de PCR y la detección en tiempo real, los kits IQ-Check utilizan oligonucleótidos o cebadores del ADN y sondas fluorescentes específicas para el organismo objetivo. La detección de una señal fluorescente

para las secuencias diana amplificadas indican la presencia del agente patógeno en la matriz alimenticia sometida a ensayo. El control interno evalúa la eficiencia de cada reacción de amplificación mediante la determinación de la presencia de factores inhibidores y asegurando la fiabilidad de los resultados negativos. Para eliminar el problema en la obtención de falsos positivos debido a la amplificación de genes de bacterias lisadas durante un proceso de descontaminación de la matriz alimentaria, se realiza un enriquecimiento durante la noche antes de realizar la amplificación de los genes de interés. Los resultados obtenidos son equivalentes o superiores a los que se logran con la metodología de referencia. Se han desarrollado protocolos que ofrecen resultados en aproximadamente 12 h. Por otro lado, aunque se pueden procesar 94 muestras por ensayo, esto resultaría un gran inconveniente, ya que este sistema de detección se restringe a laboratorios de control de calidad en los alimentos que procesan una gran cantidad de muestras al día, además de ser poco accesible para laboratorios con poca infraestructura, por el costo del sistema en su totalidad (Soto-Varela *et al.*, 2018).

2.5. Validación de Métodos Cualitativos Microbiológicos

La validación de un método es el estudio comparativo entre el método alternativo que se quiere proponer y el método de referencia. Para validar un método cualitativo microbiológico es indispensable determinar los siguientes parámetros estadísticos (SAGARPA, 2015):

- Repetibilidad: Grado de concordancia entre resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones (aparatos, operadores, laboratorio e intervalos de tiempos cortos, es decir condiciones de repetibilidad).
- Reproducibilidad: Grado de concordancia entre resultados de análisis individuales en material de análisis idéntico empleando el mismo método y obtenido por operadores en diferentes laboratorios empleando equipos diferentes. Como criterio de aceptación se requiere una confianza mínima del 95%.
- Límite de detección: demostración de la concentración más baja en la que el método es capaz de recuperar al microorganismo de las muestras inoculadas con un nivel bajo de inóculo.

- Especificidad: capacidad del método para distinguir el analito blanco u organismo diana, de otros organismos similares, pero genéticamente distintos o no blancos.
- Factibilidad: capacidad del método para detectar diferentes cepas de un microorganismo de interés.
- Selectividad: es la capacidad del método de análisis para determinar el microorganismo de interés en presencia del interferente.
- Sensibilidad: Capacidad del método para detectar el analito cuando se encuentra presente, en una amplia gama de microorganismos no diana.

El método alternativo debe demostrar que ofrece resultados comparables, sino mejores, que los obtenidos con el método de referencia. El método alternativo se podrá usar si ofrece resultados equivalentes al de referencia. Al validar un método que abarque las ventajas de los métodos fenotípicos y moleculares para la detección de *S. aureus* en matrices alimenticias, se podría tener mayor eficiencia en la obtención de resultados, además de poder disminuir resultados falsos positivos. Las matrices alimenticias de interés sanitario descritas en la guía de validación CCAYAC-CR-18/0 en las que se realiza la validación de métodos microbiológicos alternativos se clasifican en: cárnicos, aves, productos de la pesca, frutas, vegetales y productos lácteos. Por último, las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos alternativos han cobrado gran importancia, debido al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más complejos, y al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados (Camaró-Sala *et al.*, 2013).

3. HIPÓTESIS

El uso de un método polifásico para la detección de *Staphylococcus aureus* en una matriz de queso fresco permite la detección de la bacteria viable en un tiempo menor y con mayor sensibilidad en comparación a lo reportado por el método oficial en México.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Validar el método polifásico desarrollado para la detección de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos.

4.2. Objetivos Particulares

Determinar las condiciones experimentales requeridas para la detección mediante PCR de punto final de *S. aureus* (ATCC 25923 y 6538P) en muestras de quesos frescos contaminados artificialmente.

Validar el método polifásico para la detección de *S. aureus* en quesos frescos, determinando los parámetros: factibilidad y sensibilidad, especificidad, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad y límite de detección para métodos cualitativos microbiológicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivación y Mantenimiento de Cepas

Las cepas de referencia de *S. aureus* (ATCC 25923 y ATCC 6538P) y de *S. epidermidis* (ATCC 12228) almacenadas en congelación en caldo triptona soya (TSB) (BD, BA-257107.03) con glicerol al 80%, se sembraron en medio TSB fresco para posteriormente ser incubadas durante 24 horas a 37° C. Una vez que el cultivo se desarrolló, las cepas se inocularon en Agar Baird Parker para asegurar la viabilidad de la cepa. A continuación, se realizaron las pruebas bioquímicas coagulasa y termonucleasa para confirmar su identidad y posterior a ello se realizó una resiembra en TSA (BD, BA-256665.02) para asegurar la pureza de la cepa. A partir de estos últimos cultivos se realizaron los ensayos respectivos. De forma mensual las cepas se resembraron y cada 6 meses se volvieron a realizar las pruebas en agares selectivos y pruebas bioquímicas para asegurar el mantenimiento de la identidad de las mismas.

5.2. Estandarización del Protocolo Polifásico

El método polifásico está compuesto por 3 fases que consta en primera instancia en un enriquecimiento de la matriz alimenticia, seguido por una extracción del ADN bacteriano y, por último, la amplificación del gen específico por PCR.

