

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
DR. LUIS FELIPE MONCADA
UNAN-MANAGUA**



Trabajo monográfico para optar al título de licenciatura en Microbiología.

Tema:

Detección del gen universal codificador de enterotoxinas (*Sea, Seb, Sec, Sed, See, Seg, Seh, Sei, Sej*) y gen de resistencia *mecA* en *Staphylococcus aureus* aislados en quesos artesanales expendidos en el mercado Roberto Huembés Managua Nicaragua en el periodo de Septiembre-Diciembre del 2016.

Autores:

**Br. Francisco Javier Guevara Palacios.
Br. Jorge Luis Lacayo Rivera.
Br. Henriques José Malespín Joaquim.**

Tutor:

**MSC. Francisco Enrique Romero Oviedo.
Microbiología Medica UNAN- León.**

Asesor:

**MSC. Oscar Heriberto Arbizú Medina.
Docente UNAN-MANAGUA-POLISAL.**

Marzo 2017

Dedicatoria

Primeramente, queremos dedicar nuestro trabajo a Dios nuestro padre celestial digno de toda gloria, honra y honor por siempre; por darnos la vida, la fuerza y proveernos de mucha paciencia en cada momento de dificultad.

A esas personas que representan una parte muy importante en nuestras vidas, seres tan especiales que han creído en nosotros todo este tiempo y que de una u otra forma han hecho sacrificios para apoyarnos en el transcurso de esta investigación y de toda la carrera, por todo lo valioso que son dedicamos nuestro esfuerzo a nuestros queridos:

María Elena Palacios Calero mi madre y a mi prima María Violeta Montoya Guevara.

Francisco Javier Guevara palacios

Francisca Paola Lacayo Rivera mi madre, y a mi abuelo Filadelfo Antonio Lacayo Alemán.

Jorge Luis Lacayo Rivera

Mateus Joaquim mi padre, Josefa del socorro malespín Urbina mi madre y a mi tía Claudia Lechado.

Henriques José Malespín Joaquim.

Agradecimiento

Damos gracias a Dios nuestro señor por su infinita misericordia, por darnos la vida, la fuerza y el conocimiento para podernos desarrollar en esta área de trabajo.

Queremos agradecer a nuestros padres por todo su apoyo incondicional y por todos los sacrificios que han tenido que pasar para brindarnos las condiciones y los recursos necesarios para poder lograr nuestra meta.

A **Msc Francisco Enrique Romero Oviedo** por habernos dado la oportunidad de realizar nuestra tesis en el laboratorio del Departamento de Microbiología de Agua y alimento y a la institución **CNDR** por la aprobación de la investigación.

A **Msc. Oscar Heriberto Arbizu Medina** por su constante incentivo a la investigación en los diferentes campos a lo largo de nuestra carrera. A la **UNAN-Managua** por ser un alma mater que impulsa al desarrollo de los recursos humanos.

OPINION DEL TUTOR

El presente trabajo investigativo ha sido elaborado con el propósito de Detectar el gen universal codificador de enterotoxinas (*Sea, Seb, Sec, Sed, See, Seg, Seh, Sei, Sej*) y gen de resistencia *mecA* en *Staphylococcus aureus* aislados en quesos artesanales expendidos en el mercado Roberto Huembés Managua Nicaragua en el periodo de septiembre-Diciembre del 2016.

Este trabajo representa un logro en el avance investigativo para el departamento de Agua y Alimento CNDR-MINSA y la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN-Managua.

Como tutor apruebo esta investigación para que sea defendida por sus autores con el tema monográfico:

Detección del gen universal codificador de enterotoxinas (*Sea, Seb, Sec, Sed, See, Seg, Seh, Sei, Sej*) y gen de resistencia *mecA* en *Staphylococcus aureus* aislados en quesos artesanales expendidos en el mercado Roberto Huembés Managua Nicaragua en el periodo de Septiembre-Diciembre del 2016.

AUTORES:

Br. Francisco Javier Guevara Palacios

Br. Jorge Luis Lacayo Rivera

Br. Henriques José Malespín Joaquim

Francisco Enrique Romero Oviedo
Bioanalista Clínico Msc. Microbiología Médica

TUTOR

Resumen

Staphylococcus aureus son algunos de los microorganismos más representativos de la contaminación del queso, es responsable de intoxicaciones alimentarias por la producción de enterotoxinas. La mala manipulación y la falta de conocimiento de las medidas higiénico-sanitarias por parte de los productores, comerciantes y consumidores son factores que influyen directamente en la colonización del queso artesanal por esta bacteria.

La realización de este estudio permitirá conocer si las cepas aisladas en los quesos expendidos en el mercado Roberto Huembés son productoras de enterotoxinas y/o portadoras del gen *mecA*. Se desconocen en la actualidad la situación epidemiológica de los serotipos de enterotoxinas circulantes en el país y la propagación de cepas portadoras del gen *mecA* a través de este tipo de productos.

Por tal razón se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con el fin de detectar el gen universal codificador de enterotoxinas (*Sea, Seb, Sec, Sed, See, Seg, Seh, Sei, Sej*) y gen de resistencia *mecA* en *Staphylococcus aureus* aislados en quesos artesanales expendidos en el mercado Roberto Huembés Managua Nicaragua en el periodo de septiembre-Diciembre del 2016. El universo estuvo constituido por 8 puestos registrados por COMMEMA (Corporación de Mercados Municipales de Managua) del mercado Roberto Huembés donde cada tramo representara un sitio de muestreo.

Se analizaron un total de 40 muestras entre quesos frescos (20) y blandos (20) artesanales expendidos en el mercado Roberto huembés, de los cuales se comprobó que el 67.5% estaban colonizados por *Staphylococcus aureus*. El 95% (19/20) de los quesos frescos y el 40% (8/20) de los blandos respectivamente.

No se detectó ninguna cepa de *Staphylococcus aureus* portadora del gen universal codificador de enterotoxina ni del gen *mecA* en las muestras de queso artesanal analizadas.

Índice.

Dedicatoria

Agradecimiento

Resumen

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
3. Justificación.....	4
4. Planteamiento del problema.....	5
5. Objetivo General.....	6
Objetivo específico:.....	6
6. Marco teórico.....	7
6.1. Generalidades y Taxonomía.....	7
6.2. Patogenia.....	7
6.3. Virulencia.....	8
6.3.1.1. Citotóxicas.....	8
6.3.1.2. Enterotoxinas.....	8
6.3.1.3. Resistencia Antimicrobiana.....	12
6.3. Métodos diagnósticos de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	14
6.3.1. Diagnostico convencional.....	14
6.3.2. Técnicas biología molecular.....	17
7. Diseño metodológico.....	26
Técnicas e instrumentos.....	27
Diagnóstico de laboratorio.....	28
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix.....	31
8. Operacionalización de las variables.....	33
9. Análisis y discusión de resultados.....	35
10. Conclusiones.....	41
11. Recomendaciones.....	42
12. Bibliografía.....	43
Anexos.....	46
Glosario.....	55

1. Introducción.

Los alimentos son productos en su mayoría no estériles ya sea por características del mismo o por la exposición al ambiente. Estos pueden ser contaminados durante cualquier etapa de su producción, tal es el caso del queso artesanal. Por ser un producto nutritivo y de costo considerable para su consumo es un alimento con una alta demanda a nivel nacional, por lo que para los productores es de gran importancia tomar en cuenta las medidas higiénico-sanitarias necesarias para la elaboración de este y poder garantizar de esta manera la satisfacción del consumidor, evitando la transmisión de enfermedades por los alimentos (ETAs).

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) constituyen un problema de salud pública y se reconoce cada vez más la importancia de sus repercusiones sobre la salud de la población. El control y prevención de las ETA es un desafío actual en todo el mundo, especialmente porque no se conoce su real incidencia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que, dependiendo del país, entre el 15 y el 70 por ciento de los casos de diarrea en menores de cinco años de edad se debe a alimentos contaminados. Según la OMS, en América Latina y el Caribe se producen 1500 millones de casos de diarrea por año y cada año, por esa causa, mueren tres millones de niños menores de cinco años (OPS, 2001; OPS-OMS. 1995).

Staphylococcus aureus ha sido reconocido como uno de los principales patógenos humanos, responsable de gran cantidad de infecciones en la comunidad, intoxicaciones alimentarias y de un número importante de infecciones nosocomiales. Dada la diversidad de factores de virulencia que posee, tanto bioquímicos como estructurales, se lo considera como un patógeno perfecto, equipado para colonizar, invadir y diseminarse. La capacidad de este microorganismo para desarrollar mecanismos de resistencia hace necesario el conocimiento de su epidemiología como una contribución al establecimiento de medidas racionales de prevención y control. (Quiceno, 2009)

2. Antecedentes.

En Suiza, la revista Thermo Fisher Scientific publicó un estudio donde se realizó la caracterización de la contaminación en queso de leche cruda por *Staphylococcus aureus*. Se aisló *Staphylococcus aureus* en 77 de las 78 muestras. Se detectaron mediante un *screening* con agar MRSA cromogénico la resistencia a meticilina y confirmados por la PCR tiempo real. Se identificaron 13 cepas portadoras genes productores de enterotoxinas (Maxwell, 2014).

En Bolivia, realizaron un estudio para identificación de gen codificador de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* en productos lácteos en donde se analizaron 40 muestras por métodos convencionales y moleculares. En el cultivo bacteriológico se encontró *Staphylococcus aureus* en 5 (25 %) muestras de leche y en 4 (20 %) muestras de queso. Mediante la PCR se identificó en 1 muestra de queso a *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A. (Gimena., 2007)

En Colombia, se realizó el aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénico aislados de quesos en Bogotá. Se aislaron cepas de *Staphylococcus aureus* en 13 muestras de quesos provenientes de tiendas y ventas callejeras. Todos los amplificaron para el gen codificador de enterotoxina tipo A. (Vanegas, 2008)

En Colombia se realizó un estudio con el objetivo de determinar la incidencia de cepas de *Staphylococcus* potencialmente enterotoxigénicos en muestras de queso doble crema durante 1 año. De 65 cepas estudiadas se detectaron genes que codificaron para la producción de las enterotoxinas, en el 24.6% de las cepas, las cuáles fueron aisladas a partir de 12 muestras. La prevalencia de genes para *Seb*, *sea*, *sed* en estas cepas fue de 18.5%, 4.6%, y 3.0%, respectivamente. En una de las cepas estudiadas se detectaron los genes para las *Sea* y *Seb* simultáneamente. No se detectó la presencia de genes para producción de *Sec* ni *See*.

