

Universidad Nacional de San Martín

INEI – ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán

APLICACIÓN DE UNA REACCIÓN DE  
PCR–MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* TOXIGÉNICAS

Autor: Bioquímico Aníbal Alberto Brizzio

Director: Dr. Fabián Zalazar

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

AÑO 2009

*A mis hijas, María Emilia  
y María Victoria*

*"No se que opina el mundo de mi pero yo me siento como un niño que juega en la orilla del mar, se divierte descubriendo de vez en cuando un hermoso guijarro o un extraño caracol; mientras el gran océano de la verdad se extiende allí delante, todo él por descubrir".*

*Isaac Newton*



## AGRADECIMIENTOS

*Dr. Fabián Zalazar*

*Dra. Mirta Carlomagno*

*Personal del ANLIS-INEI Dr. Carlos G. Carlos Malbrán*

*Personal de la Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria*

*Personal de la Cátedra de Práctica Profesional Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas,  
Universidad Nacional del Litoral.*

## GLOSARIO / ABREVIATURAS

**Agente (Agente infeccioso)** Entidad biológica que puede causar enfermedad infecciosa.

**Aislamiento:** Aislamiento Por Cultivo. Muestra de gérmenes no necesariamente homogéneos, obtenidos de un huésped natural y conservados en laboratorio por medio de pasajes por huéspedes o medios de cultivo invitro. Debe preferirse este término al de "cepa", de uso más frecuente pero más impreciso.

**Alimento:** Toda sustancia, elaborada, semielaborada, o natural, que se destina al consumo humano, incluyendo otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos. No se incluyen sustancias medicamentosas. El agua se considera alimento.

**Brote** Epidemia de proporciones reducidas que alcanza una población pequeña.

**Brote de Toxiinfección Alimentaria (ETA):** Episodio en el cual dos o más personas presentan una enfermedad similar después de ingerir alimentos (agua incluida) del mismo origen y donde la evidencia epidemiológica o el análisis de laboratorio implica a los alimentos y/o agua, como vehículos de la misma.

**Cepa** Población de una misma especie descendiente de un único antepasado o que tiene un mismo origen, conservada por medio de una serie de pases o cultivos. Las de comportamiento semejante se denominan "homologas" las de comportamiento diferente "heterólogas".

**Caso:** Persona o animal infectado o enfermo presentando características clínicas, de laboratorio y/o epidemiológicas específicas.

**Caso de Toxiinfección Alimentaria (ETA):** Es una persona que ha enfermado después del consumo de alimentos y/o agua, considerados como contaminados, vista la evidencia epidemiológica o el análisis de laboratorio.

**Caso de diarrea:** Aumento en el número y volumen de las deposiciones y disminución en su consistencia

**CIE 10:**Corresponde a la décima Revisión de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud. Es la más reciente de una serie que se inició en el año 1893. Clasificación internacional de enfermedades. Ejemplo, Intoxicación alimentaria estafilocócica: CIE 005.0

**Diarrea** Es la disminución significativa en la consistencia de las heces, generalmente con > 3 de deposiciones/día y con volumen >200 g./día. Se denomina **Aguda (DA)** cuando tiene una duración menor de 14 días, **Persistente (D P)** su duración está entre 14 y 30 días y **Crónica** cuando supera el mes.

**ETA** Enfermedad Transmitida por Alimentos, síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población.

**Fenotipificación** Caracterizar un agente por la expresión del material genético mediante la presencia de productos metabólicos específicos.

**Fomites:** Objetos de uso personal del caso clínico o portador que pueden estar contaminados y transmitir agentes infecciosos

**Genotipificación** Caracterizar un agente por su material genético mediante la presencia de genes específicos.

**Infecciones alimentarias:** Son las enfermedades producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros tejidos, aparatos o sistemas.

**Intoxicaciones alimentarias:** Son las enfermedades producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o productos metabólicos de microorganismos, que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde la producción hasta su consumo.

**Mb** megapares de bases

Notificación Información periódica del registro de enfermedades de notificación obligatoria, obtenida por medio de todas las fuentes notificadotas.

**Pb** pares de bases

**PCR** Reacción en cadena Polimerasa

**Q S** *Quorum sensing*, detección de quórum o autoinducción es un mecanismo de control de expresiones genéticas dependiente de la densidad celular. Fenómeno responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolle comportamientos sociales coordinados. Entra dentro de los fenómenos de la multicelularidad, al igual que el patrón de la formación de colonias o la formación de cuerpos fructíferos en las mixobacterias. Si bien es en células procariotas donde se ha estudiado, se ha encontrado también en células eucariotas, y no solo en organismos unicelulares, sino también en pluricelulares, ya que incluso hay ejemplos de este comportamiento descritos en células del ser humano. En las bacterias se producen y excretan moléculas químicas a modo de señales (autoinductores) cuya concentración se incrementa en función de la densidad celular. La detección por el microorganismo de una concentración estimuladora mínima lleva a una alteración en la expresión génica.

**SE o SEs** Enterotoxinas estafilococicas

**Tasa** Relación entre el número de eventos reales y el denominador de referencia , multiplicando el resultado por un factor de amplificación, para estimar la ocurrencia de un evento.

**UI** Unidad Internacional.

**UFC (ufc/g)** Unidad formadora de colonias por gramos. Unidad en la que se expresa los resultados de los conteos bacteriológicos en alimentos y conexos.

**VETA** Vigilancia epidemiológica de las ETAs o Toxiinfecciones alimentarias. Propuesta de la vigilancia epidemiológica de las toxiinfecciones alimentarias propuesta por INPPAZ, OPS/OMS. Guía VETA.

**Vigilancia Epidemiológica** Acción sistemática, continua, oportuna y confiable, de coleccionar, analizar, interpretar, distribuir información, las acciones que se deriven y estén vinculadas a la práctica de la salud pública.

**Vigilancia Basada en el Laboratorio.** El diagnóstico y la vigilancia hecha en base a resultados de laboratorio, tanto clínico como de alimentos.

## RESUMEN

En el mundo se producen aproximadamente 1500 millones de casos de diarrea que ocurren anualmente y son el resultado directo de la contaminación química o biológica que presentan algunos de los alimentos que se comercializan (OMS, 1998). Se conocen más de 250 tipos de Enfermedades Transmitidas por alimentos, agrupándose según su origen en biológico o químico. Las primeras, son las más numerosas y de mayor impacto. *Staphylococcus aureus* ocupa un rol importante, es agente etiológico de una de las gastroenteritis más frecuentes por consumo de alimentos contaminados, "Intoxicación alimentaria estafilocócica. Mediante la optimización y aplicación de un procedimiento basado en la reacción en cadena de la polimerasa, se identifican los genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* en muestras obtenidas de brotes de intoxicaciones alimentarias. Se propone así como una respuesta a una necesidad en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, para disponer de una herramienta eficaz y sencilla para establecer una relación entre un patógeno de transmisión alimentaria, y un evento epidemiológico. Se procesaron aislamientos de *Staphylococcus aureus* recuperados de muestras de alimentos en brotes de intoxicación alimentaria ocurridos en la Provincia de Santa Fe. Estas cepas fueron caracterizadas fenotípicamente con pruebas bioquímicas convencionales. Para la obtención de ADN bacteriano, se evaluaron tres procesos de extracción: Lisis por calor con agua, Lisis por calor con TE + Tritón X-100 y un método comercial. La amplificación de los genes de enterotoxinas de *S.aureus* (SEA, SEB, SEC, SED y SEE) se realizó utilizando una Multiplex PCR. Para confirmar la identidad de los amplicones obtenidos se realizó una digestión de los mismos con la enzima *Rsa I*, previo análisis *in silico* utilizando los servicios *on line* Blast y NEBCutter. Los fragmentos de ADN resultantes en estas experiencias fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa. Se observó que el proceso de extracción de ADN con agua resultó tan eficaz como el uso de TE + Tritón o de un método comercial, con una disminución en el tiempo total del proceso. Partiendo de ADN obtenido por lisis por calor (en agua), en todas las cepas control utilizadas se pudo identificar el gen de la enterotoxina correspondiente. Además, la digestión con *Rsa I* generó fragmentos de restricción con los tamaños previstos en el análisis teórico. Esto permitió el uso de una sola reacción de digestión para confirmar la identidad de 5 genes distintos. La metodología de análisis molecular aquí propuesta, nos permitió detectar 5 genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* con una mejora -en términos de economía, practicidad y tiempo de ejecución- en comparación con otros procedimientos previamente reportados. Con esta metodología pudimos detectar genes de SEs, en distintas cepas de *S aureus* recuperadas en diferentes brotes de intoxicación alimentaria.

**INDICE**

Introducción:	11
El microorganismo	12
Taxonomía	14
Estructura Antigénica de S A	15
Toxinas, Exotoxinas, Enterotoxinas	19
Mecanismo de Acción de las Enterotoxinas. Patogénesis	31
Reservorios y huéspedes susceptibles. Determinantes del Huésped. Acción Patogénica. Factores Predisponentes. Manifestaciones Clínicas	33
Epidemiología	40
Identificación	46
Objetivos	53
Materiales y Métodos	54
Resultados y Discusión	64
Conclusiones	84
Bibliografía	86
Anexo	104

## INTRODUCCIÓN

De los aproximadamente 1500 millones de casos de diarrea que ocurren anualmente en el mundo (con 3 millones de muertes en niños menores de 5 años) se estima que, dependiendo de los países, entre el 15 % y 70 % son el resultado directo de la contaminación química o biológica que presentan algunos de los alimentos que se comercializan (OMS, 1998). Se conocen más de 250 tipos de Enfermedades Transmitidas por alimentos (Bhatia y Zahoor, 2007), agrupándose según su origen en biológico o químico. Las primeras, más numerosas y de mayor impacto, son originadas por parásitos, bacterias o virus, las segundas por sustancias químicas de origen biológico (toxinas) o compuestos químicos (plaguicidas metales pesados, etc.). (INPPAZ. Guía VETA).

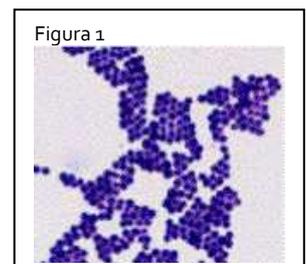
Los costos originados por estas enfermedades humanas son elevados. Se evalúa que solo en USA y considerando los 7 patógenos más frecuentes (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii*) causan 3,3 - 12,3 millones de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos, con hasta 3.900 muertes y un estimado de \$ 6,5-34,9 millones anuales (Buzby, Roberts, 1997).

Entre las bacterias que originan estas enfermedades, *Staphylococcus aureus* (S A) ocupa un rol importante, es agente etiológico de una de las gastroenteritis más frecuentes por consumo de alimentos contaminados, denominada "Intoxicación alimentaria estafilocócica, CIE 005.0". (Le Loir y cols., 2003).

---

## EL MICROORGANISMO

Su descubrimiento se remonta a 1880 cuando Ogton sugiere por primera vez el nombre de *Staphylococcus* (del griego staphyle, racimo y kokkos, granos) para describir formas bacterianas esféricas en forma de racimos apiñados, si bien anteriormente lo habían observado Pasteur y Koch. En 1884 se lo relacionó con heridas y osteomielitis. Estos racimos están constituidos por células esféricas de 0,5 a 2,5  $\mu$ m aproximadamente, que se dividen característicamente en más de un plano en forma



regular e irregular (lo que da origen al nombre de esta familia. Figura 1), y lo observó en materiales clínicos provenientes de abscesos. (Ogston A, *Micrococcus poisoning* 1882, *Classics in infectious diseases* 1984).

Posteriormente en 1884 Rosenbag los aisló en el laboratorio describiendo dos variedades según el color de las colonias, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyogenes albus*. Luego, en 1891 se dan detalles del *Staphylococcus epidermidis albus*, considerándolo una variedad avirulenta llamándolos también *Micrococcus*. En 1903 Loeb descubrió que los *Staphylococcus aureus* coagulaban el plasma pero recién en 1957 en la 7ma edición del Manual de Determinaciones Bacteriológicas de Bergey, la prueba de la coagulasa adquiere valor fundamental para la clasificación entre *S aureus* y *S epidermidis*. Aquí también se separan dos géneros, los *Micrococcus* (que utilizan la glucosa oxidativamente) y los *Staphylococcus* (que utilizan anaeróbicamente la glucosa). En 1965 el Comité Internacional de Bacteriología estandariza los test para la identificación de *Staphylococcus* y *Micrococcus* utilizando la relación G/C en base a la composición del ADN, la lisis de Lysostaphinendopeptidasa y presencia de ácidos teicoicos. En 1974 se reconoce la existencia de otra especie, el *Staphylococcus saprophyticus*. En 1975 Scheifer y Kloos diferencia 15 especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa, diferenciándolos por propiedades bioquímicas, sensibilidad a antimicrobianos, etc.; agrupándolos en *S saprophyticus*, *S epidermidis*, *S hominis* y *S simulans*. En 1982 se describieron seis especies nuevas de estafilococcus coagulasa negativa.

Los *Staphylococcus aureus* (S A) son considerados dentro de las bacterias no formadoras de esporos, como una de las más resistentes. Pueden sobrevivir en ambientes no fisiológicos (resisten condiciones extremas de calor, actividad acuosa, concentración salina) y es posible cultivarlo del material clínico desecado y en medios de cultivo simples. (Kusumaningrum y cols., 2003). De acuerdo con esto es lógico suponer que a pesar de la disponibilidad de poderosos agentes antimicrobianos de diversa acción y mejores condiciones de salud pública, desde su identificación S A continúa siendo un importante patógeno humano que coloniza y enferma a pacientes hospitalizados y a personas sanas inmunológicamente competentes.

El género *Staphylococcus* fue extensamente revisado por Schleifer and Kloos (1975) con *Staphylococcus* aislados de especímenes biológicos humanos y veterinarios y de cepas

medioambientales, considerando 33 especies y 8 subespecies. (Behme y cols. 1996). Son coagulasa positiva: *S aureus*, *S intermedius*, *S delphini*, *S schleiferi subesp coagulan* y una coagulasa variable, *S hyicus*. Siendo los restantes coagulasa negativa. Algunas son consideradas patógenas oportunistas para el hombre y animales (Pesce de Ruiz Holgado. 1996; Fueyo Mendoza. 2008).

---

## TAXONOMÍA

El género *Staphylococcus* pertenece al Phylum 2 del Dominio Bacteria; Clase Bacilli; Orden Bacillales; y Familia Staphylococcaceae (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 2ª Ed 2001, vol 1). La filogenia de *Staphylococcus* y las características bioquímicas de la familia *Micrococaceae* pueden verse en los Gráficos 1, 2 y tabla 1 presentes en el Anexo. (Madigan y cols., 1998)

Son bacterias Gram Positivas, no esporuladas, con bajo contenido en GC (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). Tienen forma de cocos, de tamaño aproximado a 0,8 µm de diámetro, y una presentación característica en agrupaciones irregulares semejantes a racimos de uvas. La especie tipo, *Staphylococcus aureus*, tiene todas las características típicas del género: anaerobio facultativo (metabolismo respiratorio o fermentativo y quimioorganotrofos), mesófilo, necesita aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa con producción de ácido y tolera condiciones ambientales muy variables.

*Staphylococcus* puede separarse del género *Micrococcus*, no patógeno, por varias pruebas, entre ellas: a) la producción de ácido de la glucosa en anaerobiosis, b) sensibilidad a 200ug/ml de lisofantina o a 100 ug de furazolidona y c) producción de ácido del glicerol en presencia de 0,4 ug/ml de eritromicina. Todos estos ensayos son positivos para *Staphylococcus*. (Waldvogel. 2002)

El género *Staphylococcus* son bacterias mesófilas con una temperatura óptima de 30° a 37° C pero pueden crecer a cualquier temperatura entre 6°C y 46°C. En cuanto al pH, se desarrolla entre valores de 4,0 y 9,8 con el óptimo en torno a la neutralidad. Es igualmente tolerante con respecto a la sal, resistiendo concentraciones de hasta un 20% de

NaCl. Posee un crecimiento en alimentos con muy baja actividad de agua ( $a_w$ ), desde 0,99 hasta 0,83 y un valor óptimo de 0,94. También es bastante resistente a la desecación, la congelación y el calor. Producen ácido y no gas evidente en pruebas bioquímicas de una amplia variedad de Hidratos de Carbono (glucosa, manitol, etc.).

En medios de cultivos sólidos, desarrollan en forma de colonias circulares de 2 mm de diámetro, de color amarillo debido a pigmentos carotenoides.

Los *Staphylococcus* potencialmente poseen una amplia variedad de enzimas. Son huéspedes de una amplia gama de bacteriófagos (Pesce de Ruiz Holgado. 1996). Su genoma, es un cromosoma circular de aproximadamente 2800 bp, con profagos, plásmidos y transposones que le confiere particularidades específicas a los genes que regulan la virulencia y la resistencia a los antibióticos (estos genes se transfieren entre cepas de S A o de otro tipo de bacterias gram-positivas a través de elementos extracromosómicos. (Novick, 1990)

#### ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*, es la especie más característica y también más virulenta del género. Se caracteriza por poseer componentes estructurales singulares y de producir numerosas enzimas consideradas factores de virulencia. Tabla 1

DETERMINANTE	FUNCIÓN
<b>Componente de la pared celular</b>	
Peptidoglicano	Activación del complemento, otras
Ácidos teicoico	Antifagocitaria
Proteína A	Antifagocitaria
Adhesinas	Adherencia a células/hospedador, colonización
Capsula mucoide y microcápsulas	Adherencia, antifagocitaria
<b>Enzimas</b>	
Coagulasa	Formación de absesos
Estafiloquinasas	Destrucción de coágulos
Hialuronidasa	Invasión hística
Catalasa	Supervivencia en fagocitos
Lipasa	Invasión, colonización
ADNsa	Destrucción de ADN
<b>Toxinas</b>	
Hemolíticas	Rotura de membrana celulares
Leucocidinas	Alteración de la permeabilidad celular
Exfoliatinas	Epidermolisis

Toxinas TSST	Shock Tóxico
Enterotoxinas	Intoxicación alimentaria
<b>Bacteriocinas</b>	Muerte de otras bacterias
Tabla 1. Factores de virulencia y acción. (Tomado de Fueyo Mendoza, 2008)	

La forma e integridad celular es mantenida por la presencia de una estructura denominada pared celular. La concentración de solutos en el interior de la célula, originan elevadas presiones (la presión de turgencia se estima en 2 atmósferas), por lo tanto es necesario una estructura que le confiera al microorganismo forma y rigidez. Esta pared, conformada principalmente por **peptidoglicano** (un compuesto propio del dominio Bacteria), formando una la unión  $\beta$ -1,4 ; no ramificada de 2 azúcares, N-acetilglucosamina y N-acetilmuramico. Existe una cadena lateral de un tetrapeptido (L-alanina, D-isoglutámico, L-Lisina, D-Alanina) que se une al residuo de ácido muramico. Estas cadenas de tetrapeptidos se unen entre sí por un puente de 5 glicinas (característico de S A). En bacterias Gram positivas el peptidoglicano es hasta el 50 % del peso de la pared (a diferencia del 10 % de las Gram negativas). La capa peptidoglicano es una cadena de azúcares (enlazados alternativamente por enlaces  $\beta$ -1,4); conectados entre sí por los puentes aminoacídicos y con enlaces entre cadenas adyacentes por transpeptidación, dado que todas las moléculas de peptidoglicano están entrecruzadas se considera que cada capa es una molécula gigante. (Mc Fadin, 2003) El peptidoglicano tiene propiedades biológicas muy importantes, resiste condiciones osmóticas muy adversas, conduce a la liberación de pirógenos endógenos e interleuquina 1 por Monocitos humanos, activa el Sistema Complemento por producción de Ac opsonicos y atrae a Leucocitos Polimorfonucleares (Mandel y cols., 2000). Las diferencias en la estructura peptidoglycano de cepas de S A pueden contribuir a las variaciones en su capacidad de causar coagulación intravascular diseminada.(Kessler y cols. 1991)

En S A como en todas las bacterias Gram Positivas, existen polisacáridos unidos a la pared celular. Estos polisacáridos son denominados **ácidos teicoicos** (gr. teichos, pared). Constituyen hasta en 40% del peso de la pared. El término de ácido teicoico refiere a componentes ya sea de la pared (esqueleto de una secuencia alternante de ribitolfosfato) o de la membrana (esqueleto de una secuencia alternante de glicerolfosfato), ya que pueden estar unidos covalentemente a ambas. Estos polialcoholes están unidos a azúcares y D-Alanina. La carga negativa neta de la superficie celular es aportada por estos ácidos

teicoicos y sirven para el trasiego de iones a través de la membrana. El ácido teicoico es especie específico, tiene buenas propiedades inmunógenas y es un receptor fágico. La adherencia a la mucosa nasal es mediada por los ácidos teicoicos. (Figura 3)

Se encuentra también, vinculada covalentemente a la capa de peptidoglicano en su parte externa una proteína de aproximadamente 40.000 Dalton, identificada como **Proteína A** exclusiva del género *Staphylococcus*. Está presente en cantidades variable en las distintas cepas. Tiene una actividad muy importante, además de activar el Sistema Complemento en determinadas circunstancias, se une al Fc terminal de todas las subclases de Ig G humana excepto la Ig G<sub>3</sub>, que es grupo específica. Entre las adhesinas asociadas a la pared celular que promueven la adherencia de la bacteria a las células del hospedador están las **proteínas de unión a la fibronectina y al colágeno**. La mayoría de los S A poseen además un **factor de agrupamiento** o Coagulasa, que hace que los microorganismos se agreguen. Este se liga al fibrinógeno por una reacción no enzimática.

La mayoría de *Staphylococcus* producen **microcápsulas de polisacárido**, que puede liberarse durante la infección focal y ser detectada en el suero del hospedador infectado. De los 11 serotipos de polisacáridos que se han identificado, el tipo 5 y 8 representan el 75 % de las infecciones humanas. Los S A resistentes a la metilina aislados son del tipo 5. La composición química de cuatro de estos polisacáridos antifagocíticos, incluidos los tipos 5 y 8, han sido determinadas y los cuatro demostraron estar químicamente relacionados. (Lowy Franklin.1998) . Ver Figura 3.

Muchas proteínas de superficie de S A tienen ciertas características estructurales en común. Estas características incluyen una secuencia de señal secretora en el N terminal, los aminoácidos que se extienden en el citoplasma cargados positivamente, un dominio hidrofóbico en la membrana, y una región de anclaje en la pared celular, todos en el carboxilo terminal. Un ligando vinculante en el dominio N terminal que se encuentra expuesta en la superficie de la célula bacteriana permite que algunas de estas proteínas funcionar como adhesinas. Varias de estas proteínas mencionadas se unen a moléculas de la matriz extracelular, y se han designado componentes microbianos adhesivos de la superficie que reconoce moléculas de la matriz (MSCRAMM). Estudios recientes sugieren que estas proteínas juegan un papel importante en la capacidad de los estafilococos a

colonizar tejido huésped y a elementos inertes (biofilm) como catéteres o prótesis. (Lowy Franklin, 1998 ; Kusumaningrum y col., 2003)

Los *S. A.*, como se dijo, excretan numerosas proteínas con función enzimática o tóxica, las enzimas y exotoxinas son caracteres variables en diferentes cepas. Producen también un pigmento carotenoides que confiere a las colonias una coloración amarilla o naranja. Estas características se utilizan para definir biotipos (fenotipos).

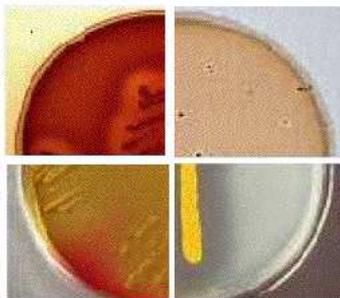


Figura 2. Crecimiento de *S. aureus* en diferentes medios de cultivo. Agar Sangre, muestra la actividad Hemolítica alrededor de las colonias. Agar Baird Parker, muestra el color negro por la reducción del telurito a telururo, con halos transparentes por la lipólisis-proteólisis de la yema de huevo. Agar Manitol Salado, muestra la presencia de la degradación del manitol en presencia de altas concentraciones de sal (7,5% de ClNa). Agar DNAsa muestra halos transparentes por la degradación del ADN tras turbiedad del medio por la precipitación del ADN (CIH 1N).

La **catalasa** (y los pigmentos carotenoides) aumenta la supervivencia en los macrófagos. Diferentes enzimas como proteasas, lipasas, lecitinasa, hialuronidasa, estafiloquinasa, intervienen en la degradación de tejidos y macromoléculas facilitando nutrientes para el crecimiento de la bacteria y provocando, al menos en parte, los síntomas de diferentes cuadros clínicos. La detección de algunas de estas moléculas se ha utilizado como carácter diferencial en medios de cultivo y en el diseño de esquemas de identificación. Figuras 2 y 3.

La **coagulasa**, que provoca la coagulación de la sangre (el fibrinógeno pasa a fibrina que forma los coágulos), es el carácter asociado a la especie y vinculado a patogenicidad más relevante. Los coágulos inducidos por la coagulasa dan lugar a la acumulación de fibrina alrededor de las bacterias protegiéndolas frente a los agentes inmunitarios del hospedador, fundamentalmente frente a la fagocitosis (Mandell y cols., 2000; Dinges y cols., 2000; Madigan y cols., 2003). Ver Figura 3

La mayoría de las cepas de *S. A.* produce algún tipo de **hemolisinas**, que dañan las membranas de las células eucariotas, incluyendo los glóbulos rojos, lisándolas. Actualmente hay descritas cinco hemolisinas: alfa, beta, gamma, delta y delta-variante. Ver Figura 3

Por el contrario sólo una minoría de cepas produce una potente **leucotoxina** (asociada a neumonía necrotizante) que ejerce acción exclusiva sobre células humanas y de conejo, la leucocidina de Pantón Valentine. Las leucotoxinas (al igual que gamma-hemolisina), son toxinas bi-componentes (uno esencial para la adherencia a la célula del hospedador y el otro el tóxico y citolítico) que destruyen leucocitos provocando la producción de pus. Se han descrito tres: la ya citada leucocidina de Pantón Valentine (LukS-PV/ LukF-PV) y otras dos menos virulentas y de descripción reciente (LukM/ LukF-PV y Luke/ LukD).

Un importante porcentaje de cepas de *S. A.* produce, también, algún tipo de **toxinas pirogénicas superantígenicas** (toxina del síndrome del shock tóxico y enterotoxinas) cuyas características se exponen más adelante (Mandell y cols., 2000, Dinges y cols., 2000, Harris y cols., 1993).

Además, algunas cepas tienen capacidad para producir **bacteriocinas**, que son de naturaleza peptídica, inhiben el crecimiento de cepas y especies de bacterias diferentes en un amplio espectro, y pueden aportar a la cepa productora ventajas tanto en la colonización de las mucosas (principalmente nasal) de portadores sanos como en procesos infecciosos mixtos o poli infecciones. (Fueyo Mendoza, 2008)

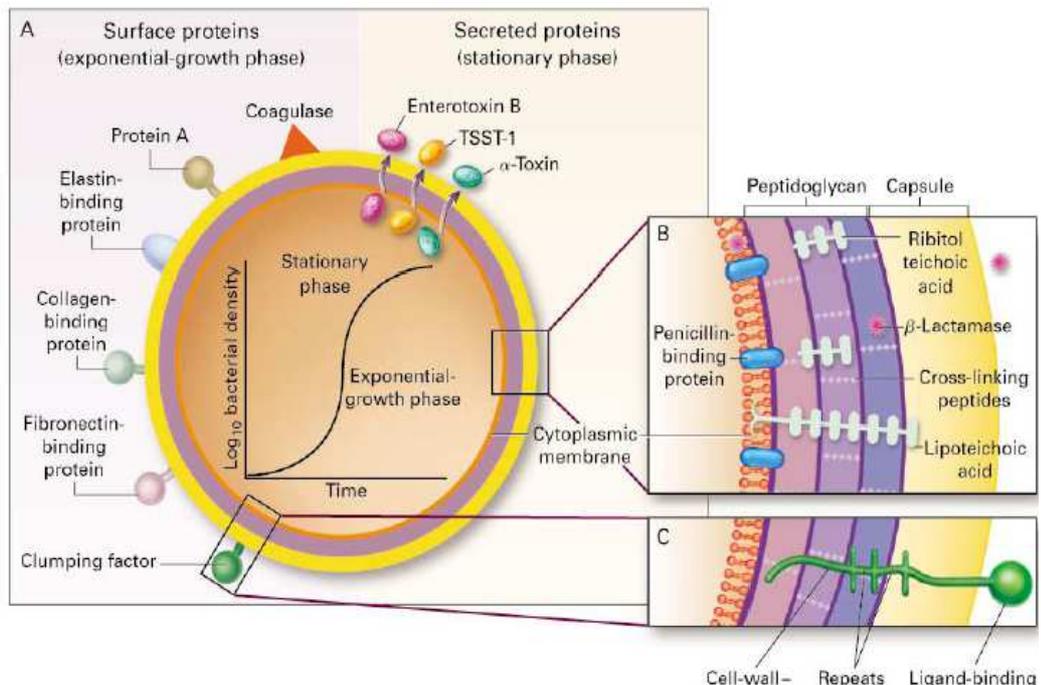


Figura 3

**A:** Superficie y proteínas de secreción. La síntesis de algunas de estas proteínas es dependiente de la fase de desarrollo y está controlada por genes regulatorios como *agr*.

**B y C:** cortes de secciones la superficie celular. Algunas de las proteínas de superficie tienen una organización similar al "clumping factor" incluyendo segmentos repetitivo de aminoácidos ácidos

---

## TOXINAS, EXOTOXINAS, ENTEROTOXINAS (S E)

Las exoproteínas producidas por *S. A.* contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedad en mamíferos anfitriones. (Yarwood y cols., 2001) Algunas cepas producen una o más proteínas de exportación o exotoxinas que incluyen: Leucotoxinas, Toxinas del Síndrome de Shock Tóxico (TSST-1), Toxinas Exfoliativas: ETA y ETB, Enterotoxinas (SEA, SEB, SEC<sub>n</sub>, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO) siendo a la fecha aparentemente incompleta la lista de enterotoxinas. Cada una de estas toxinas tienen potentes efectos sobre las células del sistema inmunológico y además varias de ellas poseen otros efectos biológicos. (Monday y cols., 1999; Zollner y cols., 2000; Le Loir y cols., 2003)

Su principal función in vivo parece ser la de inhibir la respuesta inmune del anfitrión hacia *S. A.* Las Enterotoxinas Estafilococcicas (S E) y TSST-1 poseen características comunes por las que se identifican como Toxinas Pirógenas con Capacidad Superantigénica (**PTSAgs**). Los estudios sobre las S E comenzaron en el análisis detallado e integral de aquellas cepas de *S. A.* que fueron vinculadas a intoxicaciones alimentarias. Las primeras toxinas estafilococicas identificadas (con secuenciación del péptido), estaban disponibles antes que fuera secuenciado el genoma de la bacteria. Este fue el caso de SEA (Huang y col., 1987), SEB (Huang y Bergdoll, 1970) y SEC (Spero y Schmidt, 1983). La abundancia de literatura sobre las S E varía considerablemente entre los tipos, de acuerdo a la cronología de su identificación y su importancia en la intoxicación alimentaria estafilococcica. Se ha podido establecer la secuencia aminoacídica de estas proteínas, así como la de los genes que la codifican (**SEA**: Lee y cols., 1987; **SEB** : Jones y Khan, 1986; **SEC<sub>1</sub>**: Boach y Schielievert, 1987; **SEC<sub>3</sub>**: Couch y Beteley, 1989; **SED**: Bayles y landolo, 1989; **SEE**: Couch y cols., 1988; **SEF/TSST**: Bergdoll y cols, 1981; **SEG/SEI**: Munson y cols., 1998 ; etc.).