5.2.1. Ajuste de la concentración de los inóculos

Las cepas de referencia de *S. aureus* (ATCC 25923 y ATCC 6538P) y de *S. epidermidis* (ATCC 12228) se inocularon por separado por estría cruzada en placas con agar de cuenta estándar

(NEOGEN, NCM0010A) y se incubó a 37 °C por 24 h. Del crecimiento obtenido, se inoculó una colonia aislada en 10 mL de medio BHI (BD, PA-255003.08) y se incubó a 37 °C por 24 h. Una vez que el cultivo se desarrolló, se inoculó 1 mL del cultivo en 90 mL de medio BHI y se incubó a 37 °C por 24 h. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en buffer de fosfato salino (pH 7.2) (diluciones 1:10) hasta llegar a una dilución 10^{-6} para las cepas de *S. aureus* y a una dilución 10^{-4} para la cepa de *S. epidermidis*, para obtener una concentración <10 UFC/mL y >100 UFC/mL respectivamente. Las concentraciones de los inóculos se verificaron utilizando el método de vaciado en placa, inoculando 1 mL de cada dilución final en placas con agar de cuenta estándar (Secretaría de Salud, 2019).

5.2.2. Selección del Medio de Cultivo de Enriquecimiento

Se ajustó la concentración del inóculo bacteriano a <10 UFC/mL y se determinó la recuperación del microorganismo en dos medios diferentes (caldo BHI y caldo Giolitti Cantoni (NEOGEN, NCM0184)) en diferentes tiempos de recuperación (1, 2, 3 y 4 horas). A partir del crecimiento obtenido bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se probó la recuperación del microorganismo mediante un método molecular (la combinación del método de extracción de ácidos nucleicos e iniciador seleccionado), así como un método fenotípico (la técnica de vaciado en placa), para determinar el medio y tiempo de incubación requerido para llevar a cabo la detección de *S. aureus* (ATCC 6538P y 25923).

5.2.3. Extracción de ADN

Para determinar la opción más rápida y económica para llevar a cabo la extracción de los ácidos nucleicos, se probaron dos métodos de extracción, el primero de ellos consta en una lisis rápida de las cepas control por choque térmico y el segundo se basa en una columna cromatográfica que retiene selectivamente el ADN bicatenario de la bacteria de interés.

Para la extracción de ADN por lisis rápida se realizó una suspensión de 3 colonias de las cepas fenotípicamente caracterizadas y subcultivadas en TSA por 24 h en 250 µL de agua destilada estéril. Las suspensiones bacterianas se introdujeron en un baño en agua hirviendo por 10 min, posteriormente para su enfriamiento se introdujeron en un baño de hielo por 10 min, finalmente se centrifugaron a 10,000 x g durante 5 min. El ADN obtenido, que se encontraba en el sobrenadante, previamente descrito, se utilizó como molde para la reacción de amplificación (Javid *et al.*, 2018).

El otro método de extracción utilizado para el aislamiento de ADN implicó la utilización del kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich). Con este método se realizó una lisis de la pared celular utilizando lisozima y proteinasa K, seguido de una elución de los componentes contaminantes, esto se llevó a cabo en una microcolumna de sílica debido a que el ADN bicatenario interacciona específicamente con el contenido en la columna, para finalizar con la purificación del ADN se realizó una elución con buffer tris-HCl 10 mM para colectar en un microtubo nuevo.

5.2.4. Amplificación de los Genes *nuc* y *coa* por PCR de Punto Final

Una vez extraídos los ácidos nucleicos se probaron dos iniciadores que son característicos de genes de patogenicidad de *S. aureus*. Estos genes son *nuc* y *coa*, el gen *nuc* codifica para el gen de la termonucleasa, mientras que el gen *coa* codifica para la coagulasa, estos genes son importantes debido a que solo se han encontrado específicamente en todas las cepas de *S. aureus*. La intención de probar ambos tipos de iniciadores era determinar cuál representaba menores dificultades técnicas para poder utilizar uno de ellos en el método polifásico.

La detección por PCR del gen *nuc* y *coa* se realizó siguiendo la metodología de Javid y colaboradores (2018), con algunas modificaciones. Se utilizaron los primers *nuc*-F:5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' y *nuc*-R:5'-AGCCAAGCCTTGACGAAGTAA GC-3' para la amplificación del gen *nuc*. El programa utilizado constó en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 65°C por 30 s y 72°C por 1 min, para finalizar con una extensión a 72°C durante 7 min.

Para la amplificación del gen *coa* se utilizaron los primers *coa*-F: 5'-

ATAGAGATGCTGGTACAGG-3' y *coa*-R: 5'-GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3'. El programa utilizado constó de una desnaturalización inicial a 94°C por 45 s, seguido por 30 ciclos de 94°C por 20 s, 57°C por 15 s y 70°C por 15 s, para finalizar con una extensión a 72°C durante 2 min.

La mezcla de reacción para la amplificación del gen *nuc* y *coa* se describe en el Cuadro 1.

Los amplicones se analizaron en geles de agarosa al 1.25% a 75 V por 60 min, utilizando un marcador de pares de bases de 50-2000 pb (Sigma-Aldrich) para determinar el tamaño de los amplicones y se tiñeron con SYBR safe (Invitrogen) para su visualización en un fotodocumentador GelDoc™ XR+ (Bio-Rad).

Cuadro 1. Condiciones estándar para la reacción de PCR de punto final (cálculos para 25 µL en cada microtubo)

Reactivos	Programa PCR (gen <i>nuc</i>)	Programa PCR (gen <i>coa</i>)
	Concentración final en la reacción	
dNTPs	200 µM	200 µM
MgCl ₂	2.5 mM	2.5 mM
Oligo forward	0.01 µM	0.005 µM
Oligo reverse	0.01 µM	0.005 µM
Taq polimerasa	1.25 U	1.25 U
Buffer 5X	1X	0.5X
Agua bidestilada	14 µL	19 µL
ADN	2 µL	2 µL

5.2.5. Selección del Medio de Cultivo de Enriquecimiento

Se ajustó la concentración del inóculo bacteriano a <10 UFC/mL y se determinó la recuperación del microorganismo en dos medios diferentes (caldo BHI (BD, PA-255003.08) y caldo Giolitti Cantoni (NEOGEN, NCM0184)) en diferentes tiempos de recuperación (1, 2, 3 y 4 horas). A partir del crecimiento obtenido bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se probó la recuperación del microorganismo mediante un método molecular (la combinación del método de extracción de ácidos nucleicos e iniciador seleccionado), así como un método fenotípico (la técnica de vaciado en placa), para determinar el medio y tiempo de incubación requerido para llevar a cabo la detección de *S. aureus* (ATCC 6538P y 25923)