En Colombia, se realizó un estudio en donde se analizaron 68 cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva, aislados a partir de 100 muestras de queso doble crema artesanal. Se detectó el gen *mecA* en el 18.2% de cepas de *Staphylococcus aureus*. Se detectó también

que el 42% de las cepas MRSA se eran portadoras del Gen codificador de *Seb*. (Herrera A. & Santos B., 2015)

En Costa Rica, se realizó un estudio para la determinación del perfil toxigénicos de cepas de *Staphylococcus aureus* a en muestras queso artesanal. Fueron analizadas 229 cepas proveniente de queso fresco por PCR para la detección de enterotoxinas, de las cuales *Seb* fue la más frecuente (19 muestras), seguida de *Sed* (6 muestras), no se detectó *Sea*. (Chavez, 2015).

En Nicaragua no se encontraron estudios referentes a la búsqueda de enterotoxina estafilocócica y/o *mecA* en muestras alimentarias.

3. Justificación.

Nicaragua es un país mayormente ganadero y agricultor, por lo tanto las bases alimentarias de la población consisten en granos básicos y derivados de la leche. Estos llegan a los mercados populares de donde las personas los compran para posteriormente consumirlos.

El queso es uno de los alimentos más consumidos a nivel nacional, sin embargo este está expuesto a un sinnúmero de agentes contaminantes que pueden ocasionar o no alguna afección en el consumidor. Entre los más conocidos se encuentra *Staphylococcus aureus*, agente causal de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en las personas por su capacidad para producir las llamadas enterotoxinas estafilocócicas, adicionalmente se le considera uno de los microorganismos de mayor importancia en relación con el desarrollo de la resistencia antimicrobiana.

La mala manipulación y la falta de conocimiento de las medidas higiénico-sanitarias por parte de los productores, comerciantes y consumidores son factores que influyen directamente en la colonización del queso por esta bacteria.

No se encontraron estudios a nivel nacional en los que se haya realizado la identificación genes codificadores de enterotoxinas y la detección del mecanismo de resistencia antimicrobiana mediada por el gen *mecA* en *Staphylococcus aureus* aislados a partir de muestras de quesos. La realización de este estudio permitirá conocer si las cepas aisladas en los quesos expendidos en el mercado Roberto Huembés son productoras de enterotoxinas y/o portadoras del gen *mecA*. Se desconocen en la actualidad la situación epidemiológica de los serotipos de enterotoxinas circulantes en el país y la propagación de cepas portadoras del gen *mecA* a través de este tipo de productos. Los datos aportados servirán a las autoridades competentes para evaluar si es necesario aplicar medidas correctivas que reduzcan el peligro de contraer una enfermedad por el mal manejo de los quesos.

4. Planteamiento del problema.

¿Existirán *Staphylococcus aureus* portadores del gen universal codificador de enterotoxina y gen de resistencia antimicrobiana *mecA* en quesos artesanales expendidos en el mercado Roberto Huembés?

5. Objetivo General

Detectar el gen universal codificador de enterotoxinas (*Sea, Seb, Sec, Sed, See, Seg, Seh, Sei, Sej*) y gen de resistencia *mecA* en *Staphylococcus aureus* aislados en quesos artesanales expendidos en el mercado Roberto Huembés Managua Nicaragua en el periodo de septiembre-Diciembre del 2016.

Objetivo específico:

- Aislar e identificar *Staphylococcus aureus* en muestras de queso Fresco y Blando artesanales según FDA-BAM.
- Identificar el gen *mecA* que induce la resistencia antimicrobiana en las cepas aisladas de queso Fresco y Blando artesanales a través de la técnica PCR-Tiempo Real.
- Detectar el gen universal que codifica la producción de las enterotoxina en queso Fresco y Blando artesanales a través de la técnica PCR-Tiempo Real.

6. Marco teórico.

6.1.Generalidades y Taxonomía.

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, es anaerobio facultativo, no esporulado, oxidasa positiva, no móvil y capaz de fermentar la glucosa con producción de ácido, catalasa positiva, mide de 0.5-1.5 μm de diámetro, se encuentran morfológicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares.

El género *Staphylococcus* está ubicado junto a los géneros *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus* en la Familia *Micrococcaceae*. *Staphylococcus aureus*, especie coagulasa positiva, es un reconocido patógeno humano, siendo el agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial.

Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 35°C y 40°C, pero puede crecer entre 6°C y 46°C. Es capaz de resistir un pH que varía entre 4,2 y 9.3, sin embargo su óptimo es entre 7 y 7.5. Es altamente resistente a ambientes secos y con alta concentración de sal, sobrevive en actividad de agua (*aw*) superior a 0.83.

Es una bacteria cuya distribución es amplia en la naturaleza, puede encontrarse en la piel, pelo y nasofaringe del ser humano, lesiones purulentas, aire, polvo, leche de vaca con o sin mastitis, plumas y otros. (Arias, 2008)

6.2.Patogenia

Staphylococcus aureus, tiene una amplia gama de determinantes de virulencia, que abarca componentes de pared celular y una gran variedad de exoproteínas que contribuyen en su habilidad para colonizar y causar enfermedad en mamíferos. (OPS/OMS, 2012)

Produce un cuadro de intoxicación alimentaria dado por la ingestión de una enterotoxina preformada. Existen varias enterotoxinas descritas, que se diferencian por su punto isoeléctrico. Estas mal llamadas enterotoxinas tienen más características de neurotóxicas y

actúan a nivel del nervio vago y simpático, estimulando así el centro regulador de náuseas y vomito a nivel cerebral. (Arias, 2008)

El cuadro clínico, caracterizado por nausea, vomito, dolor abdominal y postración, se presenta 1-7 horas luego de la ingestión del alimento contaminado.

6.3. Virulencia

6.3.1.1. Citotóxicas

Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotóxicas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta) nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa.

La principal función de estas proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano.

Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen:

- toxina -1 del shock tóxico estafilocócico (TSST-1)
- toxina exfoliativa (ETA y ETB)
- leucocidina

6.3.1.2. Enterotoxinas

Para que ocurra intoxicación, es necesario la producción de 1µg de enterotoxina, concentración que se alcanza cuando la población bacteriana llega a ser de 10^6 - 10^9 m.o/g. aunque estas mueran luego.

Las condiciones óptimas para la producción de enterotoxinas incluyen un pH superior a 5, una temperatura de 35°C – 37°C, un aw superior a 0.86 y un ambiente en que haya poca flora competitiva. Los alimentos más asociados con los brotes de intoxicación alimentaria

son las ensaladas frías, productos avícolas (principalmente ensalada de pollo), dulces de crema, productos lácteos (principalmente quesos) y el jamón. (Arias, 2008)

Cada una de estas exotoxinas exhibe al menos propiedades biológicas:

- Superantigenicidad, que se refiere a la habilidad de estas exotoxinas de estimular la proliferación de linfocitos T sin tener en cuenta la especificidad antigénica de estas células.
- Aumento de sensibilidad a la acción de endotoxina en modelos experimentales en conejo.

Son producidas en la fase exponencial del desarrollo y los genes que las codifican se encuentran en plásmidos, bacteriófagos o elementos genéticos heterólogos, referidos como islotes de patogenicidad. Su expresión es controlada por al menos tres sistemas reguladores globales denominados:

- gen regulador accesorio (*agr*)
- gene accesorio regulador estafilocócico (*sarm*)
- sistema represor por catabolitos.

Cada enterotoxina es traducida en un precursor proteico conteniendo una secuencia señal aminoterminal, que es clavada durante la exportación desde la célula. La enterotoxina (SE) madura es una pequeña molécula polipeptídica no glicosilada, moderadamente estable a inactivación química, proteólisis y desnaturalización por ebullición. Las enterotoxinas poseen propiedades higroscópicas, siendo muy solubles en agua y en soluciones salinas. (Gutierrez, 1992)

Las enterotoxinas estafilocócicas (SE): *Sea*, *Seb*, *Sec*, *Sed*, *See*, *Seg*, *Seh* y *Sej*. Son proteínas inmunológicamente diferentes, con pesos moleculares que oscilan entre 28.000 y 35.000 Dalton, de cadena simple no ramificada compuesta por cantidades relativamente grandes de lisina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico. (Gutierrez, 1992)

La originalmente descrita enterotoxina F ha sido identificada como la toxina productora del síndrome de *shock* tóxico (TSST-1). Se trata de una enfermedad multisistémica

caracterizada por el comienzo súbito de fiebre, vómitos y diarreas, hipotensión, enrojecimiento conjuntival, "lengua de fresa" y exantema (con posterior descamación). Investigaciones actuales indican que la producción de TSST-1, elaboradas por cepas de *Staphylococcus aureus*, mantiene una relación directa con algunos serotipos toxigénicos que provocan brotes de intoxicación alimentaria. (Lombard, 1996)

Las enterotoxinas estafilocócicas (SE) son exoproteínas simples producidas por algunas cepas de *Staphylococcus* bajo ciertas condiciones tanto en medios sintéticos como en alimentos sin embargo, una de ellas es capaz de sintetizar más de un serotipo de enterotoxinas. La ingestión de estos últimos produce un cuadro gastrointestinal conocido como "intoxicación estafilocócica". (Lombard, 1996)

La producción de enterotoxinas no está limitada a los *Staphylococcus* de un origen particular; así, ya sean las cepas de origen humano animal o ambiental, todas resultan potencialmente enterotoxigenicas.