Sin dudas el grupo más numeroso y frecuente de "PTSAg" es el de las S E. Hasta el 2005 han sido reconocidas 18 S E, serológicamente distintas, denominadas como A, B, C

(con cinco variantes antigénicas C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C bovina y C ovina), D, E, G, H, I, (las tres últimas con variantes antigénicas) J, K, L, M, N, O, P, Q, R, y U, cada una de ellas es codificada por un gen que se denomina por el prefijo se seguido de la letra a la que corresponde la enterotoxina (*sea-seu*, inicialmente se denominaron *ent*). De algunos genes han sido encontradas diferentes variantes con pequeñas diferencias en la secuencia de nucleótidos, que se denominan con un número de orden detrás del gen (Balaban y Rasooly, 2000; Dinges y cols., 2000 ; Jarraud y cols., 2001; Orwin y cols., 2003; Schmidt y Hensel, 2004). Tanto las SE como sus genes presentan diferente grado de homología, y se ha propuesto la organización de parte de los genes en cuatro agrupaciones o clusters. Esquemáticamente se puede identificar cuatro grupos de acuerdo a sus relaciones filogenéticas. Dos de ellos contienen las enterotoxinas más frecuentemente identificadas, en uno se destaca: *sea, sed, see, sej, seo, sen*, y otro con *seb, sec, seg*. Figura 4

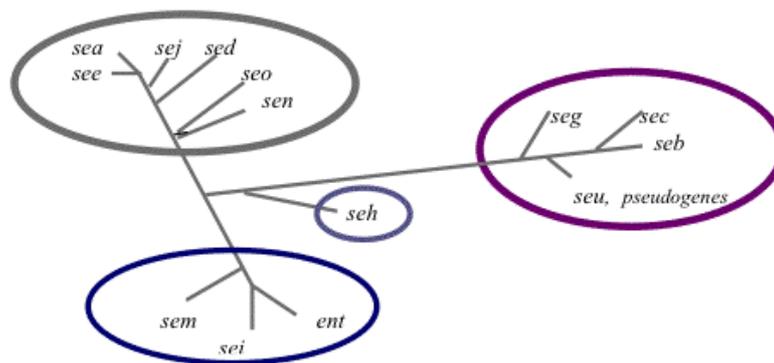


Figura 4. Relaciones filogenéticas entre genes que codifican toxinas estafilocócicas. Tomado de Fuelle Mendoza, 2008.

Estas 18 SE que han sido identificados comparten estructura y secuencia similares. Algunas de ellas se analizan en la tabla 2.

Toxin	SEA	SEB	SEC1	SED	SEE	SEG	SEH	SEI	SEJ	SEM	SEN	SEO
SEA	100	33	30	50	83	27	37	39	64	35	39	37
SEB		100	68	35	32	43	33	31	33	29	32	36
SEC1			100	31	29	41	27	26	30	26	29	33
SED				100	52	27	35	33	51	41	38	39
SEE					100	27	35	35	63	37	39	37
SEG						100	34	28	29	28	31	30
SEH							100	33	35	38	34	31
SEI								100	34	31	31	57
SEJ									100	38	42	33
SEM										100	28	31
SEN											100	42
SEO												100

After Jarraud et al., 2001. Names were corrected by the authors after the correction note published in *J. Immunol.* 166: 4260. Amino acid sequences of the precursors were compared using Blast2 sequence method (open gap of 11 and extension gap penalties of 1).

Tabla 2: Le Loir y cols., 2003

Las SE son proteínas pequeñas, secretadas al medio, solubles en agua y soluciones salinas. Sus características bioquímicas principales se resumen en la siguiente tabla.

SE type	ORF length (bp)	Precursor length (aa)	Mature SE length (aa)	Molecular mass (kDa)	pI	Reference
A	774	257	233	27,100	7.3	Betley and Mekalanos, 1985, 1988
B	801	266	239	28,336	8.6	Johns and Khan, 1988
C1	801	266	239	27,531	8.6	Bohach and Schlievert, 1987
C2	801	266	239	27,531	7.8	Bohach and Schlievert, 1989
C3	801	266	239	27,563	8.1	Hovde et al., 1990
C (bovine)				27,618	7.6	Marr et al., 1993
C (sheep)				27,517	7.6	Marr et al., 1993
C (goat)				27,600	7.0	Marr et al., 1993
D	777	258	228	26,360	7.4	Chang and Bergdoll, 1979 Bayles and landolo, 1989
E	774	257	230	26,425	7.0	Couch et al., 1988
G	777	258	233	27,043	5.7	Munson et al., 1998
H	726	241	218	25,210	Nd	Su and Wong, 1995
I	729	242	218	24,928	Nd	Munson et al., 1998
J	806	268	245 <sup>2</sup>	28,565 <sup>2</sup>	8.65 <sup>2</sup>	Zhang et al., 1998
K	729	242	219	25,539	6.5	Orwin et al., 2001
L	723 <sup>1</sup>	240 <sup>1</sup>	215 <sup>1</sup>	24,593 <sup>2</sup>	8.66 <sup>2</sup>	Fitzgerald et al., 2001
M	722 <sup>1</sup>	239 <sup>1</sup>	217 <sup>1</sup>	24,842 <sup>2</sup>	6.24 <sup>2</sup>	Jarraud et al., 2001
N*	720 <sup>1</sup>	258 <sup>1</sup>	227 <sup>1</sup>	26,067 <sup>2</sup>	6.97 <sup>2</sup>	Jarraud et al., 2001
O*	783 <sup>1</sup>	260 <sup>1</sup>	232 <sup>1</sup>	26,777 <sup>2</sup>	6.55 <sup>2</sup>	Jarraud et al., 2001

After J.P. Rosec PhD thesis. 1999. Université de Montpellier II. Les staphylocoques entérotoxiques: étude épidémiologique de souches d'origine alimentaire et détection par PCR multiple.  
 \*Named SEK and SEL in Jarraud et al., 2001, renamed SEM and SEO, respectively, in a correction note published in *J. Immunol.* 166: 4260 (2001).  
<sup>1</sup>Length of the mature moiety determined by the authors after Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht, Soren Brunak and Gunnar von Heijne: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6 (1997).  
<sup>2</sup>Molecular weight and isoelectric point of the mature moiety determined by the authors using the software MWCALC, Infobiogen. [http://www.infobiogen.fr/services/analyse/cgi-bin/mwcalc\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services/analyse/cgi-bin/mwcalc_in.pl)  
 Nd, not determined.

Figura 3: Le Loir y col., 2003

Cabe señalar que la toxina inicialmente descrita como SEF (Bergdoll y cols., 1981), no es una auténtica enterotoxina dado que no posee la capacidad biológica in vivo de las verdaderas SE: no tiene efecto emético al carecer su molécula del bucle disulfuro y no es resistente a la pepsina. Por ser causante del Síndrome de Shock Tóxico (SST) ha pasado a denominarse TSST-1 (codificada por el gen *tst*). Al día de hoy se conocen las variantes ovina (TSSTov), cuya molécula difiere en 7 residuos de aminoácidos de la TSST-1 y la bovina (TSSTbov),

que antihigiénicamente es igual a la TSST - 1 humana pero el gen que la codifica difiere en 12 nucleótidos. Tanto las SE como la TSST son termoestables y resistentes a la inactivación por proteasas. Las enterotoxinas: A, B, D de origen humano y C descrita en caballos son antigénicamente diferentes pero comparten entre ellas propiedades biológicas y fisiopatológicas (Fueyo Mendoza, 2008)

Debe considerarse la descripción futura de otros tipos de PTSAg, conforme se secuencien, parcial o completamente los genomas de nuevas cepas de S. A. Por otro lado, está bien documentada la existencia de cepas con varios genes de PTSAGs. En algunos casos la presencia de varios genes (y producción de varias PTSAGs) es debida a su localización en un mismo elemento genético, en otros casos se debe a la acumulación de elementos genéticos diferentes en una misma célula bacteriana

Estas exoproteínas son ricas en lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, y tirosina. La mayoría de ellas poseen un bucle de cistina necesario para la adecuada conformación tridimensional y que probablemente esté involucrado en la actividad emética. Son proteínas muy estables, resisten la mayoría de enzimas proteolíticas, como la tripsina o la pepsina y por tanto, mantienen su actividad en el tubo digestivo después de la ingestión. También resisten la quimotripsina, renina y papaína. A las SEB y SEC<sub>1</sub> pueden recortárseles el bucle de cistina por una digestión con tripsina suave. La SEB puede ser destruida por la digestión por pepsina a pH 2, pero es pepsina resistente a pH más altos, que son las condiciones normales en el estómago después de la ingestión de alimentos. Las enterotoxinas son altamente resistentes al calor, además, que se cree que son más resistentes al calor en los productos alimenticios que en un medio de cultivo de laboratorio. No obstante, pueden ser inactivadas por los tratamientos térmicos utilizados en la esterilización de alimentos enlatados, cuando estén presentes en bajas concentraciones.

El tratamiento térmico en medio ácido por lo general da lugar a una pérdida de la actividad inmunológica y la consecuente pérdida de la actividad biológica. SEA y SED resultaron ser indetectable (pérdida de reconocimiento serológico), pero no obstante siguen activas (ensayo in vivo en gatos lactantes) después de un tratamiento térmico (Le Loir, 2003). La inactivación por calor de SEA, SEB, SEC se ha demostrado variable de acuerdo a la matriz alimentaria y al pH. Por lo tanto, es muy difícil prever el impacto del tratamiento térmico en la actividad de las enterotoxinas, ya que depende de tipo SE que

sea, concentración y la matriz alimentaria. Además, en algunos casos la inactivación por calor es reversible espontáneamente por un pH alcalino o por el tratamiento con urea. En suma, estos datos muestran que las SE resisten condiciones que fácilmente destruyen las bacterias que los producen lo que origina un serio riesgo y un problema de salud pública

### **PTSAg, una familia de Exotoxinas**

Los PTAGs son un grupo de exotoxinas secretadas por S A (aunque se reconocen y denominan también de esta forma a antígenos de *Streptococcus pyogenes*) que se han agrupado de esta forma porque comparten varias características biológicas (Bohach y cols. 1990).

La familia de PTSAGs incluye TSST-1 y la mayor parte de la enterotoxinas (SEA, SEB, SECn, SED, SEE, y SEH). Cada una de estas exotoxinas tienen por lo menos dos propiedades biológicas: **pirogenicidad, superantigenicidad**, además de la capacidad para aumentar la letalidad de endotoxina en conejos hasta 100.000 veces. Algunos PTSAGs poseen propiedades adicionales, por ejemplo, las Enterotoxinas son potentes agentes eméticos mientras que otros PTSAGs no lo son (Bergdoll, Schlievert, 1984), asimismo, TSST-1 es único en su capacidad para cruzar las mucosas.

La propiedad mejor caracterizada de los PTSAGs es la superantigenicidad, que se refiere a la capacidad de estas exotoxinas de estimular la proliferación de linfocitos T, sin respetar el antígeno específico de estas células (Marrack y Kappler, 1990). Los mecanismos moleculares que subyacen en otras propiedades compartidas o exclusivas de PTSAG son menos conocidos. Otras toxinas, SEG, SEH, y SEI o sus genes, *sej* y *sek*, también podrían ser PTSAGs o codificar PTSAGs; porque exhiben actividad superantigenica o secuencia de homología a PTSAGs conocidos. Además de sus similitudes funcionales, las toxinas PTSAGs comparten una serie de características genéticas y bioquímicas, como la mayoría de las proteínas secretadas por S A y se producen principalmente en la fase postexponencial de crecimiento.

### **Regulación Genética de la expresión de TSAgs**

Los genes de estas toxinas, son transportados por plásmidos, bacteriófagos o elementos genéticos heterólogos referidos a su patogenicidad aislada (Bohach. 1990). Estos genes tienen diferentes soportes génicos y la mayoría de estos son elementos genéticos móviles. Tabla 4.

Por ejemplo, **sea** es llevado por una familia de fagos (Betley y Mekalanos. 1985; Coleman y cols. 1989). El **seb** tiene localización cromosomal según algunos aislamientos clínicos, mientras que se ha encontrado en un plásmido de 750 kb en otras cepas de S A. La SEC<sub>bovina</sub> es codificada por un gen situado en una isla de patogenicidad y SEE es transmitido por un fago defectuoso.

El principal sistema regulador de control de la expresión de genes de factores de virulencia en S A es el **gen regulador accesorio agr** que actúa en combinación con el **regulador accesorio estafilocócico sar**. Algunos, pero no todos los genes de S E son controlados por el sistema de agr. Los genes *seb*, *sec* y *sed* se han demostrado ser agr dependientes, mientras que el *sea* y *sej* son independientes de agr. Investigaciones recientes demostraron que SEB, como TSST, tiene un **regulador negativo global** de transcripción de genes de exoproteínas, y que actúa a través del sistema agr dependiente del catabolismo. La expresión de agr está estrechamente vinculada al "quórum sensing" (Q S) la producción de las S E, dependientes de agr en los alimentos depende de la capacidad de las cepas de S A para aumentar a una alta densidad celular (estimado  $10^6$  ufc / g) en los productos alimenticios; indicando que los factores ambientales juegan un papel importante en la expresión de genes SE. (Dunman y col. 2001) En resumen, la regulación genética de la expresión de determinantes de virulencia y su expresión está controlada por al menos tres sistemas de regulación global: "Gen Regulador Accesorio *agr*", "Gen Regulador accesorio *sar*" y "Sistema de represión catabólica". El sistema regulador Q S es la regulación de la expresión génica en respuesta a fluctuaciones de la densidad celular. Las bacterias utilizan rutas de comunicación quórum sensing para regular diversas actividades fisiológicas incluyendo: simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, motilidad, esporulación y formación de biofilms (Miller y Bassler, 2001).

En S A el locus agr es el responsable del control de la expresión de numerosos determinantes de virulencia vía Q S (Jarraud et al., 2002). El agr, induce la expresión de exoproteínas, mientras suprime la expresión de la proteína de superficie a través de un

octapeptido de sensibilidad bacteriana o densidad bacteriana. Las proteínas de superficie son predominantemente sintetizadas durante la fase de crecimiento exponencial, y las proteínas secretadas se sintetizan durante la fase estacionaria. Esta expresión secuencial de los genes puede tener importancia clínica. Diferentes etapas de la infección estafilocócicas parecen requerir diferentes grupos de determinantes de virulencia. Durante las etapas iniciales de la infección, la expresión de proteínas de superficie que unen las moléculas de la matriz extracelular favorece el éxito la colonización de los tejidos huésped, mientras que la síntesis de exoproteínas favorece la propagación a los tejidos adyacentes. Esta hipótesis está apoyada por estudios en animales que muestran que la inactivación de genes reguladores reduce la virulencia bacteriana. (Cheung AL y col. 1994)

#### Localización y organización de los genes que codifican PTSAGs: profagos, plásmidos e islas de patogenicidad

Gene	Genetic location	Reference
sca	prophage	Betley and Mekalanos, 1985; Borst and Betley, 1994
scb	chromosome, plasmid, transposon	Shafer and Iandolo, 1978 Shalita et al., 1977; Altboum et al., 1985
scI	Plasmid	Altboum et al., 1985
sc <sub>bov</sub>	pathogenicity island	Fitzgerald et al., 2001
scd	plasmid (pIB485)	Bayles and Iandolo, 1989
see	defective phage	Couch et al., 1988
seg	<i>Enterotoxin gene cluster (egc)</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
sei	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
sej	plasmid (pIB485)	Zhang et al., 1998
sck	pathogenicity island	Orwin et al., 2001
sel	pathogenicity island	Fitzgerald et al., 2001
sem	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
sen*	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
seo*	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001

\*Renamed after the correction note published in *J. Immunol.* 166: 4260 (2001).

Tabla 4 Le Loir Y y col. 2003.

Actualmente, hay abundante información experimental sobre el soporte genético de muchos determinantes tanto de virulencia como de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas. (Kimpe y cols., 1995 ; Yarwood y cols., 2001 ; Dunman y cols., 2001; Cheung y cols. 1992) Estos determinantes han sido adquiridos por las bacterias hospedadoras por procesos de transferencia horizontal en los que participan elementos móviles y por tanto variables (transposones, fagos y plásmidos) que, además, se encuentran formando parte de "guarderías" o "clusters" de genes. La secuenciación de genomas parciales y completos de *S. aureus* ha permitido conocer la organización de genes en diferentes islas de patogenicidad, que inicialmente se denominaron específicamente SaPI (Novick y cols. 2001) y posteriormente **vSa**, donde "Sa" es abreviatura de *Staphylococcus aureus*. Siguiendo la propuesta de denominación de Baba, se ha hecho una clasificación (Schmidt y Hensel. 2004) que con la adición de datos complementarios tomados de (Gill y cols., 2005) se resume a continuación:

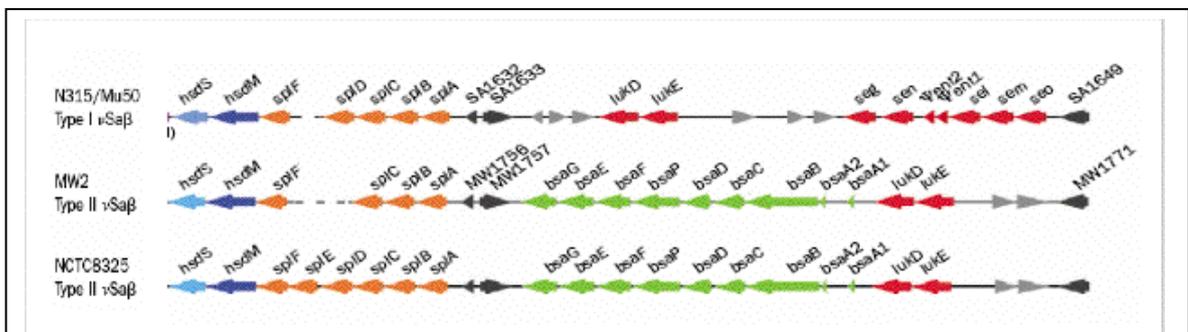
**i) Familia de las vSa**, donde v significa "isla", surge a partir del estudio comparativo del genoma de seis aislamientos de *S. aureus* que dio lugar a otras tantas subfamilias (vSa1, vSa2, vSa3, vSa4, vSa $\alpha$  y vSa $\beta$ ). Las islas vSa1 a vSa4 contienen genes de integrasas (*int*), elementos que le confieren la movilidad (se pueden escindir espontáneamente del cromosoma) y están flanqueadas por sitios att, datos que muestran su origen y relación con bacteriófagos. Por el contrario vSa $\alpha$  y vSa $\beta$  contienen genes que codifican transposasas, lo cual supone un claro indicio de la participación de transposones en el origen de las islas. Además, no se pueden escindir, lo cual es debido a la inactivación por delección parcial de los genes que codifican transposasas.

- vSa1- vSa4. La designación de vSa1 fue sugerida para un grupo de islas previamente descritas como SaPI y que contienen clusters con genes *SE* y/o TSST-1 (Figura 5).
- vSa $\alpha$ - vSa $\beta$ -vSa $\gamma$ . Una o más islas de esta sub-familia están presentes en las seis cepas de *S. aureus* secuenciadas

Se caracterizan por tener un número variable de ORF de distintos tamaños. vSa $\alpha$ , contiene 11 formas alélicas con genes *set* que codifican exotoxinas, y un cluster de genes de lipoproteínas. vSa $\beta$ , encontradas en cuatro genomas secuenciados con tamaño y composición de genes muy variable de un aislamiento a otro y tienen en común que llevan agrupaciones de genes de serin-proteasas. vSa $\gamma$ , se ha encontrado en las cuatro cepas secuenciadas, lleva varios genes de exotoxinas (*set*), así como los genes *eta*, *hly*, y *phenol* soluble modulín.

ii) **etd-PAI**, posee los genes *etd* y *edin-B* (Yamaguchi y cols. 2002). Esta isla también aparece en cepas no asociadas a casos de infecciones exfoliativas, y no aparece en las cepas MRSA cuyo genoma ha sido secuenciado (Gill y cols. 2005). Los genes de las enterotoxinas SEA, SEE, SEK, SEP, SEG<sub>2</sub>, así como los de la leucotoxina PV, y de la exfoliatina ETA han sido asociados con distintos bacteriófagos lisogénicos ó profagos a los que se denomina ΦSa, donde Sa indica *Staphylococcus aureus* (Novick . 2001). Recientemente, algunos autores han considerado a estos profagos como PAIs. (Gill y cols. 2005).

iii) **Familia de las SCCmecs**. Hace tiempo que se conoce que el gen de resistencia a la meticilina, *mecA*, pertenece a un elemento genético insertado en el cromosoma de los estafilococos (SCC, staphylococcus cassette chromosome) que, además, porta secuencias de plásmidos, transposones y otros genes de resistencia, variando de tamaño entre 2060 kb. Diferentes versiones de SCCmec han sido secuenciadas y se conoce la organización de sus genes (Gill y cols. 2005).



Estructura de las islas de patogenicidad de *S. aureus* del grupo vSaβ ó de las *serin proteasas* (*spl*). Las tres islas llevan genes para una leucotoxina (*lukD* y *lukE*) y la de Tipo I, los cinco genes de enterotoxinas que integran el agrupamiento *egc*. Tomado de Baba et al., 2002.

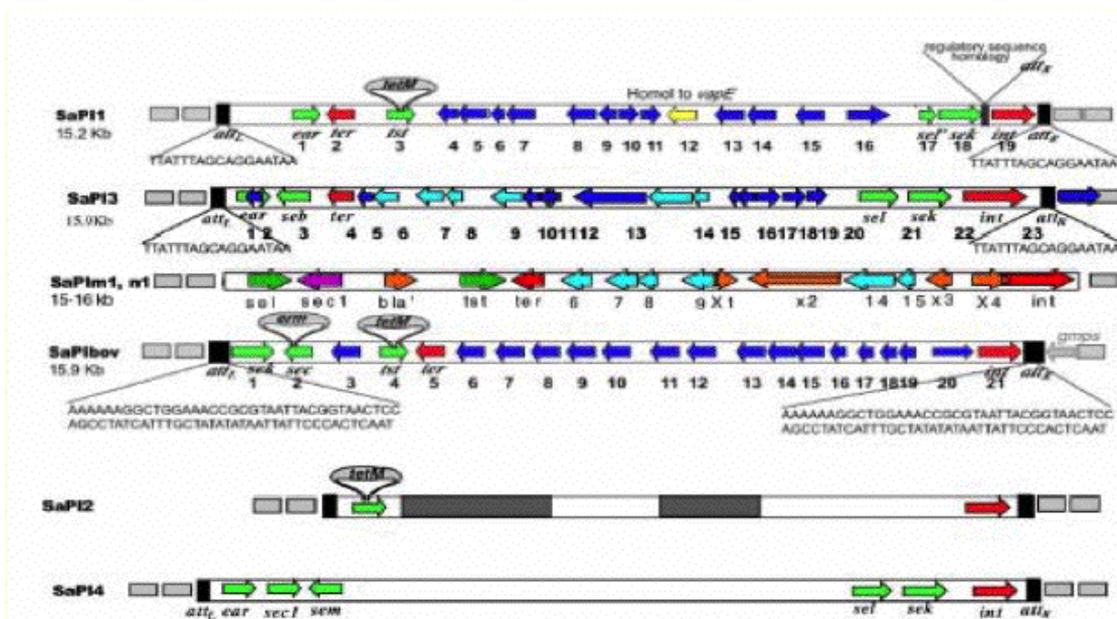


Figura 5: Tomado de Fueyo Mendoza 2008.

## Estructura Biológica de PTSAGs

Cada enterotoxina se origina a partir de un precursor de la proteína que contiene una secuencia amino terminal de señal de exportación, la cual es clivada durante la exportación desde la célula. Como se señaló, son pequeños polipéptidos no glicosilados, con pesos moleculares que van desde 20.000 a 30.000 Da y moderadamente estables a la inactivación química (proteólisis) y a la desnaturalización por calor (ebullición). La comparación de la secuencia de aminoácidos entre PTSAGs revela una identidad variable entre el 22 al 80% y curiosamente la homología primaria de secuencia no ha predicho la homología en sus estructuras terciarias, por ejemplo TSST-1, SEA, SEB, y SEC tienen muy similares estructuras tridimensionales. (Schlievert y col., 1995) Al comparar la estructura tridimensional de TSST-1, con SEA, SEB y SEC, es evidente que cada una de estas las proteínas se dobla en una estructura prototipo mayor. (Hoffmann y col. 1994) La ejemplificación hecha para la estructura básica para TSST-1 también se observan en otros PTSAGs, aunque estas toxinas tienen características adicionales. Este alto nivel de homología estructural no es sorprendente en vista de su relación funcional.

Estudios moleculares de las S E han demostrado que superantigenicidad y la capacidad de causar Intoxicación Alimentaria Estafilococica (SFP) son determinados por partes separadas de la proteína (Alberg y cols. 1990). Todas las toxinas identificadas hasta el momento comparten un número importante de propiedades incluyendo:

- I) la capacidad de causar emesis y gastroenteritis en un modelo de primates,
- II) superantigenicidad,
- III) intermedia resistencia al calor y la digestión por pepsina,
- IV) la semejanza estructural terciaria (incluyendo una unión disulfuro intramolecular).

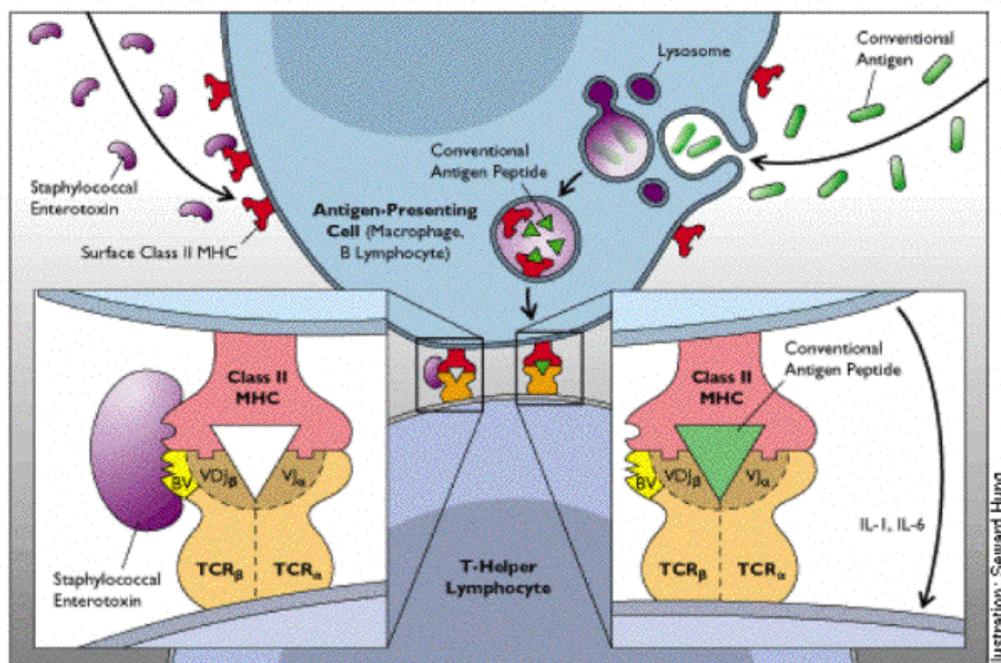
Ocho principales toxinas han sido identificadas con diversos grados avance en la investigación de sus estructuras y funciones. Se conoce la secuencia peptídica principal de todas estas toxinas y se observó que existe una importante similitud. En general, el 15% de los residuos son totalmente conservados en todas las S E conocidas. La mayoría de estos residuos se encuentran ya sean centralizados o en el C terminal. Con anterioridad al descubrimiento de SEG y SEI, las SE podrían dividirse en dos grupos, uno con SEB y de las

SECs y el otro con SEA, SEE, SED, y SEH. El segundo grupo es de cierto interés porque SEA y SEE son 84% idénticas en tanto SED y SEH son más lejanamente similares. La toxinas SEG parecen pertenecer al primer grupos (37 a 40% idéntica a SEB y SEC) y la toxina SEI al segundo grupo (26 a 28% idéntico al SEA, SED, y la SEE; 20,6% de similitud a la SEH)

A partir de cristalográficos surgieron una gran cantidad de datos interesantes sobre las estructuras de las S E. A partir de estos estudios se propuso que todas las S E se ajusten a un patrón común de proteína. La forma general de la molécula es elipsoide, y contienen dos dominios diferentes (A y B). El dominio **Dominio B** es el más pequeño y es común a otras exotoxinas. Existe un puente disulfuro (bucle) que se encuentra al final del dominio. La estructura resultante del bucle es flexible, aunque esto parece variar entre las S E pequeñas y medianas. El **Dominio A** es el más grande y contiene los aminoácidos amino y carboxi terminal. Aunque ciertamente hay algunas diferencias en las estructuras de las S E, las semejanzas son bastante notables. Las características estructurales particulares de las S E pueden originar su capacidad para inducir la intoxicación alimentaria estafilocócica (SFP) y su resistencia al cribado en el tracto gastrointestinal, cualidades que TSST-1 carece. (Dinges, 2000).