5.2.6. Determinación de la Sensibilidad del Método Polifásico Utilizando la Matriz Láctea

Como última fase de la estandarización del método polifásico, se determinó la posibilidad de recuperar a *S. aureus* en presencia de un microorganismo interferente (y en una concentración mayor que el microorganismo de interés) en la matriz láctea (queso fresco pasteurizado Lala®). Previamente se ajustaron inóculos de una mezcla de *S. aureus* (ATCC 6538P y 25923) a diferentes concentraciones, de 3 a 3×10^{-3} UFC/mL y una concentración del microorganismo interferente (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) mayor o igual a 100 UFC/mL. Simultáneamente se inocularon artificialmente 10 mL del microorganismo de interés e interferente en 10 g de quesos frescos pasteurizados para realizar el preenriquecimiento en el medio seleccionado a diferentes tiempos de recuperación (2, 4, 6 y 8 h), para posteriormente realizar la extracción de los ácidos nucleicos con el método seleccionado y la amplificación del gen específico con los iniciadores determinados, para determinar la sensibilidad del método polifásico antes de comenzar con la validación. El tiempo de recuperación y la sensibilidad obtenida en esta sección se consideraron para determinar los parámetros estadísticos durante el proceso de validación del método polifásico para la detección de *S. aureus* en quesos frescos pasteurizados.

5.3. Validación del Protocolo Polifásico

Para desarrollar un método no normalizado se debe presentar evidencia objetiva de la validación del método, para ello un método de PCR estandarizado que sirva para la detección de *S. aureus* en matriz láctea tiene que cumplir con los siguientes parámetros de validación descritos por la guía de validación CCAYAC-CR-18/0 (Secretaría de Salud, 2019):

- Verificación del tamaño del inóculo
- Verificación de la muestra
- Sensibilidad y factibilidad
- Especificidad
- Repetibilidad

- Reproducibilidad
- Selectividad
- Verificación del límite de detección de menos de 10 UFC

5.3.1. Verificación del Tamaño del Inóculo

En primera instancia se realizó la verificación del tamaño del inóculo por el método de vaciado en placa, para determinar el uso de una concentración menor a 10 UFC/mL de la mezcla de cepas puras de *S. aureus* (microorganismo de interés) y para el caso de *S. epidermidis* (microorganismo interferente) una concentración mayor de 100 UFC/mL. Esta verificación se realizó seis veces antes de fortificar la matriz láctea.

5.3.2. Verificación de la Muestra

Es indispensable verificar que la matriz láctea no contenga el microorganismo de interés, por esta razón se incubó la matriz (sin fortificar) en agar Baird Parker, seguido de las pruebas bioquímicas confirmatorias coagulasa y termonucleasa (en el caso de presentarse colonias típicas de *S. aureus* en el agar Baird Parker), este proceso se realizó por triplicado antes de comenzar con la validación. Todas las muestras fueron almacenadas a -40 °C hasta su utilización durante la validación.

5.3.3. Factibilidad y Sensibilidad

Para confirmar la capacidad del método polifásico para detectar las dos cepas de *S. aureus* (ATCC 6538P y 25923) se realizó la detección de cada una de ellas fortificando quesos frescos utilizando diferentes niveles de contaminación (3 a 3×10^{-3} UFC/g de alimento), este proceso se realizó por triplicado.

5.3.4. Especificidad

Un método alternativo basado en PCR debe presentar una especificidad alta del microorganismo de interés frente a un microorganismo interferente. Para determinar la especificidad del método se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Promedio de UFC del microorganismo interferente}}{\text{Promedio de UFC del microorganismo de interés}}$$

5.3.5. Repetibilidad

La repetibilidad se determinó considerando el número de veces que se obtuvo una detección positiva del total de las 6 muestras analizadas el mismo día, considerando que el experimento se realizó en 4 días, en cada día se obtuvo un resultado para repetibilidad.

5.3.6. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método polifásico se determinó promediando los resultados de repetibilidad en los 4 diferentes días, obteniendo como mínimo una confianza del 95% (23 resultados positivos de las 24 repeticiones totales).

5.3.7. Selectividad

La selectividad del método polifásico se determinó fortificando quesos frescos pasteurizados con

una mezcla de *S. aureus* (ATCC 6538P y 25923) a una concentración menor o igual a 10 UFC/mL y una concentración del microorganismo interferente (*S. epidermidis* ATCC 12228) mayor o igual a 100 UFC/mL. Se realizaron 20 repeticiones dividido en 4 diferentes días, obteniendo como mínimo 80% de resultados positivos.

5.3.8. Verificación del Límite de Detección de Menos de 10 UFC

La verificación del límite de detección se determinó utilizando diferentes niveles de contaminación (3 a 3×10^{-3} UFC/g de alimento) de la mezcla de las cepas de *S. aureus* fortificando quesos frescos pasteurizados. Se realizaron 20 repeticiones dividido en 4 diferentes días, obteniendo como mínimo 80% de resultados positivos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización Fenotípica de las Cepas de Referencia

Las cepas de referencia de *S. aureus* (ATCC 25923 y ATCC 6538P) presentaron por separado crecimiento característico en medio Baird Parker, observándose colonias color negro por la reducción del telurito a telurio, rodeadas de un halo transparente mostrando la actividad de lecitinasa (Figura 4). Se pudo confirmar la identidad de *S. aureus* al presentar actividad de coagulasa y termonucleasa (Figura 5), que representan las pruebas bioquímicas confirmatorias descrito por la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014 para la detección de *S. aureus*.



Figura 4. Colonias de color negro típicas de *S. aureus* por la reducción de telurito a telurio, rodeadas de un halo transparente mostrando la actividad de lecitinasa en medio de cultivo Baird Parker.