6.3.1.2.1. Estabilidad

Las SE son unas de las proteínas más estables. Esto se puede observar en varios puntos:

- Termo resistencia: son más termo resistente que los propios *Staphylococcus* y que las toxinas de numerosos microorganismos. Al someter la enterotoxina a temperatura de ebullición por 30 minutos, permanecen restos de toxicidad. Esta termo resistencia depende de la temperatura, tiempo de la exposición, concentración de la SE y el sustrato donde se produce el tratamiento térmico. (Gutierrez, 1992)
- Resistencia a las proteasas: presentan cierta resistencia a enzimas tales como la tripsina, quinotripsina, renina o papaína, lo que les permite atravesar el tracto digestivo sin ver afectada su actividad biológica.

- Resistencia al almacenamiento: mantienen su actividad después de un almacenamiento prolongado en diversas condiciones (amplio grado de temperatura, baja actividad de agua, pH, etc.).
- Efecto del pH: las SE permanecen activas a pH de 3 a 10 a temperaturas de 22° a 34°c durante 4 horas (Gutierrez, 1992). No se registra actividad en condiciones extremas de pH (1.85 y 12).

6.3.1.2.2. Patogenicidad

Cuando los alimentos contaminados con enterotoxinas estafilocócicas son ingeridos por el hombre, los síntomas se manifiestan bruscamente entre 2 y 6 h después. Aparecen náuseas, vómitos, malestar general, diarreas y en casos graves postración, calambres y *shock* por caída brusca de la presión arterial. (Lombard, 1996)

Los síntomas duran habitualmente menos de 24 h y la enfermedad raramente es fatal, aunque en ocasiones puede ser necesario remplazar la pérdida de líquidos que se producen a consecuencia de los vómitos y las diarreas. Por otra parte, se ha encontrado el crecimiento de cepas estafilocócicas productoras de enterotoxinas en paciente con enterocolitis pseudomembranosa después de un tratamiento con antibióticos de amplio espectro. La enfermedad se manifiesta por calambres abdominales, diarreas graves y deshidratación. (Lombard, 1996)

La presencia de cepas estafilocócicas enterotoxigenicas resistentes a medicamentos aislados en cultivos puros de estos pacientes, la necrosis intestinal por la secreción de enterotoxinas y ciertas manifestaciones clínicas distingue la enfermedad de la intoxicación alimentaria.

Los sitios receptores eméticos para las toxinas que provocan intoxicaciones son las vísceras abdominales, donde el estímulo sensorial llega al centro del vómito por las vías aferentes parasimpáticas (vagales) y simpáticas.

La diarrea inducida por enterotoxinas ha sido 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. (Lombard, 1996)

6.3.1.3. Resistencia Antimicrobiana

Según la OMS, la resistencia a los antimicrobianos es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable. Los organismos resistentes (bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) pueden resistir ataques de medicamentos antimicrobianos tales como antibióticos, fungicidas, antivirales y antipalúdicos, de tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen de forma errónea o se intercambian características de resistencia, pero la utilización y el uso indebido de antimicrobianos también acelera su aparición. Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, las malas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de alimentos propician la propagación de las resistencias.

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico.

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico, a saber:

- Inactivación del antibiótico.
- Alteración del sitio blanco del antibiótico.
- Barreras de permeabilidad.

Gen *mecA*

El gen *mecA* es un trozo de ADN cromosomal adicional de 30 a 50 Kb y se caracteriza por tener una longitud de 2.1 kb, localizado en un elemento genético móvil, llamado cassette cromosomal estafilococal (SCCmec). Este posee dos elementos regulatorios (*mecR1* y *MecI*) que controlan la transcripción de gen *mecA*, es el responsable de la inducción de la síntesis de una proteína fijadora de penicilina transpeptidasa supernumeraria; PBP o PBP 2a, capaz de mantener la integridad de la pared celular durante el crecimiento y la división celular cuando las enzimas habituales son inhibidas por los antibióticos β -lactámicos. Esta proteína presenta una migración electroforética entre PBP2 PBP3, tiene un tamaño molecular de 76 KDa y se caracteriza por presentar muy baja afinidad por la meticilina y todos los β -lactámicos. La expresión del gen pueden ser constitutivo o inducible, se ha sugerido que este gen y su ADN asociado son elementos móviles, probablemente los plásmidos de β -lactamasas pueden proveer un sitio de inserción temporal para el transposón que contiene el *mecA*. Tiene una región promotora constituida por los 300 primeros nucleótidos más los genes regulatorios, es similar en secuencia a las regiones análogas de las β -lactamasas estafilocócicas, los genes regulatorios *mecl* y *mecR1* reprimen (*mecl*) o conducen (*mecR1*) la expresión del *mecA*. (Morosini, 2011)

6.2.1.3.1.1.Método de identificación fenotípico para el gen *mecA*.

Los métodos clásicos se basan en el conocimiento de que la temperatura (30-35°C), osmolaridad (2-4% de NaCl), tiempo de incubación (24-48 h) y densidad del inóculo, son factores críticos para la detección óptima de las cepas heterorresistentes.

De manera habitual, el fenotipo de resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* se puede detectar en el laboratorio mediante la técnica de difusión con discos de oxacilina (1 μ g) y/o cefoxitina (30 μ g) o por dilución en caldo o en agar. Para ello se utiliza el medio de Mueller Hinton suplementado con 2% de la resistencia a NaCl en el caso de realizar los métodos de dilución y además ajustado con cationes en el caso de que se realice mediante el método de dilución en caldo. Se requiere un inóculo equivalente al 0,5 de la escala de McFarland y 24 horas completas de incubación en atmósfera aerobia a 35°C.

Una cepa de *Staphylococcus aureus* se considera resistente a la oxacilina cuando el halo de inhibición de la oxacilina es ≤ 10 mm o cuando la CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L. En el caso de los ECN, una cepa se considera resistente a la oxacilina cuando la concentración mínima inhibitoria (CMI) es $\geq 0,5$ mg/L, excepto en *S. lugdunenses* que se considera resistente si la CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L. La resistencia a la meticilina implica resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas. (Morosini, 2011)

6.3. Métodos diagnósticos de *Staphylococcus aureus*

Existe una amplia gama de métodos para el aislamiento y confirmación de la presencia de *S. aureus* en alimento, su mayoría basado en las características bioquímicas del microorganismo y son denominados métodos de referencias, del mismo modo se pueden implementar el uso de PCR en tiempo real y otras técnicas serológicas y moleculares (Dr. Rodríguez Calleja, 2013)

6.3.1. Diagnostico convencional

El diagnostico convencional de *Staphylococcus aureus* consiste en la identificación del microorganismo a partir de las muestras alimenticias, siguiendo un proceso de enriquecimientos en agua buferada la cual permite la recuperación de células dañadas, luego de esto, continuando con un proceso de enriquecimiento selectivo y diferencial en el agar Baird Parker y culminando con la confirmación de las pruebas bioquímicas. Siendo este un método válido y aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) como gold standard. (Reginald W. Bennett, 2016)

6.3.1.1.Cultivo en Agar Baird Parker

Es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos, muestras ambientales. Este agar contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento del *Staphylococcus aureus*. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos. La yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y, además, la actividad de lipasa. Los *Staphylococcus* producen colonias de color de gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito; los *Staphylococcus* que producen lecitinasa descomponen la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes. Es posible que se forme una zona de precipitación debido a la actividad de lipasa. (oxid, 2015)

6.3.1.2.Pruebas bioquímicas

Coagulasa

El Objetivo de esta es separar *Staphylococcus aureus* que posee coagulasa, de las otras especies de *Staphylococcus* que genéricamente se denominan coagulasa negativos. El *Staphylococcus aureus* posee dos tipos de coagulasa:

a. Una endocoagulasa o coagulasa ligada o "clumping factor" que está unida a la pared celular. Esta actúa directamente sobre el fibrinógeno provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado (test en lámina).

b. Una exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un factor (CRF), formándose un complejo coagulasa-CRF, el cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina. (Reginald W. Bennett, 2016)

6.3.1.3. Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense NTON – 03 065 – 06

La presente norma tiene como objeto establecer las características y especificaciones que deben cumplir los quesos, se aplica a todos los productos destinados al consumo directo o a ulterior elaboración que se ajustan a la definición de queso.

Se entiende por **queso** el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

- a) coagulación total o parcial de las siguientes materias primas: leche y/o productos obtenidos de la leche por efecto del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial el suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación.
- b) técnicas de elaboración que permitan la coagulación de la leche y/o de productos obtenidos de leche y que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartad.

Se entiende por queso sin madurar el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación.

El producto deberá ajustarse a los criterios microbiológicos establecidos de acuerdo con los principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para los Alimentos (CAC/GL 21-1997).

Microorganismos	n(1)	c(2)	m(3)	M(4)
Staphylococcus aureus, UFC/cm ³	5	1	10 ²	10 ³
Coliformes totales, UFC/cm ³	5	2	200	500
Coliformes fecales, UFC/UFC cm ³	5	1	10	10
Escherichia coli, UFC/cm ³	5	0	0	0
Listeria monocytogenes en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia
Salmonella en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia

(1) n = Número de muestras que deben analizarse

(2) c = Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor que m pero no mayor que M.

(3) m = Recuento máximo recomendado

(4) M = Recuento máximo permitido

6.3.2. Técnicas biología molecular.

6.3.2.1.Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN duplicarse en millones de partículas virales. El ADNc se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés. (Dios, 2013)

Elementos de la PCR

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer, H₂O y la enzima, en donde más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. También hay otras enzimas que se utilizan como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis*. (Dios, 2013)

Primers o iniciadores

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente).

Buffer

El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado.

Otros.

El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya

viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

Termociclador

Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos.

Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño

dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

6.3.2.2.PCR en tiempo real

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final /convencional, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. (Dios, 2013)

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR, punto final que necesita una mayor concentración.

Componentes de la PCR en tiempo real.

Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Master mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente. Para

evitar estos problemas, una alternativa es diseñar los primers, utilizando programas informáticos disponibles, o comprarlos ya validados de las compañías de biología molecular, quienes garantizan resultados altamente eficientes y satisfactorios para los usuarios. (Dios, 2013)

SYBR Green

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real, para ello la estrategia tecnológica que ha dado buenos resultados es los sistemas basados en reporteros fluorescentes. En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos. Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El más usado para estos fines se llama SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia. Aunque el SYBR Green es uno de los reporteros fluorescentes más utilizados por los investigadores debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primers. Muchos laboratorios, para evitar esta situación, optimizan sus reacciones realizando una «curva melting» o «curva de disociación» al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros de primers. (Dios, 2013)

Sondas

Estos métodos siguen el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o «quencher». Para ello, existen dos métodos específicos, estos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación. Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados

con un reportero fluorescente y un «quencher», ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el quencher, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan, aunque existen otras en el mercado. Los métodos por hibridación consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia. Un ejemplo de este método, son las sondas molecular Beacons que también son comerciales. Los métodos específicos son más costosos que los no específicos, pero son más eficientes al garantizar la especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos. Cualquiera que sea el método que se aplique, se pueden adquirir fácilmente, ya que la gama de sondas para desarrollar, tanto los métodos específicos como los no específicos, es amplia.

Cualquiera de los métodos que se utilicen para detectar los productos amplificados en cada ciclo de la reacción necesita de la tecnología incluida en los termocicladores de PCR en tiempo real para:

- excitar al reportero,
- capturar la señal de emisión del mismo
- realizar el análisis cuantitativo.

En el mercado existen diferentes tipos de termocicladores para esta finalidad, cuyas diferencias principales son la fuente de energía que utilizan para la excitación. En general son tres las fuentes: las lámparas de luz, diodos de emisión de luz (LED, por sus siglas en inglés) y láseres. Cualquiera que sea la fuente, primero el reportero es excitado y su señal de emisión colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda

correspondiente que llega hasta un fotodetector que captura la información proveniente de la muestra para su análisis en el software del equipo. Otros rasgos característicos son las velocidades para incrementar o disminuir las temperaturas en cada etapa de la reacción, el número de muestras que puede soportar, los consumibles para la reacción y los kits que se utilizan para la amplificación; en algunos casos sólo se usan reactivos del proveedor del termociclador, es decir, son sistemas cerrados y en otros casos, se pueden utilizar reactivos de diferentes proveedores, es decir, son sistemas abiertos.

MAXIMA SYBER Green

Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix es una solución lista para usar optimizada para qPCR y RT-qPCR de 2 pasos. Las mezclas maestras incluyen Maxima Hot Start Taq ADN polimerasa y dNTPs en un buffer de PCR optimizado. Sólo se deben agregar plantillas y primers. El colorante intercalante SYBR Green I permite la detección y análisis de ADN sin utilizar sondas específicas de secuencia.

Maxima Hot Start Taq ADN polimerasa en combinación con un buffer optimizado asegura la especificidad y sensibilidad de la PCR. El dUTP se incluye en la mezcla para el control opcional de la contaminación por arrastre usando uracil ADN glicosilasa (UDG) (1). El uso de Mezclas Maestras qPCR de Maxima SYBR Green en PCR en tiempo real asegura la cuantificación reproducible, sensible y específica de plantillas genómicas, plasmídicas, virales y de cDNA. Las Mezclas Master qPCR de Maxima SYBR Green son compatibles con la mayoría de los termocicladores en tiempo real (scientific 2016).

POWER UP™ SYBR® Green Master Mix

PowerUp™ SYBR® Green Master Mix es una mezcla maestra 2X pre-formulada, optimizada y universal para flujos de trabajo de PCR en tiempo real. Junto con los conjuntos de iniciadores y plantillas suministrados por el usuario, PowerUp™ SYBR® Green Master Mix está diseñado para amplificar los objetivos para un análisis preciso de la expresión génica.

6.3.2.3.Lectura e interpretación

No es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra, el análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación génica. Para ello, los termocicladores están proveídos de una PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación o curva melting que muestra información sobre la especificidad de la reacción. Otro paso importante del análisis es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación precisa del blanco génico; este procedimiento depende de los intereses del investigador. Para ello existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa. La primera generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra. En la práctica, este tipo de cuantificación se usa para medir la carga viral o bacteriana en diferentes tejidos. La segunda se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (gen housekeeping) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en el que aumentaron o disminuyeron los niveles de ARNm o en su caso, si no hubo cambios. Cualquiera que sea el tipo de cuantificación que se elija, casi todos los software de los equipos están posibilitados para llevar a cabo los análisis matemáticos y estadísticos que se requieren en cada tipo de cuantificación. (Dios, 2013)

6.3.2.3.1. Electroforesis

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida

que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. (Dios, 2013)

6.3.2.3.2. GelRed.

Gel Red es un estable, no tóxico y ambientalmente seguro intercalante ácido nucleico fluorescente de tinción de material genético (ARN, ADN) amplificado al usar la técnica de PCR. Es usado para reemplazar el tóxico y cancerígeno Bromuro Ethidium (EthBr). (Biotium, 2013)

7. Diseño metodológico.

Área de estudio: Mercado Roberto Huembés, ubicado en el departamento de Managua Nicaragua. Es un mercado grande y agradable, el principal mercado de artesanías de este departamento por lo tanto es visitado por una gran variedad de personas tanto nacionales como turistas, en este se comercializan una amplia gama comidas típicas, golosinas y el queso, que es fuente nutritiva característica en el plato de la familia nicaragüense.

Tipo de estudio: Descriptivo de corte transversal

Universo:

El universo estuvo constituido por 8 puestos registrados por COMMEMA (Corporación de Mercados Municipales de Managua) del mercado Roberto Huembés donde cada tramo representara un sitio de muestreo.

Tipo de muestreo:

No probabilístico por conveniencia.

Muestra

Está constituida por 40 muestras provenientes de 4 puestos de venta de queso, que corresponden al 50% del total de los puestos autorizados. Se seleccionaran 2 tipos de quesos diferentes: quesos frescos y quesos blandos, 5 de cada uno en los tramos escogidos, utilizando las $n=5$ según las Normas técnicas obligatorias Nicaragüense para los quesos NTON- 03 065- 06

Criterios de inclusión.

- Que el queso sea artesanal
- Que sea el queso expendido al público en general
- Que el queso sea expendido por puestos regulados por COMMEMA

Criterios de exclusión

- Que el queso tenga marca comercial registrada.
- Quesos pasteurizados

Técnicas e instrumentos

Con el objetivo de recopilar información de la muestra, se llenaron fichas de recolección de datos con información acerca del tipo de queso, tiempo de almacenamiento, procedencia, mercado distribuidor aspectos de las muestras entre otros datos.

Las muestras del estudio fueron compradas por los autores del mismo y transportadas al Centro Nacional de Diagnósticos de Referencia CNDR– MINSA en un termo con refrigerantes, a un temperatura de 4°C y donde serán procesadas en el laboratorio de Agua y Alimentos del departamento de Microbiología, utilizando el método de aislamiento convencional basado en la FDA-BAM de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

La identificación de los genes; universal codificador de enterotoxinas y *mecA* en *Staphylococcus aureus* se realizó por el uso de la técnica PCR-Tiempo Real. Las muestras amplificadas que correspondan con los pesos moleculares de los genes en estudio, se correrán en agarosa por electroforesis con fines complementarios.

Análisis de la Información

El manejo y redacción de la información se realizara mediante la utilización de los programas de computación Microsoft office Word, Microsoft office Excel y Microsoft office PowerPoint para la elaboración de la presentación del trabajo, del sistema operativo Windows 8.

Diagnóstico de laboratorio.

Aislamiento de *Staphylococcus aureus* Según FDA – BAM

Recuento en Agar Baird Parker

- Pesar 50 gr de la muestra en una bolsa Stomacher
- Adicionar 450 ml AB (Agua Bufferada)
- Agitar vigorosamente la bolsa que contiene el medio pre enriquecido
- Realizar diluciones seriadas de la solución madre (10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}).
- Inocular 1 ml de las diluciones sobre la superficie de 3 placas del medio Baird Parker, de forma equitativa (0.4 ml, 0.3 ml y 0.3 ml)
- Extender el inóculo con asas de Drigalsky, dejar las placas por 10 minutos para que el medio absorba por completo el inóculo.
- Invertir las placas e incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 24- 48 horas.

Selección de colonias típicas.

- Se seleccionan las placas que contengan de 20- 200 colonias. Las colonias de *Staphylococcus aureus* son circulares, lisas, convexas, húmedo, de 2-3 mm de diámetro, de color gris a negro azabache, con frecuencia margen de color claro (casi blanco), rodeado de zona opaca y con una zona clara externa; las colonias tienen consistencia de mantequilla gomosa cuando se toca con una aguja.
- Si se observan varios tipos de colonias posibles de *Staphylococcus aureus* en las placas seleccionadas, se cuentan y se registran por separado.
- Se toman más de 1 colonia (2 o 3) de cada tipo para realizar la prueba de coagulasa.²

Prueba de Coagulasa.

- Se transfieren las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* a tubos pequeños que contienen 0.2 a 0.3 ml de BHI y emulsionar a fondo.
- Se inocula en un medio TSA a partir de las suspensiones de BHI y se incuban tanto el agar como la suspensión a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas.
- Añadir 0.5 ml de plasma reconstituido con EDTA al medio BHI y mezclar bien.

- Incubar por 6 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y revisar periódicamente la formación del coagulo. Solo un coagulo que se mantiene firme en el fondo del tubo cuando este se inclina o se invierte, se considera positivo.