Es importante comprender la característica estructural para entender la actividad superantigenica (unión de la PTSAgs a la de MHC Clase II y el TCR). Sobre la base de varios estudios mutagénicos ha sido dilucidado un modo general TCR vinculante, considerando la conocida especificidad V $\beta$  de estas moléculas. La unión al TCR de las SEA, SEB, SEC se producen a través de la cavidad superficial en la parte superior de la molécula. Esta cavidad aparece para interactuar con los tres bucles de la V $\beta$  (CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub>, y HV<sub>4</sub>). La actividad superantigenica resulta entonces, de la interacción directa de las S E con receptores antígenicos (TCR) de células T y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígeno (APC). (Wahib Mahana, 1999) Las toxinas superantigenicas interactúan por el reconocimiento específico de cadenas V  $\beta$  del TCR, vinculando de forma cruzada el TCR del linfocito y el CMH clase II de la APC, lo que origina la activación. Parece ser que la interacción entre la S E y de MHC es primera y necesaria para unirse luego a la cadena V $\beta$  del TCR. De este vínculo cruzado resulta la activación inespecífica y proliferación de las células T, con una gran secreción de las interleuquinas que podrían estar implicadas en el mecanismo de toxicidad S E. A través de esta interacción, las S E activan células T en órdenes de magnitud por encima de la activación antígeno-

específica. La actividad emética de las SE no está tan bien caracterizada como actividad superantigenica. (Hamad y cols., 1997 ; Balaban y Rasooly, 2000). La actividad de la enterotoxina se caracteriza por la capacidad de S E, de causar respuesta emética, mientras que otros superantígenos no lo son eméticos (Dinges y cols. 2000). Poco se sabe acerca de cómo las S E causan síntomas de intoxicación alimentaria, a no ser que podrían tener un efecto directo sobre el epitelio intestinal y en el nervio vago, que causa la estimulación del centro emético y el tránsito del intestino. La dosis infecciosa requerida para inducir la intoxicación alimentaria estafilocócica en los seres humanos se estima en alrededor de 0,1  $\mu\text{g}$ , y puede variar en función de la sensibilidad del paciente (Evenson y cols., 1988).



. Modo de unión de un superantígeno y de un antígeno convencional a una cetula presentadora de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y a receptores de linfocitos T colaboradores (TCR). A diferencia de los antígenos convencionales (derecha) los superantígenos (izquierda) se unen a ciertas regiones de moléculas de una región del receptor específico del linfocito-T colaborador, llamada BV (previamente V $\beta$ ), que está fuera del hueco o lugar de unión del antígeno convencional. [Tomado de <http://www.hosprract.com/issues/2000/01/celeu.htm>].

Figura 7: Tomado de Fueyo Mendoza. 2008.

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TOXINAS ESTAFILOCOICAS. ACTIVIDAD DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCOICA. PATOGENESIS

Los PTSAgs a una concentración menores a  $10^{-12}$  M, pueden activar a una clase de linfocitos T (Linfocitos CD $_4^+$ ) para liberar citocinas (Interferon  $\gamma$ : INF  $\gamma$ ; Factor de Necrosis tumoral: TNF; Interlukina 1: IL1; entre otras), por lo tanto produce efectos sistémicos

importantes como fiebre, hipotensión, lesiones cutáneas, shock, falla multiorgánica y hasta la muerte. La unión a receptores de clase II del Complejo mayor de histocompatibilidad de los monocitos-macrófagos es en sitios diferentes de los clásicos surcos de unión antigénica (Jonson y cols., 1991) causa activación de la proliferación o, en algunas circunstancias inhibición de las funciones de las célula T. De esta forma pequeños focos de S A, productores de superantígenos, pueden llevar a una liberación espectacular de citoquinas con efectos sistémicos. (Beery y cols., 1984)

Los detalles de la supresión inmunológica no están totalmente dilucidados, pero las células T estimuladas proliferan y a continuación experimentan una rápida apoptosis, lo cual resulta en inmunosupresión generalizada junto con una deleción de numerosas células T en la periferia. La S E como superantígeno con acción en el sistema inmune pero con consecuencia sobre el endotelio yeyunal, origina una gastroenteritis. Se puede demostrar en un modelo murino SCID con SEB, (5 a 100 ug por inyección intraperitoneal en los segmentos de la mitad del yeyuno) La evaluación posterior morfológica el endotelio y por histoquímica e inmunohistoquímica para CMH clase II y CD3 de células T pone en evidencia la reducción de la altura de las vellosidades, aumento de la profundidad de las criptas y aumento significativo de la expresión del CMH y aumento de las células CD4 +. Esto muestra que la activación del sistema inmune por superantígenos causa importantes cambios en las vellosidades reynales, criptas, arquitectura y celularidad. Además se ha demostrado que la acción de los superantígenos induce una muerte celular programada (apoptosis) en la mayoría de las células CD4+. La unión del CMH II, TCR y superantígeno induce un aumento del Ca<sup>++</sup> intracelular y la transcripción de varios genes de citocinas (IL2 y IL4, y GM-CSF) , la muerte celular de las células T por superantígenos es originada por mecanismos CD11a/CD18 dependiente. (Haslinger y cols., 2003)

Se sabe que el objetivo de la respuesta a las S E, para iniciar el reflejo emético se encuentra en el vísceras abdominales, donde existe receptores putativos para S E. (Sugiyama y Hayama, 1965). Algunos de estos receptores aún no han sido identificados y existe incertidumbre con respecto a los primeros acontecimientos en la patogenia de la Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (S F P). Una de las principales hipótesis es que la emesis se produce en respuesta a una inflamación S E-inducida. Los síntomas de la SFP son altamente correlativos con la generación de una serie de mediadores inflamatorios, incluyendo prostaglandina E2, leucotrieno B4, y ácido 5-hydroxyeicosatetraenoico.

También han sido implicados como críticos mediadores en la SFP, cisteinil leucotrienos y leucotrienos E<sub>4</sub>. No está claro si estos mediadores se generan directa o indirectamente, en respuesta a las SE. En última instancia la respuesta emética a la SE depende de la activación del centro emético medular en el tronco cerebral que es estimulada por impulsos transmitidos a través del vago y nervios simpáticos. Varios grupos han propuesto que mastocitos celulares son una de las fuentes primarias de mediadores inflamatorios liberados durante SFP. Una hipótesis actual es que la SE desencadena la degranulación de los mastocitos a través de su unión a los receptores directos de estas células y no a través de la típica mediada por la inmunoglobulina-E del proceso de activación de los mastocitos. (Komisar y cols., 1992). Aunque se encontró que SEB no induce directamente, en mastocitos de mono, la liberación de mediadores de la inflamación. Estos hallazgos indican que la activación de los mastocitos in vivo requiere de uniones SE y señales adicionales coestimuladoras. Alternativamente, se ha propuesto un modelo neurogénico en el que las células son estimuladas por neuropéptidos liberados de los nervios sensoriales. La sustancia P es un péptido activador putativo de mastocitos que se ha sido implicado en la toxicidad inducida por SEB (Gottfried y cols., 1989). Sin embargo esto no se demostró experimentalmente. En conclusión, de confirmarse el papel en la SFP de los mastocitos, deben ser aclarados los mecanismos a través de la cual la se promueve la degranulación de estos.

La diarrea inducida por enterotoxinas es atribuida a la disminución de la absorción del agua desde la luz del intestino y a un aumento simultáneo de la secreción de ésta y de sales minerales desde las glándulas intestinales en un mecanismo mediado por 3-5 AMP. Se considera que valores menores de 1,0 µg de enterotoxina en 100 g de alimentos son suficientes para inducir síntomas clínicos en individuos susceptibles (Bécquer Lombard y cols., 1996)

---

RESERVORIOS Y HOSPEDADORES SUSCEPTIBLES. DETERMINANTES DEL HUÉSPED Y ACCIÓN PATOGENICA. FACTORES PREDISPONENTES A LA INFECCIÓN Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

**Reservorios y huéspedes susceptibles.**

La colonización por *S. aureus* de los individuos probablemente comienza poco tiempo después del nacimiento. El neonato es colonizado por SA a partir de su entorno humano inmediato (Velásquez Meza, 2005). Los sitios principales son el muñón del cordón umbilical, el área perineal, la piel y eventualmente el tracto gastrointestinal. Con el crecimiento del niño los nichos ecológicos más importantes son las fosas nasales anteriores y garganta. (Bergdoll y cols., 1989). En el individuo adulto se coloniza preferentemente la nasofaringe, piel y mucosas. (ICMSF, 1996 ; Musser y cols., 1990) Se han determinado 3 patrones de portador: a) aproximadamente el 20% de los individuos porta siempre al menos una cepa portadores persistentes. ; b) la mayor parte, un 60 % porta intermitentemente cepas de SA , esta intermitencia y su frecuencia varía con las cepas ; c) el resto, 20 %, son no portadores. Es más frecuente la portación en niños que en adultos y algunos individuos cambian su estado de portación entre los 10 y 20 años. Las razones del estado de portación son desconocidas. (Kluytmans y cols., 1997) Los otros reportes indican que los seres humanos adultos sanos están colonizados en un 30 a 50 % con SA (reservorio natural de SA), con 10 a 20 % de colonización persistentemente. (Casewell y cols., 1986) Son aislados persistentemente colonias tanto las meticilina-sensibles como resistentes a la meticilina. (Sanford y cols., 1994) Las personas colonizadas con SA tienen un mayor riesgo de infecciones posteriores. (Wenzel y Perl, 1995) Valores de colonización por estafilococos son altos entre los pacientes con diabetes tipo 1, usuarios de drogas por vía intravenosa, los pacientes sometidos a hemodiálisis, los pacientes quirúrgicos y pacientes con SIDA. (Weinke y cols., 1992) Los pacientes con defectos cualitativos o cuantitativos de la función leucocitaria también están en mayor riesgo de enfermedad estafilocócica. La portación nasofaríngea de SA es un hallazgo común, no obstante para los manipuladores de alimentos y personal hospitalario constituye un serio problema (Figueroa y cols., 2002). Se han realizado varios estudios que evalúan la erradicación de esta portación mediante terapia antibiótica, pero sin buenos resultados (Kluytmans y cols., 1997). Hasta el momento, la terapia más efectiva ha sido la aplicación tópica de mupirocina, aunque se ha visto que la erradicación no es definitiva, ya que una gran proporción de los tratados vuelve a colonizarse. Es importante vigilar los perfiles de resistencia que presentan las cepas aisladas de la comunidad debido al aumento que han experimentado las cepas multirresistentes, como las cepas meticilino resistentes (MRSA) que originan brotes de ETA por intoxicación alimentaria estafilocócica. (Jones y cols., 2002) A partir de los lugares que coloniza, este microorganismo puede contaminar los alimentos, de forma directa o indirecta (Jay, 1993)

## Determinantes del huésped y acción patogénica. Factores predisponentes a la infección.

Es importante señalar que la mayoría de las enfermedades provocadas por *S. A.* resultan de la acción combinada de varios determinantes de patogenicidad con diversas funciones: adherencia, invasión de tejidos, evitar la fagocitosis y toxigenicidad. En el desarrollo y pronóstico de la enfermedad, también son factores determinantes los dependientes del hospedador.

Considerando la “**virulencia**” como la capacidad relativa de un microorganismo para producir enfermedad, vinculándosela a dos aspectos principales de la acción del parásito sobre su huésped, la posibilidad de **invadir** y la de **producir daño** por la acción de productos de exportación. Los “factores de virulencia” están presentes de manera significativa en *S. A.* (Yarwood y cols., 2001). Tabla 5. Las exotoxinas (entre ellas los PTAGs), producidas por *S. A.* contribuyen a establecimiento y mantenimiento de la enfermedad. Estas proteínas, son conocidas como “factores de virulencia” y viajan por el torrente sanguíneo produciendo daño en zonas apartadas del foco infeccioso.

Patologías clínicas asociadas a la colonización/infección por <i>S. aureus</i>
<b>Estado de portador</b> : nasofaringe, piel, vagina, etc
<b>Infección directa</b> Piel: foliculitis, ántrax, impetigo, hidradenitis, celulitis, abscesos, infecciones de heridas, etc. Infecciones de heridas profundas, a menudo después de traumatismos, , cirugías, inserción de cuerpos extraños, bursitis, artritis, osteomielitis
<b>Infección hematológica secundaria a infección directa</b> Bacteriemia/sepsis Infección metastásica: artritis, osteomielitis, meningitis, endocarditis, pericarditis, absceso pulmonar, etc.
<b>Enfermedad mediada por toxinas, en asociación con estado de portador o infección directa</b> Síndrome de piel escaldada Síndrome de Shock Tóxico Intoxicación alimentaria
<b>Tabla 5:</b> Tomado de Fueyo Mendoza, 2008, Mandel et al 2000; Asier 2001; Peacock et al 2002.

La acción de *S. A.* (o la acción de los factores de virulencia) sobre el huésped implica una serie de interacciones entre el microorganismo y una serie de estructuras y mecanismos del huésped. Estas interacciones pueden identificarse como Adhesión, Invasión, Quimiotaxis, Opsonización, Destrucción celular.

*Adhesión de S A:* Toda colonización de un huésped por un microorganismo requiere de una adherencia inicial a las células de aquel. Se deben considerar tres tipos de adherencia, a) la adherencia a las células mucosas de la matriz es mediada por el componente del ácido teicoico de *S aureus* y por una variedad de otros ligandos, b) la adhesión de *S aureus* a la piel traumatizada o con solución de continuidad, a los cuerpos extraños y a estructuras endoteliales involucran la interacción con muchas proteínas de la matriz extracelular, siendo las más importantes el fibrinógeno, laminina, trombospondina, vitronectina, elastina, sialoproteína, y colágeno. Las interacciones estudiadas con mayor detalle involucran la fibronectina, el fibrinógeno, el colágeno, y elastina en las que los dominios activos de las proteínas del huésped han sido caracterizados y su cobertura muestra modular la adherencia de *S A*. Los ligandos de *SA* en el caso de estas proteínas del huésped también han sido caracterizados y son, proteína fijadora de fibronectina, A y A, factor de agrupamiento, proteínas fijadoras de colágeno, y proteínas fijadoras de elastina. Los sucesos postadhesión son de particular importancia aquí, como la fagocitosis de *S A*, por células endoteliales y la inducción del factor tisular procoagulante.

*Invasión:* La invasión que sobreviene luego de la adhesión y colonización requiere de una penetración del microorganismo a través de la superficie epitelial o mucosa, sin embargo se conoce poco sobre los mecanismos biológicos que se oponen a ella.

*Quimiotáxis:* Una vez que *S A* ha penetrado la capa mucosa o epitelial del huésped, la mayor línea de defensa está constituida por los PMN y por el Sistema Monocítico Macrofágico. La movilización de células al lugar de invasión requiere de señales específicas tanto de parte del microorganismo como del huésped. Entre las primeras se encuentran involucrados con certeza los productos de *S A*, asociados a la pared celular. Las señales del huésped se vinculan a la activación del Sistema Complemento y a la activación de  $C5a$  por los componentes de la pared celular de *S A*.

*Opsonización:* El reconocimiento de *S A* por los fagocitos es mediado por sus receptores para el fragmento Fc de la IgG, por parte de los receptores para la subunidad activa del tercer componente del Sistema Complemento el  $C3b$ . Este proceso de reconocimiento implica que *S A*, para ser ingerido debe estar recubierto por  $C3b$ , IgG o ambas, este proceso se llama opsonización.

*Destrucción celular:* Luego de ser fagocitados casi todos los S A intracelulares son destruidos rápidamente dentro de las vacuolas de los fagocitos, más allá de la persistencia de unos pocos microorganismos intracelulares. Se ha demostrado que el mayor responsable de la destrucción son los mecanismos bactericidas dependientes de oxígeno:  $O_2$  y  $H_2 O_2$  entre otros radicales. (Franklin Lowy, 1998)

## Manifestaciones clínicas en el hombre

Las patologías clínicas asociadas a colonización-infección por SA son las descritas. El exudado piógeno o un **absceso** es la lesión anatómica básica inducida por S A. La infección directa por rotura profunda de la piel u otra lesión, así como el drenaje de abscesos al medio interno, los catéteres, las heridas accidentales o quirúrgicas, pueden permitir que las bacterias atraviesen las defensas del organismo y causen una **infección sistémica** (septicemia e infecciones metastásicas). A veces, tras la diseminación septicémica se producen cuadros clínicos mixtos o complejos. Además, en ciertas circunstancias la producción de exotoxinas puede tener lugar y provocar **toxemia** o toxinosis (Dinges y cols. 2000). Los individuos proclives a las infecciones estafilocócicas son los recién nacidos, las mujeres en período de lactancia, las personas con enfermedades crónicas (especialmente afecciones pulmonares, diabetes y cáncer), las que presentan afecciones cutáneas e incisiones quirúrgicas y aquellas cuyos sistemas inmunológicos están inhibidos por el uso de corticosteroides, radioterapia, fármacos inmunodepresores o medicaciones anticancerosas. S A es un importante patógeno tanto nosocomial como comunitario, siendo capaz de infectar distintos tejidos y órganos, causando patologías que a veces son extremadamente graves, y en algunos de los cuadros clínicos pueden estar implicados un amplio espectro de factores de virulencia (Dinges y cols., 2000). Las enfermedades mediadas por toxinas pirogénicas superantígenos pueden estar asociadas al estado de portador o a episodios de infección directa. El **síndrome estafilocócico de la piel escaldada (SSSS)**, es causado por cepas que están presentes en zonas localizadas de infección (nasofaringe principalmente, ombligo, aparato urinario, abrasiones superficiales, conjuntiva y sangre). Las manifestaciones clínicas están mediadas por la diseminación hematógena de las toxinas exfoliativas, en ausencia de anticuerpos antitoxina específicos. Los pacientes generalmente son menores de seis años de edad, con el antecedente de una

infección clínica o subclínica por estafilococo y que presentan fiebre y amplias zonas eritematosas muy sensibles. En la piel escaldada, la piel se descama en láminas dejando áreas desnudadas; comúnmente se afectan las regiones peribucal, genital y torácica, pero puede comprometerse cualquier parte del cuerpo, mientras que en el **impétigo** tiene lugar la formación de pequeñas ampollas llenas de pus (pústulas). Son enfermedades de distribución mundial, que surgen esporádicamente en los hospitales, el reservorio del agente infeccioso es el ser humano y el modo primario de transmisión es la diseminación por medio de las manos. La incubación comúnmente es de 4 a 10 días y el período de transmisibilidad, mientras persistan las lesiones (Mandell y cols. 2000). El **síndrome del shock tóxico (SST)**, describe un conjunto de síntomas que comprometen diversos sistemas del cuerpo y cursa con fiebre alta, hipotensión, inflamaciones, erupciones cutáneas diseminadas, disfunción multiorgánica y ocasionalmente muerte. La mayor parte de las manifestaciones clínicas están mediadas por la diseminación hematógena de la toxina TSST-1 en ausencia de anticuerpos antitoxina específicos. El SST se identificó por primera vez a finales de la década de 1970 y a principios de la década de 1980, cuando el uso de tampones de gran absorción durante la menstruación estaba muy difundido. La sangre y el mucus vaginal favorecen el desarrollo de las cepas de estafilococos constituyentes de la microbiota vaginal, el tampón concentra el material y facilita la colonización. Debido a los cambios en la fabricación de los tampones y su uso, la incidencia del SST inducido por tampón ha disminuido, siendo actualmente raro. Sin embargo, se siguen considerando poblaciones de riesgo de SST las personas sometidas a operaciones de cirugía, individuos con diabetes, SIDA, enfermedad pulmonar crónica o enfermedad cardíaca (Mandel y cols., 2000). El Síndrome de Shock tóxico, a diferencia de la gastroenteritis causada por las S E, no se ha asociado con el consumo de alimentos. Sin embargo, su presencia en los alimentos puede indicar una posible fuente de propagación de esta enfermedad para los seres humanos. La **intoxicación alimentaria estafilocócica** resulta del consumo de alimentos en los que S A se ha multiplicado por encima de  $10^5$  ufc/ g y producido enterotoxinas. Como ya se dijo, las S E son resistentes al calor (desde 5-10 minutos a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta varias horas a  $80\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a la radiación gamma (valores D entre  $2.793\text{ kGy}$ ) y a la acción de las proteasas intestinales como la pepsina. La cantidad necesaria de enterotoxina requerida para causar la intoxicación es muy pequeña del orden de  $0,5\text{ }\mu\text{g /kg}$  en monos, siendo para éste la dosis emética del orden de  $0,2\text{ }\mu\text{g /kg}$  en el hombre. Este nivel se alcanza en poblaciones de S A mayores de  $10^5$  células por gramo (Balaban y Rasooly, 2000; Mossel y cols., 2002; <http://>

vm. cfsan. fda. gov/ ~mow/ chap3.html). El cuadro clínico se caracteriza por un período de incubación de entre 2 y 6 horas, y una sintomatología de náuseas, vómitos violentos, dolor abdominal, seguido de diarrea profusa. Aunque realmente no es grave en el sentido clínico y sólo rara vez termina en muerte; sí es muy desagradable y causa una incapacidad total durante cierto período de tiempo. A diferencia de otras enterotoxinas bacterianas las SEs no actúan directamente sobre el revestimiento del tracto intestinal, causando acumulación de líquido en asas intestinales ligadas. Actúan como superantígenos sobre el receptor de los linfocitos T colaboradores en el intestino y sobre centros nerviosos del intestino. La capacidad emética es la que las diferencia de otras PTSAgs. (Mandell y cols. 2000). La mayor parte de los brotes descritos hasta la fecha han sido causados por cepas que producían SEA y/ o SED (Jay, 1994; Suzuki y cols., 1999; Mossel y cols., 2002; Le Loir, 2003; Wei y Chiou, 2002). El descubrimiento en los últimos años de muchas SE lleva a pensar que algunas de ellas podrían ser tan o más frecuentes, como causa de intoxicación que las toxinas clásicas (Jarraud y cols., 2001 ; Ikeda Tetsuya y cols., 2005). Se debe tener en cuenta además que la toxigenicidad no está relacionada directamente a la producción de coagulasa por las cepas de *Staphylococcus*. Cepas coagulasa negativas han sido descritas por varios autores y se vincularon con numerosos brotes de intoxicación alimentaria (Rapini y cols. 2005)

El tratamiento y prevención de las infecciones estafilocócicas merece un párrafo aparte. La elección de un antibiótico depende del lugar de la infección, la gravedad de la enfermedad y cuál de los antibióticos elimina las bacterias con mayor eficacia (Mandell y cols., 2000). Para la mayoría de las infecciones cutáneas, los antibióticos orales como la cloxacilina y la eritromicina resultan adecuados. Las infecciones más graves, en especial las de la sangre, requieren terapia intravenosa, en general durante 6 semanas. En estos casos se utilizan, en cepas sensibles a meticilina: amoxicilina-clavulánico, cefalosporinas, imipenem, fluorquinolonas, y clindamicina; y en cepas resistentes a meticilina: linezolid, quinupristina-dalfopristina, trimetoprim-sulfametoxazol y glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina). Para eliminar el estado de portador, la mupirocina, sola o en combinación con la rifampicina o el trimetoprim-sulfametoxazol resulta eficaz (Mandell y cols. 2000). La intoxicación alimentaria no se trata con antimicrobianos, dado que es causada por toxinas preformadas en el alimento colonizado por S A.

La prevención de infecciones estafilocócicas es problemática dado que muchos individuos son portadores asintomáticos, y algunas enfermedades (como la foliculitis) se pueden contraer por simple contacto cutáneo. En algunas actividades (cuidado de niños en guarderías, cuidado de ancianos, funciones de enfermería en hospitales, así como manipulación de alimentos) las personas portadoras deben de ser excluidas o tratadas con antimicrobianos para eliminar su estado de portador. Esto es debido a la fácil transmisión por contacto persona a persona o por elementos inertes (agujas, catéteres, utensilios o aire contaminado) hechos que facilitan la aparición y diseminación de cepas categorizadas como nosocomiales. Existe una fuerte evidencia de que una alta proporción de los casos de bacteriemia por *S. A.* parecen tener un origen endógeno por cepas presentes en la mucosa nasal del enfermo, dato que apoyaría el establecimiento de tratamientos de erradicación preventiva.

---

## EPIDEMIOLOGÍA

Como se vio, *S. A.* es un patógeno ampliamente difundido y que produce un amplio rango de enfermedades humanas a través de sus factores de virulencia (Jarraud y cols., 2001)

### Transmisión

*Staphylococcus aureus* es uno de los agentes etiológicos más importantes de la Toxiinfecciones Alimentarias o Enfermedades Transmitidas por Alimentos "ETA" (Bea y cols., 1996), señalado entre los principales problemas de salud pública de las Américas y donde los alimentos contaminados son fuentes importantes de contagio (Almeida y cols., 1996). Se debe tener en cuenta que la Enfermedad Diarreica Aguda es la principal causa de muerte en niños menores de 5 años en los países en vías de desarrollo. (EDA 19 %, IRA 19 %, Sarampión 17 %) (Mazzi y cols., 1999). **La Diarrea Aguda Infecciosa DAI es la segunda causa de morbi-mortalidad mundial y la OMS calculó durante 1996, unos 4.000 millones de casos, con 2.5 millones de muertes, la mayoría en niños de países en desarrollo.** Ver Tablas 6 y 7. En Europa se estima una incidencia media de 1 episodio/persona/año. (Carretero y cols., 2003) Se considera que dos factores han contribuido a complicar el problema en el mundo occidental últimamente: a) La industrialización de la comida que ha alterado el patrón epidemiológico, con dispersión de los casos en el tiempo y en el espacio

dificultando el pronto reconocimiento de los focos epidémicos; b) el uso indiscriminado de antibióticos en seres humanos y animales como tratamiento, esto empeora el diagnóstico en la DA y ha producido un incremento alarmante de cepas resistentes, con aumento de casos secundarios y disminución de coprocultivos positivos (por lo tanto la declaración de estos casos como negativos).

<b>VIRUS</b>	<b>BACTERIAS</b>	<b>PROTOZOOS</b>
Rotavirus	<i>Salmonella sp</i>	Giardia Lambia
Calicivirus (V. Norwalk)	<b><i>Staphylococcus Aureus</i></b>	Criptosporidium(3)
Adenovirus	<i>Campylobacter</i>	Cyclospora (3)
Citomegalovirus	<i>Escherichia Coli</i>	Isospora Belli (3)
Virus E. Barr	<i>Y enterocolitica</i>	
	<i>Shigella</i>	
	<i>Clostridium Perfringens</i>	
	<i>Bacillus Cereus</i>	
	<i>Vivrio Cholera, Parahemolico</i>	
	<i>Vibrio Vulnificus</i>	

Tabla 6. clasificación de los agentes etiológicos de Diarrea Aguda Infecciosa.

<b>Fuente</b>	<b>Agente etiológico</b>
Lácteos no pasteurizados	<i>Salmonella, C Yeyuni, Yersinia</i> <i>Listeria Monocitogenes.</i>
Aves (pollos) y huevos	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> <i>Salmonella, Campylobacter</i>
Carne poco cocinada	<i>E.Coli EnteroHemorráca</i> <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>
Marisco, pescado crudo	<i>Listeria Monocitogenes</i> <i>Vivrio Parahemolítico,</i> <i>Vibrio Vulníficus</i>
Quesos blandos estilo francés	<i>Listeria Monocytogenes</i> <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>

Tabla 7. Alimentos vehículo de diarreas infecciosas.

Las personas colonizadas con cepas de S A, como se ha dicho, tienen mayor riesgo de infectarse con estas cepas. La mayoría de los casos de infección nosocomial se adquieren a través de la exposición a las manos de los trabajadores de la salud después de que han sido colonizadas transitoriamente con estafilococos de sus propios reservorios o por el contacto con un paciente infectado. Los brotes también pueden resultar de la exposición a un único operador a largo plazo del medio ambiente o de las fuentes, pero estas formas de transmisión son menos comunes. (Sanford y cols., 1994)

Aunque la causa más probable de DA sean las infecciones, solo se identifica el germen causal en una minoría de casos. La transmisión sigue generalmente la ruta fecal-oral. En países con condiciones de salud pública pobres, con higiene deficiente, en guarderías y otros centros cerrados la diseminación suele ser persona a persona. Los brotes epidémicos se producen por ingesta de aguas o alimentos contaminados.

Los estudios de Vigilancia Alimentaria determinan que, la presencia de enterotoxina estafilocócica y/o conteo bacteriano elevado, no guarda relación con las alteraciones físicas o químicas en los alimentos. Esto agrega un grado de complejidad mayor al control y fiscalización de alimentos, ya difícil debido a cambios en las costumbres socioculturales (tipos de alimentos, modos de cocinarlos, lugares donde se consumen, etc). Vinculados directamente a los problemas sanitarios más importantes que amenazan a la población mundial, los alimentos contaminados tienen un impacto comercial considerable, ya que la globalización, la intensificación de los intercambios de productos y los desplazamientos de las personas son responsables en no escasa medida de la propagación y agravación de las enfermedades, del aumento del número de brotes infecciosos y de la complejidad de las patologías existentes. Por esto Actualmente se considera que los alimentos son la mayor fuente de exposición a riesgos debido a la presencia de agentes patógenos, tanto químicos como biológicos, que afectan sin distinción el nivel de desarrollo de los países. (Rodríguez y Matamoros, 2001).

### **Reportes epidemiológicos de Intoxicación Alimentaria estafilococica (SFP/IAE). Tendencias de la enfermedad**

En los Estados Unidos, cada año, ocurren entre 3,3 y 12,3 millones de casos de infección, estimándose pérdidas económicas anuales que oscilan entre 6,5 y 34,9 miles de millones de dólares EE.UU., entando SA entre los agentes etiológicos más importantes (OMS. 1997b ; Hernández Lezama FAO/OMS ; Timothy . 2000 ; CDC. 2006)

En América Latina, un estudio evaluó la contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública de las principales ciudades, determinándose que SA es el mayor riesgo en ocasionar un brote de ETA. (Almeida C. 1996)

Los estudios de Vigilancia Alimentaria realizados en Cuba determinan que SA es una causa importante de ETA (mayor al 30% de los reportes realizado). (Rodríguez y Matamoros . 2001)

En Chile el Programa de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos, indica que en la Región Metropolitana SA tiene una alta incidencia de los brotes de origen alimentario. (Prado Jiménez y col. 2002)

En Brasil se indica según reportes de datos obtenidos en el Municipio de Porto Alegre en el período de 1995 a 2002 que SA es el segundo agente etiológico de ETA en importancia. (Gotaardi. y col. 2006)

En Europa la situación es similar, en Francia los reportes indican que los estafilococos toxigénicos son la segunda causa de las enfermedades transmitidas por alimentos después de la *Salmonella*, sin embargo, se sabe muy poco acerca de las características de las cepas involucradas. (Kérouanton A y col. 2007)

En el Reino Unido fueron examinados las cepas de *Staphylococcus aureus* responsables de brotes entre 1969 y 1990 en el Laboratorio de Higiene de alimentos PHLS. El 79 % de estas resultaron ser productoras de una o más enterotoxinas. La carne, la volatería o sus productos eran el vehículo en el 75 % de incidentes con el jamón y el pollo el más con frecuencia implicado. El setenta y un por ciento de las cepas de incidentes era lisados por fagos de grupo III o I/III. ([Wieneke](#) y col. 1990)

En Polonia las infecciones e intoxicaciones por alimentos se registraron mostraron una incidencia media en el período 1998-2001 69,6/100.00. Entre los agentes etiológicos más frecuentes en los brotes esta, *Staphylococcus aureus* (10,0% de los casos). El principal vehículo de los alimentos y el agua son los brotes de diversas comidas preparadas (> 2) las materias primas de origen animal (29,2% de los casos), las comidas de huevos (27,6%). (Sadkowska y col. 2003)

En Italia la investigación puso de relieve que estos organismos son muy comunes y constituyen un riesgo potencial para la salud de los consumidores. (Normanno y col. 2005)

En España los brotes registrados por la Red de Vigilancia indican que SA es el segundo agente más frecuentemente reportado y confirmado en brotes de ETA (Hernández y cols. 1995)

En Japón fueron reportados entre 1980 y 1999, 2.525 aislamientos de brotes alimentarios que involucraron 59.964 personas con 3 muertes. Los alimentos involucrados fueron preparaciones típicas japonesas. (Shimizu y col. 2000)

Todos los estudios demuestran que cada año se incrementa la morbilidad tanto de las EDA como de las ETA. Esto revela la ineficacia de las acciones sanitarias en esta decisiva área de la salud pública. (Scott E. 2003)

En Argentina los datos existentes son escasos, entre los reportes consultados se destaca que SA es la segunda causa de ETA entre 1993 y 2001 en la provincia de Río Negro (Di Pietro S y col. 2004)

Los antecedentes que se analizaron en la Provincia de Santa Fe son los vinculados a los hallazgos en el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud, en laboratorios de Hospitales de la provincia y en el laboratorio de alimentos de la Agencia de Seguridad Alimentaria, del Ministerio de Salud de Santa Fe. La información disponible sobre los eventos vinculados a SA, es escasa y fragmentada por diferentes motivos que escapan a la intención del presente trabajo. En este sentido se ha realizado un relevamiento de las siguientes fuentes:

Laboratorios de Hospitales: Se carece de información consolidada para este agente etiológico. Se tratan como eventos particulares y eventualmente se reportan científicamente si es importante el hallazgo.