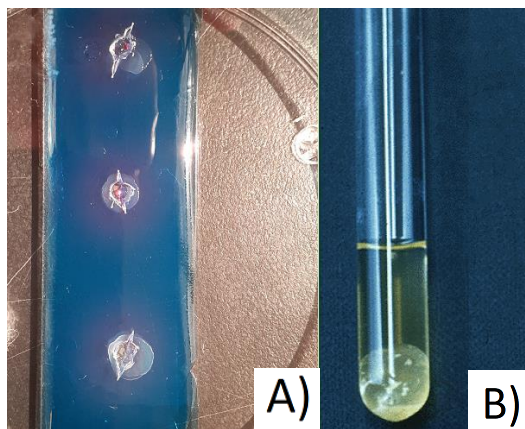


Figura 5. Pruebas bioquímicas confirmatorias. A) Halo rosa en agar DNAsa característico de la hidrólisis del ADN por la nucleasa termoestable de *S. aureus*. B) Formación de coágulo generado a partir de plasma de conejo y un inóculo de *S. aureus*, esta bacteria convierte directamente el fibrinógeno en fibrina utilizando una enzima llamada coagulasa.

6.2. Estandarización del Protocolo Polifásico

6.2.1. Selección del Medio de Cultivo de Enriquecimiento

Para la recuperación de *S. aureus* en los medios BHI y Giolitti Cantoni, se realizó una serie de diluciones de la concentración estandarizada (3 UFC/mL), donde solo se pudo obtener conteo en placa a una concentración de 3 UFC/mL, pero pudiendo amplificar el gen *nuc* desde una concentración de 3 hasta 3×10^{-6} UFC/mL en todos los tiempos de recuperación (1, 2, 3 y 4 h) en ambos medios de cultivo (Figura 7). No hubo diferencias al utilizar un medio de enriquecimiento general (BHI) o un medio selectivo (Caldo Giolitti Cantoni). Debido al riesgo a la salud que representa el agente selectivo telurito de potasio contenido en el caldo Giolitti Cantoni, se optó por utilizar para nuestro protocolo el medio BHI.

El protocolo polifásico desarrollado consta, en primera instancia, en un preenriquecimiento en el medio BHI, seguido de una extracción de ácidos nucleicos por lisis rápida, para finalizar con la amplificación específica del gen *nuc* para la detección de las cepas de *S. aureus*.

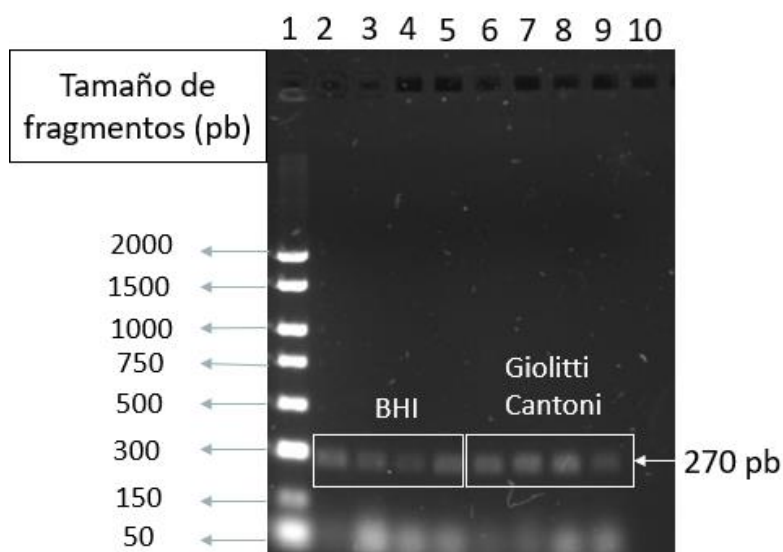


Figura 6. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen *nuc* (270 pb), recuperado en diferentes tiempos y medios de cultivo (BHI y Giolitti Cantoni). Carril 1) marcador de pares de bases 50-2000 pb. Carril 2 a 5) amplicones del gen *nuc* en los tiempos de recuperación de 0, 1, 2 y 4 h respectivamente, en el medio BHI. Carril 6 a 9) amplicones del gen *nuc* en los tiempos de recuperación de 0, 1, 2 y 4 h respectivamente, en el medio Giolitti Cantoni.

6.2.2. Determinación del Método de Extracción de Ácidos Nucleicos e Iniciadores a Utilizar en el Método Polifásico

A las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 25923 y ATCC 6538P se les extrajo el material genético, utilizando el método de extracción de ADN cromosomal del kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich) y el método de lisis rápida, los genes *coa* y *nuc* fueron amplificados por PCR de punto final, obteniéndose en ambos casos amplicones de un tamaño de 270 pb para el gen *nuc* y de 680 pb para el gen *coa* (Figura 6), el tamaño de ambos amplicones coincidió con lo reportado por otros autores (Javid *et al.*, 2018).