Extracción del ADN por Calor.

- Se colocan 120 ul de agua destilada en viales de 1.5 ml previamente rotulados.
- Se toman las colonias de los medios TSA y se mezclan homogéneamente en los viales.
- Se llevan los viales al equipo Eppendorf ThermoMixer por 10 minutos. El equipo agita y eleva la temperatura hasta los 100°C para producir la desnaturalización del ADN.
- Centrifugar a 8 000 rpm por 5 minutos. En el sobrenadante se encuentra el material genético extraído. (Mercedes, 2011)

Extracción con Mericon DNA Bacteria Kit

- Se realiza una suspensión de las colonias seleccionadas para el pool a partir de TSA en un vial de 1.5 ml
- Centrifugar a 13,000 x G por 5 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Adicionar 200 ul de mericon DNA Bacteria kit y resuspender homogenizando con Vortex
- Se llevan los viales al equipo EppendorfThermoMixer por 10 minutos. El equipo agita y eleva la temperatura hasta los 100°C para producir la desnaturalización del ADN.
- Centrifugar a 8 000 rpm por 5 minutos. En el sobrenadante se encuentra el material genético extraído.(Quiagen 2016)

Extracción con Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal

- A partir del cultivo puro de la bacteria en TSA , realizar el pool tomando las colonias y suspendiéndolas en 200 ul de Agua libre ácido nucleico
- Centrifugar a 13,000 x G por 5 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Adicionar 500 ul de agua libre de ácido nucleico.
- Adicionar 200 ul de perlas imantadas Dynabeads DNA DIRECT universal
- Posicionar el vial en frente al imán y descartar el sobrenadante
- Realizar el 3 lavados con 200 ul de buffer de lavado
- Descartar el sobrenadante
- Adicionar 100 ul de buffer de re-suspensión (eludido) pre incubado a 65°C en el eppendorf Thermomixer y resuspender vigorosamente
- Posicionar el vial en la columna de imán y recolectar el sobrenadante en otro vial previamente rotulado (Introgen 2012)

Técnica de PCR tiempo real.

PCR en tiempo real para detección del gen *mecA*

La amplificación se realizó según Mercedes, 2011 con algunas modificaciones utilizando un Termociclador Light Cycler 1.5 Roche usando los primer para la detección de gen *mecA* (241 pb) y nuc (288) según el siguiente esquema: desnaturalización a 95 °C por 7 minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 10 segundos, 58 °C por 20 segundos y 72 °C por 2 minutos, y luego una extensión final a 72 °C por 5 minutos (Mercedes, 2011).

Reactivos	Concentraciones	Cantidad (ul)
	□	
Agua		1.8
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	1x	5
<i>mecA</i> 1 5'-GCA ATC GCT AAA GAA CTA AG-3	1 uM	1
<i>mecA</i> 25'-GGG ACC AAC ATA ACC TAA TA-3'	1 uM	1
<i>nuc1</i> : F -GCG ATT GAT GGT GAT ACA GTT	0.1 uM	0.1
<i>nuc2</i> : R- AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	0.1 uM	0.1
Template		1
Total		10ul

PCR en tiempo real para detección del Gen universal codificador de enterotoxina.

Se hizo la amplificación usando el gen universal SA-U / SA-P en el equipo StepOne Plus de Applied Biosystems con un volumen total (mezcla de la reacción) de 20µL. Los parámetros aplicados al termociclador durante la fase inicial estarán dado a 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30 s a 45°C, 30s a 72°C, y el proceso final de elongación a 72°C por 7 minutos. (Capucine Letertre et al, 2003)

Reactivos	Concentraciones	Cantidad
	□	(ul)
Agua		1.6
Maxima SYBRGreen/Fluorecein Supermix	1x	10
SA-U 54 10 uM (Forward 5'-TGT ATG TAT GGA GGT GTA AC-3')	0.8 uM	3.2
SA-P 55 10 uM (Reverse 5'-TCT TGA ACD GTH ACH HTT TTY TT-3')	0.8 uM	3.2
Template		2
Total		20

El control de calidad de los métodos utilizados se realizara utilizando las siguientes cepas control:

ATCC: 25923 (*Staphylococcus aureus*, nuc positivo)

ATCC: 12288 (*Staphylococcus aureus*, mecA positivo)

Corrida electroforética.

La corrida se realizó con un voltaje de 110v por 1 hora y 15 minutos con gel de agarosa al 4.2% y TAE 1x (Tris Ácido Acético EDTA), posteriormente se sometió el gen a la post tinción con GelRed por 30 minutos.

Gel de Agarosa 4.2%

- Se pesaran 3g de Agarosa FisherThermoscientific
- En un Erlenmeyer con 70 ml de TAE 1x (Tris- Ácido Acético- EDTA) disolver los 3g de Agarosa
- Llevar a ebullición
- En la cámara electroforética depositar el gel y posicionar la peineta
- Dejar solidificar

GelRed

- Preparar el gel según el protocolo pre establecido
- Realizar la corrida electroforética según protocolo pre establecido
- En una cubeta, adicionar 100 ml de TAE 1x
- Adicionar 30 ul de GelRed
- Sumergir el gel de agarosa después de la corrida electroforética en la solución de tinción por 30 -60 minutos
- Realizar la visualización y fotografía bajo luz ultravioleta (Biotium, 2013).

8. Operacionalización de las variables.

Variables	Sub-variables	Indicadores	Valores	Criterios
Aislamiento convencional de <i>Staphylococcus aureus</i> en queso	Aislamiento de <i>Staphylococcus spp.</i>	Agar Baird Parker	Crecimiento característico de UFC Sin crecimiento bacteriano	Colonias circulares, lisas, convexas, de 2-3 mm de diámetro, de color gris a negro, rodeada de zona opaca y con una zona clara externa.
	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	Coagulasa	Negativa Positiva	Formación del coagulo en el plasma citratado
PCR para la detección de Genes codificadores en <i>Staphylococcus aureus</i>	PCR tiempo real	Gen <i>mecA</i>	Si- No	Curva de amplificación significativa Curva meltin (75.5 ±0.3)
		Gen <i>nuc</i>	Si- No	Curva de amplificación significativa Curva meltin (77.5 ±0.3)
		Gen SA-U/P	Si- no	Curva de amplificación significativa Curva meltin (77.5

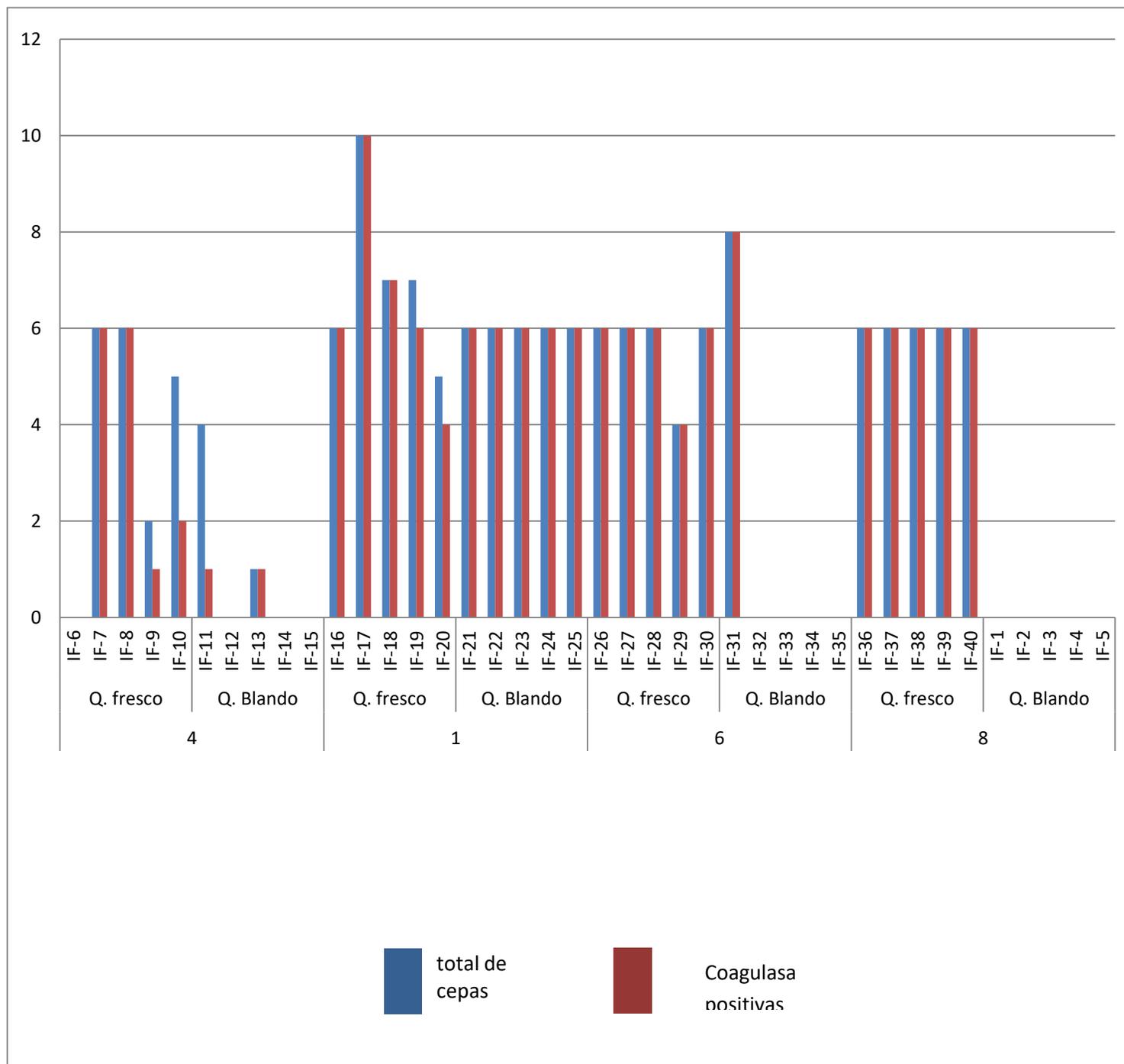
				±0.3)
	Electroforesis	Gen <i>mecA</i>		241 pb
		Gen <i>nuc</i>		288 pb
		Gen SA- U/P		141 pb