Epidemiología Provincial: Se carece de información consolidada para este agente etiológico. Se reportan eventualmente los L2, C2 y se confeccionan los boletines epidemiológicos provinciales, de acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, que especifica puntualmente los eventos a reportar. La intoxicación alimentaria estafilocócica (SFP) se encuentra entre las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos.

Bromatología Provincial: Se ha trabajado en diferentes casos y brotes originados presuntamente por S A. En su totalidad se relevó información epidemiológica, y se analizaron alimentos vinculados al brote.

El análisis del alimento en los brotes evaluados arrojó la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo. La presencia de toxinas en el alimento o la producción de toxinas de las cepas aisladas no se realizan por protocolos de análisis reconocidos. La falta de disponibilidad de los recursos tecnológicos necesarios (equipamiento y reactivos para la identificación de la presencia de toxinas o la existencia de genes productores de toxinas) impide la evaluación integral del evento. La puesta en evidencia de enterotoxinas mediante pruebas biológicas (Dean y col.1968 ; Duncan C y col 1968) se realizó eventualmente y en brotes específicos, con las debidas reservas.

### **Marco legal de Epidemiología.**

En nuestro país se define en 1960 con la sanción de la Ley 15.485 "De Notificaciones Médicas Obligatorias" (actualizaciones 1966 y 1979), un nuevo agrupamiento de enfermedades. Posteriormente (en 1993) se revisaron los conceptos generales e instrumentos de vigilancia incorporando las Normas del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. En esta legislación el concepto de Vigilancia Epidemiológica es "la recolección y análisis de los datos registrados en forma sistemática, periódica y oportuna, convertidos en información integrada estrechamente con su divulgación a quienes tienen la responsabilidad de intervención y a la opinión pública". Tiene el propósito de "identificar hechos sobre el estado de salud de las poblaciones con la finalidad de intervenir precozmente en el control de los problemas de salud y asimismo aportar conocimientos integrales para la planificación, ejecución y evaluación de las acciones en salud. Dentro de sus objetivos están "lograr datos sobre eventos en la población y factores que la condicionan para luego facilitar la información para su utilización en forma oportuna" y "conocer de manera continua el comportamiento epidemiológico de las patologías seleccionadas sujetas a vigilancia para ejecutar medidas eficaces y oportunas de intervención".

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, (SI.NA.VE) esta conformado por subsistemas generales y específicos. El Subsistema General, corresponde a la consolidación semanal de la información de enfermedades de notificación obligatoria con datos de laboratorio según corresponda. El Específico, comprende la notificación de enfermedades a través de fichas específicas (con información de laboratorio) y son : Parálisis flácida, aguda, sarampión, meningitis, hantavirus, cólera, dengue, , tétanos neonatal, rabia, hepatitis,

paludismo, , brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, infecciones hospitalarias, síndrome urémico hemolítico, botulismo, enfermedades respiratorias a través de unidades centinelas, diarreas virales y centros de referencia para enfermedades diarreicas.

El SI.NA.VE. presenta una lista de "Enfermedades Notificables" , indica una modalidad de notificación y una periodicidad de esta. Las intoxicaciones alimentarias son tomadas en conjunto y se detalla su notificación en el Manual de Normas y Procedimientos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica VIGI+A. 2000. Los brotes Intoxicación Alimentaria Estafilicocica deben ser notificados como "Toxiinfecciones Alimentarias", definidos en sus aspectos generales y particulares y notificados por el "Informe final de Brote", el Informe Epidemiológico Semanal "C2" y el Informe Epidemiológico Quincenal "L2". Estas son las manera de notificación los eventos en cada hospital, allí están indicados los datos que se deben informar y la forma de hacerlo para que los datos puedan ser consolidados, informe epidemiológico o boletín epidemiológico. En el anexo son presentados los formularios utilizados

En el SI.NA.V.E. las fuentes de datos deben estar vinculadas a la información que requiere el objetivo de vigilancia. Se deben considerar fuentes básicas (Hospitales, Centros de Salud, Unidades Centinelas, Laboratorios y Establecimientos Privados) junto a otras fuentes accesorias (Estadísticas Vitales, Estadísticas Hospitalarias, Datos Ambientales, Bancos de Drogas, Organismos Gubernamentales y no Gubernamentales, Medios de Difusión)

---

## IDENTIFICACIÓN

Para la determinación de la presencia de genes de enterotoxinas en *Staphylococcus aureus* el primer paso es el aislamiento e identificación del microorganismo en un alimento. Esto presenta varias dificultades debido a la gran distribución de S. A. a sus reservorios y a lo compleja de la matriz. Esta ya sea de alimentos, superficies, ambiente o muestras clínicas, presenta usualmente contaminaciones que dificultan el análisis del resultado. Es por esto que se deben ser seguidos los procedimientos establecidos, cuando los haya acompañando a la muestra de la información necesaria. (ICMSF. 1999)

## Muestras

Las muestras clínicas pueden variar en casi toda su extensión de tipo o clase, desde sangre, fluidos, hisopados, esputo, vómitos, materia fecal materiales inyectables, prótesis, fomites, etc. En el caso de alimentos se consideran de importancia aquellos ricos en proteínas y materias grasas, productos cárnicos, productos lácteos, productos de pastelerías, helados. Se debe tener en cuenta como muestra importante a los hisopados recogidos en superficies en contacto con alimentos así como también de los manipuladores. (orofaringe, lecho subungual fosas nasales, etc.). (Pepe O y col. 2006)

## Medios de Cultivo

En alimentos, para la investigación de SA (aislamiento o recuento) se han propuesto diversos medios específicos. Estos difieren principalmente en los agentes selectivos entre los que se destacan telurito de potasio, cloruro de litio, azida sódica, glicina, concentraciones elevadas de cloruro de sodio y polimixina B. En la actualidad se aceptan que los medios que contienen yema de huevo con algunos de los agentes selectivos producen una mayor recuperación unido a una fácil identificación de colonias presuntivas de S A.(ICMSF. 1999) Se debe tener en cuenta que en ámbito del Control y fiscalización de alimentos se encuentra normado tanto las técnicas empleadas como los medios utilizados. En el laboratorio clínico no existen indicaciones metodológicas específicas, no obstante están aceptados protocolos muy difundidos (Mc Faddin , 2003; Mandel GL, 2000)

## Metodología Analítica

En el laboratorio clínico, el procesamiento de las muestras, los medios de cultivo y el protocolo utilizado difieren en cada centro de salud. En líneas generales se realiza un aislamiento en Agar Sangre de las muestra clínicas, donde se identifican las colonias características y se realizan las pruebas bioquímicas para su caracterización fenotípica.

En alimentos se utiliza el método de siembra sobre Agar de Baird Parker. (Código Alimentario Argentino, Ley 18284) (ICMSF, 1999), (FIL-IDF 145:1990), (FDA/BAM. 1995) (Bécquer Lombard y col. 1997) A partir del cual se identifican y cuentan las colonias típicas para referir el valor a una cantidad de muestra, ya sea en peso o volumen. Las identificación de SA se basa en la demostración de la presencia de la coagulasa, considerando que existe

una correlación positiva entre la presencia de la misma y la virulencia del patógeno en humanos (Hernández Betancourt y col. 2005, Mac Faddin, 2003)

### Detección e Identificación de Enterotoxinas Estafilococicas

En principio se debe considerar que la producción detectable de toxina se realiza a niveles altos de contaminación ( $10^6$  ufc/gr) lo cual haría posible su control por prácticas seguras de elaboración de alimentos. (Park y cols., 1994). La resistencia de la toxina a condiciones extremas de actividad acuosa, temperatura, pH, etc aporta un grado de complejidad a los procedimientos preventivos. (Halpiny Marth, 1989).

La detección de enterotoxinas en alimentos y la enterotoxigenicidad de cepas de *S aureus* no está taxativamente explicitado en la legislación alimentaria argentina (Código Alimentario Argentino, Anexos y Suplet – Ley 18284). La investigación de la presencia de genes de enterotoxinas en cepas de *S aureus* aisladas, está poco difundida y se asume que las cepas productoras de coagulasa y termonucleasa son enterotoxigénicas (Dinges y cols. 2000). Sin embargo, la Food and Drug Administration (FDA) establece que la sola presencia de grandes cantidades de *S aureus* (coagulasa positivos) en los alimentos no constituye evidencia suficiente para incriminar un alimento como causante de toxi-infección, sino que es necesario además, evaluar la producción de enterotoxinas en los aislados. Se debe considerar asimismo que existen sobradas evidencias que otras especies de *Staphylococcus* coagulasa positiva son productores de enterotoxinas, (Khambay y cols., 1994). Por otro lado existen gran cantidad de reportes que indican que cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa son portadores de genes de enterotoxinas.(Bautista y cols., 1988)

La investigación de **enterotoxina en alimentos** puede realizarse actualmente por: **Inmunodifusión** (según el Manual ICMSF segunda edición (1982). Método de Casman y Bennett, 1965), **ELISA** (TECRA Enterotoxin VIA o TECRA UNIQUE TM STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN) y **ELFA** (miniVIDAS-bioMerieux).

Por otra, parte, la producción de enterotoxina por un **cultivo puro** puede ponerse de manifiesto por: **Inmunodifusión** (Manual ICMSF segunda edición, 1982, por el Método de Cultivo en agar semisólido, detectándose las enterotoxinas por la Técnica de doble difusión en portaobjetos); y por **Aglutinación de partículas de látex** (Staphylase Test (Oxoid), Slidex Staph Plus Test (bioMerieux), Staphaurex Plus (Remel), Prolex Staph Latex (Pro-Lab).

La confirmación de producción enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus*, ya sea de interés alimentario, clínico o epidemiológico es de una gran importancia. Para esto se dispone de métodos fenotípicos y genotípicos.

Dentro de las caracterizaciones fenotípicas pueden citarse:

**Pruebas bioquímicas** (Medios de cultivo individuales, o kits comerciales: API Staph de bioMerieux, STAPH ID de Microgen, Rapid Staph Plus Panel , VITEK);

**Métodos inmunológicos** (Aglutinación Staphylase Test (Oxoid), Slidex Staph Plus Test (bioMerieux, Inmunodifusión , ELISA TECRA, ELFA biomerieux).

Dentro de los métodos genotípicos se encuadran:

**Hibridación** (GENE-TRAK® *Staphylococcus aureus* Assay - Neogen; VIT *Staphyl* (Vermicon) hibridación y fluorescencia;

**Reacción en cadena de la polimerasa** (PCR convencional de punto final, PCR en tiempo real).

**Electroforesis en campo pulsado.**

Los métodos de investigación de enterotoxinas en alimentos tienen un grado de dificultad considerable aunque variable, debido a la complejidad inherente, ya por lo costoso de la metodología o por depender de la disponibilidad de kits comerciales. El método de referencia o "gold standar" es la doble inmunodifusión en gel (tipo Ouchterlony) (ICMSF. 1999). Figura 8. Debido a sus dificultades operativas, elevado costo y escasa disponibilidad de reactivos, la implementación en el país es muy limitada (de acuerdo a los datos relevados no se aplica en ningún laboratorio oficial ni privado).

La determinación de producción de enterotoxinas por una cepa pura se puede realizar por aglutinación pasiva reversa del látex (**RPLA**). Esta técnica es sencilla y difundida pero con dificultades de disponibilidad comercial. En esta prueba las enterotoxinas son identificadas por los anticuerpos específicos para cada una de las cinco enterotoxinas preestablecidas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE. Se han reportado objeciones a esta técnica por presentar reacciones cruzadas entre SEB y los SECs y entre el SEA y SEE. Además están diseñados considerando solo una parte de las enterotoxinas probables (solo 5 tipos de enterotoxinas), objeción cada vez más importante debido a reportes de brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica originados por cepas que producirían más de una enterotoxinas y una o más no están contempladas en el protocolo de análisis. Se debe

considerar que su sensibilidad depende de un nivel de toxina significativo. Actualmente su disponibilidad comercial es muy limitada.

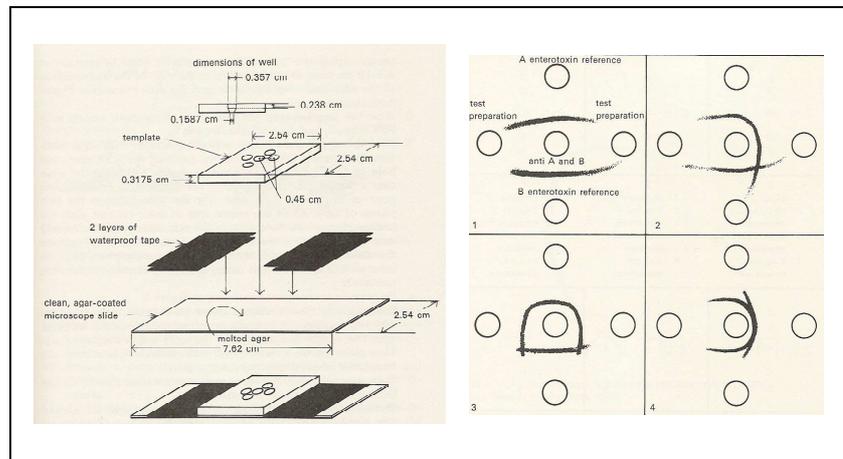


Figura 8: Técnica de doble inmunodifusión en gel de agarosa

También se ha reportado el diseño y la utilización de diferentes tipos de pruebas biológicas, para poner en evidencia la existencia de enterotoxinas. (Arm y cols., 1965 ; Dean y cols., 1972 ; Moon Whipp, 1970 ; Morris y cols., 1976 ; Cohen y cols., 1978 ; De Boer y cols., 1999; Sesardic , 2002; Hu y cols., 2003). Estas pruebas, fueron diseñadas para diferentes enterotoxinas y emplean diferentes modelos animales ("ratones lactantes", "asas de intestino en conejos", etc.). Si bien por su utilidad en determinadas circunstancias son ineludibles, pero debido a la complejidad que implica su realización y a las objeciones de conciencia que presentan no se instauran como rutina en el laboratorio. Esta imposibilidad presenta un inconveniente para la evaluación apropiada de un "caso" o "brote de ETA" vinculado a *S aureus*, que a diferencia de otros agentes etiológicos, donde el desafío se encuentra en la identificación taxonómica precisa, en este caso se debe investigar la presencia de enterotoxina o la existencia de una cepa toxicogénica.

Actualmente la evaluación integral de un brote de toxiinfección alimentaria se realiza por la utilización de la electroforesis en campo pulsado PFGE. (Cha y cols., 2006 ; López y cols., 2008) En esta técnica se genera patrones de restricción de gran tamaño, obtenidos al digerir el ADN de un organismo con endonucleasas de baja frecuencia de corte, que son separados mediante el procedimiento de electroforesis en un campo pulsante revelando el polimorfismo de los fragmentos generados. Para *S A* la endonucleasa de

elección es Smal, que da tamaños comprendidos entre 1500 y 15 kb, y de fácil interpretación. Al día de hoy tras la elaboración de un protocolo consenso para su aplicación (Munchan y cols., 2003) se debe de considerar la PFGE con Smal como el marcador genético de elección (gold standard). El alto potencial discriminatorio permite subdividir los aislamientos bacterianos en relación con posibles situaciones de brotes epidemiológicos.

## OBJETIVO.

El presente trabajo intenta dar una respuesta a una necesidad en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria, como es el de disponer de un herramienta eficaz y sencilla para establecer una relación entre un patógeno de transmisión alimentaria, *Staphylococcus aureus*, y una "intoxicación alimentaria estafilocócica"; intentando demostrar su responsabilidad en ese evento epidemiológico; en el marco de una vigilancia epidemiológica activa e integrada, basada en el Laboratorio.

Considerando las dificultades planteadas en la individualización de estemicroorganismo como agente etiológico en un brote de enfermedad transmitidas por alimentos, entre las que se encuentran: Imposibilidad de disponer de pruebas bioquímicas que indique con exactitud la producción de toxinas del agente, frecuencia de agentes fenotípicamente identificados pero carentes de toxicidad, frecuencia de agentes taxonómicamente diferentes con toxicidad demostrada, imposibilidad de instrumentación de pruebas biológicas para demostración de toxicidad, la necesidad de considerar sólo relaciones epidemiológicas en un estudio epidemiológico de brote ; con una la legislación alimentaria no actualizada al respecto y con el fin sistematizar el trabajo se plantean, los siguientes objetivos específicos:

- I) *Aplicar una reacción basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para la detección de cepas de Staphylococcus aureus toxigénicos. Realizar una optimización para aplicarla como rutina analítica en un laboratorio de alimentos.*
- II) *Establecer relaciones (fenotípicas y genotípicas) entre cepas aisladas de alimentos, manipuladores y medioambientales.*
- III) *Realizar una propuesta metodológica de aplicación en el laboratorio de microbiología de alimentos, considerando el marco legal vigente (legislación alimentaria actual).*

## MATERIALES Y MÉTODOS

## CEPAS Y AISLAMIENTOS DE *S AUREUS*

### Cepas de *Stapylococcus aureus*

Las cepas incluidas en este estudio (ver Tabla 1) fueron colectadas en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria –ASSAL- Ministerio de Salud (Santa Fe) durante un período de 5 años (2003-2008).

Muestras período 2003-2008	Número
Muestras de alimentos de rutina	5
Muestras de alimentos de brotes de intoxicación alimentaria	9
Muestras clínicas (hisopados de manipuladores, otras mtras. Clínicas)	3
Total	17

Tabla 1: Muestras de las cuales se aislaron las cepas del estudio.

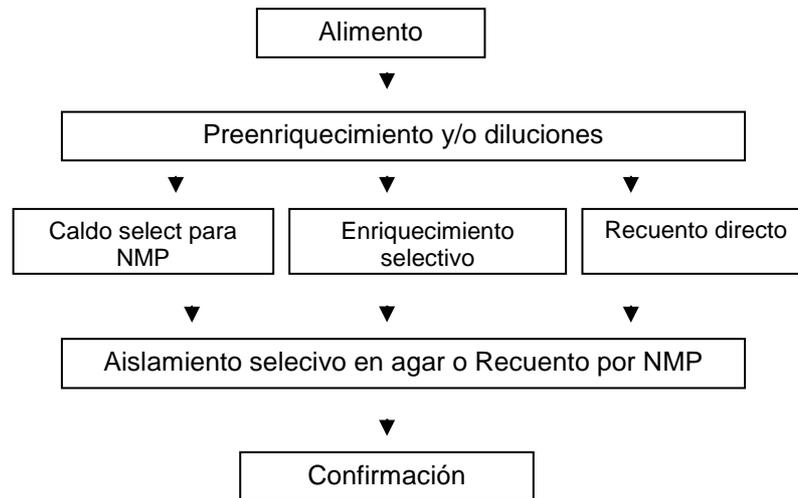
### Controles

En todos los ensayos se utilizaron, como controles positivos, cinco cepas salvajes productoras de enterotoxinas SEs. Se utilizaron como controles negativos repiques provenientes de cepas de *S aureus* no enterotoxigénicas (ATCC 25923 y ATCC 6538) cedidas por centros de salud. En el presente trabajo, las cepas fueron mantenidas a -20°C en medio con glicerol al 20%. (Hajek V. 1976)

Eventualmente para su recuperación y/o reaislamiento, las muestras fueron sembradas en Agar Triptona Soya o Agar Cerebro Corazón y Caldo Cerebro Corazón (BHI), los inóculos fueron incubados a 37 °C, por 18/24 horas.

### Aislamientos

Las muestras de alimentos fueron procesadas siguiendo el esquema de trabajo del Esquema 1, el cuál se fundamenta en la normativa vigente. Las muestras de alimentos y conexos (envases, superficies de aparatos equipos, ambientes, etc) provenientes de la fiscalización de alimentos se procesaron por las técnicas oficiales recomendadas: Código Alimentario Argentino (Ley 18284, Norma FIL-ISSO 138/86, 145 A/97, ISO 6881-1; ICMSF, 1999. International Commission of Microbiological Specifications for Foods).

Esquema 1: Esquema de búsqueda de *S aureus*

En el preenriquecimiento y diluciones se utilizó Agua Peptonada (o el más apropiado de acuerdo a la naturaleza del alimento: Ringer, Butterfield, Agua Peptonada Tamponada)

En el enriquecimiento selectivo o Número Más Probable (NMP) el usado y aconsejado, es el Caldo Giolitti Cantoni (GC) con telurito de potasio al 0.005% y tapón de parafina.

En los aislamientos se pueden utilizar distintos agares (Agar Kranep, Agar Difosfato de Fenoltaleína y Polimixina, Agar Leche Sal, Agar Manitol Salado, Agar Vogel Jonson). Figura 1. El medio recomendado actualmente, Baird Parker, contiene yema de huevo como agente de identificación y telurito de potasio además como agente selectivo. Las colonias de estafilococos en Baird Parker son negras redondas de bordes lisos, convexas 2 o 3 mm con borde blanco fino opaca y un halo claro. Este halo característico originado por la lipovitelina del huevo (zona de aclaramiento alrededor de las colonias) se le suma un precipitado blanco dentro de la zona de aclaramiento por formación de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados. La coloración negra o gris oscura es producto de la reducción del Telurito a Teluro. Se deben considerar el tipo de alimento analizado y la posible contaminación de este para el cálculo de las diluciones apropiadas y efectuar un correcto conteo de las unidades formadoras de colonias. Según el tipo de alimento se puede utilizar la siembra directa de 0,5 a 1 ml.

Figura 1: Medios utilizados para *Staphylococcus*

### Caracterización fenotípica de las cepas

Las pruebas bioquímicas se realizaron a partir de un aislamiento de Agar BHI incubado a 37°C durante 24 hs en aerobiosis. Los cultivos fueron incubados en aerobiosis por 48 hs a 35°C excepto especificación. Sobre los aislamientos obtenidos se realizaron las siguientes determinaciones: presencia de catalasa, coloración de gram, presencia de DNasa (Merck) y coagulasa (Merck). (Imágenes presentadas en la Fig. 2)



Figura 2

Posteriormente con el fin de realizar una caracterización fenotípica de las cepas obtenidas se realizaron las pruebas bioquímicas que figuran en la Tabla 2, (**Mac Faddin. 2003 ; BEHME y col 1996**). Las pruebas bioquímicas típicas de *S aureus* que se utilizaron se citan a continuación con las imágenes correspondientes. No figuran las pruebas que comparten todo el género *Staphylococcus*. En la Fig. 3 pueden observarse imágenes típicas de algunas de estas pruebas.



Figura 3

Pruebas	<i>S aureus</i>	<i>Schleiferi</i>	<i>Hyicus</i>	<i>Intermedius</i>	<i>Delphyni</i>
	<i>Sub aureus</i>	<i>Coagulans</i>			
DNAsa	+	+	+	+	-
Voges Proskauer	+	+	-	-	-
Reducción de Nitrato	+	+	+	+	+
Urea	+	+	-	+	+
PYR	-	+	-	+	+
Maltosa	+	-	-	V	+
Lactosa	+	V	+	V	+
Manitol	+	-	-	-	+
Manosa	+	+	+	+	+
Trehalosa	+	-	+	+	-
Sucrosa	+	-	+	+	

Tabla 2: Cepas de *Staphylococcus* más relevantes vinculadas a brotes de toxiinfección alimentaria

## DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS POR MULTIPLEX PCR

### Aislamiento de ADN genómico

En la obtención del ADN de cada cepa estudiada se intentó aplicar una metodología que sea "simple" y a la vez "eficaz" en la obtención de ADN de calidad para ser utilizado posteriormente. En este sentido se analizaron tres metodologías: Extracción de ADN por calor, utilización de detergentes y un método comercial (Wizard).

a) Lisis en Agua por calor: Es el más simple de todos, se propone extraer el ADN bacteriano por una lisis por calor. Se tomaron de cada cepa estudiada 5-10 colonias, que fueron resuspendidas en 150 µl de agua bidestilada y calentadas durante 15 minutos a 100°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante, recogido en un tubo nuevo, se utiliza como templado en la reacción de PCR y se puede almacenar a -20°C. (Zhang y col. 2005, Mayoral y col. 2005)

b) Extracción con Triton al 1%: Se utilizó un cultivo fresco en caldo del cual se parte para extraer el ADN del pellet de bacterias. Una colonia fue suspendida en 5 ml de Caldo Cerebro Corazón y cultivada durante 24 hs a 37°C. Se centrifuga posteriormente el caldo descartándose el sobrenadante. Se resuspende el pellet celular en 150 µl de Triton X100 al 1% en buffer TE 10:1 pH 8 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8), y se incuba durante 15 minutos a 100 °C. Posteriormente se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante recogido se utilizó como templado en la reacción de PCR.

c) Wizard DNA Genomic Kit (Promega): Las extracciones de ADN fueron realizadas según las instrucciones del fabricante.

### Oligonucleótidos primers o Cebadores

Las secuencias de los oligonucleótidos primers utilizadas son las propuestas por Naresh Sharma (Sharma y col., 2000) y fueron diseñadas para alinearse con las secuencias de ADN publicadas de los genes de enterotoxinas de sea, seb, sec, sed, see. (Bayles y landolo, 1989 ; Betley y Mekalanos, 1988 ; Bohach y Schlievert, 1987 ; Couch y col., 1988 ; Jones y Khan, 1986). El protocolo propuesto permite la detección de genes que codifican para estas enterotoxinas utilizando un Primer Universal "forward" que se aparea a una región 5' conservada y 5 primers "reverse" específicos para cada una de 5 genes individuales que codifican cada una de las enterotoxinas (sea, seb, sec, sed, see) en una sola reacción de amplificación (Multiplex PCR). Los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, INC., (Miami, FL 33102-5743). La secuencia de los oligonucleótidos primers utilizados, su locación, descripción y tamaño de fragmentos que generan se muestran en la Tabla 3.

Nombre del Primer y tamaño	Descripción	Secuencia Nucleotídica	Locación en el gen (x)	Producto de PCR
SA-U (20)	Primer universal forward	5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC-3'	-	-
SA-A (18)	Reverse primer para sea	5'-ATTAACCGAACGTTCTGT-3'	639-657	270 pb
SA-B (18)	Reverse primer para seb	5'-ATAGTGACGAGTTAGGTA-3'	564-562	165 pb
ENT-C (20)	Reverse primer para sec	5'-AATTGTGTTTCTTTATTTTCATAA-3'	485-510	102 pb
SA-D (20)	Reverse primer para sed	5'-TTCGGGAAAATCACCTTAA-3'	676-696	306 pb
SA-E (16)	Reverse primer para see	5'-GCCAAGCTGTCTGAG-3'	584-600	213 pb

Tabla 3. Detalles de los primers y sus amplicones

## Amplificación de ADN in vitro por la Reacción en Cadena de la Polimerasa

### Preparación de la Master Mix

En una primera instancia se utilizaron reactivos individuales según el protocolo señalado a continuación. En recipientes apropiados (microtubos), aptos para PCR, se colocaron los reactivos en cantidad necesaria para el número de muestras a analizar. El volumen final usado fue de 25  $\mu$ l. Se utilizó en cada reacción un control positivo (cepas productoras de enterotoxinas), un control negativo (cepas de *S aureus* no productora de enterotoxina) y un control interno de reacción (IAC). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 5  $\mu$ l del 5X Green GoTaq Buffer pH 8.5 (Promega Corp, USA), dNTPs 100  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 0.4  $\mu$ M de cada primer (SA-U, SA-A, SA-B, SA-C, SA-D y SA-D), Taq DNA Polimerasa (2.5 U/100  $\mu$ l de reacción) y 2.5  $\mu$ l de la muestra de ADN (Tabla 4). Durante la preparación de la Master Mix se colocaron los tubos y los reactivos a utilizar en un baño a 4°C. Se homogenizaron cuidadosamente todos los reactivos y se adicionaron en un tubo (rotulado MM) en volumen necesario.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final	
		Volumen por tubo ( $\mu$ l)	
H <sub>2</sub> O destilada	-	12,5	-
5X Buffer PCR	5X	5,0	1X
dNTPs	1 mM	2,5	100 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,0	2.5 mM
Mezcla de Primers	10 $\mu$ M c/u	1,0	0.4 $\mu$ M
Taq DNA pol	5 U/ $\mu$ l	0.75	2.5 U/100 $\mu$ l
Templado		2,5	

Tabla 4 MasterMix con reactivos individuales

En una segunda etapa se evaluó la posibilidad de utilizar una mezcla de reactivos para PCR preparada comercialmente con el fin de analizar la viabilidad de la sencillez propuesta. Cuando se utilizó la **Master Mix Comercial** (GoTaq Green MasterMix) la reacción de amplificación (25  $\mu$ l) se preparó con 12.5  $\mu$ l del 2X GoTaq Green MasterMix Buffer (pH 8.5), conteniendo Taq DNA Polimerasa con dNTPS y MgCl<sub>2</sub> en concentraciones finales de 200  $\mu$ M y 1.5 mM, respectivamente, 0.4  $\mu$ M de cada primer (SA-U, SA-A, SA-B, SA-C, SA-D y SA-D) y 5  $\mu$ l de la muestra de ADN (Tabla 5)

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen por tubo ( $\mu$ l)
Master Mix	2X	12,5
Agua Destilada	-	6,5
Mezcla de Primers	0,4 $\mu$ M c/u	1,0
Templado		5,0

Tabla 5. Master Mix comercial

### Mezcla de Primers

Se utilizaron en principio de forma individual con una concentración de trabajo final de 10 mM para cada uno (*sau, sea, seb, sec, sed, see*). Posteriormente se probó el uso de una mezcla de todos los primers con la misma concentración individual final.