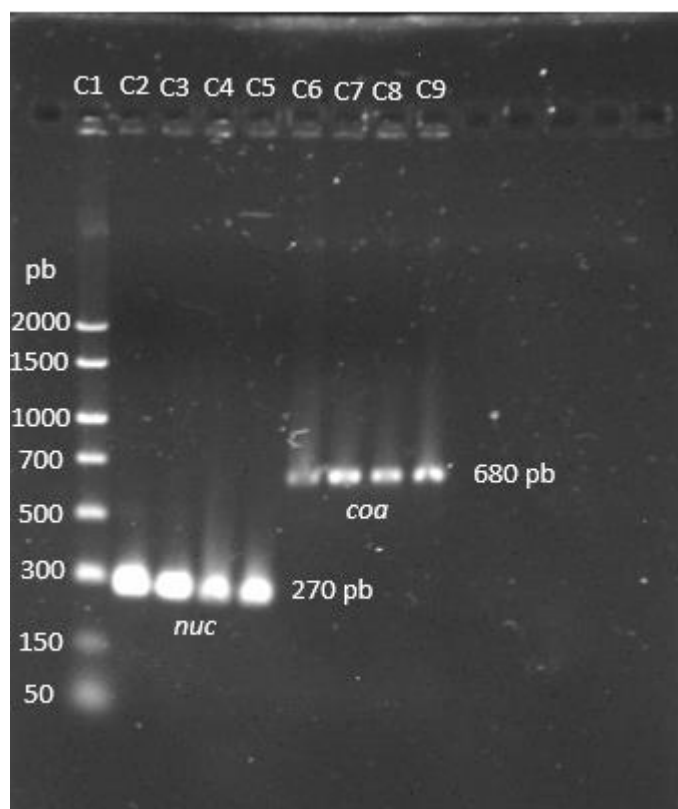


Figura 7. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de productos de amplificación de PCR de punto final para los amplicones de los genes *coa* y *nuc* extraídos de cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 6538P y 25923. C1) marcador de pares de bases 50-2000 pb. C2 y C6) Amplicón de cepa ATCC 6538P extraída con el kit comercial. C3 y C7) Amplicón de cepa ATCC 25923 extraída con el kit comercial. C4 y C8) Amplicón de cepa ATCC 6538P extraída por lisis rápida. C5 y C9) Amplicón de cepa ATCC 25923 extraída por lisis rápida.

Se han descrito regiones hipervariables en el gen *coa* en diferentes cepas de *S. aureus*, donde se pueden obtener diferentes tamaños para el amplicón, desde 729, 810, 891, hasta 972 pb utilizando los mismos primers (Omar *et al.*, 2014). Es por esta razón que se seleccionó el gen *nuc* para nuestro protocolo. Por otro lado, el tiempo de extracción de ADN por parte del kit comercial fue de 1 h y 20 min y para la extracción de ADN por lisis rápida fue de 30 min, obteniéndose amplicones del mismo tamaño y ambos con la misma calidad electroforética, motivo por el cual se seleccionó como parte del protocolo el método de extracción por lisis rápida, por requerir menos tiempo para realizar la extracción de los ácidos nucleicos y ser más económico, ya que para esta técnica solo se requiere agua, un baño maría y un baño de hielo.

6.2.3. Determinación de la Sensibilidad del Método Polifásico Utilizando la Matriz Láctea

Al determinar la concentración mínima en la que se puede detectar a *S. aureus* fortificando la matriz láctea con un microorganismo interferente (*S. epidermidis*), solo se pudo recuperar al microorganismo de interés cuando la matriz de queso fresco se inoculó a una concentración de 3 UFC/g y se incubó durante 4 horas en BHI, obteniendo amplicones de un tamaño de 270 pb (Figura 8). Por esta razón para la validación de nuestro método polifásico se utilizó una concentración de la bacteria de interés de 3 UFC/g de alimento, realizando un preenriquecimiento en BHI de 4 horas a 37 °C.

La disminución de la sensibilidad del método polifásico comparándolo con la recuperación sin utilizar una matriz láctea, es indicativo de una inhibición durante la amplificación del gen *nuc* por parte de la matriz, debido a que ya se han reportado inhibidores de la PCR en matrices alimenticias con alto contenido de grasas, proteínas y polifenoles (Luque *et al.*, 2014), sin embargo, bajo las condiciones probadas, la detección fue exitosa.

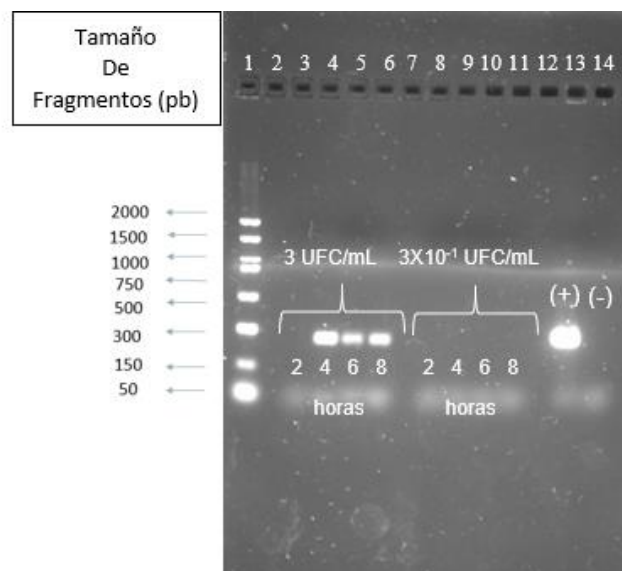


Figura 8. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen nuc (270 pb), recuperado en diferentes tiempos y concentraciones de *S. aureus*. Carril 1) marcador de pares de bases 50-2000 pb. Carril 4 a 6) amplicones del gen nuc en los tiempos de recuperación de 4, 6 y 8 h respectivamente y a una concentración inicial del inóculo de 3UFC/g de alimento. Carril 13) control positivo. Carril 14) control negativo.

6.3. Validación del Protocolo Polifásico

6.3.1. Verificación del Tamaño del Inoculo y de la Muestra

La concentración promedio obtenida durante la verificación del microorganismo de interés (mezcla de cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y 25923) fue de 3 UFC/mL, por otro lado, el promedio obtenido para el microorganismo interferente (*S. epidermidis* ATCC 12228) fue de 310 UFC/mL. Estas concentraciones de ambos inóculos fueron utilizadas durante todo el proceso de validación.

Las muestras de quesos frescos pasteurizados utilizados durante la validación no presentaron crecimiento alguno de colonias típicas de *S. aureus* en el medio de cultivo Baird Parker.

6.3.2. Factibilidad y Sensibilidad

El método polifásico pudo amplificar el gen *nuc* de las cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y 25923 (por separado) en quesos frescos contaminados artificialmente a una concentración inicial de 3 UFC/g y a un tiempo de recuperación de 4 h (Figura 9).