9. Análisis y discusión de resultados

Los resultados obtenidos en el estudio revelaron el aislamiento de *Staphylococcus aureus* en 67.5% (27 de las 40) de las muestras analizadas con un valor un máximo de 9×10^7 UFC/g, un mínimo de 2×10^2 UFC/g y un promedio de 7.03×10^6 UFC/g. Estos datos en comparación con la investigación realizada por Jirón y Aburto en el 2007 donde analizaron el 36% de las queseras artesanales de Camoapa (5/14) encontrando *Staphylococcus aureus* en el 100% de las muestras, con valor de crecimiento promedio de 6.1×10^6 UFC/g; y el estudio realizado por Delgado y Torres en Lima, Perú 2001 donde se trabajó con 39 muestras de queso fresco artesanal registrándose un crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el 87.2% de las muestras con valores promedio de 3.1×10^5 UFC/g, un máximo de 1.3×10^6 UFC/g y un mínimo de 1.6×10^4 UFC/g, podríamos inferir que los crecimientos de la bacteria en los quesos artesanales tienen un índice elevado, siendo que la variabilidad de los resultados están dados según el tipo de muestras analizadas. Tabla No 1.

Al tomar en cuenta que en las muestras de queso fresco artesanal de nuestro estudio se presentó una incidencia del 95% (19/20), el patrón de crecimiento de dicho microorganismo en queso fresco artesanal mantuvo índices similares en los 3 estudios superiores al 85%. En contraste con los datos del análisis de queso blando artesanal donde se obtuvo solamente el 40% (8/20) por lo que decimos que las características propias de los alimentos influyen directamente en la probabilidad de colonización del *Staphylococcus aureus* (Arias, M. L, 2008) siendo que los quesos frescos de los estudios observados fueron los más contaminados, del mismo modo podemos decir que las buenas prácticas de manufactura cumplen un papel importante en garantizar la inocuidad de estos productos lácteos como son las exposición al aire libre, las barreras de protección y manipulación (Arauz, Narvaez & Garcia Varela 2013).

Grafico No 1. Identificación por la prueba de coagulasa según las FDA-BAM de las cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de muestras de queso artesanal expendidos en el Mercado Roberto Huembés durante el periodo de Noviembre-Diciembre del 2016



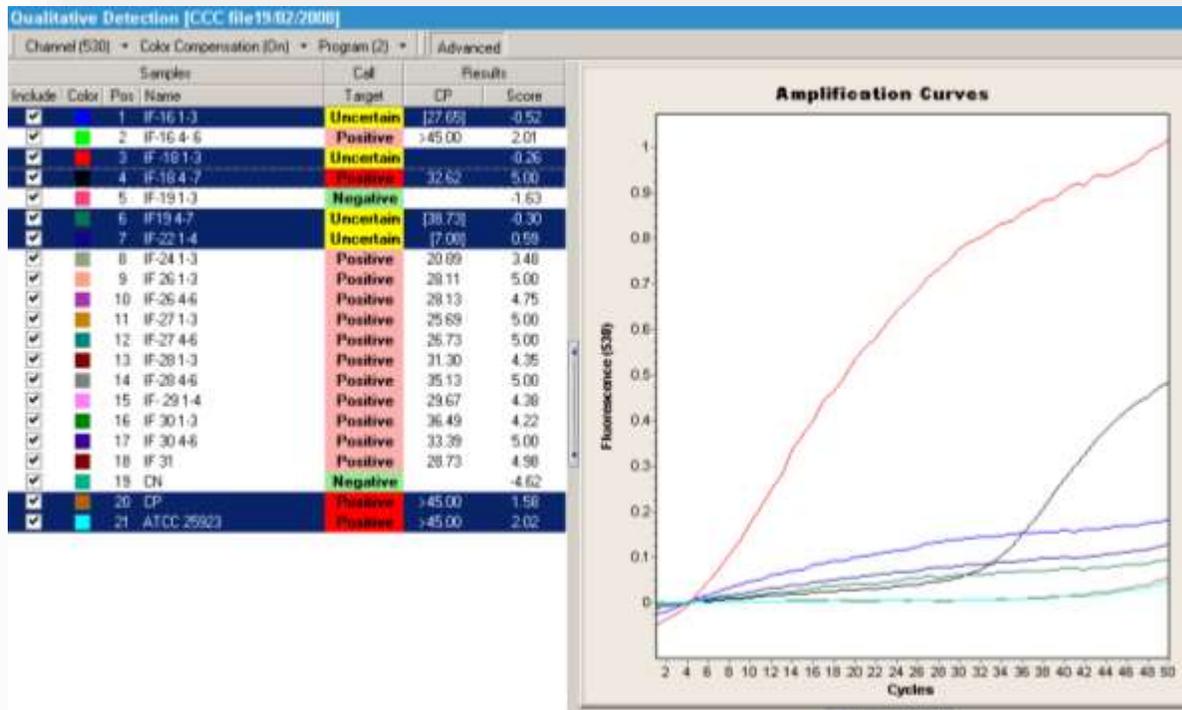
Fuente: resultados de laboratorio

En la gráfica No. 1 se observan los resultados de la prueba de coagulasa establecida por la FDA-BAM como prueba confirmatoria para la identificación de *Staphylococcus aureus*. De las 798 cepas obtenidas de 27 quesos (19 quesos fresco y 8 quesos blandos) se seleccionaron 155 (20%), de las cuales 146 resultaron *Staphylococcus aureus*. Tabla No 2.

Las cepas *Staphylococcus aureus* confirmadas (146) con la prueba de coagulasa fueron sometidas a la extracción de ADN por calor (Mercedes, 2011) para detección del gen *mecA* por la qPCR usando de *screening* al gen *nuc* (leeuwen 2008). El 100% de las cepas analizadas fueron negativas para el gen de resistencia *mecA* (88 *pooles*) de las cuales el 93% fueron positivas para el gen *nuc* y el 7% (6 *pooles*) negativas. En contraste con el estudio realizado por Arbizu M. 2009, en donde se usó el gen *nuc* como *screening* con un resultado positivo para las 234 cepas aisladas (100%).

La discrepancia encontrada entre los resultados negativos para el gen *nuc* con respecto a la prueba de coagulasa positiva, creó la incertidumbre acerca de la existencia de algún mecanismo inhibitor de la PCR, lo que nos llevó a realizar la separación de las cepas problema de los *pooles* para realizar su extracción nuevamente a partir de los cultivos de TSA utilizando otros métodos.

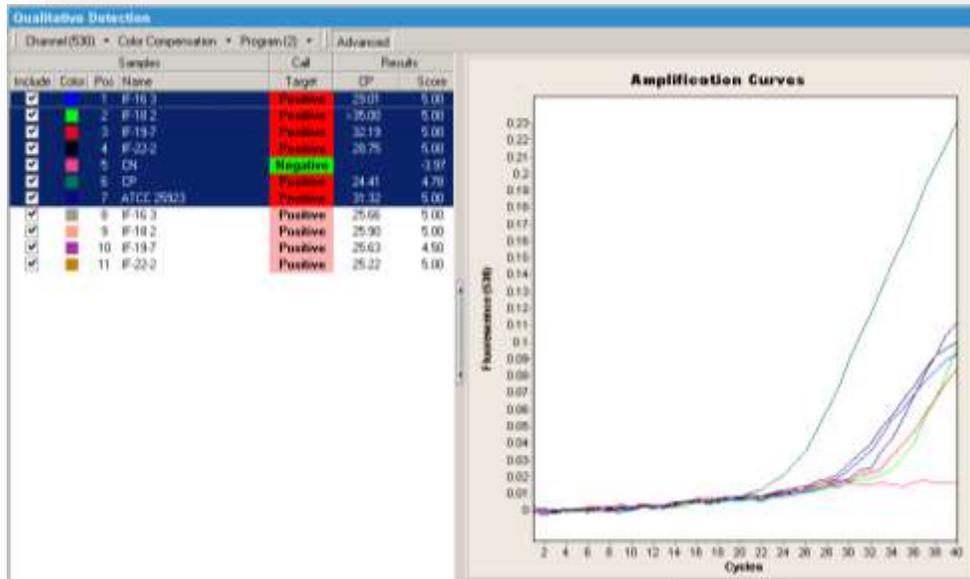
Grafico No 2. Extracción por Mericon Bacteria Kit de cepas conflicto.



Fuente: Resultados de laboratorio.

Se observa en esta grafica que las muestras problemas que fueron separadas y extraídas con el método Mericon Bacteria Kit resultaron positivas, sin embargo con curvas de amplificación insatisfactorias y CTs bajos; así como el resultado negativo y/o incierto en diversas PCRs

Grafico No 3. Extracción por Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal de cepas conflictivo.



Fuente: Resultados de Laboratorio

La Grafica No3 demuestra que las curvas de amplificaciones fueron satisfactorias y hubo un mejor CT en el qPCR de las muestras que se extrajeron con Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, en comparación con las mismas extraídas con Mericon bacteria Kit.

El 7% del total de las cepas extraídas por calor presentaron problemas con la detección del nuc, este resultado concuerda con el estudio realizado por Molina et al, 2006 que manifiesta que con la extracción por calor se consigue una efectividad superior al 90%.

Posteriormente se utilizó el método de extracción Mericon Bacteria kit donde resultaron positivas apenas el 50% de estas. A partir de las cepas restantes en las que no ocurrió la amplificación del gen nuc se realizó nuevamente la extracción, con el método Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, con el cual la amplificación del 100% fue satisfactoria.