### Programa de Ciclado

El programa de ciclado utilizado fue una modificación del propuesto originalmente por N Sharma (2000), con el fin de adecuarlo a las condiciones de trabajo (Tabla 6).

Ciclo	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	95	5 min
2-30	1	95	15 sec
	2	50	30 sec
	3	72	30 sec
31	4	72	2 min

Tabla 6. Programa de ciclado

### Control de amplificación

Control Interno de Amplificación (IAC): Para asegurar la calidad de la muestra amplificar, se debe utilizar un control de amplificación en cada mezcla de reacción de PCR, el "IAC". Es una secuencia de ADN presente en el mismo tubo de reacción, que es coamplificada simultáneamente con el extracto de ADN obtenido de la muestra problema. Este IAC no compite por los primers de la reacción (no competitivo), ya que el blanco de amplificación en nuestro caso son secuencias conservadas del rARN 16S.

### Detección de ADN amplificado. Análisis de los productos de amplificación

Finalizada la reacción de amplificación se analizaron los productos formados por electroforesis horizontal (Cuba electroforesis horizontal y fuente BioRad) en un gel de agarosa (Promega) al 2% en presencia de Bromuro de Etidio (Promega) 0.5 µg/ml. Una alícuota de 12,5 µl del producto amplificación se corrió en un campo de 80 V por espacio de 1 hora o hasta la resolución deseada. Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV (UVP). Las imágenes se captaron en una cámara digital (Kodac 35S). Se utilizó un marcador de tamaño molecular en cada corrida. (Cincuenta Marker Promega)

### **Confirmación de productos de amplificación**

#### *Analisis in silico:*

A fin de Seleccionar la/s enzima/s de restricción más apropiada/s para realizar una digestión de los amplicones obtenidos en la Multiplex-PCR para las SE, se realizó un análisis de las correspondientes secuencias, asistido por programas bioinformaticos con los servicios on line Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

#### Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción (endonucleasas de restricción) son enzimas que reconocen secuencias cortas y específicas (a menudo palindrómicas) de ADN, catalizan el clivaje de los ácidos nucleicos de doble cadena en sitios que caen dentro o en las adyacencias del sitio de reconocimiento. Este clivaje es llevado a cabo incubando la muestra con una o varias enzimas en las condiciones de reacción apropiadas (buffer de reacción, temperatura tiempo, etc). Para la reacción de digestión tradicional, a escala analítica, se lleva a cabo en un volumen de 20 µl con 0,2-1,5 µg del de ADN como sustrato usando un exceso de entre 2 a 10 veces la cantidad de enzima a digerir. Se usó el protocolo descrito en la Tabla 7.

Tabla 7. Digestión con enzimas de restricción, condiciones de reacción.

Componente	Cantidad (vol o masa)
Agua destilada estéril	20 ul
10X buffer	2 ul
Albúmina sérica bovina acetilada, 10 mg/ml	0,2 ul
ADN a digerir	1 ug
Mezclar pipeteando suavemente	
Enzima de restricción 10 U/ul	0,5 ul

Una vez agregados todos los componentes, se mezcla suavemente, se centrifuga brevemente y se incuba a temperatura óptima durante 1-4hs. Los productos obtenidos se analizan por electroforesis en el soporte más apropiado de acuerdo al tamaño esperado de los fragmentos de digestión.

Además se probó una metodología simplificada para la cual se adicionó 1 ul de enzima directamente en la reacción de amplificación, incubando a la temperatura de trabajo de la enzima.

El análisis de los productos formados se lleva a cabo por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % en presencia de 0,5 ug/ml de Bromuro de Etidio. Se comparó el tamaño de las bandas generadas con los patrones de tamaño molecular apropiados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación del tipo de enterotoxina estafilocócica, aporta, en principio, una historia rica e importante para el estudio microbiológico, epidemiológico, clínico, alimentario y medio ambiental. La instrumentación de una rutina con metodologías moleculares que relacionen genéticamente diferentes cepas, su fenotipo y antibiograma con el tipo de enterotoxina que producen, puede aumentar significativamente nuestro conocimiento de los eventos epidemiológicos producidos por una cepa en particular.

En nuestro país, ante la presentación de un evento epidemiológico que tiene como presunto responsable a *Staphylococcus aureus* (S A) y con el fin de analizar lo ocurrido, se deben realizar diferentes tipos de acciones, previstas ya sea en la legislación alimentaria como en la epidemiológica. En lo referente a alimentos, esta legislación exige: ausencia del microorganismo en algunos alimentos (para niños y lactantes, crema chantilly, algunos productos dietéticos), aceptación de valores preestablecidos (productos lácteos, productos cárnicos, caldos deshidratados, etc.). (Ley 18284, Anexos y Supletorios- Código Alimentario Argentino. [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar)). Se asume que las cepas productoras de coagulasa y termoneucleasa son enterotoxigénicas, vinculándose una probable contaminación con niveles elevados de S A coagulasa positivo. (Dinges y cols . 2000) Sin embargo, en la misma legislación, no se señala específicamente la búsqueda de enterotoxinas estafilocócicas. La Food and Drug Administration (FDA) establece que la sola presencia de grandes cantidades de S A coagulasa positivos, en los alimentos no constituye evidencia suficiente para incriminar un alimento como causante de toxiinfección alimentaria, sino que es necesario además, evaluar la producción de enterotoxinas en los aislamientos. (FDA/BAM. 8<sup>th</sup> Chapter 13)

Asimismo, en la normativa epidemiológica establecida en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, (SI.NA.VE) y sus subsistemas generales y específicos, se detalla una lista de "eventos" a vigilar, una modalidad y una periodicidad de notificación. Las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas, se encuentran dentro del listado de Enfermedades Notificables para el SI.NA.VE., como Toxiinfecciones alimentarias. Se encuentra definida en sus aspectos generales y particulares y deben ser informadas como "Informe final de Brote". En los Informes periódicos (Informe Epidemiológico Semanal "C2" e Informe Epidemiológico Quincenal "L2"), se cuentan los eventos que cada efector de salud debe informar para que los datos puedan ser consolidados, en un informe o boletín epidemiológico. (Manual de Normas y Procedimientos del Sistema Nacional de Vigilancia

Epidemiológica VIGI+A). Por no estar desagregada, no se pueden conocer los datos específicos vinculados a los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica. Además la disponibilidad de los datos referentes a toxiinfecciones alimentarias es inconstante.

En el aspecto clínico, ya sea en un “caso” o en un “brote”, los laboratorios de los efectores públicos de salud (dispensarios, hospitales, etc.), no siguen una norma preestablecida para el aislamiento e identificación del organismo responsable. En los laboratorios consultados, se aplican procedimientos de consenso avalados por organismos nacionales o internacionales o por la bibliografía disponible. No obstante de disponer de información epidemiológica, en las determinaciones rutinarias de *Staphylococcus*, se determina presencia de coagulasa, eventualmente un número variables de pruebas bioquímicas y su antibiotipo correspondiente. (ICMSF, 1999 ; Mac Faddin, 2003)

En este contexto y más allá de la toxigenicidad de *Staphylococcus aureus*, se deben tener en cuenta las publicaciones de reportes de cepas enterotoxigenicas de *Staphylococcus* coagulasa negativas como *S cohnii*, *S xilosus*, *S haemoliticus* y *S epidermidis* (Bautista y cols. 1988, Lammler 1991, Rapini y cols. 2005). Por otro lado existe sobrada evidencia que otras especies de *Staphylococcus* coagulasa positiva son productores de enterotoxinas, como el *S hyicus* y *S intermedius*, siendo este último implicado claramente en brotes de intoxicación alimentaria (Khambay y cols .1994). Teniendo en cuenta además la existencia de cepas de S A que no producen enterotoxinas, se debería plantear un análisis más profundo sobre la etiología de las intoxicaciones alimentarias estafilococicas a la luz de las metodologías disponibles.

Es importante señalar que cepas con caracteres de virulencia particulares, ya sea por poseer resistencia a antibióticos o genes de enterotoxinas, pueden transferirse a la comunidad desde nichos ecológicos animales o medioambientales. (Pepe y cols., 2006; Archer, 1998). Según reportes de brotes se debe tener en cuenta la adquisición de patologías con cepas de origen hospitalario con caracteres de virulencia (Jones y cols., 2002 ; Figueroa y cols., 2002). Se debe considerar que los factores de virulencia en *Staphylococcus* están en caracteres genéticos móviles (Kluytmans y cols., 1997 ; Fueyo Mendoza, 2008; Yarwood y cols., 2001)

Ante la presencia de una Toxiinfección alimentaria, con una probable definición de intoxicación alimentaria estafilocócica, se debe demostrar la existencia de enterotoxinas en los alimentos vinculados al brote o, en su defecto, la presencia de genes de enterotoxinas en las cepas aisladas, junto con un relevamiento epidemiológico. Para tal fin se dispone de diferentes metodologías con dos objetivos principales: determinar las enterotoxinas existentes en alimentos o determinar la producción de toxina (existencia de genes de toxina) de las cepas aisladas.

Los métodos de investigación de enterotoxinas disponibles tienen un grado de dificultad considerable aunque variable. Debido ya sea a la complejidad inherente o por lo costoso de la metodología. El método de la doble inmunodifusión en gel (gold estándar), debido a las dificultades operativas para su implementación y elevado costo no está disponible en el país. La determinación de producción de enterotoxinas por aglutinación pasiva reversa del látex (RPLA) aunque sencilla presenta dificultades operativas y de disponibilidad comercial. Los procedimientos basados en ELISA y ELFA, si bien están disponibles y su costo es relativamente accesible, presentan una complejidad de implementación rutinaria que hace limitado su uso y alcance. La utilización de pruebas biológicas, para poner en evidencia la existencia de enterotoxinas, debido a la complejidad que implica su realización y a las objeciones planteadas no representan una opción real. Por esto, la elección se limita a la utilización de técnicas genéticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (con dos variantes de importantes de señalar: la reacción de PCR individual o la Multiplex-PCR) para la identificación de genes productores de enterotoxinas y la utilización de la electroforesis en campo pulsado PFGE en la evaluación integral de un brote de toxiinfección alimentaria ([Cha y cols., 2006](#) ; [López y cols., 2008](#))

La determinación de producción de enterotoxinas en una cepa pura por PCR, por su sencillez, relativamente baja complejidad operativa (disponibilidad de equipamiento) y económicamente accesible (disponibilidad de recursos), la convierte en una metodología de elección. Esta metodología permite poner de manifiesto la producción de toxina por una cepa determinada y realizar una aproximación en la relación genética de distintas cepas aisladas en un brote. Ofrece la posibilidad de detectar secuencias específicas de un gen por la amplificación de DNA deseado y permite la incorporación de nuevos genes, aún bajo análisis. Diferentes autores han reportado el diseño de reacciones de PCR para toxinas estafilocócicas, ([Johnson y cols., 1991](#), [Tsen and Chen, 1992](#), [Bohach y cols., 1990](#)) Estos

utilizan sistemas individuales o múltiples pero no cubren simultáneamente el espectro de los 5 genes de enterotoxinas más investigados. A fin de aportar herramientas diagnósticas útil para nuestro laboratorio y en base a la información científica disponible, en el presente trabajo nos propusimos aplicar una metodología de identificación molecular de cepas de S A utilizando ensayos de Multiplex PCR.

Luego de realizar un análisis de la bibliografía relativa al uso de ese tipo de estrategias para la detección de S A, decidimos basarnos en un protocolo publicado por Sharma y cols. (2000) sobre el cual realizamos modificaciones con el objetivo alcanzar beneficios en términos de practicidad sin sacrificar especificidad ni sensibilidad. El trabajo original implicaba la extracción de ADN bacteriano por un laborioso procedimiento que utiliza agentes caotrópicos, detergentes, enzimas líticas y tierras de diatomea, seguido de la amplificación por PCR empleando como cebador directo (forward) un oligonucleótido que se aparea en una región conservada en los genes de todas las enterotoxinas conocidas y 5 cebadores reversos, cada uno específico para cada una de las 5 toxinas de interés (A-E). Finalizada la amplificación, se realizaba una purificación de los amplicones obtenidos y una digestión con las enzima de restricción *Rsa* y *Mbol.*. Finalmente, el análisis de los productos obtenidos se lograba por una separación electroforética en un gel de agarosa coloreado con bromuro de etidio.

A partir del análisis crítico de este protocolo, nuestros esfuerzos estuvieron inicialmente dirigidos a evaluar alternativas relativas a : a) el proceso de extracción de ADN bacteriano, b) las condiciones de amplificación y c) la reacción de digestión. Una vez seleccionadas condiciones que consideramos como las mas apropiadas en nuestros ensayos, nos abocamos a la aplicación de esta metodología para analizar molecularmente cepas de S A aisladas de alimentos y brotes de intoxicaciones alimentarias.

Para el paso de extracción del ADN bacteriano se probaron 3 variantes: a) Lisis por calor de colonias bacterianas resuspendidas en agua estéril, b) Lisis por calor de colonias resuspendidas en buffer TE conteniendo Tritón X-100 al 1 % y c) extracción con un equipo comercial (Wizard Genomic DNA purification kit). La Fig. 1. muestra los resultados de las amplificaciones por PCR, a partir de ADN de una cepa control de S A (portadora del gen SE-A) obtenidas por los 3 protocolos utilizados. En todos los casos, la extracción realizada por lisis por calor en agua rindió una banda del tamaño esperado, con resultados similares (o de

mejor calidad) que la extracción en presencia de Tritón X-100 o con el equipo comercial. En consecuencia, debido a la simplicidad en el procedimiento (solo se utiliza agua para resuspender las colonias, el tiempo insumido es menor), decidimos utilizar este procedimiento en todos los ensayos posteriores (Fig 1.).

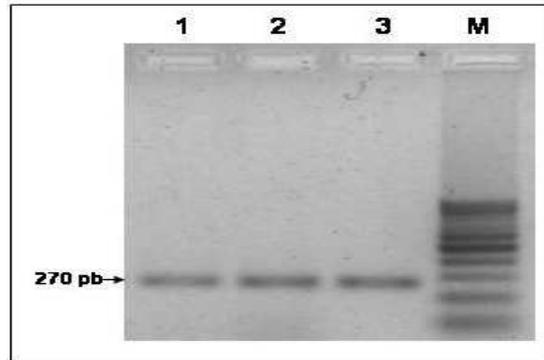


Figura 1. Evaluación de diferentes protocolos de extracción. PCR para ST-A a partir de ADN extraído con: 1, TE 10:1 pH 8.00 + Triton X-100 1%, 2, Agua estéril a ebullición, 3, equipo comercial (Wizard genomic DNA purification kit).

Una vez seleccionada la manera de realizar la extracción de ADN bacteriano, el paso siguiente fue el de analizar algunas condiciones de la reacción de amplificación por PCR para los genes de las distintas SE.

En primera instancia, se evaluó el efecto de la concentración de dNTPs sobre la reacción, para lo cual se utilizaron cantidades crecientes de los mismos, desde 40 a 120  $\mu$ M. La figura 2 muestra una imagen típica de estos ensayos trabajando con una cepa productora de SE-A, en los cuales la mayor señal fue encontrada para una concentración de dNTPs igual a 100  $\mu$ M. En concordancia con otros autores, con concentraciones en defecto se produce una disminución en el rendimiento del producto formado. En forma opuesta, con dNTPs en exceso puede observarse una disminución en la señal esperada pero debido, fundamentalmente, a que se favorece la formación de productos no deseados, comprometiendo la especificidad del ensayo.

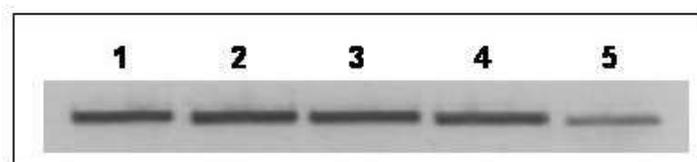


Figura 2. Efecto de la concentración de dNTPs sobre la reacción de amplificación. Concentración final de dNTPs: 1, 120mM; 2, 100 mM; 3, 80 mM; 4, 60 mM; 5, 40 mM.

De forma similar se diseñó una experiencia semejante para conocer la concentración de  $MgCl_2$  más apropiada para esta reacción. En este caso se testearon concentraciones de

MgCl<sub>2</sub> que van desde 1,0 a 3,0 mM. En nuestros ensayos, la mayor señal fue obtenida cuando la concentración de MgCl<sub>2</sub> en el medio fue 2.0 mM. (Figura 3).

Figura 3. Efecto de la concentración de sobre la reacción de amplificación.  
Concentración final de Mg Cl<sub>2</sub>: 1, 3.0 mM; 2, 2.5 mM; 3, 2.0 mM; 4, 1.5 mM; 5, 1.0 mM.

Resultados similares en cuanto a las concentraciones óptimas de MgCl<sub>2</sub> y dNTPs fueron encontradas con todas las cepas disponibles usadas como referencia (datos no ilustrados)

Una vez seleccionados los parámetros anteriores (extracción de ADN, concentraciones de dNTPs y MgCl<sub>2</sub>), se evaluó la performance del ensayo en el análisis de distintas muestras de aislamientos de S A obtenidas en nuestro laboratorio. La Fig. 4 es una imagen representativa de amplicones generados a partir de distintas muestras de ADN de S. aureus aislados en distintos procedimientos realizados en la región.

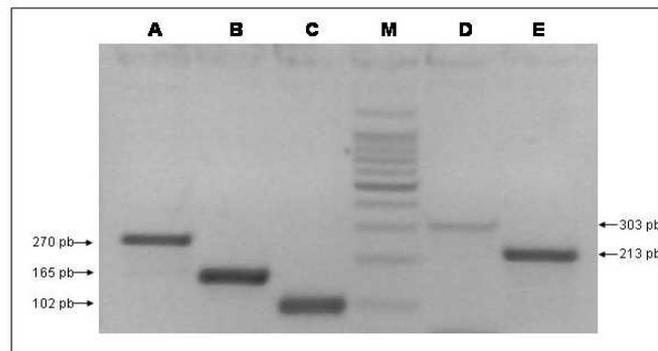


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación por Multiplex PCR de genes de Enterotoxinas de Saureus . Calles: A, B, C, D y E, Enterotoxinas A, B, C, D y E, respectivamente. Calle M: Marcador de Tamaño Molecular ( BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega, USA).

En esta experiencia se pueden visualizar los fragmentos de amplificación correspondientes a los cinco genes de toxinas analizados, con tamaños que se corresponden con lo esperado, según lo publicado en bibliografía y a un análisis previo *in silico*.

A fin de confirmar la especificidad de la Multiplex PCR utilizada, se programó someter los productos de amplificación a una digestión con enzimas de restricción,

Previo al desarrollo experimental, se realizó un análisis *in silico* a fin de conocer los sitios de corte teóricos en cada uno de los amplicones bajo estudio. La Tabla 1 y la Figura 5 muestran los resultados del análisis teórico para la enzima de restricción seleccionada (*Rsa I*)

Gen de Toxina	Sitio de Corte (Posición)	Tamaños de fragmentos
<i>sea</i>	98	172 y 98 pb
<i>seb</i>	107	107 y 58 pb
<i>sec</i>	65	65 y 37 pb
<i>sed</i>	83, 137	166, 83 y 54 pb
<i>see</i>	7, 59, 98,	7, 39, 52 y 115 pb

Tabla 1. Análisis teórico de la acción de la enzima de restricción *Rsa I*.

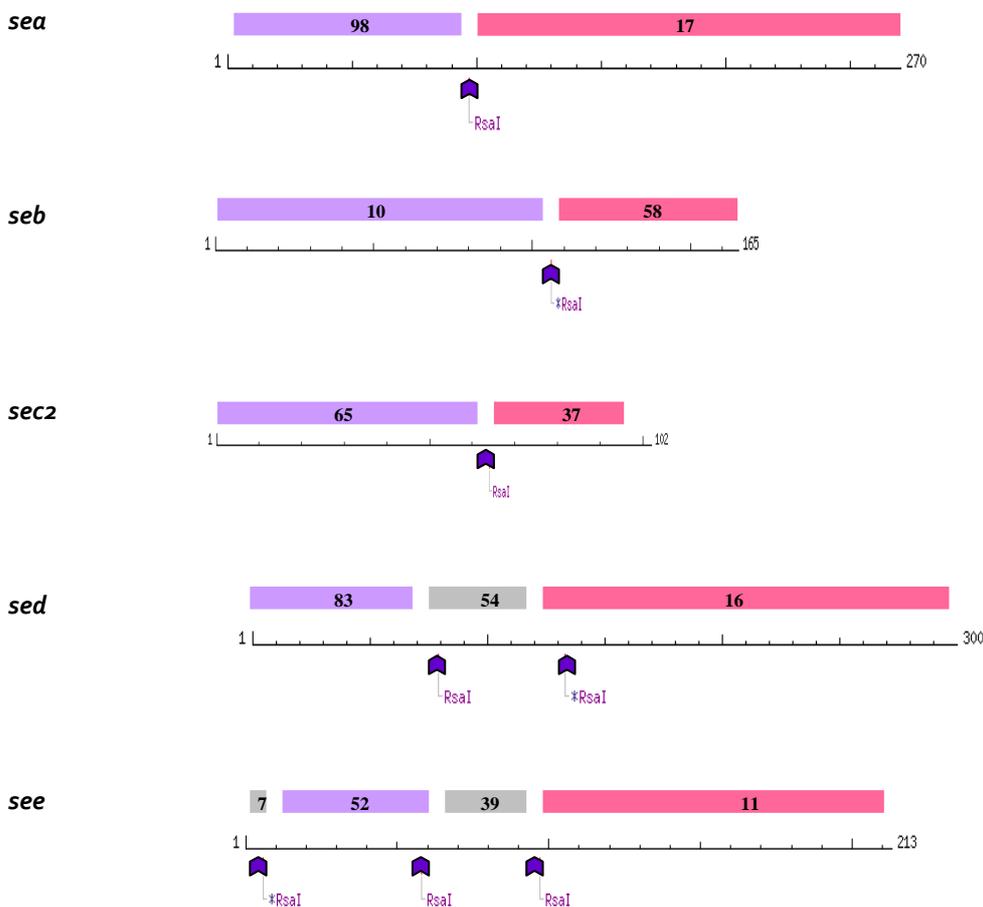


Figura 5. Genes de enterotoxinas amplificados, sitios de corte con las enzima *Rsa I* y fragmentos generados.

Un dato interesante surgido de este análisis teórico fue el hecho de que el amplicón de la Enterotoxina E (SEE), también presentaría sitios de corte para la enzima *Rsa I*, situación que no fuera indicada en el trabajo original de Sharma y cols. ( 2000). En consecuencia, una vez realizado el análisis anterior, se procedió a realizar experimentalmente la digestión de los productos obtenidos. La Fig. 6 es un ejemplo de los ensayos de digestión con *Rsa I*, en el que se puede observar el resultado del corte de los amplicones con la enzima mencionada.

La electroforesis en geles de poliacrilamida brindaría mayor resolución, sobre todo para los fragmentos menores a 100 pb pero, debido a su practicidad, se decidió realizar los ensayos en geles de agarosa.

A partir de estos ensayos pudimos constatar experimentalmente que, como había predicho en el análisis *in silico*, la enzima *RsaI* también es capaz de digerir el fragmento resultante de la amplificación del gen *see*. Esto es un dato importante dado que una sola enzima puede ser utilizada para el análisis de 5 genes de enterotoxinas de *S. A* distintos. Además, esto es otra diferencia importante en relación a lo propuesto en el trabajo de Sharma y cols. (2000), en el cual se propone *RsaI* para digerir los amplicones de las enterotoxinas A-D y *MboI* para digerir el amplicón de SEE.

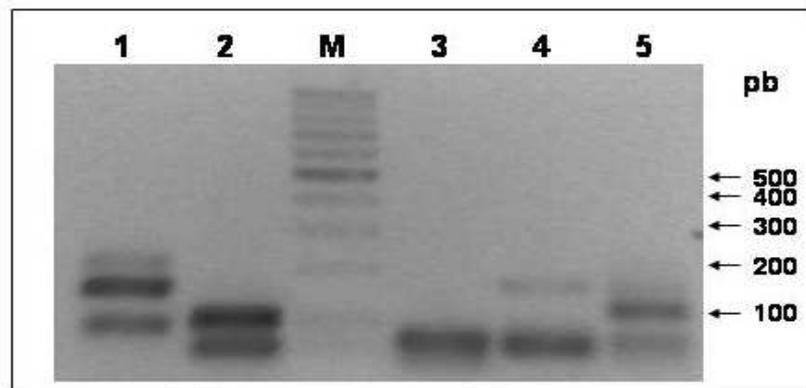
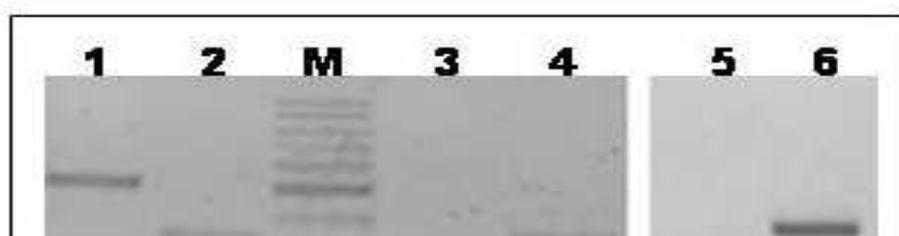


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos de amplificación por Multiplex PCR de genes de Enterotoxinas de *Saureus*, digeridos con enzimas de restricción. Calles: 1, 2, 3, 4 y 5, amplicones de Enterotoxinas A, B, C y D, respectivamente, digeridos con *RsaI*; Calle M: Marcador de Tamaño Molecular ( BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega, USA).

En los primeros ensayos, las reacciones de amplificación fueron sometidas a pasos de extracción previos a la incubación con la enzima correspondiente. En experiencias subsiguientes, se analizó la posibilidad de realizar la incubación con la enzima de restricción, directamente en el medio en el que se realizó la amplificación *in vitro*, sin ningún tratamiento previo. La Figura 7 muestra los resultados alcanzados al comparar ambas alternativas de trabajo.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% productos de amplificación por Multiplex PCR de genes de Enterotoxinas de Saureus, digeridos con enzimas de restricción .. Calles: 1, Amplicón del gen de Enterotoxina A (270 pb); 4, Amplicón del gen de Enterotoxina B (165 pb); Calles 2 y 3, amplicones de Enterotoxinas A y B, respectivamente, digeridos con *Rsal*, previo paso de extracción; Calles 5 y 6, amplicones de Enterotoxinas A y B, respectivamente, digeridos con *Rsal* directamente en la reacción de PCR. Calle M: Marcador de Tamaño Molecular ( Cincuenta Marker, Biodynamics, Argentina)

Puede observarse que al digerir los productos formados directamente en el tubo de reacción de PCR, sin ningún paso intermedio se obtuvo un perfil similar al de la digestión con pasos previos de purificación tal como estuvo propuesto por Sharma y cols. (2000). Considerando que la endonucleasa utilizada no presentó ninguna aparente pérdida o disminución de su actividad en el medio de reacción de amplificación, en todos los ensayos siguientes, las digestiones fueron realizadas sin el paso adicional de purificación.

Una vez que encontramos factible lograr una amplificación de fragmentos de genes de enterotoxinas de S A utilizando la Multiplex PCR y a fin de avanzar en la estandarización del ensayo, decidimos evaluar el uso de una master mix comercial conteniendo (además de la enzima ADN polimerasa) dNTPs y  $MgCl_2$  en concentraciones similares a las encontradas como óptimas en la PCR "casera" (o *made in house*). En la Figura 8 puede verse que obtuvimos un mejor rendimiento, sin pérdida en especificidad, cuando utilizamos la master mix comercial en comparación con la master mix "casera". Además, hay que considerar una ganancia adicional en practicidad, al disminuir el número de pasos a realizar durante el inicio de las reacciones de amplificación. A esto se suma el hecho de que la master mix comercial seleccionada tiene también entre sus componentes una mezcla de colorantes y una viscosidad tal que permite que las reacciones de amplificación puedan ser directamente depositadas en los pocillos de los soportes en los que se realice el análisis electroforético (Figura 8).

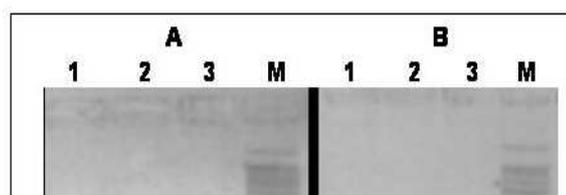


Figura 8. Comparación de la performance de la Multiplex PCR utilizando distintas Master Mix. A) Master Mix "casera", B) Master Mix comercial (GoTaq Green Master Mix, Promega, USA). Calles 1,2 y 3, amplicones correspondientes a genes de enterotoxinas A (270 pb)

### **Aplicación de una multiplex PCR en el análisis de un brote de intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus* ocurrido en Las Rosas (Provincia de Santa Fe**

Un presunto brote de una enfermedad transmitida por alimentos fue denunciado en la oficina de Seguridad Alimentaria del municipio de la localidad de Las Rosas, provincia de Santa Fe, el día 17 de febrero de 2008. Efectivamente, a instancias del responsable del establecimiento elaborador, según consta en la documentación oficial, se comunica a las autoridades sanitarias, que posteriormente al consumo de "canelones de verdura", adquiridos en el local de su propiedad un número no determinado de personas habrían experimentados una sintomatología compatible con una intoxicación alimentaria producto de la cual habrían sido atendidos en el Hospital de la localidad (SAMCo Las Rosas). Los afectados se habían presentado en su negocio declarando lo sucedido, motivo por el cual se da curso a las autoridades correspondientes.

Se realizan distintos procedimientos oficiales tendientes obtener la información necesaria para la elaboración del informe de brote pertinente. Se audita el establecimiento elaborador y se toman muestras oficiales del alimento implicado: canelones con relleno de verdura, sin cocinar (**INPPAZ/OPS/OMS Guía VETA**). Se entrevista a los afectados, recuperándose muestras de restos de alimentos ingeridos (canelones con salsa y crema). Además se consulta al centro de salud donde fueron atendidos los afectados y se confeccionan las planillas y formularios de relevamiento de "Brote de ETA". (**Manual de Normas y Proc. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. VIGI+A. SINAVE. 2000**).