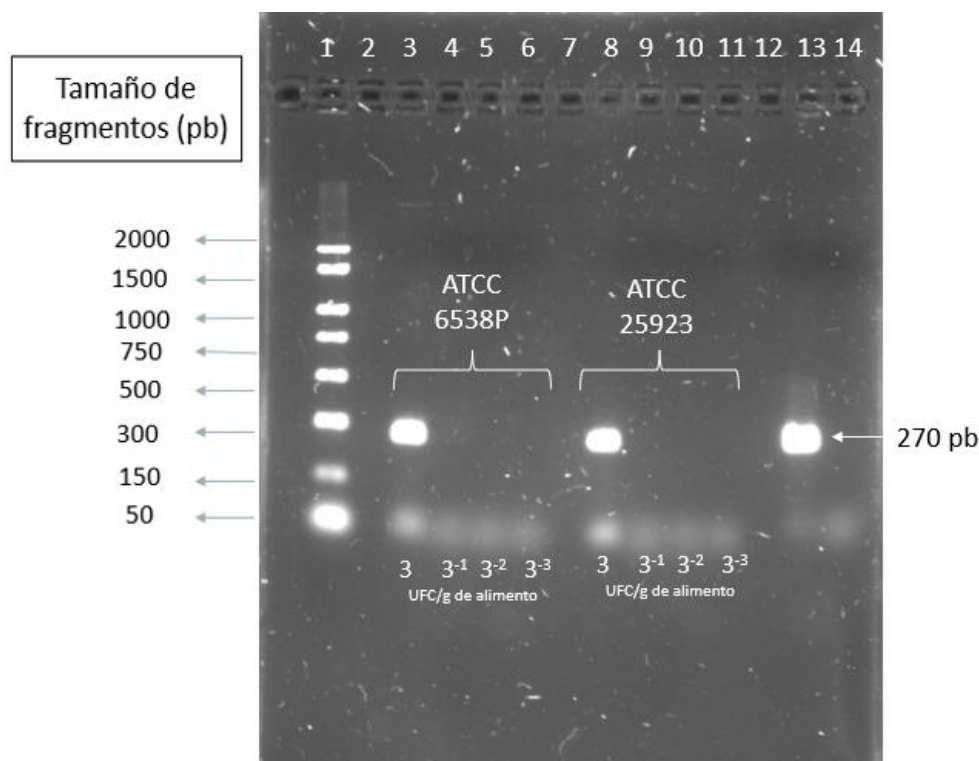


Figura 9. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen *nuc* (270 pb), recuperado en diferentes niveles de contaminación de las cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y 25923 (factibilidad y sensibilidad). Carril 1) marcador de pares de bases 50-2000 pb. Carril 3) amplicón del gen *nuc* recuperado de la cepa de *S. aureus* ATCC 6538P en un tiempo de recuperación de 4 h y a una concentración inicial del inóculo de 3UFC/g de alimento. Carril 8) amplicón del gen *nuc* recuperado de la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 en un tiempo de recuperación de 4 h y a una concentración inicial del inóculo de 3UFC/g de alimento. Carril 13) control positivo. Carril 14) control negativo.

6.3.3. Especificidad

La especificidad obtenida a partir del promedio de la verificación de los inóculos del microorganismo de interés e interferente fue de 103.33%, esto es indicativo de una alta especificidad por parte del método polifásico frente a una alta concentración de un microorganismo interferente. La especificidad en un método cualitativo es dependiente a la concentración del inóculo de la bacteria interferente, debido a que en la guía de validación CCAYAC-CR-18/0 indica utilizar una concentración >100 UFC/mL (concentración 100 veces mayor que la del microorganismo de interés), por esta razón para nuestro método desarrollado basado en la amplificación específica de un gen que solo se encuentra en *S. aureus*, se obtuvo una especificidad alta, pudiendo amplificar concentraciones bajas de *S. aureus* en la matriz de queso fresco. El

criterio de aceptación para la especificidad de un método microbiológico cualitativo es mínimo 80% (Fondevila *et al.*, 2014).

$$\text{Especificidad} = \frac{310 \text{ UFC}}{3 \text{ UFC}} = 103.33\%$$

6.3.4. Repetibilidad

Se obtuvieron 24 detecciones positivas por amplificación del gen *nuc* de las 24 repeticiones totales divididas en 4 días diferentes, esto es indicativo de que el grado de concordancia de los resultados positivos no se ve afectado al realizar detecciones sucesivas e independientes obtenida por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones del protocolo polifásico.

6.3.5. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método polifásico obtenida de la repetibilidad promediada en los 4 diferentes días fue del 100%, donde el criterio de aceptación es de una confianza del método mayor o igual a 95% (Fondelia *et al.*, 2014), esto es indicativo de que nuestro método polifásico para la detección de *S. aureus* en matriz de queso fresco no se ve afectado cuando se realizaron detecciones en diferentes tiempos o días.

6.3.6. Selectividad

Se obtuvieron 20 detecciones positivas de una mezcla de cepas de *S. aureus* en quesos frescos de las 20 repeticiones totales, obteniendo el 100% de resultados positivos, donde el criterio de

aceptación es de un valor mayor o igual a 80% de resultados positivos (Secretaría de Salud, 2019). Por lo tanto, nuestro método polifásico para la detección de *S. aureus* en matriz de queso fresco tiene la capacidad de detectar al microorganismo de interés a pesar de encontrarse en mayor concentración un microorganismo interferente como lo fue en este caso *S. epidermidis*. Por otro lado, se observó en algunas repeticiones una disminución en la intensidad de las bandas de los amplicones del gen *nuc*, esto se debe a un efecto inhibitorio de la PCR por parte de la matriz de queso fresco (Figura 10).