Con estos pudimos evidenciar la presencia del gen nuc en el 100% (146 cepas) confirmando que eran *Staphylococcus aureus* y su correlación con los resultados de la prueba coagulasa positiva.

Grafica No 4. Detección del gen universal codificador de la producción de enterotoxinas estafilocócicas por qPCR en muestras de quesos artesanal expendidos en el mercado Roberto Huembes durante el periodo de Noviembre- Diciembre de 2016.



Fuente: Resultados de laboratorio

El grafico No 4. Muestras las curvas de amplificación obtenidas después de la realización de las qPCR en las cepas aisladas, donde solamente hubo una amplificación significativa en los controles positivos para la enterotoxinas.

Con respecto a la detección de enterotoxina estafilocócica no se logró identificar ninguna cepa de *Staphylococcus aureus* portadora del gen universal codificador de la enterotoxina en los 100% de las muestras analizadas. Esto correlaciona con los valores obtenidos en otros estudios como los de Chavez, 2015 y Herrera A. & Santos B., 2015 donde la prevalencia de esta la enterotoxinas no sobrepasan el 9% de las muestras analizadas.

10. Conclusiones

Se analizaron un total de 40 muestras de las cuales 20 fueron quesos frescos y 20 quesos blandos artesanales expendidos en el mercado Roberto huembés, en donde se comprobó que el 67.5% estaban colonizados por *Staphylococcus aureus*. El 95% (19/20) de los quesos frescos y el 40% (8/20) de los blandos respectivamente.

Los resultados de los 88 pools trabajados equivalentes a 154 cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, fueron negativos para la detección del gen *mecA* que induce la resistencia antimicrobiana.

Los resultados de los 88 pools trabajados equivalentes a 154 cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, fueron negativos para la detección del gen SA-U/P que codifica la producción de enterotoxinas estafilocócicas.

11. Recomendaciones

A los productores y comerciantes.

Cumplir con las medidas higiénico-sanitarias para la manipulación y procesamiento de los quesos artesanales, así como las condiciones óptimas de transporte y almacenamiento del producto terminado.

A los investigadores, CNDR y UNAN.

Dar continuidad a estudios de *Staphylococcus aureus* en quesos artesanales expendidos en los diferentes mercados del país para la búsqueda del gen universal codificador de enterotoxinas y/o gen *mecA* para conocer la situación epidemiológica de dichos parámetros.

12. Bibliografía

1. Reginald W. Bennett. (2016). Bacteriological Analytical Manual Chapter 12 Staphylococcus aureus. *U.S. Food and Drug Administration*, 4/6. Obtenido de <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071429.htm>
2. Anibal A. Brizzio, et al. (2011). Descripción de un brote de intoxicación alimentaria estafilocócica ocurrido en Las Rosas, Provincia de Santa Fe., *Revista Argentina de Microbiología*.
3. Arias, M. L. (2008). Microbiología de aguas y alimentos, Principios y prácticas de laboratorio. *Universidad de Costa Rica- Facultad de Microbiología*, 29-33.
4. Capucine Letertre, S. P. (2003). Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal. *Elsevier Ltd.*, 17, 139–147.
5. Chavez, C. (julio de 2015). *International Association for Food Protection*. Obtenido de <https://iafp.confex.com/iafp/2015/webprogram/Paper8603.html>
6. Dios, T. d. (2013). Tecnología en Salud, Fundamentos de la reacción en cadena de la Polimerasa. *Investigacion en Discapacidad*, 70-78.
7. Elizabeth Lucci et al. (2014). Crecimiento de *Staphylococcus aureus* y producción de enterotoxinas durante la manufactura y almacenamiento de queso “telica”. *Revista Venezolana*.
8. Fanny Herrera A,^{1*} Ph.D, Jesús Santos B,² Ph.D. (2015). Enterotoxigenic Genes in strains of *Staphylococcus* spp., isolated from cheese made in Pamplona-Colombia.
9. Gimena., G. A. (2007). Identificación del gen codificado de la enterotoxina de *staphylococcus aureus* en productos lácteos. *Vision científica*.
10. Gutierrez, J. A. (1992). *Detección de Enterotoxinas Estafilocócicas y TSST-1 Mediante Técnica de Transferencia Electroforética*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

11. Herrera A., F., & Santos B., J. (2015). Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes en queso doble crema artesanal. . *U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 29-37.
12. Lombard, A. B. (1996). Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. *Revista Cubana Aliment Nutr.*
13. Maxwell, A. (21 de julio de 2014). *ThermoFisher Scientific*. Obtenido de <http://acceleratingscience.com/food/characterizing-staphylococcus-aureus-contamination-in-raw-milk-cheese/>
14. Mercedes, C. (2011). Frecuencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en personal. *Revista Panamericana de la Salud.*
15. Morosini, M. I. (2011). Deteccion Fenotipica de Mecanismos de Resistencia en Gram Positivos. *Procedimientos en Microbiologia Clinica*, 3.
16. Murray, P. R. (1995). *Microbiologia Medica 6th Edicion.*
17. NTON-03 065- 06. (2009). *Normas Tecnicas Obligatorias Nicaraguense para queso.*
18. OPS/OMS, u. (2012). *Staphylococcus aureus*. Obtenido de iblioteca Virtual en Salud -: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/aureus.pdf>
19. oxoid. (2015). BAIRD PARKER AGAR (7112). *oxoid.*
20. Vanegas, M. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigenicos aislados de quesos en bogota.
21. Arauz, Narvaez & Garcia Varela. «Elaboracion de documentos de soporte para la implementacio de las buenas practicas de manufactura de la empresa lacteos " jackson" ubicada en el departamento de Chontales durante los meses (agosto de 2012- Septiembre de 2013).» 2013, 18.
22. Introgen. «Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal for isolation of PCR-ready genomic DNA from Small samples.» *INTROGEN life technologies*, 2012.

23. leeuwen, Van. «A nuc-deficient meticillin-resistant staphylococcus aureus strain.» *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008: 157.
24. Quiagen. «Mericon QUIAGEN Bacteria Kit .» *QUIAGEN sample & assay Technologies*, 2016.
25. scientific, Thermo Fisher. «Thermo Fisher scientific.» *Thermo Fisher scientific*. 2016. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0241> (último acceso: 07 de enero de 2017).

Anexos

Cronograma de actividades

semanas	fechas	actividades	fechas	actividad 2	fechas	actividad 3	fechas	actividad 4
semana 1	28/11/2016	Toma de muestra lote 1 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	29/11/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	30/11/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	02/12/2016	PCR Electroforesis
	29/11/2016	Toma de muestra lote 1 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	30/11/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	01/12/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	02/12/2016	PCR Electroforesis
Semana 2	05/11/2016	Toma de muestra lote 2 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	06/12/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	07/12/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	09/12/2016	PCR Electroforesis
	06/12/2016	Toma de muestra lote 2 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	07/12/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	08/12/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	09/12/2016	PCR Electroforesis

semana 3	12/12/2016	Toma de muestra lote 3 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	13/12/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	14/12/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	16/12/2016	PCR Electroforesis
	13/12/2016	Toma de muestra lote 3 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	14/12/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	15/12/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	16/12/2016	PCR Electroforesis
Semana 4	19/12/2016	Toma de muestra lote 4 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	20/12/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	21/12/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	23/12/2016	PCR Electroforesis
	20/12/2016	Toma de muestra lote 4 (5 muestras) Trasporte al laboratorio, Cultivo en agar Baird Parker	21/12/2016	Lectura a 24horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa	22/12/2016	Lectura a 48horas, selección de colonias Pase a agar TSA y Coagulasa. Lectura de Coagulasa Extracción de ADN	23/12/2016	PCR Electroforesis

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
Instituto Politécnico de la Salud “Dr. Luis Felipe Moncada”

Departamento de Bioanálisis clínico

Licenciatura en Microbiología.



Ficha observacional de recolección de datos para la realización de un estudio en quesos artesanales expendidos en el mercado Roberto Huembés, Managua, Nicaragua 2016 dirigida a consumidores y vendedores.

1. Demandas de consumidores según tipo de queso

a. Tipo de queso más demandado.

- i. Queso extra duro (madurado)
- ii. Queso ahumado
- iii. Queso fresco
- iv. Queso blando
- v. Otros: _____

b. ¿Porque se vende/ compra más este tipo de queso?

- i. El precio
- ii. La calidad
- iii. La utilidad
- iv. Otro:

2. Condiciones Higiénico- Sanitarias

a. El puesto está registrado por COMENMA

- i. Si
- ii. No

b. Local de almacenamiento adecuado

- i. Si
- ii. No

c. Vitrinas en buenas condiciones

- i. Si
- ii. No

d. Personal porta medidas para evitar la contaminación por manipulación

- i. Si
- ii. No
- iii. Parcialmente
- iv. Otras medidas : _____

e. Otras observaciones :

Tabla No 1. Resultados del aislamiento de *Staphylococcus aureus* en agar Baird Parker obtenidos de muestras de queso artesanal expendidos en el Mercado Roberto Huembés durante el periodo de Noviembre-Diciembre del 2016

Muestras	No.	Conteo UFC/gr			
		Puesto 1	Puesto 4	Puesto 6	Puesto 8
Queso Blando	1	3.4×10^3	1×10^3	8×10^2	<1
	2	3.4×10^3	<1	<1	<1
	3	2.9×10^3	1×10^3	<1	<1
	4	2.9×10^3	<1	<1	<1
	5	1.6×10^3	<1	<1	<1
Queso Fresco	1	1.5×10^7	<1	2.5×10^5	4×10^6
	2	9×10^7	6×10^2	2×10^5	4.7×10^6
	3	4.4×10^7	3.6×10^7	5×10^5	2.8×10^6
	4	5.3×10^7	2×10^2	4×10^4	7.3×10^6
	5	1.8×10^7	2×10^3	4×10^5	5.3×10^6