La documentación junto con las muestras se remiten al laboratorio central de la Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria para su evaluación. La tabla N°2 resume los datos recogidos en el relevamiento epidemiológico.

Personas que consumieron los alimentos sospechosos (nombre, sexo, edad,)	Afectados	Fecha y hora de consumo de la comida sospechosa	Fecha y hora de comienzo de los síntomas	Alimentos consumidos en el día de inicio de síntomas	Síntomas
5 personas; 4 adultos (2 mujeres, 2 hombres) y 1 niño.	3 adultos y un niño afectados	16/02/08 En el lapso De 13 a 14 hs	16/02/08 Entre las 16 y 16:30 hs	Canelones con salsa y crema. Te con leche Mate cocido con leche Tostadas	Diarreas Nauseas Vómitos Dolor abdominal

**Tabla 2:** Resumen del Registro colectivo (Se utiliza Formulario VETA 2)

La información fue recogida utilizando como guía los formularios VETA (INPPAZ/OPS/OMS. Guía VETA). Considerando la información disponible por la cantidad de afectados, la evaluación de las tasas de ataque específica de los alimentos ingeridos para estimar el riesgo atribuible a cada uno de los mismos no se consideró necesaria, identificándose como alimento sospechoso, al canelón de verdura.

Se realizaron los análisis de rutina de un brote de toxiinfección alimentaria: recuento de microorganismos indicadores (Coliformes Totales, Coliformes Fecales, presencia de *Escherichia coli* sp en 1 gramo de muestra, Conteo de Clostridios Sulfito Reductores) e investigación de patógenos más frecuentes (*Salmonella* sp y *Shigella* sp y *E coli* enteropatógena, *Clostridium prefringens*, conteo de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, en 25 gramos). El análisis previo de la información que consta en la documentación, sugiere la presentación de una intoxicación alimentaria.

Canelón de verdura. (Sin cocinar) (cepa 013)	Canelón de verdura con salsa y crema. (Cocinado) (cepa 015)	Relleno de verdura	Masa del canelón (crepes o panqueques)	Salsa con crema
10 <sup>5</sup> ufc/gramo De <i>S aureus</i>	10 <sup>5</sup> ufc/gramo De <i>S aureus</i>	10 <sup>5</sup> ufc/gramo De <i>S aureus</i>	<10 <sup>2</sup> ufc/gramo De <i>S aureus</i>	<10 <sup>2</sup> ufc/gramo De <i>S aureus</i>

--	--	--	--	--

**Tabla 3:** Alimentos recuperados y Microorganismos Analizados

Los valores de indicadores microbiológicos no mostraron niveles significativos. Se encontraron conteos significativamente altos de *Staphylococcus coagulasa* positivo (iguales o mayores a  $10^5$  ufc/gramo) en tres de las muestras analizadas. Asimismo, no se detectó la presencia de ninguno de los otros patógenos analizados (Tabla 3).

Intentando determinar el origen de la cepa en cuestión y el mecanismo por el cual se transmitió al alimento, se intentó hallar cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivos en el lugar donde fue elaborado el alimento en cuestión y si existían portadores de *Staphylococcus coagulasa* positivos entre los manipuladores de alimentos del negocio. Se realizó un hisopado se superficies en el establecimiento elaborador y de los manipuladores de alimentos que estuvieron en los días cercanos al brote de toxiinfección alimentaria. Estos dieron resultados positivos para *Staphylococcus coagulasa* positivos en 2 de los manipuladores (Tabla 4).

Hisopados de superficies y mesadas		Hisopados nasofaríngeos de manipuladores de alimentos				
Mesada	Equipos	Manip 1	Manip 2	Manip 3	Manip 4	Manip 5
-	-	+	-	+	-	-

**Tabla 4.** Investigación de *S aureus* en manipuladores, aparatos y equipos.

Se realizaron una serie de pruebas bioquímicas para aproximar una caracterización fenotípica de las cepas aisladas, según las pruebas definidas anteriormente, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.

Cepa	DNAse	Acetoina.	Red Nitrato	Urea	PYR	Maltosa	Lactosa	Manitol	Manosa	Sucrosa
Canelones crudos(013)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Canelones	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

cocidos(015)										
Manipul 1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Manipul 3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Tabla 5. Caracterización bioquímica de *S aureus* aislados en brote de Las Rosas.

Los hallazgos de laboratorio, junto con los reportes epidemiológicos y el informe de auditoría del establecimiento elaborador, fueron remitidos para la confección del Informe Final de Brote (SI.NA.VE. , VIGI+A).

Posteriormente, en esta ocasión merced a la disponibilidad de contar con otras herramientas de laboratorio se continuó con el análisis de lo ocurrido. En las cepas aisladas se investigó la presencia de genes productores de enterotoxinas estafilocócicas, lo que arrojó resultado positivo para la Enterotoxina tipo B (Figura 9).

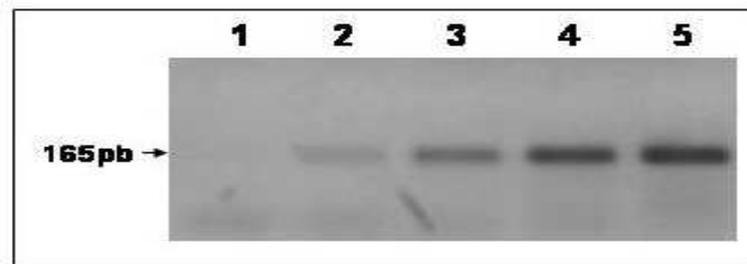


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación por Multiplex PCR de genes de Enterotoxinas de Saureus, aislados en brote de intoxicación alimentaria en Las Rosas (Santa Fe). Calle: 1, Control de Reactivos; calles 2-5: ADN extraído de Saureus aislados a partir de Manipulador 1 (calle 2), Manipulador 3 (calle 3), Canelones Crudos (calle 4) y Canelones Cocidos (calle 5).

A la luz de estos resultados, se intentó evaluar la relación existente entre las cepas aisladas. Se dispuso la posibilidad de remitir el hallazgo a organismos de referencia (ANLIS-INEI Carlos G Malbrán) para confirmar los resultados e intentar establecer relaciones genéticas entre las cepas de diferentes orígenes vinculados al brote. Para obtener datos en esta etapa, se trabajó con muestras correspondientes a alimentos consumidos (canelones crudos y cocidos) y a hisopados obtenidos de dos manipuladores (los que dieron positivo al aislamiento de *Staphylococcus coagulasa* positivo, Ver Tabla 5).

La Figura 10 es una imagen obtenida en un análisis por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) de los ADN de las cepas remitidas.

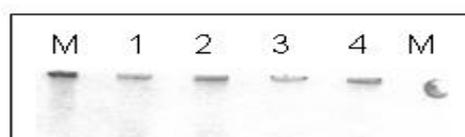


Figura 10. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado. Calles 1-4: ADN extraído de S A aislados a partir de Manipulador 1 (calle 1), Manipulador 3 (calle 2), Canelones Crudos (calle 3) y Canelones Cocidos (calle 4). Calle M, Marcador de Tamaño Molecular.

No se obtuvo información oficial pero se puede contar con un informe preliminar en el cual se puede observar que la imagen en PFGE muestra que: 3 muestras (1, 3 y 4) presentaron un patrón de 13 bandas identificables, con identidad total e indistinguible en la posición de todos los fragmentos. La muestra restante (2) presentó un perfil formado por 12 bandas de los cuales 6 presentaron movilidades electroforéticas diferentes a las de las 3 muestras anteriores. Al asignar el origen de los distintos patrones electroforéticos, se desprende que las muestras de ADN provenientes de las cepas de *Staphylococcus coagulasa positivos* aisladas de los canelones, tanto crudos (muestra 3) como cocidos (muestra 4), compartieron el perfil con la muestra obtenida a partir de hisopado nasofaríngeo del manipulador 1. Si bien es llamativo el hallazgo de S A en ambos manipuladores, a partir de los perfiles por PFGE se podría decir que existe una muy alta probabilidad de que la carga de *Staphylococcus* encontrada en los alimentos haya sido aportada por la manipulación de los mismos por parte del Manipulador 1. (Tenover y cols., 1996)

### **Aplicación de una multiplex PCR en el análisis de un brote de intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus* ocurrido en Santa Fe Capital**

Sobre un brote de Toxiinfección Alimentaria ocurrido en mayo 2003 en la ciudad de Santa Fe, se aplicaron las herramientas analíticas ahora disponibles en nuestro laboratorio, con el fin de analizar lo ocurrido en aquella oportunidad.

El 11 de mayo 2003 se tomó conocimiento en oficinas de la Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria (por entonces Dirección Provincial de Bromatología), de un número no especificado de personas que presentaba un síndrome gastroentérico agudo. Estas se encontraban albergadas en un centro de evacuados debido a la emergencia hídrica declarada en la ciudad de Santa Fe el 29 de abril de ese año.

Por una creciente inusitada se produjo el desborde del Río Salado, el cual constituye el límite natural del oeste de la ciudad, dejando bajo aguas casi el 60 % de la ciudad. Esto originó la evacuación de más de 100.000 personas hacia zonas no inundadas de la ciudad y su alojamiento en improvisados "centros de evacuados". Los citados centros eran dependencias de escuelas, instituciones públicas y privadas, clubes, etc. adaptadas para recibir a personas que debían retirarse de sus domicilios por estar estos bajo agua. En uno de esos centros se produjeron cuadros de gastroenteritis aguda que afectó a un número importante de personas que estaban allí alojadas, con características compatibles con una toxiinfección alimentaria. El citado Centro de Evacuados, identificado como "CGT Junín", sito en Junín 3051 de la ciudad de Santa Fe, albergaba a 300 personas aproximadamente, allí se presentó el evento señalado afectando a 25 personas.

La comida sospechosa identificada fue Hamburguesas con Arroz Blanco. La bebida servida era agua de mesa envasada comercial. Los alimentos eran elaborados por una cocina centralizada, que asistía con 320 raciones a este centro. Esta cocina era una de las 6 que existían en ese momento, proveyendo mas 50.000 raciones y estaba cargo de una empresa local con trayectoria en la gastronomía. El número de raciones que recibían los centros fluctuaban periódicamente debido a la movilidad de las personas.

Este centro era asistido con alimentos transportados adecuadamente (vehículo habilitado, contenedores de acero inoxidable, personal capacitado). No contaba con una adecuada disposición de los alimentos ni con una adecuada higiene y conservación de los mismos. Además se constató una inadecuada disposición de los residuos. Sí se pudo observar el mantenimiento de la higiene de los sanitarios y las condiciones apropiadas del mismo.

La información colectada refiere que en horas posteriores a la comida sospechosa comenzaron los síntomas en los comensales (única comida que compartieron los

afectados). La cantidad de afectados difiere según los encuestados y al momento de realizar la consulta. El número total informado fue el considerado de mayor consenso. Cabe mencionar que el evento relatado se desarrolló en personas en situación de estrés y hacinamiento.

En la recolección de datos no se emplearon los formularios oficiales usados en los registros de brotes, en parte debido a la situación particular que se vivía.

En la visita diaria que se realizaba para atender las condiciones sanitarias y alimentarias de las personas alojadas, se realizó una encuesta a los afectados y se pudo recuperar parte del alimento ingerido. Asimismo se pudo constatar que se recibía un número sensiblemente superior de raciones al necesario, como consecuencia de haber reportado un mayor número de evacuados a los realmente existía; este alimento era conservado en condiciones deficientes (sin frío y en recipientes no higiénicos) para ser consumido durante el resto del día.

En el análisis de las muestras de alimento, hamburguesas cocidas al horno pudo demostrar la presencia de *S aureus* en valores superiores a  $10^5$  ufc / gramo.

No se pudo recuperar el alimento crudo o sin cocinar en el lugar donde fue elaborado, debido a que una vez listo se distribuyó en su totalidad. No fueron reportados otros brotes en los restantes centros de evacuados que eran provistos por la misma cocina. Según refieren, trabajadores de esa cocina también consumieron los mismos alimentos sin reportar síntomas al momento de la consulta.

Las personas fueron atendidas en el lugar por la emergencia médica no requiriendo hospitalización. El cuadro remitió favorablemente y de forma espontánea. La sintomatología que referían los afectados, sugiere la presentación de una intoxicación alimentaria.

Sobre la muestra del alimento se investigó la presencia de los patógenos más frecuentes (investigación de *Salmonella* y *Shigella* y *Escherichia coli* enteropatógena, *Clostridium prefringens*, y conteo de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en 25 gramos). No se realizaron los análisis de recuento de microorganismos indicadores (Coliformes Totales, Coliformes Fecales, presencia de *Escherichia coli* sp en 1 gramo, Conteo de

Clostridios Sulfito-Reductores) debido a las condiciones generales de conservación y manipulación de los alimentos. La Tabla 6 detalla las muestras analizadas y los resultados iniciales obtenidos.

Código	Tipo de muestra	Nº analisis	Resultado	Observaciones
Muestra "H"	Hamburguesa	P 0473/03	Positivo para <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva	Única muestra recuperada
Muestra "I"	Hamburguesas	P 073/03	Positivo para <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivo	
Hisopado de nasofaringe "K"	No alimento	P 073/03 bis	Positivo para <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivo	Muestra perdida
Hisopados de superficie de zona de manipulación de alimentos "L,M,N,O"	No alimento	P 073/03 tris	Positivo para <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivo	Muestra perdida

Tabla 6. Muestras analizadas y resultados bacteriológicos obtenidos

En la muestra analizada, el valor encontrado en los recuentos de *Staphylococcus* fue superior a  $5 \times 10^5$  ufc/gr. Se aislaron 2 tipos de colonias típicas, las que fueron codificadas e investigadas. La cepa identificada como "H", no coagula el plasma de conejo (Mc faddin. 2003), la identificada como "I" es coagulasa positiva. Se informa la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positivo en niveles superiores a  $1 \times 10^5$  ufc/g, compatible con el cuadro clínico reportado.

No se encontraron indicios del resto de los patógenos investigados. Las cepas fueron almacenadas en congelación por el método del glicerol. Durante el almacenamiento se perdieron las cepas, K (correspondiente a hisopados nasofaringeo de la persona responsable de la manipulación de los alimentos en el Centro de Evacuados) y las L, M, N y O (obtenidas en el relevamiento de superficies en la zona de recepción y racionamiento de los alimentos)

Las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas de los alimentos sospechosos demostraron que eran compatibles con *Staphylococcus aureus* (Tabla 7).

Cepa	Coagul DNAsa	V. P	Nitrato	Urea	PYR	Maltosa	Lactosa	Manitol	Manosa	Trealosa	sucrosa
H	+/+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

<b>I</b>	+/+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

**Tabla 8 .** Pruebas bioquímicas (Mc Faddin . 2003)

Con la metodología ahora disponible se investigó la presencia de genes productores de enterotoxinas en las cepas conservadas. La aplicación de la PCRmultiplex implementada para la determinación de genes de enterotoxina estafilococica (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) puso de manifiesto la existencia de bandas de amplificación correspondientes a la secuencia de la enterotoxina tipo B. (Fig 11)

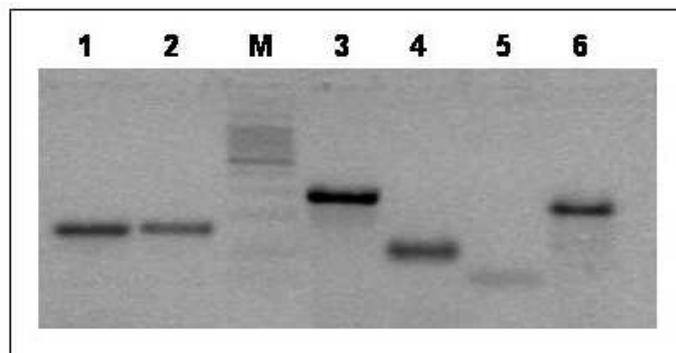


Figura 11. 1: Cepa **H** ; 2: Cepa **I** ; 3: SA control con **SE-A** ; 4: SA control con **SE-C** ; 5: Control **MM** ; 6: SA con **SA-E** ; M: Marcador de Tamaño Molecular (100 pb Ladder, Promega Corp.).

## CONCLUSIONES

A partir del desarrollo de este trabajo de tesis, pudimos proponer una alternativa metodológica para la identificación molecular de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*. Las modificaciones propuestas, implicaron una ganancia en términos de practicidad y tiempo en todos los pasos del análisis: extracción de ADN, amplificación *in vitro* y confirmación por digestión con enzimas de restricción.

Con el ensayo propuesto pudimos evaluar la presencia de genes de enterotoxinas en cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos y en distintos brotes de intoxicación alimentaria ocurridos en la Provincia de Santa Fe.

Los resultados obtenidos indicarían que es posible planificar la introducción de este protocolo de análisis como una rutina en los laboratorios de análisis de alimentos de mediana complejidad, como una herramienta más en la evaluación epidemiológica de brotes de Enfermedades de Toxiinfección Alimentaria y como un paso preliminar a la evaluación general por PFGE.

El diseño de un análisis de múltiplex-PCR, además de ser sencillo, económico, no requiere de gran equipamiento y permite la eventual inclusión de otros genes que codifican enterotoxinas identificadas con posteridad al desarrollo de este trabajo.

Existe evidencia científica cada vez más fuerte en señalar que los brotes de intoxicación alimentaria estafilococcica son causados por más de una enterotoxina y por enterotoxinas recientemente identificadas que no se detectan en los controles por métodos comerciales. Es importante la detección del o los tipos de toxinas producidas por cepas aisladas de brotes de toxiinfección alimentaria, ya que permite determinar cual cepa es la responsable del brote y que alimentos estaría implicados, siempre en el marco del estudio epidemiológico de brote.

Finalmente, proponemos la aplicación de un protocolo de identificación molecular como el aquí presentado, para la investigación de rutina de *Staphylococcus aureus*. Enterotoxigénicos. Esto implica una actualización de la reglamentación sanitaria ya que es posible y definitorio realizar una caracterización de los *Staphylococcus* aislados de alimentos o vinculados a brotes de toxiinfecciones alimentarias, realizar una fenotipificación y verificar su potencial toxigénico, conjuntamente con la determinación de la presencia de enterotoxinas en alimentos de alto riesgo.



## BIBLIOGRAFÍA

1. **Adesiyum EY, Tarini SR, Hoover DG.** 1984. *Vet Microbiol* 9:487-495.
2. **Alberg G, Hammer D, Fleisher B.** 1990. Relationship between enterotoxic and T lymphocyte-stimulating activity of staphylococcal enterotoxin B . *J Immunol* 144:4501-4506.
3. **Almeida C, Schuch D, Scala Gelli D; Cuellar J, Diez A, Escamilla José. OPS-OMS/INPPAZ.** 1996. Contaminación Microbiana De Los Alimentos Vendidos En La Vía Pública En Ciudades De América Latina Y Características Socio-Económicas De Sus Vendedores Y Consumidores. OPS/HCV/FOS/96.22
4. **APHA.** 1992. American Public Health Association. Compendium of methods for the examination of foods. 3.ed. Washington. 1219p.
5. **Archer Gordon L.** 1998. *Staphylococcus aureus: A Well-Armed Pathogen.* 1998. *Clinical Infectious Diseases*; 26:1179–81.
6. **Arm HG, Floyd TM, Farber JE, Hayes JR.** 1965. Use of Ligated of Rabbit Small Intestine in Experimental Shigellosis. *Journal of Bacteriology.* Vol 89. No 3
7. **Atanassova V, Meindl A and Ring C.** 2001. *International Journal of Food Microbiology* [Volume 68, Issues 1-2](#), 15 August 2001, Pages 105-113
8. **Balaban, N, Rasooly, A.** (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 1-10.
9. **Bascomb Sand Manafi M.** 1998. Use of Enzyme Tests in Characterization and Identification of Aerobic and Facultatively Anaerobic Gram-Positive Cocci. *Clinical Microbiology Reviews.* Vol. 11, No. 2. p. 318–340.
10. **Bautista L, Gaya P, Medina M, Nuñez M.** 1988. A Quantitative Study of Enterotoxin Production by Sheep Milk Staphylococci. *Applied And Environmental Microbiology.* P. 566-569.
11. **Bhatia A, Zahoor S.** 2007. *Staphylococcus Aureus Enterotoxins: A Review.* *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 3:188-197
12. **Bayles K, Iandolo J,** 1989 . Genetic and Molecular Analyses of the Gene Encoding Staphylococcal Enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 171(9):4799-4806.
13. **Bean N, Goulding JS, Lao C, Angulo FJ.** 1996. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1988-1992. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* CDC Surveill. Summ; 45: 1-66

14. **Becker K, Roth R, Peters G.** 1998. Rapid and Specific Detection of *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiple PCR Enzimoassay for Amplification and Hibridization of Staphylococcal Enterotoxin Gene, Exfoliative Toxin Genes, and Toxc Shock Syndrome Toxin 1 Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. p.2548-2553.
15. **Becker K, Friedrich W A , Peters G, von Eiff C.** 2004. Estudio sistemático sobre la prevalencia de los genes que codifican para la Enterotoxina SEIM, SEIO, y SEIN [Molecular Nutrition & Food Research](#) What is RSS Volume 48, Issue 7 , Pages 488 – 495 Published Online.
16. **Bécquer Lombard A, Leyva Castillo V, Lara Ortiz C, Mota de la Garza L.** 1997. *Staphylococcus aureus*, actividad termonucleasa y enterotoxinas en alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 11(2):89-93.
17. **Bécquer Lombard A, Mota de la Garza L, Lara Ortiz C.** 1996. Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. *Revista Cubana Aliment Nutr.* 10(2).
18. **Beery John T, Taylor Steve L., Schlunz Leslie R., Freed Robert C., Bergdoll Merlin S.** 1984. Effects of Staphylococcal Enterotoxin A on the Rat Gastrointestinal Tract. *Infection And Immunity*. p. 234-240- Vol. 44, No. 2.
19. **Behme, Ronald, Shuttleworth Roger, McNabb Alan, Colby W. D.** 1996 Identification of Staphylococci with a Self-Educating System Using Fatty Acid Analysis and Biochemical Tests. *Journal of Clinical Microbiological*. Vol. 34, No. 12. p. 3075–3084
20. **Benjamin M, Lu J, Donnelly G, Dureja P, McKay D.** 1998. Changes in Murine Jejunal Morphology Evoked by the Bacterial Superantigens *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B are Mediated by CD4 Cells. *Infect Inmun.* p.2193-2199, Vol 86, No 5.
21. **Bergdoll M S , Schlievert P M .** 1984. Toxic – SOC Syndrome Toxin. *Lancet* ii:691.
22. **Bergdoll M S.** 1989. *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. Michel Dole Ed Marcel Dekker, Inc New Cork. 463-523

23. **Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP.** 1981. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. [Lancet.](#) 9;1(8228):1017-21.
24. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>a</sup> Ed 2001 (vol 1).** [www.procarvates.com](http://www.procarvates.com).
25. **Betley, M., and J. J. Mekalanos.** 1988. Nucleotide sequence of type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* **170**:34-41.
26. **Blomster-Hautmaa D, Kreiswirth B, Kornblum J, Novick R, Schlievert P.** 1986. The Nucleotic and partial amino acid sequence of Toxic Shock Syndrome Toxin-1. *J Biol Chem.*, Vol. 261, Issue 33, 1783-15786.
27. **Boach G, Schlievert P.** 1987 Nucleotide Sequence of the Staphylococcal Enterotoxin C<sub>1</sub> Gene and Relatedness to other Pyrogenic Toxins. *Molecular and General Genetic MGG.* Vol 209, No 1.
28. **Bohach, G A , fase D J, Nelson R D, Schlievert P M,** 1990. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin involved in shock toxic síndrome and related illnesses. *Rev. Microbiol.* 17:251-272.
29. **Breckinridge JC, Bergdoll MS.** 1971. *N Engl J Med* 284:541-543.
30. **(Buzby JC, Roberts T.** [World.](#) Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness [Health Stat Q.](#) 1997;50 (1-2):57-66.
31. **Carretero J. Esteban.** 2003. Enterocolitis Infecciosas y Parasitarias Principales Desordenes. <http://www.sepd.es/noticias/335>.
32. **Casewell MW, Hill RLR.** 1986. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 18 :Suppl A:1-1.
33. **CDC.** Centers for Disease Control and Prevention. 2006. Enteric Diseases Epidemiology Branch. Division of Foodborne, Bacterial, and Mycotic Diseases. National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases. <http://www.cdc.gov/foodnet/>.
34. **Cha J O, Lee J K, Jung Y H, Yoo J I, Park Y K, Kim B S, Lee Y S.** 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl Microbiol.* ;101 (4):864-71 16968298 ([P,S,E,B](#))

35. **Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E.** 2006. Diminished virulence of a sar-agr mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* 1994;94:1815-1822.
36. **Cheung, J. Koomey, C. Butler, S. Projan, V. Fischetti.** 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (sar) distinct from agr. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* Vol. 89, pp. 6462-6466. Microbiology.
37. **Chien-Shun C, Hsiao-Lun W, Li-Chu Y.** 2000. Comparison of Pulsed Field Gel Electrophoresis and Coagulase Gen Restriction Profile Analysis Techniques in the Molecular Typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, p.2186-2190, Vol. 38, No 6.
38. **Choi Y, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J.** 1989. Interaction of *Staphylococcus aureus* Toxin "Superantigens" with Human T Cells . *PNAS* November 15. vol. 86 no. 22 8941-8945.
39. **Código Alimentario Argentino, Ley 18284, Anexos y Supletorios.** [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar).
40. **Cohen Jacob, Marambio EHana, Lynch Beatriz, Moreno Alberto.** 1978. Infeccion por *Bacilus Cereus* en Recien Nacidos. *Revista Chilena de Pediatna* Vol. 55 N° 1
41. **Couch J, Beteley M.** 1989. Nucleotide Sequence of the Type C3 *Staphylococcal* Enterotoxin Gene Suggests that Intergenic Recombination Causes Antigenic Variation. *J Bacteriol.* ISSN 0021-9193, Vol171No 8 pp.4507-4510.
42. **Couch J, Soltis M, Betley M .** 1988. Clonig and Nucleotide Sequence of the type E *Staphylococcal* Enterotoxin Gene. *J. Bacteriol.* ; 17(7); 2954-2960.
43. **Dean A, Ching Y, Williams R, Harden L.** 1972. Test for *Escherichia coli* Enterotoxins Using Infant Mice. *The Journal Infections Disease.* Vol.125, No 4.
44. **De Boer Monica L, Kum Winnie WS, Chow Anthony W.** 1999. *Staphylococcus aureus* isogenic mutant, deficient in toxic shock syndrome toxin-1 but not *staphylococcal* enterotoxin A production, exhibits attenuated virulence in a tampon-associated vaginal infection model of toxic shock syndrome. *Can. J. Microbiol.* 45 (3) : 250–256
45. **Di Pietro S; Haritchabalet K; Cantón G; Iglesias L; Mancini S; Temperoni A; Labanchi J.; Barbarossa N; Garcia M.; Cofre M; Rosales S; Herrero E; Bigatti R; Orellana O; Larrieu E.** 2004. Vigilancia epidemiológica de enfermedades

- transmitidas por alimentos en la Provincia de Río Negro, Argentina, 1993-2001;64(2):120-124. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/BIREME/OPS/OMS> - Biblioteca Virtual en Salud
46. **Dinges Martin, Orwin paul, Schlievert Patrick.** 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews. Vol13 N°1, p. 16–34. American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
  47. **Dong-Liang Hu, Katsuhiko Omoe, Yu Shimoda, Akio Nakane, Kunihiro Shinagawa.** 2003 . Induction of Emetic Response to Staphylococcal Enterotoxins in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). Infect Immun. January; 71(1): 567–570
  48. **Duncan C, Sugiyama H, Strong D.** 1968. Rabbit Ileal Loop Response to Strains of *Clostridium perfringens*. Journal of Bacteriology, May 1968.p1560-1566. Vol 95, No 5.
  49. **Dunman P, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown E, Zagursky R, Shlaes R, Projan S.** 2001. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the *agr* and/or *sarA* Loci. Journal Of Bacteriology. p.7341–7353 Vol.183, No. 24.
  50. **Emori T G , Gaynes R P.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev. October; 6(4): 428-442
  51. **Erickson Marilyn C.** Recognition and Prevention of Staphylococcal Enterotoxins as Intentional Contaminants of Foods. Available [http://74.125.47.132/search?q=cache:ac6wupAuYTWJ:www.ugacfs.org/faculty/Erickson/Staphylococcus.pdf+Recognition+and+Prevention+of+Staphylococcal+Enterotoxins+as+Intentional+Contaminants+of+Foods&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ar&lr=lang\\_en](http://74.125.47.132/search?q=cache:ac6wupAuYTWJ:www.ugacfs.org/faculty/Erickson/Staphylococcus.pdf+Recognition+and+Prevention+of+Staphylococcal+Enterotoxins+as+Intentional+Contaminants+of+Foods&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ar&lr=lang_en)
  52. **Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S. and Bergdoll, M.S.** 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. Food Microbiol. 7: 311-316.
  53. **Faria N, Oliveira D, Westh H, Monnet D, Larsen A, Skov R, Lencastre H.** 2005. Epidemiology of Emerging Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a Nationwide Study in a Country with Low Prevalence of MRSA Infection. Journal Of Clinical Microbiology, p. 1836–1842.

54. **FDA/CFSAN, Bad Bug Book.** 2001. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>>
55. **Figueroa G, Navarrete WP, Caro CM, Troncoso HM, Faundez ZG.** 2002. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. *Revista Médica de Chile* v.130 n.8.
56. **Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J. and Smith, C.J.** 2001. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* 183: 63-70.
57. **Fueyo Mendoza, Jose Maria.** 2008. Frecuencia y Tipos de toxinas suérantígenos en S A de diferentes orígenes: tipos y relaciones. Editorial Univ de Oviedo. <http://site.ebrary.com/lib/unsamp/Doc?id=10219530&ppg=32>
58. **García Avión , Prats Godo J, Serra Majem L.** 1998. Informe SESPAS Comisión de 20 de enero de 1998, Conclusiones de Consejo de Europa 30/04/1998.
59. **Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongondin EF.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and biofilm-producing methicillin-resistant *S. epidermidis* strain. *J Bacteriol.* 187,2426-2438.
60. **Gottardi, Carina Philomena Tebisch; Souza, Cláudia Ache Saldanha de; Schmidt, Verônica.** 2006. Surtos de toxinfecção alimentar no município de Porto Alegre/RS, no período de 1995 a 2002 / Food-borne disease in the city of Porto Alegre /RS, from 1995 to 2002. ; 20 (143):50-55. tab. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>
61. **Gottfried, A., P. H. Scheuber, B. Reck, B. Sailer-Kramer, A. Hartmann, and D. K. Hammer.** 1989. Role of substance P in immediate-type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84:880–885.
62. **Hajek V.** 1976. *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. *International Journal of Systematic Bacteriology.* p. 401408 . Vol. 26, No. 4.