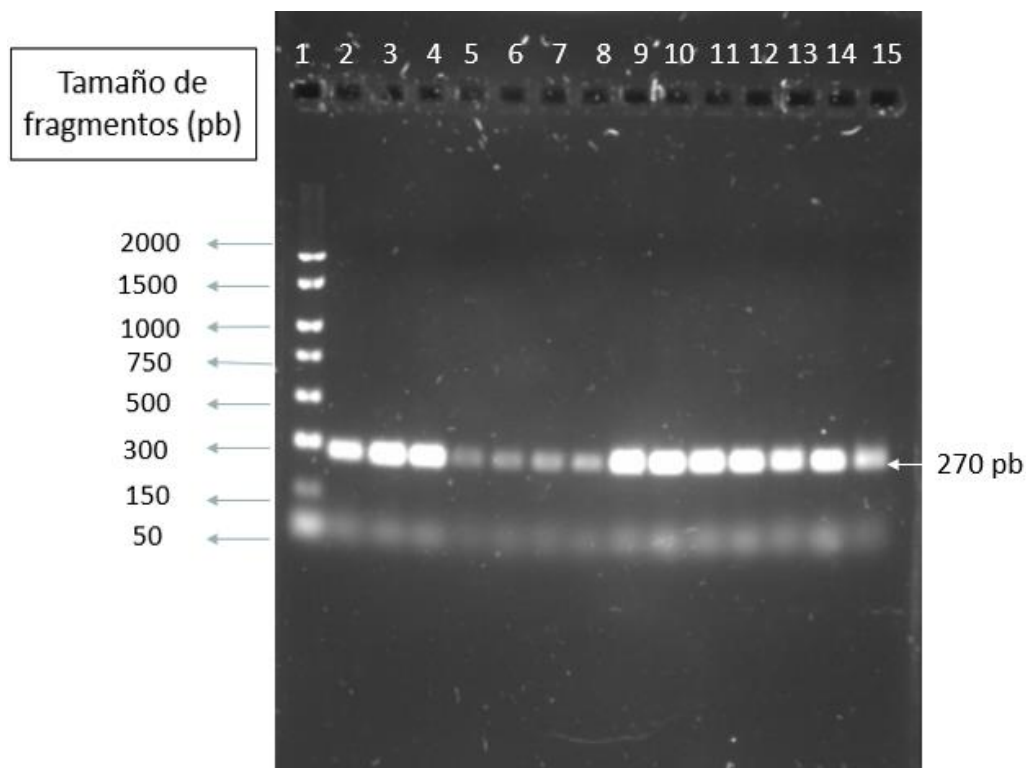


Figura 10. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen *nuc* (270 pb). Carril 1) marcador de pares de bases 50-2000 pb. Carril 2-15) amplicones del gen *nuc* recuperado de una mezcla de las cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y 25923 en un tiempo de recuperación de 4 h, a una concentración inicial del microorganismo de interés de 3 UFC/g y una concentración del microorganismo interferente (*S. epidermidis* ATCC 12228) de 310 UFC/g.

6.3.7. Verificación del Límite de Detección de Menos de 10 UFC

El método polifásico pudo amplificar el gen *nuc* de una mezcla de las cepas de *S. aureus* ATCC

6538P y 25923 en quesos frescos contaminados artificialmente, solo a una concentración inicial de 3 UFC/g y a un tiempo de recuperación de 4 h, a otras concentraciones menores no se observó la amplificación de la señal (Figura 11). Se obtuvieron 20 detecciones positivas de las 20 repeticiones totales, obteniendo un 100% de resultados positivos, donde el criterio de aceptación es de un valor mayor o igual a 80% de resultados positivos (Secretaría de Salud, 2019).

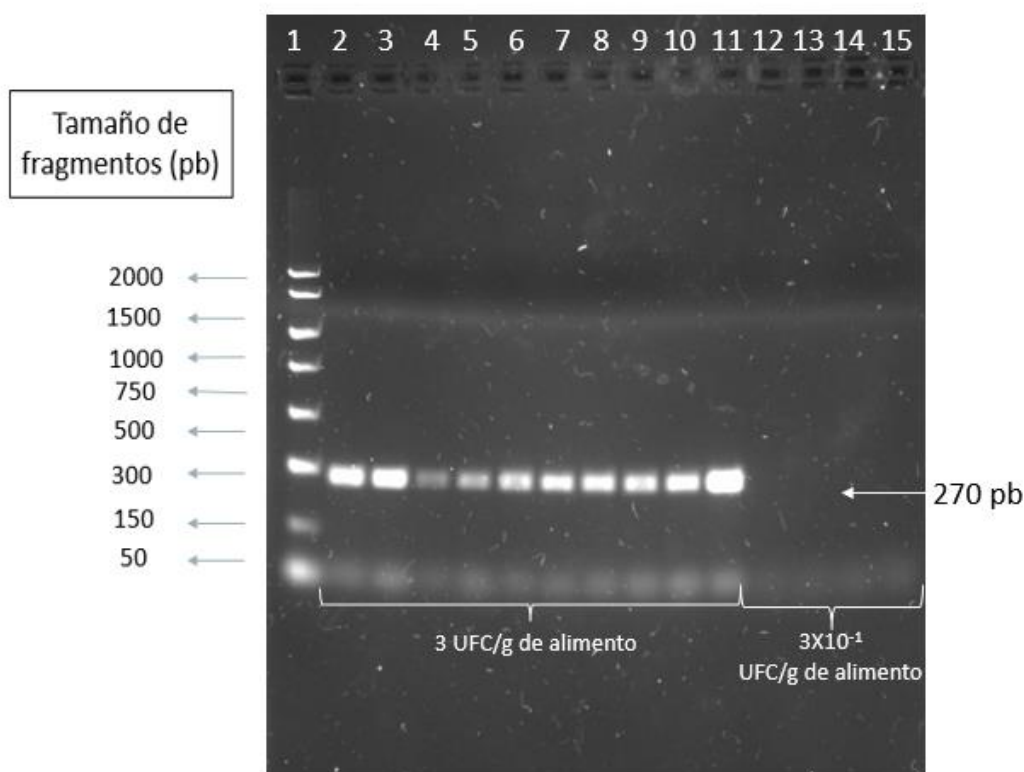


Figura 11. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.25% de amplicones del gen *nuc* (270 pb), recuperado en diferentes niveles de contaminación de las cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y 25923. Carril 1) marcador de pares de bases 50-2000 pb. Carril 2-11) amplicones del gen *nuc* recuperado de una mezcla de las cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y 25923 en un tiempo de recuperación de 4 h y a una concentración inicial del inóculo de 3UFC/g de alimento.

7. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método polifásico para la detección de *S. aureus*, realizando un preenriquecimiento en caldo BHI durante 4 horas, utilizando como técnica de extracción de ácidos nucleicos una lisis rápida y la amplificación del gen *nuc* como indicador de presencia/ausencia del microorganismo. El método desarrollado fue validado para la matriz de queso fresco siendo factible para las cepas control ATCC 6538P y 25923 de *S. aureus* con repetibilidad, reproducibilidad y selectividad del 100%, con una especificidad frente al interferente (*S. epidermidis* ATCC 12228) de 103% y un límite de detección de 3 UFC/g. El método polifásico validado presentó una sensibilidad de 3 UFC/g, así como un tiempo de respuesta menor a 8 horas, ambas condiciones por debajo de las reportadas para el método fenotípico oficial en México (10 UFC/g y 216 h respectivamente).

8. RECOMENDACIONES

Evaluar la sensibilidad del método de detección aumentando el tiempo de preenriquecimiento con concentraciones del patógeno más bajas a las probadas en este estudio.

Comparar el método polifásico validado desempeñándolo simultáneamente con el método fenotípico tradicional (NOM-210-SSA1-2014).

Determinar la incidencia del patógeno en la ciudad de Hermosillo, Sonora debido a la inexistente información epidemiológica al respecto.

Validar el método polifásico para la detección de *S. aureus* en las matrices alimenticias restantes

Estandarizar el método polifásico utilizando otros genes específicos de *S. aureus*, modificando las condiciones de amplificación para su desarrollo.

9. REFERENCIAS

- Alejo-Riveros J. C., Cortes-Muñoz M. S., Correa-Lizarazo D. X., Klotz-Ceberio B., Herrera-Arias F. C., y Martínez-Galán J. P. (2011). Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia. Colombia.
- Alibayov B., Baba-Moussa L., Sina H., Zdeňková K. y Demnerová K. (2014). *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. Molecular Biology Reports, 41(8), 5005-5018. doi:10.1007/s11033-014-3367-3
- Becton Dickinson y Company (2016). BD Baird Parker agar. Recuperado de https://www.humeau.com/media/blfa_files/276840.pdf
- Brakstad O. G., Aasbakk K. y Maeland J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. Journal of Clinical Microbiology, 30(7), 1654.
- Camaró-Sala M. L., Martínez-García R., Olmos-Martínez P., Catalá-Cuenca V., Ocete-Mochón M. D. y Gimeno-Cardona C. (2013). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. doi:10.1016/j.eimc.2013.11.010
- Cervantes-García E., García-González R. y Salazar-Schettino P. M. (2014). General characteristics of *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, 61(1), 28-40.
- Dada R., Mishra S., Mohanty K., Kumar M. y Vemprala K. (2014). Polymerase Chain Reaction. Manual of Cytogenetics in Reproductive Biology, 59.
- Fondevila, N., Compaired, D., Maradei, E., & Duffy, S. (2014). Validación de una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa y evaluación de su desempeño en la infección aguda. Revista argentina de microbiología, 46(3), 188-195.
- Foster T. J. (2004). The *Staphylococcus aureus* “superbug”. The Journal of Clinical Investigation, 114(12), 1693-1696.
- Gil M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Revista Chilena de Infectología, 17, 145-152.
- Goh S. H., Byrne S. K., Zhang J. L. y Chow A. W. (1992). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology, 30(7), 1642.
- Guillén R., Carpinelli L., Rodríguez F., Castro H., Quíñonez B., Campuzano A. y Grau L. (2016). *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos. Revista Chilena de Infectología, 33(6), 609-618.
- Hummerjohann J., Naskova J., Baumgartner A. y Graber H. U. (2014). Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. Journal of Dairy Science, 97(3), 1305-1312.

- Jamali H., Radmehr B. y Ismail S. (2014). Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2226-2230. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7509>
- Javid F., Taku A., Bhat M. A., Badroo G. A., Mudasir M. y Sofi T. A. (2018). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. *Veterinary world*, 11(4), 423.
- K. Abbas A., y Lichtman A. (2019). *Inmunología Celular y Molecular* / A.K. Abbas, A.H. Lichtman.
- Koneman E. W. y Allen S. (2017). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*: Ed. Médica Panamericana.
- Lowy F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532.
- Murray P. R., Rosenthal K. S. y Pfaller M. A. (2017). *Microbiología Médica*: Elsevier Health Sciences.
- Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A. y Bolzoni G. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98(1), 73-79.
- Organización Mundial de la Salud (2015). Enfermedades de transmisión alimentaria. Recuperado de https://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/
- Ryan K. J., Ray C. G. y Muñoz B. R. (2016). *Microbiología Médica*: Sherris: McGraw-Hill Interamericana.
- Secretaría de Salud (2014). Norma oficial mexicana NOM-210-SSA1-2014, bienes y servicios. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Recuperado de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015
- Singh R., Ray P., Das A. y Sharma M. (2010). Enhanced production of exopolysaccharide matrix and biofilm by a menadione-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant. *Journal of Medical Microbiology*, 59(5), 521-527.
- Soto-Varela Z. E., Gutiérrez C. G., de Moya Y., Mattos R., Bolívar-Anillo H. J. y Villarreal J. L. (2018). Molecular detection of *Salmonella spp.*, *Listeria spp.* and *Brucella spp.* in fresh artisanal cheese marketed in the city of Barranquilla: A pilot study. *Biomédica*, 38, 30-36.
- Trnčíková T., Hrušková V., Oravcová K., Pangallo D. y Kaclíková E. (2013). Erratum to: Rapid and Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* in Food Using Selective Enrichment and Real-Time PCR Targeting a New Gene Marker. *Food Analytical Methods*, 6(3), 989-989. doi:10.1007/s12161-013-9605-9
- Watts A., Ke D., Wang Q., Pillay A., Nicholson-Weller A. y Lee J. C. (2005). *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and Immunity*, 73(6), 3502-3511.
- Zendejas-Manzo G. S., Avalos-Flores H. y Soto-Padilla M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.