Fuente: Resultados de laboratorio

Tabla No 2. Tabla de Resumen de los resultados obtenidos del procesamiento de muestras de queso artesanal expendidos en el Mercado Roberto Huembés durante el periodo de Noviembre-Diciembre del 2016

codigo de Mx	tipo de queso	puesto	conteo					coagulasa			PCR			Resultados
			-2	-3	-4	-5	-6	cepas	2h	24 h	Nuc	MecA	Entero	
IF-1	QUESO BLANDO	8	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-2	QUESO BLANDO	8	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-3	QUESO BLANDO	8	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-4	QUESO BLANDO	8	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-5	QUESO BLANDO	8	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-6	QUESO FRESCO	4	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-7	QUESO FRESCO	4	6					6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-8	QUESO FRESCO	4					36	6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-9	QUESO FRESCO	4	2					2	1	1	pos	neg	neg	negativo
IF-10	QUESO FRESCO	4		2				5	2	2	pos	neg	neg	negativo
IF-11	QUESO BLANDO	4		1				4	0	1	pos	neg	neg	negativo
IF-12	QUESO BLANDO	4	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-13	QUESO BLANDO	4		1				1	1	1	pos	neg	neg	negativo
IF-14	QUESO BLANDO	4	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-15	QUESO BLANDO	4	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-16	QUESO FRESCO	1					15	6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-17	QUESO FRESCO	1					90	10	10	10	pos	neg	neg	negativo
IF-18	QUESO FRESCO	1					44	7	7	7	pos	neg	neg	negativo
IF-19	QUESO FRESCO	1					53	7	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-20	QUESO FRESCO	1					18	5	4	4	pos	neg	neg	negativo
IF-21	QUESO BLANDO	1	34					6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-22	QUESO BLANDO	1	34					6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-23	QUESO BLANDO	1	29					6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-24	QUESO BLANDO	1	29					6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-25	QUESO BLANDO	1	16					6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-26	QUESO FRESCO	6			25			6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-27	QUESO FRESCO	6			20			6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-28	QUESO FRESCO	6			50			6	6	6	pos	neg	neg	negativo

IF-29	QUESO FRESCO	6			4			4	4	4	pos	neg	neg	negativo
IF-30	QUESO FRESCO	6			40			6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-31	QUESO BLANDO	6	8					8	8	8	pos	neg	neg	negativo
IF-32	QUESO BLANDO	6	1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-33	QUESO BLANDO	6	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-34	QUESO BLANDO	6	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-35	QUESO BLANDO	6	<1	<1	<1	<1	<1							negativo
IF-36	QUESO FRESCO	8				40		6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-37	QUESO FRESCO	8				47		6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-38	QUESO FRESCO	8				28		6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-39	QUESO FRESCO	8				73		6	6	6	pos	neg	neg	negativo
IF-40	QUESO FRESCO	8				53		6	6	6	pos	neg	neg	negativo

Fuente: Resultados de laboratorio

Genoma bacteriano: *Staphylococcus aureus* strain TN/CNH/8/14 MecA (mec-A) gene, complete cds

ORIGIN

1 atgaaaaaga taaaaattgt tccacttatt ttaatagttg tagttgctgg gtttggata
61 ttttttatg ctcaaaaga taaagaatt aataacta ttgatgcaat tgaagataaa
121 aatttcaaac aagttataa agatagcagt tatatttcta aaagcgataa tggggaagta
181 gaaatgactg aacgtccgat aaaaatataa aatagtttag gcgttaaaga tataaacatt
241 caggatcgta aaataaaaa agtatctaaa aataaaaaac gagtagatgc tcaataataa
301 attaaaaaca actacggtaa cattgatcgc aacgttcaat ttaattttgt taaagaagat
361 ggtatgtgga agtttagattg ggatcatagc gtcattatc caggaatgca gaaagacca
421 agcatacata ttgaaaattt aaaatcagaa cgtggtaaaa ttttagaccg aaacaatgtg
481 gaattggcca atacaggaac agcatatgag ataggcatcg ttccaaagaa tgtatctaaa
541 aaagattata aagcaatcgc taaagaacta agtatttctg aagactatat caaacaacaa
601 atggatcaaa attgggtaca agatgatacc ttcgtccac ttaaaccgt taaaaaatg
661 gatgaatatt taagtgattt cgcaaaaaa tttcatctta caactaatga aacagaagat
721 cgtaactatc ctctaggaaa agcgacttca catctattag gttatgttgg tcccattaac
781 tctgaagaat taaaacaaaa agaataataa ggctataaag atgatgactg tattggtaaa
841 aagggactcg aaaaacttta cgataaaaa cgccaacatg aagatggcta tctgtgcaca
901 atcgttgacg ataatagcaa tacaatcga catacattaa tagagaaaa gaaaaagat
961 ggcaaagata tcaactaac tattgatgct aaagtcaaa agagtattta taacaacatg
1021 aaaaatgatt atggctcagg tactgctatc caccctcaa cagggtgaatt attagcactt
1081 gtaagcacac ctctcatga cgtctatcca tttatgtatg gcatgagtaa cgaagaatat
1141 aataaattaa ccgaagataa aaaagaacct ctgctcaaca agttccagat tacaacttca
1201 ccaggttcaa ctcaaaaaat attaacagca atgattgggt taataacaa aacattagac
1261 gataaaacaa gttataaaat cgatggtaaa ggttggcaaa aagataaac ttgggggtgt
1321 tacaacgta caagatatga agtggtaaat ggtaaatcgc acttaaaaca agcaatagaa
1381 tcatcagata acattttctt tgctagagta gcactcgaat taggcagtaa gaaattgaa
1441 aaaggcatga aaaaactagg tgttgggtgaa gatataccea gtgattatcc atttataat
1501 gctcaaattt caaacaaaaa tttagataat gaaatattat tagctgattc aggttacgga
1561 caaggtgaaa tactgattaa cccagtacag atcctttcaa tctatagcgc attagaaaa
1621 aatggcaata ttaacgcacc tcacttatta aaagacagca aaaaacaaagt ttggaagaaa
1681 aatattattt ccaagaaaaa tatcaatcta ttaactgatg gtatgcaaca agtcgtaaat
1741 aaaaacata aagaagatat ttatagatct tatgcaaac taattggcaa atccggctact
1801 gcagaactca aatgaaaca aggagaaact ggcagacaaa ttgggtggtt tatatcatat
1861 gataaagata atccaacat gatgatggct attaagtta aagatgaca agataaagga
1921 atggctagct acaatccaa aatctcaggt aaagtgtatg atgagctata tgagaacggt
1981 aataaaaaat acgatataga tgaataacaa aacagtgaag caatccgtaa cgatgggtgc
2041 ttactgttt tattatgaat tattaataag tgctgttact tctccctaa atacaatttc
2101 ttcatttca ttgatgttg aaag

(NCBI, 2014)

Glosario

amplicones: ADN amplificado en la PCR.

threshold; demarca la positividad o negatividad de la PCR.

CT: Ciclo threshold, es el punto de unión entre la curva de amplificación y el umbral

FDA-BAM: Institución de control de alimentos y administración de drogas (de las siglas en inglés para “Food and Drugs Administration”); usado como referencia en procedimientos de laboratorios de Agua y alimentos.

MecA: Gen que codifica a la proteína PBP2a de unión a penicilina, confiere una resistencia completa a todos los antibióticos β -lactámicos, incluso las penicilinas semisintéticas.

Melting: curva de disociación que permite saber si el producto amplificado era el que se buscaba y no dímeros u otros productos inespecíficos.

Pool / pools: Mezcla de cepas provenientes de la misma muestra; se realiza para la optimización de recursos.

Screening: Tamizaje realizado en los estudios, sirve de referencia para algún parámetro que se desea medir.

Abreviaturas

TSST-1: Toxina-1 del síndrome de choque Tóxico.

TSA: Agar tripticasa soya

SE: enterotoxina estafilocócica.

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; (PCR tiempo real)

PBP: proteína fijadora de las penicilinas

OMS: organización Mundial de la salud

NTON: Normas Técnicas Obligatorias Nicaragüenses

Nuc: gen que codifica la producción de termonucleasa

mM: micro mol

KDa : Kilo Dalton

G-C : Guanina-Citocina

dUTPn: di uracil Trifosfatos

dNTP's: di nucleótidos trifosfatos

CMI: concentración mínima inhibitoria

BHI: Caldo infusión, cerebro corazón (de las siglas en inglés "Brain Heart Infusion")

A-T: Adenina-Timina

TAE: Tris- Ácido acético + EDTA



Centrifuga



ThermoMixer



Placas Microposilllo



ThermoCycler Applied Biosystem Step-One Plus



Capilares LightCycler



Carrusel de capilares



Cámara de Electroforesis



Transluminador UV



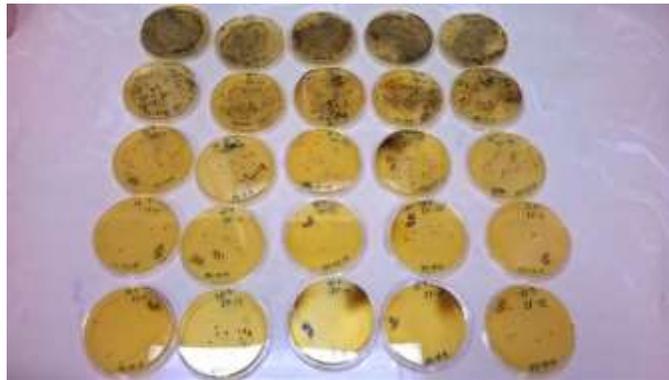
Electroforesis en gel de Agarosa al 4.2% del Gen *mecA* (222pb) + *nuc* (281pb). TAE 1x + Gel Red



Colonias Típicas en Agar Baird Parker



Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en
Agar Baird Parker



Crecimiento homogéneo, Queso artesanal según n=5.



Coagulasa Positiva, *Staphylococcus aureus*