63. **Halpin-Dohnalek MI, Marth EH.** 1989. *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods. A review. *J Food Prot* ; 52: 267-82.
64. **Hamad, A.R., Marrack, P. and Kappler, J.W.** 1997. Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins. *J. Exp. Med.* 185: 1447-1454
65. **Harris TO, Grossman D, Kappler JW, Marrack P, Rich RR, Betley MJ.** 1993. Lack of complete correlation between T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun* ;61:3175-3183.
66. **Harris TO, Grossman D, Kappler JW, Marrack P, Rich RR, Betley MJ.** 1993. Lack of complete correlation between T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun*; 61:3175-83.
67. **Haslinger B, Strangfeld K, Peters G, Schulze-Osthoff K, Sinha B.** 2003. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor and the mitochondrial death pathway *Cellular Microbiology* 5 (10), 729–741.
68. **Hernández Betancourt O; Ulloa Cuesta Y; del Río Méndez D; Galdós M.** 2005. *Staphylococcus Aureus* y su Identificación en los Laboratorios Microbiológicos. Revisión Bibliográfica. *Archivo Médico de Camagüey.* 9(1) ISSN 1025-0255. *Instituto Superior de Ciencias Médicas "Carlos J. Finlay". Centro de Inmunología y Productos Biológicos CENIPBI.*
69. **Hernández G, Mangas I, Mateo S, Tello O, Rotaeché V.** 1995. Vigilancia de Brotes de Infecciones e Intoxicaciones de Origen Alimentario. España. 1994. *Bol Epidem Semanal.* 3/30, 293-299
70. **Hernández Lezama L.** Problemas relativos a la calidad e inocuidad de los alimentos y su repercusión en el comercio. <http://www.fao.org/docrep/x4390t/x4390to6.htm>
71. **Hirooka EY Muller EE, Freitas JC, Vicente E, Yoshimoto Y, Bergdoll MS.** 1988. Enterotoxigenicity of *S. intermedius* of Canine origin. *Int J Food Microbiol* 7:185-191.
72. **Hoffmann M L, Jablonoski L M, Crum K K, Hackett S P, Chi Y I, Stauffacher C V, Stevens D L, Bohach G A.** 1994. Prediction of T-cell receptor and major Histocompatibility complex binding sites on staphylococcal enterotoxin C1. *Infect. Immun* 62:3396-3407.

73. **Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Kalinacova V, Gondol J, Gromus J.** 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Food. *AnnAgric Environ Med*;9 (2):179-82.
74. **Huang I Y, Bergdoll M S.** 1970. The Primary Structure of Staphylococcal enterotoxin B II. Isolation , Composition and Sequence of Chymotrypic peptides. *J Biol Chem* 245:3511-3517.
75. **Huang I Y, Huges J L, Bergdoll M S, Schant E J.** 1987. Complete amino acid sequence of Staphylococcal Enterotoxin A, *J. Biol Chem* 162:7006-7013.
76. **ICMSF.** 1999. *Internacional Comisión on Microbiolog Specifications for Foods , of the nternational Union of Microbiological Societies. Microorganismos de los Alimentos . metodos de muestreo para análisis microbiologicos : principios y aplicaciones específicas . 2 da Ed Editorial Acribia S.A: Zaragoza España.*
77. **ICMSF.** 1999. *Internacional Comisión on Microbiolog Specifications for Foods , of the nternational Union of Microbiological Societies. Microorganismos de los Alimentos , su significado y Métodos de enumeración . 2 da Ed Editorial Acribia S.A: Zaragoza España*
78. **Ikeda Tetsuya, Tamate Naoto, Yamaguchi Keiji, Makino Sou-ichi.** 2005. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H .*Applied And Environmental Microbiology*, p. 2793–2795 Vol. 71, No. 5
79. **Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis, INPPAZ.** Guía para el establecimiento de Sistemas de Vigilancia Epidemiológicas de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y al Investigación de Brotes de Toxi-infecciones Alimentaria. "Guía VETA". INPPAZ/OPS/OMS, HPV/FOS/103/93.
80. **Internacional Dairy Federation.** FIL-IDF 145:1990, Milk and Milk-Based Products Numeration of *Staphylococcus aureus*.
81. **Janeway C, Travers P, Walport M, Capra D.** *Inmunobiología. El Sistema Inmunitario en Condiciones de Salud y Enfermedad.* Ed Masson S.A. Barcelona España. 2000.
82. **Jarraund S, Peyrat M, Lim A, Tristan A, Bes M, Mouget C, Etienne J, Vandenech F, Bonneville M, Lina G. egc.** 2001. A Highly Prevalente Operon of Enterotoxin Gene, Formas a Putative, Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*. 166; 669-677.

83. **JAY, J.M.** Microbiología moderna de los alimentos. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 804p.
84. **Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR.** 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*; 29(3): 426-430.
85. **Jones C, Khan C.** 1986. Nucleotide Sequence of the Enterotox B Gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 166(1):29-33.
86. **Jones Timothy F, Kellum Molly E, Porter Susan S, Bell Michael, Schaffner W.** 2002. Un brote de Enfermedades transmitidas por los Alimentos Causados por Meticilino-resistente *Staphylococcus aureus* adquirida en la Comunidad. *Emerging Infectious Diseases* • Vol. 8, No. 1.
87. **Jones Timothy.** 2000. The Tennessee Foodborne Illness. Surveillance Network (FoodNet).. Tennessee Medicine
88. **Jonson Howard, Russell Jeffry, Pontzer, Carol.** 1991. Saphyloccal Enterotoxin Superagntigens. Society for Experimental Biology and Medicine. P.S.E.B.M. 1991 Vol198.
89. **Katsuhiko Omoe, Machiko Ishikawa, Yu Shimoda, Dong-Liang Hu, Shigeko Ueda, Kunihiro Shinagawa.** 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 857-862, Vol. 40, No. 3.
90. **Katsuihiko Omoe, Machiko Ishikawa, Yu Shimoda, Dong-Liang Hu, Shigeko Ueda and Kunihiro Shinagawa.** 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei*, genes in *Staphylococcus aures* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. Aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh*, *sei* Genes . *Journal of Clinicla Microbiology*. p.857-862, Vol. 40, No. 3.
91. **Kérouanton A; Hennekinne JA; Letertre C; Petit L; Chesneau O; Brisabois A; De Buyser ML.** 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. [Int J Food Microbiol](#);115(3):369-75.

92. **Kessler CM, Nussbaum E, Tuazon CU.** 1991. Disseminated intravascular coagulation associated with *Staphylococcus aureus* septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation. *J Infect Dis* ;164:101-107.
93. **Khambaty FM, Bennet EW, Shah DB.** 1994. Application of pulse-field gel electroforesis to the epidemiological characterition of *S intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect* 113:75-80.)
94. **Kimpe S, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane J.** 1995. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, pp. 10359-10363. Medical Sciences.
95. **Kloos W And Schleifer K .** 1975. Isolation and Characterization of *Staphylococci* from Human Skin II. *International Journal Of Clinical Microbiology.* 25:50-61
96. **Kloos W And Schleifer K.** 1975. Isolation and Characterization of *Staphylococci* from Human Skin I. *International Journal Of Systematic Bacteriology.* 25 62-79
97. **Kloos Wesley and Wolfshohl Jana .** 1982. Identification of *Staphylococcus* Species with the API STAPH-IDENT System. *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 509-516
98. **Kluytmans J, A Van Belkum, H Verbrugh .** 1997. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 505–520.
99. **Komisar, J., J. Rivera, A. Vega, and J. Tseng.** 1992. Effects of staphylococcal enterotoxin B on rodent mast cells. *Infect. Immun.* **60**:2969–2975.
100. **Kusumaningrum H. D, G. Riboldi, W. C. Hazeleger and R. R. Beumer.** 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods *International Journal of Food Microbiology* Volume 85, Issue 3, 25. Pages 227-236
101. **Lammler Christoph.** 1991. Characterization of *Staphylococcus hyicus* with the ATB 32 Staph.System and with Conventional Tests. *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 1221-1224
102. **Le Loir Y, Baron F and Gautier M.** 2003. *Genet. Mol. Res.* 2 (1): 63-76(2003).

103. **Lee C, Schmidt J, Johnson-Winegar, Spero L, Iandolo J.** 1987. Sequence Derivation and Comparison of the Exfoliative Toxin A and Toxin B Genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* , 169(9):3904-3909.
104. **[Letertre C](#), [Perelle S](#), [Dilasser F](#), [Fach P](#).** 2003. A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes sea to sej of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes*.17(5):227-35.
105. **Li, H., A. Llera, D. Tsuchiya, L. Leder, X. Ysern, P. M. Schlievert, K. Karjalainen, and R. A. Mariuzza.** 1998. Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor beta chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Immunity* 9:807–816.
106. **[Linnemann CC Jr](#), [Staneck JL](#), [Hornstein S](#), [Barden TP](#), [Rauh JL](#), [Bonventre PF](#), [Buncher CR](#), [Beiting A](#).** 1982. The epidemiology of genital colonization with *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 96(6 Pt 2):940-4.
107. **Lowy Franklin D.**1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 1998;339(27):2025.
108. **López C, Feltri A, Leotta G, González G, Manfredi E, Gottardi G, Elder M, De Las Carreras S, Patri C, Guajardo F, San Martín A, Rivas M.** 2008. Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén *Revista Argentina de Microbiología* 40: 198-203
109. **Mac Faddin J.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. 3ra Ed .2003.
110. **Madigan M, Martinko J, Parker J,** Brock Biología de los Microorganismos. 8va Ed Prentice Hall International (UK) Lda. 1998.
111. **Mandel GL, Bennett JE, Dolin R.** Ed. Bennett'S. Principles and Practice of Infecciones Dieases 5º Ed. Ed Churchill Livingstone . 2000
112. **Marrack P, Kappler J.** 1009. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* . 248:705-711. [Erratum, *Science* 1990;248:1066.
113. **Mayoral C, Noroña M, Baroni MR, Giani R and Zalazar F.** 2005. Evaluation of a Nested-PCR Assay for *Streptococcus pneumoniae* detection Pediatrics Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Rev.Arg. Microbiol.* (2005) 37: 184-188.
114. **Mazzi E, Mejia M, Cordero D.** 1999. *AIEPI* 1999;97(4)
115. **McClure J, Conly J, Lau V, Elsayed S, Louis T, Hutchins W, Zhang K.** 2006. Novel Multiplex PCR Assay for Detection of the Staphylococcal Virulence

- Marker Pantone-Valentine Leukocidin Genes and Simultaneous Discrimination of Methicillin-Susceptible from -Resistant Staphylococci. *Journal Of Clinical Microbiology*. p. 1141–1144.
116. **McCormick, J.K., Yarwood, J.M. and Schlievert, P.M.** 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 77-104.
117. **Mehrotra M, Wang G, Johnson W.** 2000. Multiplex PCR for Detection of Gene for Staphylococcus aureus Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin1 and Methicillin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. p.1032-1035, Vol.38,No.3.
118. **Monday S, Bohach G.** 1999. Use of Multiplex PCR to Detect Classical and Newly Described Pyrogenic Toxin Genes in Staphylococcal Isolates. *J. Clinical Microbiol.* 37:p.3411-3414.
119. **Monday Steven R, Vath Gregory M, Ferens Witold A., Deobald Claudia, Rago James V., Gahr Pamala J., Monie Dileep D., Iandolo John J., Chapes Stephen K., Davis William C., Ohlendorf Douglas H., Schlievert Patrick M., Bohach Gregory A.** 1999. Unique Superantigen Activity of Staphylococcal Exfoliative Toxins. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 4550–4559.
120. **Morris et al.** 1976. Enterotoxigenic E coli Detection. *Journal Clin Microbiol.* Vol 3.
121. **Mossel D AA, B Moreno and C Struijck.** *Microbiología de los Alimentos*. Ed Acribia S. A. España. 2002
122. **Murchan S., M Kaufman, A Deplano, R de Ryck., M. Struelens, C Zinn, V Fusing, S Salmenlianna.** 2003. Harmonization of Pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains methicillin-resistant S aureus a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol.* 41, 1574-1585,
123. **Munson, S.H., Tremaine, M.T., Betley, M.J. and Welch, R.A.** 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 66: 3337-3348.
124. **Musser J, P. Schlievertt, A. Chow, P Ewan, B. Kreiswirthii, V. Rosdahl, A. Naidutt, W. Witteft, R. Selander.** 1990. A single clone of Staphylococcus aureus causes the majority of cases of toxic shock syndrome. *Medical Sciences*. Vol. 87, pp. 225-229.

125. **Nakayama Akifumi, Akiko Okayama, Misao Hashida, Yasuzumi Yamamoto, Hisakatsu Takebe, Takashi Ohnaka, Tomoyuki Tanaka, and Shunsuke Imai.** 2006. Development of a routine laboratory direct detection system of staphylococcal enterotoxina genes *Journal of Medical Microbiology*, 55, 273–277.
126. **Norma FIL IDF Standard 145: 1990.**
127. **Norma FIL IDF Standard 60A:1978.**
128. **Norma ISO 6888-1. Parte 1.**
129. **Normanno G; Firinu A; Virgilio S; Mula G; Dambrosio A; Poggiu A; Decastelli L; Mioni R; Scuota S; Bolzoni G; Di Giannatale E; Salinetti AP; La Salandra G; Bartoli M; Zuccon F; Pirino T; Sias S; Parisi A; Quaglia NC; Celano GV.** 2005. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol*;98(1):73-9.
130. **O'Toole P, Foster T .** 1987. Nucleotide Sequence of the Epidemplytic Toxin A Gene of *Sataphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* ; 169(9):3910-3915.
131. **OMS 1998a.** Food safety - a worldwide public health issue. 1998. [www.who.ch/Programmes/fsf](http://www.who.ch/Programmes/fsf).
132. **OMS. 1997b.** Foodborne diseases - probably 350 times more frequent than reported. Informe de prensa OMS/58, 13 de agosto de 1997.
133. **OMS. 2005.** Organización Mundial de la Salud (2005). Informe sobre la Salud en el Mundo - ¡Cada madre y cada niño contarán! Ginebra (Suiza), 2005, <http://www.who.int/whr/2005/es/index.html>
134. **Orwin P, Fitzgerald R, Leung D, Gutierrez J, Bohach D, Schlievert P,** 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L, *Infection and Immunity*, p. 2916-2919, Vol. 71, No. 5.
135. **Palomares C, Torres MJ, Torres A, Aznar J, Palomares JC.** 2003. Rapid Detection and Identification of *Staphylococcus aureus* from Blood Culture Specimens Using Real-Time Fluorescence PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis Mar*;45(3):183-9.
136. **Park C, Akhtar M, Rayman M.** 1994. Evaluation of a Commercial Enzyme Immunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, D, and E in Foods. *Applied And Environmental Microbiology*. p. 677-681. Vol. 60, No. 2.

137. **Pepe Olimpia, Blaiotta Giuseppe, Bucci Francesca, Anastasio Marilena, Aponte Maria, Villani Francesco.** 2006. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded. Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process. Applied And Environmental Microbiology. p. 7057–7062. Vol. 72, No. 11
138. **Pesce de Ruiz Holgado, Aida.** 1996. Basualdo Cafo de Torres. Microbiología Biomédica. Ed Atlante S:R.L. Bs As.
139. **Prado Jiménez, Valeria; Solari G., Verónica; Alvarez A., Isabel; Arellano C., Carolina; Vidal A., Roberto; Carreño C., Mónica; Mamani M., Nora; Fuentes R., David; O'Riyan G., Miguel; Muñoz F., Víctor.** 2000. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: período 1999-2000 / Survey of foodborne diseases in the Metropolitan Area of Chile. [Rev. med. Chile](#); 130 (5):495-501, mayo 2002. tab, graf. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>
140. **Quevedo, Michanie, Gonzalez Ayala.** 1990. Actualización de Enfermedades Transmitidas por alimentos . OPS/OMS .
141. **Rapini L S, Cerqueira M M, Carmo L S, Veras J F, Souza M R.** 2005. Presence of *Staphylococcus* strains producer of enterotoxins and toxic shock toxin syndrome isolated from goat's cheese handlers Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.57 no.6 Belo Horizonte.
142. **Ren, K, J. D. Bannan, V. Pancholi, A. L. Cheung, J. C. Robbins, V. A. Fischetti, and J. B. Zabriskie.** 1994. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. J. Exp. Med. 180:1675–1683.
143. **Robbins Ruth, Gould Sara, And Bergdoll Merlin.** 1974. Detecting the Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* Strains. Applied Microbiology, p. 946-950
144. **Sadkowska-Todys M; Stefanoff P; Labunska.** 2003. Foodborne infections and intoxications in Poland in 2003. [Przeegl Epidemiol](#);59(2):269-79, 2005.
145. **Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP.** 1994. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis ;19:1123-8.

146. **Scallan E et al.** 2005. Prevalence of diarrhoea in the community in Australia, Canada, Ireland, and the United States. *International Journal of Epidemiology*, 34:454–460
147. **Schlievert P M, Bohach G A, Ohlendorf D H, Stauffacher C V, Leung D Y M, Murria D L, Prasad S P, Earhart C A, Jablonski L M, Hoffmann M L, Chi Y I.** 1995. Molecular Structure of Staphylococcus and Streptococcus Superantigens. *J. Clin. Immunol.* 15:45-105.
148. **Sesardic D.** 2002. Alternatives in testing of bacterial toxins and antitoxins. *Dev. Biol (Basel).* 111:101-8
149. **Schmitz H and Hensel.** 2004. Pathogenicity island in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiology, Rev.* 17,14-56.
150. **Scott E.** 2003. Food safety and foodborne disease in 21st century homes. STANIER REVIEW. *Can J Infect Dis Vol* 14 No5.
151. **Sharma N, Rees C, Dodd C.** 2000. Development of a Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for *Staphylococcus aureus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, p.1347-1353.
152. **Shimizu A, Fujita M, Igarashi H, Takagi M, Nagase N, Sasaki A, Kawano J.** 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* Coagulase Type VII Isolates. from Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks (1980–1995) in Tokyo, Japan, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J of Clinical Microbiology*, p. 3746–3749. Vol. 38, No. 10.
153. **SINAVE VIGI+A.** Ministerio de Salud, Argentina. Dirección de Epidemiología, Programa de Vigilancia de la Salud y Control de Enfermedades. Manual de Normas y Procedimientos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 1999, Revisión Internacional 2000.
154. **Spero L Shimdt J.** 1983. The Complete Aminoacid sequence of Staphylococcal Enterotoxin C1. *J Biol Chem* 258:6300-6306. **N P**
155. **Su Y C and Wong A C.** 1995. Identification and Purification of a new Staphylococcal Enterotoxin, H. *Appl. Environ. Microbiol.*1438-1443, Vol 61, No. 4.
156. **Sugiyama, H., and T. Hayama.** 1965. Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. *J. Infect. Dis.* 115:330–336.
157. **Tenover F, R Arbeit, G Archer, J Biddle, S Byrne, R Goering, G Hancock, G A Hébert, B Hill and R Hollis .** 1994. Comparison of traditional and molecular

- methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* ; 32(2): 407-415.
158. **Tenover Fred, R Arbeit, R Goering, P Micklensen, B Murray, D Persing, B Swaminathan.** 1996. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol.*, p 2233-2239, Vol.33, No.9.
159. **Thomas Damien Yann, Jarraud Sophie, Lemercier Brigitte, Cozon Gregoire, Echasserieau Klara, Etienne Jerome, Gougeon Marie-Lise, Lina Gerard, Vandenesch Francois.** 2006. Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. *Infection And Immunity*, p. 4724-4734 Vol. 74, No. 8
160. **Tong-Rong C, Ming-Haung H, Chien-Shun C, Hau-Yang T,** 2001. Development and use of PCR primers for the investigation of C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *International Journal of Food Microbiol* Vol 71, Issue 1, Pages 63-70.
161. **Tsen, H.-Y., and T.-R. Chen.** 1992. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**:685-690
162. **Vandenesch F, Eykyn S, Bes M, Meugnier H, Fleurette J, Etienne J.** 1995. Identification and Ribotypes of *Staphylococcus caprae* Isolates. Isolated as Human Pathogens and from Goat Milk. *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 888-892 Vol. 33, No. 4
163. **Velázquez-Meza M E.** 2005. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud pública Méx* v.47 n.5 Cuernavaca.
164. **Versalovic J, Koeuth T and Iupski J R .** 1991. Comparación de Perfiles de ADN bacteriano a través de REP-PCR. *Nucl Acids Res*; 19:6823
165. **Wahib Mahana.** 1999. *Infection And Immunity*, p. 1894-1900 Vol. 67, No. 4. Mapping of Staphylococcal Enterotoxin A Functional Binding Sites and Presentation by Monoclonal Antibodies and Fusion Proteins
166. **Waldvogel Francis.** 2002. Mandel G, Benett J, Dolin R, Mandel G, Douglas G, Benett J, *Enfermedades Infecciosas Principios Prácticos.* Editorial Panamericana. 5ta Ed.

167. **Weinke T, Schiller R, Fehrenbach FJ, Pohle HD.** 1992. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* ;11:985-9..
168. **Wenzel RP, Perl TM.** 1995. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *J Hosp. Infect* ;31:13-24
169. **Wie-Gang Hu, Xi-Hua Zhu, Yu-Zhang Wu, Zheng-Cai Jia.** 1998. Localization of a T-Cell Epitope of Superantigen Toxic Shock Syndrome Toxin 1 to Residues 125 to 158. *Infection and Immunity*. p. 4971-4975, Vol.66, No 10.
170. **Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, et al.** 2002. Identification of *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encode a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun*. 70, 5835-5845.
171. **Yarwood J, McCormick, P. Schlievert..** 2001. Identification of a Novel Two-Component Regulatory System That Acts in Global Regulation of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Bacteriology*. p. 1113–1123 Vol. 183, No. 4.
172. **Zhang K, McClure J, Elsayed S, Louie T, Conly J.** 2005 . Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 5026–5033 Vol. 43, No. 10
173. **Zollner, Wichelhaus, Hartung, Von Mallinckrodt, Wagner, Brade, Kaufmann.** 2000. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis *Clinical & Experimental Allergy* 30 (7), 994–1000. doi:10.1046/j.1365-2222. 2000.00848.x.

## ANEXO

**TABLAS**

**Tabla 1 . Rasgos distintivos de los Cocos Gram Positivos**

Género	Disposición celular	Fermentación	% GC	16S rRNA	Características
Micrococcus	Tetradas	-	66-73	Alto GC	Aerobio estricto
Staphylococcus	Pares	+	30-39	Bajo GC	Único género con Ác teicoico
Planococcus	Pares tetradas	-	39-52	Bajo GC	Ppalmente marino
Sarcina	Cuboidales	+	28-31	Bajo GC	Muy tolerante al Ácido, pared con celulosa
Ruminococcus	Pares cadenas	+	39-46	Bajo GC	Anaerobio obligado. Rumen de animales
Peptococcus	Grupos pres	+	50-51	Bajo GC	Anaerobio obligado. Fermenta pep no azúcares.
Peptoestreptococcus	Grupos cadenas cortas	+	28-37	Bajo GC	Anaerobio obligado. Flora habitual humana
Deinococcus	Pares tetradas	-	62-70	Deinococcus thermus	Filogeneticamente Único

(Madigan M, Martinko J, Parker J, Brock Biología de los Microorganismos)

**Tabla 2 . Diferencias entre *Micrococcus* y *Staphylococcus***

	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
Tetradas	+	-
Agar Furazolidonana	+	-
Test de oxidasa y bencidina	+	-
Fermentan la glucosa anaerobicamente	-	+

(Pesce de Ruiz Holgado, Aida. 1996)

**Tabla 3: Identificación de las 3 especies más frecuentes de *Staphylococcus***

	<i>S aureus</i>	<i>S epidermidis</i>	<i>S saprophyticus</i>
Coagulasa	+	-	-
Resistencia Novobiocina	-	-	+
D-manitol (producción aeróbica de ácido)	+	+/-	+/-
Fosfatasa	+	+	-
Trealosa (producción aeróbica de ácido)	+	-	+
Pared celular, proteína A	+	-	-

, (Pesce de Ruiz Holgado, Aida. 1996)

Tabla 4 Caracterización bioquímica de *S. aureus*.

Taxon	No. of strains	% of positive reactions <sup>a</sup>																																				
		Oxidase (modified)	Coagulase (tube)	Glucose fermentation	Urea hydrolysis	Arginine hydrolysis	Ornithine decarboxylase	Glucose acid	Lactose acid	Sucrose acid	D-Mannitol acid	Sialkin acid	Sorbitol acid	L-Arabinose acid	D-Raffinose acid	Maltose acid	D-Xylose acid	D-Trehalose acid	D-Cellobiose acid	D-Fructose acid	D-Mannose acid	D-Galactose acid	Xylinol acid	D-Melezitose acid	Esculin hydrolysis	Nitrate reduction	PYR	Phosphatase	6.5% NaCl growth	Novobiocin resistance	Gelatinase	DNase	Tween 80 lipase	Furazolidone resistance	Acetoin	Beta-glucosidase		
<i>S. arlettae</i>	2	0	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	0	100	0	100	100	100	0	100	0	0	0	17	100	0	0	100	100	100	100	100	17	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	130	0	99	100	80	100	0	100	79	100	94	2	0	0	0	100	0	96	1	100	100	86	0	7	52	98	0	100	100	1	78	99	83	0	95	32		
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> group B	3	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	100	100	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	0	
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> total	133	0	99	100	80	100	0	100	80	100	94	2	0	0	0	100	0	96	1	100	100	86	0	7	51	98	0	100	100	1	77	99	81	0	95	31		
<i>S. auricularis</i>	2	0	0	0	10	0	100	0	100	0	50	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	0	80	100	0	10	0	0	0	0	0	0	0		
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	39	0	0	0	97	0	100	10	100	0	71	97	0	0	0	0	3	0	0	0	100	97	0	0	0	0	92	0	0	100	0	10	60	3	0	92	0	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	34	0	0	0	100	76	100	0	100	91	97	97	0	0	0	0	100	0	0	0	100	97	73	0	0	0	97	0	3	100	0	100	100	0	0	97	0	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> group b	2	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100	0	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> total	36	0	0	0	100	78	100	0	100	92	97	97	0	0	0	0	100	0	0	0	100	97	69	0	0	0	97	0	3	100	0	100	100	0	0	97	0	
<i>S. caprae</i>	38	0	0	0	100	92	100	0	100	50	95	95	0	0	0	0	89	0	97	0	100	95	71	0	0	0	79	100	92	100	0	74	100	37	0	87	0	
<i>S. carnosus</i>	9	0	0	0	100	0	100	0	100	78	0	100	0	89	0	0	0	0	11	0	100	100	0	0	0	0	100	56	100	100	0	0	0	0	0	11	0	
<i>S. carnosus</i> group B	10	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	100	0	100	20	30	0	0	20	80	50	20	100	0	0	20	0	0	20	
<i>S. carnosus</i> total	19	0	0	0	100	0	100	0	100	37	0	47	11	42	0	0	0	0	58	0	100	58	16	0	0	11	89	53	58	100	0	0	11	0	0	5	11	
<i>S. caseolyticus</i>	2	90	0	70	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	70	100	0	70	0	0	0	100	100	0	100	50	100	0	0	0	100	0	
<i>S. caseolyticus</i> group B	2	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	100	100	0	100	50	100	0	0	0	100	0	
<i>S. caseolyticus</i> total	4	95	0	85	0	0	0	100	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	35	100	50	35	0	0	0	100	100	0	100	50	100	0	0	0	100	0	
<i>S. chromogenes</i>	5	0	0	0	100	80	100	0	100	84	100	0	0	0	0	0	20	0	96	0	100	100	40	0	0	0	100	60	100	100	0	100	100	0	0	0	0	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	7	0	0	0	100	0	0	0	100	0	21	100	0	50	0	0	0	100	0	100	0	100	43	14	21	0	0	0	0	100	100	0	0	71	0	71	0	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	32	0	0	0	100	91	29	0	100	97	17	97	47	6	0	3	97	0	100	0	100	100	16	47	0	47	3	69	53	100	100	75	0	59	0	31	46	
<i>S. delphina</i>	2	0	100	100	100	100	0	100	100	100	90	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100	90	100	0	0	38	0
<i>S. epidemidis</i>	155	0	0	100	98	94	1	100	99	100	2	0	1	0	1	99	0	3	0	100	98	94	0	88	1	99	0	92	100	3	87	1	85	0	100	0	0	
<i>S. epidemidis</i> group b	6	0	0	0	100	100	83	0	100	100	100	0	0	17	0	0	100	0	0	0	100	83	83	0	100	0	100	0	100	100	0	83	0	100	0	100	0	
<i>S. epidemidis</i> group c	39	0	0	0	100	92	95	0	100	100	100	3	0	3	0	0	100	0	3	0	100	97	100	0	97	0	95	0	31	100	0	54	0	64	0	100	0	
<i>S. epidemidis</i> group d	3	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	100	100	0	100	0	67	0	100	100	0	100	0	67	0	100	0	
<i>S. epidemidis</i> group e	9	0	0	0	100	100	78	0	100	89	100	0	0	22	0	0	0	100	0	0	100	100	89	0	89	0	100	0	100	100	0	67	0	100	0	100	0	
<i>S. epidemidis</i> group f	2	0	0	0	100	100	100	0	100	50	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100	100	0	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100	0	100	0	
<i>S. epidemidis</i> group g	3	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100	100	0	0	0	100	0	100	100	0	100	0	33	0	100	0	
<i>S. epidemidis</i> total	217	0	0	0	100	97	94	0	100	98	100	2	0	3	0	0	100	0	2	0	100	98	95	0	89	0	98	0	82	100	2	81	0	80	0	100	0	
<i>S. equorum</i>	48	0	0	0	94	100	56	0	100	92	98	94	94	23	94	0	100	96	88	48	100	100	50	0	8	94	100	46	50	100	98	71	0	0	0	10	99	
<i>S. equorum</i> group b	21	0	0	0	100	100	52	0	100	100	100	100	24	86	0	100	100	100	62	100	100	19	0	0	24	100	14	76	100	100	71	0	0	0	0	5	100	
<i>S. equorum</i> total	69	0	0	0	96	100	55	0	100	94	99	96	96	23	91	0	100	97	91	52	100	100	41	0	6	72	100	36	58	100	99	71	0	0	0	9	99	
<i>S. felis</i>	21	0	0	0	100	100	100	0	100	100	43	5	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	0	0	48	95	0	0	0	
<i>S. felis</i> group b	20	0	0	0	100	100	100	0	100	100	100	95	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	0	0	29	100	0	0	0	
<i>S. felis</i> total	41	0	0	0	100	100	100	0	100	100	71	49	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	0	0	39	98	0	0	0	
<i>S. gallinarum</i>	2	0	0	0	100	100	100	0	100	50	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100	0	0	0	100	100	50	100	100	100	83	17	0	0	50	100	
<i>S. haemolyticus</i>	167	0	0	100	5	98	0	100	89	100	73	0	2	0	0	0	100	0	99	0	94	1	87	0	30	1	98	97	0	100	0	1	7	8	0	81	26	
<i>S. haemolyticus</i> group b	14	0	0	0	100	0	100	0	100	100	50	0	0	0	0	0	0	100	0	79	0	93	0	100	0	43	0	100	100	0	100	0	0	21	0	0	100	40
<i>S. haemolyticus</i> total	181	0	0	0	100	4	98	0	100	90	100	71	0	2	0	0	0	100	0	98	0	94	1	88	0	31	1	98	97	0	100	0	1	8	7	0	82	27
<i>S. hominis</i>	5	0	0	0	100	100	0	0	100	20	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	20	0	45	20	100	0	0	100	0	0	0	65	0	5	0
<i>S. hominis</i> group b	2	0	0	0	100	100	0	0	100	63	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	63	0	50	0	100	0	0	100	0	0	50	0	13	0	0
<i>S. hominis</i> group c	13	0	0	0	100	92	0	0	100	62	100	38	0	0	0	0	0	100	0	15	0	100	0	38	0	85	0	92	8	0	100	77	0	8	0	15	0	
<i>S. hominis</i> group d	48	0	0	0	100	77	4	0	100	85	100	29	0	0	0	0	0	100	0	65	2	92	0	83	2	92	0	98	10	0	100	2	0	0	46	0	38	0
<i>S. hominis</i> group E	2	0	0	0	100																																	

Taxon	No. of strains	% of positive reactions <sup>a</sup>																																			
		Oxidase (modified)	Congulate (tube)	Glucose fermentation	Urea hydrolysis	Arginine hydrolysis	Ornithine decarboxylase	Glucose acid	Lactose acid	Sucrose acid	n-Mannitol acid	Sorbitol acid	l-Arabinose acid	n-Raffinose acid	Maltose acid	n-Xylose acid	n-Trehalose acid	n-Cellobiose acid	n-Fructose acid	n-Mannose acid	n-Galactose acid	Xylyl acid	n-Melezitose acid	Esculin hydrolysis	Nitrate reduction	PYR	Phosphatase	6.5% NaCl growth	Novobiocin resistance	Ge-kinase	DNase	Tween 80 lipase	Furazolidone resistance	Acetoin	Beta-glucosidase		
<i>S. intermedius</i> total	86	0	94	100	100	99	0	100	100	100	13	0	0	0	100	0	100	100	99	0	0	0	100	99	100	100	0	100	100	100	0	100	100	98	0	1	4
<i>S. kloosii</i>	2	0	0	100	100	30	0	100	100	90	100	0	0	100	0	100	0	100	0	20	0	0	50	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	30	0	
<i>S. kloosii</i> group b	2	0	0	100	100	50	0	100	100	50	100	0	0	50	0	100	0	100	0	0	0	0	50	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	50	0	
<i>S. kloosii</i> total	4	0	0	100	100	40	0	100	100	70	100	0	0	75	0	100	0	100	0	10	0	0	50	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	40	0	
<i>S. lennis</i>	12	100	0	100	25	0	0	100	92	100	100	100	58	100	92	100	90	100	100	100	100	0	17	100	100	19	92	100	83	0	0	0	0	2	75		
<i>S. lugdunensis</i>	105	0	0	100	56	0	0	100	100	72	100	1	0	0	0	100	0	99	0	100	72	0	7	0	98	99	2	100	0	15	96	0	0	99	43		
<i>S. lugdunensis</i> group b	4	0	0	100	50	0	0	100	100	100	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	100	100	0	100	0	25	75	0	0	100	0			
<i>S. lugdunensis</i> total	109	0	0	100	56	0	0	100	100	73	100	1	0	0	0	100	0	99	0	100	73	0	6	0	98	99	2	100	0	16	95	0	0	99	43		
<i>S. muscae</i>	2	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	0	0	0	67	0		
<i>S. pasteurii</i>	2	0	0	100	100	100	0	100	0	100	100	0	0	0	100	0	100	0	100	50	100	0	88	0	100	0	100	0	88	0	50	0	100	100	0		
<i>S. piscifementans</i>	6	0	0	100	100	100	0	100	100	100	0	100	0	0	67	0	100	0	21	100	0	100	100	100	46	96	100	0	67	100	0	0	67	100	0		
<i>S. piscifementans</i> group b	2	0	0	100	100	100	0	100	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	50	0	50	100	100	50	100	100	0	100	100	0	50	100	0	50	100	
<i>S. piscifementans</i> total	8	0	0	100	100	100	0	100	100	100	0	100	0	0	75	0	100	0	100	16	88	0	88	100	100	47	97	100	0	75	100	0	75	100	0	13	100
<i>S. pulverii</i>	5	100	0	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	20	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. saprophyticus</i>	73	0	0	100	100	71	0	100	86	100	88	0	0	0	100	0	99	0	100	0	8	12	1	0	4	15	14	100	100	73	1	0	0	99	6		
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	4	0	100	100	100	100	81	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	25	100	0	0	
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	8	0	0	100	0	100	0	100	13	0	0	0	0	0	0	0	88	0	100	100	100	0	3	0	100	100	100	0	100	100	48	0	100	0	0		
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> group b	17	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	88	0	100	100	100	0	0	0	94	100	100	100	0	82	100	88	0	100	14	0	
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> group c	6	0	33	100	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	100	100	100	0	100	100	83	0	100	0	0	
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> total	31	0	6	100	0	100	0	100	3	0	0	0	0	0	0	0	90	0	100	100	100	0	1	0	97	100	100	100	0	90	100	77	0	100	8	0	
<i>S. sciuri</i>	27	100	0	100	0	0	0	100	81	100	100	100	96	67	0	100	0	100	100	100	100	52	0	22	100	100	4	100	100	100	100	59	0	0	0	100	
<i>S. sciuri</i> group b	2	100	0	100	0	0	0	100	50	100	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0	0	0	100	
<i>S. sciuri</i> total	29	100	0	100	0	0	0	100	79	100	100	100	97	69	0	100	0	100	100	100	100	55	0	28	100	100	3	100	100	100	100	62	0	0	0	100	
<i>S. simulans</i>	33	0	0	100	94	100	0	100	97	100	79	0	0	0	9	0	97	0	100	24	58	0	0	0	100	97	9	100	0	18	27	97	0	15	0		
<i>S. vitulus</i>	13	100	0	0	0	0	0	100	0	100	100	31	52	0	0	23	65	94	69	100	100	0	0	77	100	0	4	100	100	0	0	0	0	0	25	0	
<i>S. wamneri</i>	76	0	0	100	92	95	4	100	8	100	64	0	0	0	0	100	0	100	0	97	7	11	0	9	0	43	1	1	100	0	63	0	89	0	91	58	
<i>S. wamneri</i> group b	4	0	0	100	100	100	0	100	0	100	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	0	100	0	0	100	0	75	0	100	0	75	50		
<i>S. wamneri</i> group c	5	0	0	100	80	80	0	100	20	100	60	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	20	0	20	0	80	0	0	100	0	40	0	100	0	100	75	
<i>S. wamneri</i> total	85	0	0	100	92	94	4	100	8	100	61	0	0	0	0	100	0	100	0	98	6	11	0	9	0	48	1	1	100	0	62	0	91	0	91	59	
<i>S. xylosox</i>	2	0	0	100	100	38	0	100	100	100	100	0	50	0	100	100	100	0	100	100	0	50	0	0	100	88	100	100	100	0	0	50	0	0	50	0	
<i>S. xylosox</i> group b	31	0	0	100	100	65	0	100	100	100	100	0	19	87	0	100	100	97	0	100	100	19	14	0	7	97	83	100	100	100	65	3	0	0	30	13	
<i>S. xylosox</i> total	33	0	0	100	100	63	0	100	100	100	100	0	18	85	0	100	100	97	0	100	100	18	16	0	7	97	83	100	100	100	67	3	0	0	32	13	
Unnamed group 1	2	0	0	100	13	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	25	88	100	0	0	0	0	0	25	0		
Unnamed group 2	5	0	0	100	100	100	0	100	0	92	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	100	40	0	24	0	80	0	100	100	0	100	0	80	0	100	0	
Unnamed group 3	3	0	0	100	0	100	0	100	67	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	33	0	0	100	17	0	
Unnamed group 4	3	0	0	100	100	92	0	100	67	100	100	100	100	67	100	100	100	0	100	100	8	0	0	0	100	100	42	100	100	100	33	0	0	58	100		

<sup>a</sup> Multiple examinations of reference strains were reduced to a single data set prior to inclusion in the database. PYR, pyroglutamate aminopeptidase.

(Behme, Ronald, Shuttleworth Roger, Mcnabb Alan, Colby W. D. 1996 Identification of Staphylococci with a Self-Educating System Using Fatty Acid Analysis and Biochemical Tests. Journal of Clinical Microbiological. Vol. 34, No. 12. p. 3075–3084)

	<b>Diarrea no inflamatoria</b>	<b>Diarrea inflamatoria</b>
CLÍNICA	Diarrea acuosa (I. Delgado)	Heces escasas, con tenesmo y dolor pueden ser a veces disenteriformes (Colon)
LABORATORIO	< 3 PMN/4 Campos Lactoferrina normal	> 3 PMN />4 campos Lactoferrina normal
MEC DE PROD	Enterotoxina Staphylococcus B.Cereus, C.Botulium Shigella, Vivrios. ECET. Virus	Citotoxinas/invasivas Salmonella, Shigella, Campylobacter C.Difficile Entamoeba h Yersinia ECEI ECEH
COMPLICACIÓN	Deshidratación	Bacteriemia. Infecciones metastásicas Artritis reactivas. S.Hemolítico-coco urémico
Evaluación Médica	Moderadas y graves	Siempre

**Epidemiología, *Staphylococcus aureus* como agente etiológico.**

Eventos	Modalidad de Notificación	Fuente de Notificación	Periodicidad
Toxi-infección Alimentaria	Númérica, Estudio de Brote	C2 – Lab	Semanal

(Manual de Procedimientos de Vigilancia Epidemiológica VIGI+A. 2000)

Enfermedad	Tipo	No de muestra y cantidad	Momento de la recolección	Recipiente	Conservación	Transporte	Observación
ETA	Mat Fecal	25 gr	Hasta 7 días después del consumo	Frasco esterilizado o tapa a rosca	Refrigeradas	Refrigeradas	Derivar a Bromatol. Lab. Pcial.
	Alimentos	Cantidad suficiente	Lo antes posible	Frasco esterilizado o tapa a rosca o bolsas de polietileno o estéril	Refrigerada. Remitir aún en estado de descomposición o escasos restos	Refrigeradas	
Para valor legal: Las muestras deben corresponder al mismo lote. El envase no debe haber sido Abierto, debe estar precintado, en bolsa de plástico lacrada o sellada. Labrar un acta donde conste: fecha, lugar, personas presentes en el acto, producto y lote. Dejar copia del acta al dueño del negocio. Ante ausencia de escribano debe estar firmada por alguna autoridad local (policía, médico, etc.							

(Manual de Procedimientos de Vigilancia Epidemiológica VIGI+A. 2000)



<b>Tabla 8. Definición de la enfermedad y clasificación según CIE.</b>	
	<b>3.6 TOXIINFECCIONES ALIMENTARIA (BROTE DE ETA)</b>
<b>Justificación</b>	La inmediata búsqueda e investigación de brotes, evitan la propagación de la enfermedad. La identificación de los alimentos involucrados es fundamental para la prevención de este grupo de enfermedades
<b>Descripción</b>	Los brotes de enfermedad de origen alimentario se identifican por la aparición del cuadro clásico en un lapso en general breve (horas días), entre personas que han comido los mismos alimentos (agua inclusive). Es esencial la búsqueda de los posibles implicados, de los alimentos, del vehículo y del agente etiológico en personas y alimentos. Es difícil identificar los casos aislados de enfermedad de origen alimentario (excepto en caso de botulismo)
<b>Agente</b>	Diversos
<b>Transmisión</b>	A través de agua y alimentos
<b>Reservorio</b>	Diversos
<b>Incubación</b>	Variable según el tipo de agente
<b>Transmisibilidad</b>	Variable según el tipo de agente
<b>Distribución</b>	Variable según el tipo de agente
<b>Definición de Caso</b>	<p><b>Caso sospechoso:</b> aparición de un mismo cuadro gastroentérico y/o neumológico en un lapso en general breve (horas o días) en dos o más personas que consumieron el mismo alimento (incluye agua)</p> <p><b>Caso confirmado:</b> Se obtendrán muestras de heces y vómitos para examen de laboratorio y muestra de alimentos involucrados para su examen. Se confirma si existe coincidencia de resultados de laboratorio clínico y laboratorio de alimento involucrado. También puede confirmarse por a través de la investigación epidemiológica de campo</p>
<b>Modalidad de vigilancia</b>	Notificación de brote por software específico y numérico por C2. Se sugiere recurrir a la Guía de Procedimientos de Investigación de Brotes de Enfermedades transmitidas por Alimentos del Instituto Nacional de Epidemiología Juan Jara.
<b>Medidas de control</b>	Dependerán del agente etiológico y los aspectos de manipulación de los alimentos. Se deberán solicitar la lista completa de los alimentos servidos. Los signos clínicos más notables, junto con un cálculo del periodo de incubación, constituyen datos útiles acerca del agente etiológico más probable. Se compararan las tasas de ataque para cada alimento ingerido y no ingerido, estas tasas orientaran sobre la responsabilidad de cada alimento e la producción del brote.

(Listado de enfermedades notificables. Manual de Procedimientos de Vigilancia Epidemiológica VIGI+A. 2000)

Tabla 9.

**NIVEL JURISDICCIONAL**  
Semana N° .....

**INFORME EPIDEMIOLOGICO SEMANAL C2**

Hospital..... Departamento.....

*Las enfermedades del listado deben contener todos los datos*

BOTULISMO COLERA PESTE FIEBRE AMARILLA DIFTERIA RABIA HUMANA PSITACOSIS	SARAMPION PARALISIS FLACCIDAS <15años POLIOMIELITIS MAREA ROJA TETANOS NEONATAL HANTAVIRUS CARBUNCO	<p><i>Enfermedades notificadas por número de caso y grupos de edad</i></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Total</th> <th>&lt;1</th> <th>1 a 4</th> <th>5 a 9</th> <th>10-14</th> <th>15-49</th> <th>50y+</th> <th>S/esp</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>	Total	<1	1 a 4	5 a 9	10-14	15-49	50y+	S/esp																																																																																
Total	<1	1 a 4	5 a 9	10-14	15-49	50y+	S/esp																																																																																			

MENINGOENCEFALITIS MENINGITIS TB < 5años SIFILIS CONGENITA SIFILIS HEPATITIS A, B, C, otras FIEBRE TIFOIDEA TETANOS otras edades RUBEOLA CONGENITA LEPTOSPIROSIS	LEISHMANIASIS CHAGAS AGUDO/COGENITO BRUCELOSIS F.H.A. BROTE ETA: TRIQUINOSIS BROTES ETA: TOXINFECCION ALIMENTARIA: GONOCOCCIAS LEPRO TUBERCULOSIS	DIARREAS < 5años DIARREA 5 y + PALUDISMO FIEBRE TIFOIDEA URETRITIS NO GONOCOCC. RABIA ANIMAL (especie) HIDATIDOSIS
--	---	--

FECHA DIAGN.	APELLIDO y NOMBRE	EDAD		DOMICILIO	DEPARTAMENTO	DIAGNOSTICO	OBSERVACIONES
		FEM.	MASC				

**Tabla 10**

**INFORME EPIDEMIOLOGICO QUINCENAL "L2"**

FECHA DEL INFORME: desde ...../...../.....

HOSPITAL / LOCALIDAD : .....

*Las patologías constantes se continúan según correspondiendo en SECTOR 1 de la planilla*

*Las patologías del recuadro se adelantan telefónicamente a Epidemiología de la Provincia y los datos se consignan en "Sector Nº 1" (reverso)*

BOTULISMO	MAREA ROJA
COLERA	SARAMPION
DIFTERIA	FIEBRE AMARILLA
CARBUNCO	DENGUE
PESTE	RABIA Humana y Animal
POLIO - PFA <15	HANTAVIRUS
PSITACOSIS	BROTE : 2 o mas casos relacionados
TRICINOSIS	
TETANO NEONATAL	
TETANO OTROS	
BROTOS POR ETA	

**EPIDEMIOLOGIA DE LA PROVINCIA**  
Tel-Fax: 0342-4599684  
E-mail dirprospe@infovia.com.ar

LEISHMANIASIS	T.B.C.	TOXOCARIOSIS OCULAR
CHANCRO BLANDO	ESQUISTOSOMIASIS	COQUELUCHE
LEPRA	HEPATITIS "B" y "C"	MICOSIS PROFUNDA
RUBEOLA	SIFILIS CONGENITA	INF. INTRAHOSP.
CHAGAS AGUDO	SIFILIS	HIV
CHAGAS CONGENITO	FIEBRE TIFOIDEA	FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA
HIDATIDOSIS	PARATIFOIDEA	

 edades deben contener los datos en "SECTOR Nº2" (reverso) y se deben notificar total de casos por grupo etario.

HEPATITIS SUPUR. GENITALES GONOC. Y NO GONOC.  
DIARREAS SIFILIS

DENGUE Y HANTAVIRUS : derivar al Laboratorio Central de la Prov. (Santa Fe) TE: 0342-4892895 FAX: 0342-481178  
 FIEBRE AMARILLA: derivar a Inst. de Virología (Prov. Córdoba) TE: 0351-4603088/460285 - FAX: 0351-4691610  
 BOTULISMO: derivar al ANLIS "C. Malbrán". TE: 011-43031806 al 11 INT: 220 FAX: 011 43031433  
 FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA : derivar a INST. NAC. DE ENFERMEDADES VIRALES HUMANAS "Dr. Julio Meisleguer" Tel-Fax 02477-433045 (Pergamino -Bs. As.)

**SECTOR Nº1 : SOLO POSITIVOS DE DIAGNOSTICO**

FECHA DE RECEP. MUESTRA	A O I	APELLIDO Y NOMBRE o clave (N-A-DD-MM-AA)	EDAD		DOMICILIO-RESIDENCIA HABITUAL (Calle y nº, Localidad)	PATOLOGIA PRESUNTIVA	TIPO DE MUESTRA.	METODO D/C/S/R ***	DIAGN. DE LABORATORIO (Indique agente etiológico o título)	DERIVADO A
			F	M						



Tabla 11



**INFORME FINAL DE BROTES (ETA) AL SINAVE**

1. Identificación del brote: Día Mes Año Provincia Departam Localidad

2. Distribución por grupos de edad

	En riesgo	Enferas
Menor de 1		
1 a 4		
5 a 14		
15 a 44		
45 a 64		
65 y más		
<b>TOTAL</b>		

3. Hospitalizados: Defunciones:

4. Fecha de primeros síntomas: Primer caso Último caso

5. Período de incubación (marque con X): horas días semanas cuatrisesmanas

Período Mínimo Máximo Mediana

6. Sintomatología: náuseas vómitos diarrea dolor abdominal fiebre edemas  
neurológica cardiovascular cefalea mialgias otros

7. Alimento / Vehículo implicado:

Sospechado Confirmado por laboratorio Conf. epidemiológicamente

8. Mecanismo de transmisión: (alimento, agua, aire, vectores, etc.) \_\_\_\_\_

9. Método de comercialización: (sin envase, casero, comercial) \_\_\_\_\_

Tratamiento previo a preparación final: (cocido, refrigerado, congelado, etc) \_\_\_\_\_

Forma de servir / ingerir: (crudo, calentado, recalentado, otros) \_\_\_\_\_

10. Donde se adquirió/consumió el alimento: (Familiar, Comercial, Institucional, Industrial, Comunitario) \_\_\_\_\_

11. Principales factores contribuyentes: \_\_\_\_\_

12. Laboratorio: resultados

Muestras	(+)	Resultados: etiología - Tipificación
Enfermos		
Manipuladores		
Alimento		
Otros alimentos		
Entorno		

13. Principales medidas adoptadas \_\_\_\_\_

14. Observaciones: Informe añadido: a autoridades \_\_\_\_\_ a comunidad \_\_\_\_\_ a otros \_\_\_\_\_

Firma y aclaración del responsable: \_\_\_\_\_



## GRÁFICOS

Grafico 1. Principales agentes etiológicos de Toxiinfecciones alimentarias.

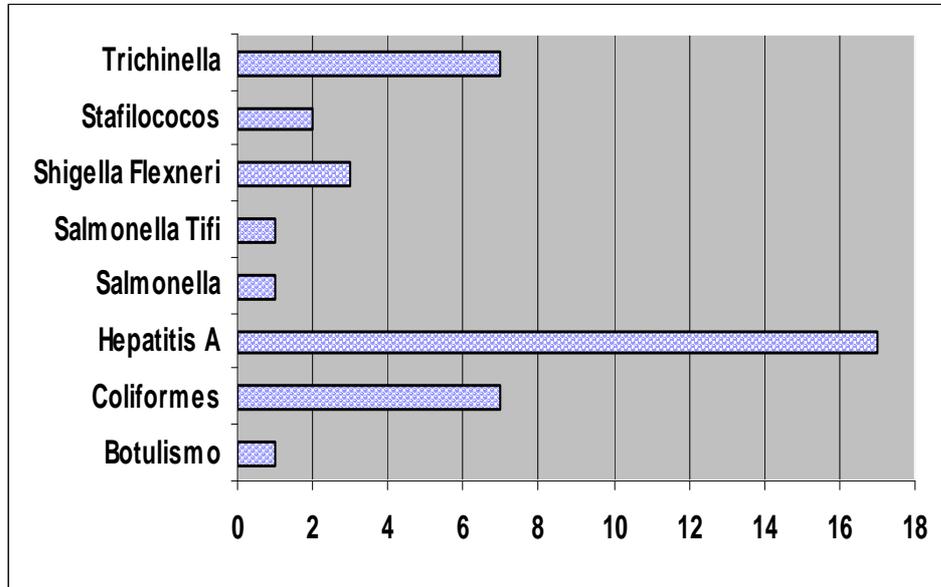


Gráfico 2: Tendencias de las Toxiinfecciones Alimentarias. Argentina. 1997 – 2003. Fuente OPS/OMS Argentina. Número de brotes por etiología y cantidad de afectados Argentina 2006. Fuente OPS/OMS Argentina

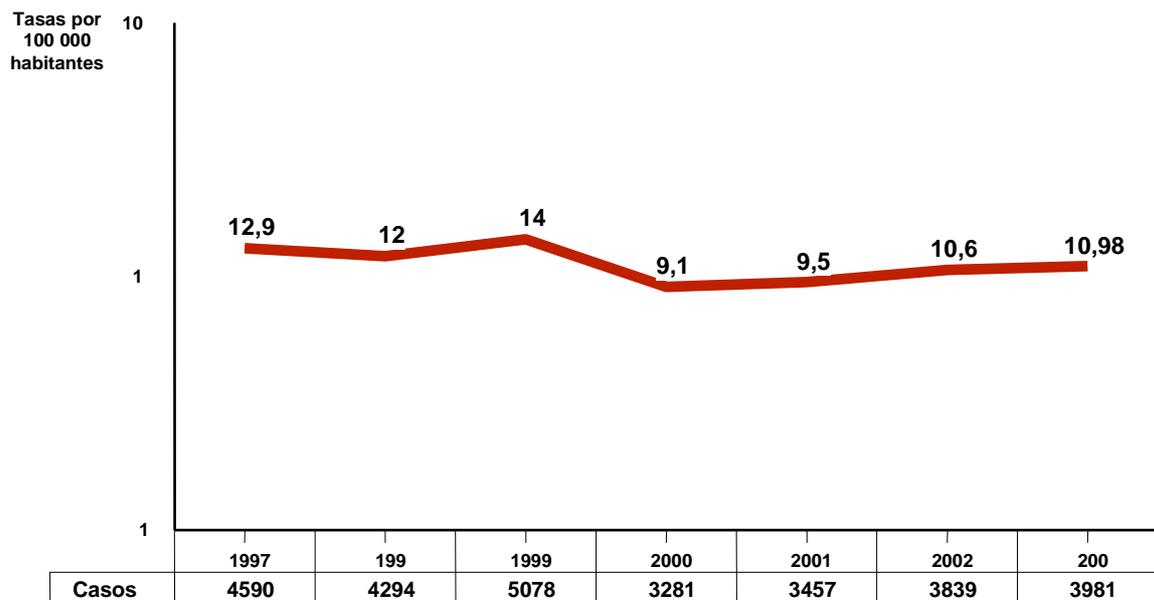




Gráfico 3. Brotes de ETA y promedio de afectados. Argentina. Años 2000 – 2003. . Fuente OPS/OMS Argentina

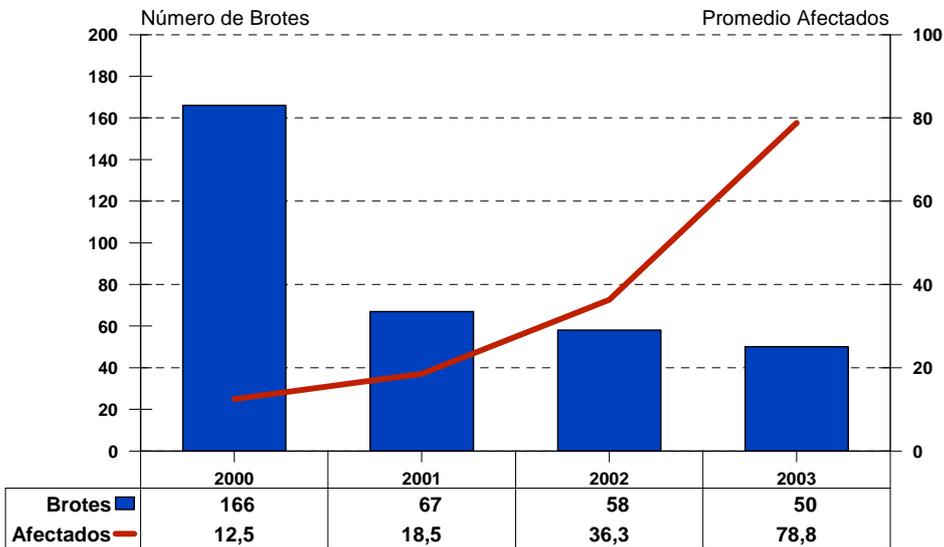


Gráfico 4 Agente de brotes/caso de ETA. Fuente ANALIS – INEI Carlos G Malbrán.

Nº de Aislamientos confirmados por el LNR - 2007

Agente etiológico	Humano	Alimentos
<i>Shigella</i> spp.	930	
<i>Salmonella</i> spp.	510	239
<i>E. coli</i> O157	167	1
STEC no-O157	56	37
<i>Campylobacter</i> spp.	42	
<i>V. cholerae</i> no-O1	26	
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	9
<i>S. aureus</i>	10	42
EIEC	4	

13

## COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

### Medio Baird Parker

Approximate Formula\* Per 950 mL

Pancreatic Digest of Casein	10.0 g
Beef Extract	5.0 g
Yeast Extract	1.0 g
Glycine	12.0 g
Sodium Pyruvate	10.0 g
Lithium Chloride	5.0 g
Agar	20.0 g

pH=6,9

**Enriquecimiento con Telurito:** Emulsión de yema de huevo conteniendo telurito de potasio. Emulsión al 30% de yema de huevo con telurito de potasio al 0.15%.

Suspender 63 g del polvo en 950 ml de agua y mezclar. Calentar mezclando por 1 minuto o hasta disolver totalmente el polvo. Ajustar pH. Autoclave a 121°C for 15 minutes. Enfriar a 45-50°C y aseptícamente agregar, 50 mL de la emulsion de yema de huevo y telurito.

### Giolitti Cantoni

Tryptone	10.0 g
Beef Extract	5.0 g
Yeast Extract	5.0 g
D-Mannitol	20.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Lithium Chloride	5.0 g
Glycine	1.2 g
Sodium Pyruvate	3.0 g

pH=6,9

Disolver 54.2 g del polvo en 1 litro de agua destilada y agitar hasta disolución del polvo. Ajustar pH. Dispensar 19 mL en tubos 20 x 200 mm tubes. Autoclavar 121°C for 15 minutes. Enfriar. Aseptícamente adicionar 1.05 mL de una solución de Tellurito al 1% por tubo.

### DNase Test Agar

Tryptose	20.0 g
Deoxyribonucleic Acid	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g

pH=7,3

Levar a 1 L con agua destilada. Controlar pH. Autoclavar 121°C for 15 minutes

### Caldo Cerebro Corazón (BHI)

Brain Heart, Infusion from (solids)	6.0 g
Peptic Digest of Animal Tissue	6.0 g
Pancreatic Digest of Gelatin	14.5 g
Dextrose	3.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.5 g

pH=7,4

Levar a 1 L con agua destilada. Controlar pH. Autoclavar 121°C for 15 minutes

### Agar Triptosa Soja, Caldo Triptosa soja

Formula aproximada para 1 l de agua destilada

Tryptose	20.0 g
Dextrose	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g

Agar 15.0 g  
Tryptosa Broth , con iguales ingredients pero sin Agar

**Agua Peptonada (Agua de peptona)**

Peptona de gelatina al 0,1 por ciento.

**Medio de Luria Bertani (LB)**

Triptona 10 gr.  
Extracto de levadura 5 gr  
NaCl 10gr  
Levar a 1 L con agua destilada. Autoclavar 121°C for 15 minutes

**Medio Luria Bertani con Glicerol**

Medio Luria Bertani con 20%de glicerol.

**Bromuro de etidio. 5 mg/mL stock**

Almacenar en frascos color topacio, o frascos cubiertos con papel de aluminio para evitar la fotoinactivación  
Diluir a 1 µg/mL para teñir los geles. Una solución de trabajo se prepara con 100 µL de solución stock en 500 mL de agua destilada.

Atención: las soluciones de BrEt han de manejarse con precaución ya que es un potente agente mutágeno. Siempre han de ser utilizadas con guantes. El BrEt ha de inactivarse antes de desecharse.

**Buffer de electroforesis: (TBE concentración 10x):**

890 mM Tris, 890 mM Acido bórico, 20 mM EDTA pH= 8

Para 1 L: 108 g Tris base, 55 g ácido bórico y 40 ml EDTA 0,5 M pH= 8. Autoclavar en alícuotas de 500 mL ó 1 L.

**TE: 10 mM Tris-HCl (pH= 8), 1mM EDTA (pH= 8)**

Para 1 L: 10 ml Tris 1M (pH 7,5), 2 ml EDTA 0,5M (pH= 8,0), 988 ml agua bidestilada. Autoclavar en alícuotas de 500 ml ó 1 L