

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SEDE RODRIGO FACIO  
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en  
Microbiología y Química Clínica

Revisión bibliográfica:

Importancia de las enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus* en  
alimentos. Diferentes métodos de detección e identificación.

Nielsy Virginia Vargas Ovares

A76813

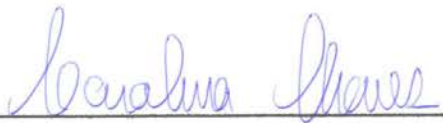
Tutora: Dra. María Laura Arias Echandi

Julio, 2015

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación:



Dra. María Laura Arias Echandi  
Tutora



Dra. Carolina Chaves Ulate  
Lectora



Dra. Pilar Salas Chaves  
Lectora



Dra. Ingrid Salas Campos  
Presidente del Tribunal



Dra. Florencia Antillón Guerrero  
Profesor designado

## Tabla de contenido

Resumen .....	3
Justificación.....	4
Objetivo general .....	5
Objetivos específicos .....	5
Introducción .....	6
Capítulo I: Características de <i>Staphylococcus aureus</i> y sus principales enterotoxinas . .....	9
1.1 Características del género <i>Staphylococcus</i> y de la especie <i>Staphylococcus aureus</i> ..	9
1.1.1 Historia.....	9
1.1.2 Hábitat .....	10
1.1.3 Características y condiciones de crecimiento .....	11
1.1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
1.2 Enterotoxinas producidas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
1.2.1 Nomenclatura y clasificación .....	13
1.2.2 Localización y regulación génica.....	14
1.2.3 Condiciones para la producción de enterotoxinas .....	16
1.2.4 Superantígenos .....	18
Capítulo II: Importancia clínica y epidemiológica de las enterotoxinas producidas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2.1 Intoxicación alimentaria estafilocócica .....	19
2.1.1 Alimentos asociados y fuentes de contaminación.....	19
2.1.2 Cuadro clínico y dosis requerida.....	20
2.1.3 Mecanismo de acción de las SEs.....	21
2.2 Epidemiología .....	24
2.2.1 Situación a nivel mundial .....	24
2.2.2 Situación en Costa Rica .....	27

<b>Capítulo III: Métodos de detección e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> y sus enterotoxinas .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Bioensayos .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Inmunoanálisis .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Métodos moleculares .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Métodos basados en espectrometría de masas .....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>36</b>
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>38</b>

## Resumen

En la actualidad, se han descrito unas 250 enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) producidas por microorganismos entre los que se encuentran bacterias, hongos, virus y parásitos (1). Dentro de estas, *Staphylococcus aureus* tiene un papel importante. Ya que esta bacteria, posee un alto potencial para provocar diversas infecciones en el ser humano y los animales. Se puede encontrar como comensal, colonizando la mucosa nasal, la piel y la nasofaringe del ser humano (2). Es capaz de producir toxinas extracelulares, como lo son las toxinas exfoliativas (ET), la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1) y enterotoxinas (SEs). Estas últimas, son las responsables de las intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus* (SFPs, por sus siglas en inglés). Son una familia de 23 toxinas termoestables, que causan problemas a nivel del tracto gastrointestinal del ser humano (3). Los casos más severos con necesidad de hospitalización se dan en niños, adultos mayores o personas con el sistema inmune debilitado (2, 3). Cinco son las más importantes por ser las que se encuentran con más frecuencia causando SFPs. Se trata de la SEA, SEB, SEC, SED y la SEE, responsables de cerca del 95 % de los brotes de intoxicación alimentaria, por lo que se conocen como las enterotoxinas clásicas (3).

## Justificación

Las enfermedades transmitidas por alimentos causan al año, millones de pérdidas económicas a los negocios, y en el peor de los casos cobran vidas humanas. Es por eso que el acceso a alimentos inocuos es considerado un derecho (4).

*Staphylococcus aureus* es una bacteria que ha adquirido importancia en lo que a cuadros clínicos se refieren. Esta bacteria es un patógeno que puede causar, desde infecciones en la piel, hasta enfermedades más severas como una neumonía o una septicemia (3).

Uno de los principales cuadros clínicos provocados por *S. aureus*, es lo que se conoce como intoxicación alimentaria estafilocócica (SFP) que es causada por el consumo de alimentos contaminados con sus enterotoxinas. Dichas enterotoxinas se encuentran asociada a brotes de diarrea y vómito a nivel mundial. Hasta el día de hoy se han identificado más de 23 diferentes enterotoxinas estafilocócicas (5).

Por esta razón, es importante conocer las características bioquímicas y estructurales de las principales enterotoxinas producidas por *S. aureus*, la situación actual sobre los brotes, signos y síntomas que provocan su consumo, así como las técnicas más rápidas y sensibles para la detección e identificación de las mismas.

Además, esta investigación podría servir como base para la realización de futuros trabajos referentes a la aplicación y mejoramiento de los métodos existentes para la determinación de *S. aureus* y sus enterotoxinas en alimentos.

### **Objetivo general**

Realizar una revisión bibliográfica, sobre las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* presentes en alimentos, su importancia en salud y las principales técnicas de detección e identificación.

### **Objetivo específico**

1. Describir las principales características de *Staphylococcus aureus* y de sus enterotoxinas encontradas en alimentos.
2. Realizar una revisión bibliográfica sobre la importancia clínica y epidemiológica asociada al consumo de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* y los principales alimentos en las que se encuentran.
3. Describir los principales métodos de detección e identificación de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* utilizados actualmente.

## Introducción

Cuando se habla de inocuidad de los alimentos se hace referencia a todos los riesgos que pueden hacer que los alimentos sean nocivos para la salud del consumidor (6). En este caso, el principal riesgo son las enfermedades de transmisión alimentaria, conocidas como ETAs, las cuales son las responsables de un gran número de consultas médicas al año, además de producir pérdidas económicas y de productividad. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1 500 millones de casos, y 3 millones de niños menores de 5 mueren anualmente. Sin embargo, es posible que el número de casos sea mayor, debido al enorme subregistro que se presenta mayormente en países en vías de desarrollo (7).

Las ETAs incluyen todo aquello que pueda causar daño al consumidor al ingerir un alimento. Las que causan mayor número de casos, y por tanto las más importantes, son las de origen microbiológico. Actualmente se han agregado a esta lista lo que son los organismos genéticamente modificados, los alérgenos y los residuos de medicamentos u hormonas generados en la producción de alimentos de origen animal (6).

En la actualidad, se han descrito unas 250 ETAs producidas por microorganismos entre los que se encuentran bacterias, hongos, virus y parásitos, muchos de los cuales tiene la capacidad de causar cuadros diarreicos (1). Con respecto a esto, se estima que cerca del 70 % de las diarreas por ingesta de alimentos contaminados, son causadas por microorganismos o sus toxinas (7).



Los microorganismos pueden causar enfermedades alimentarias de 3 maneras: las infecciones, las intoxicaciones y las toxiinfecciones. Las infecciones alimentarias se producen cuando se ingieren alimentos que contienen los microorganismos patógenos vivos. En estos casos es importante que se dé multiplicación del microorganismo dentro del hospedero; entre los ejemplos más importantes se pueden citar las infecciones causadas por *Salmonella* (8). Las intoxicaciones, se producen por la ingesta de la toxina producida por el microorganismo en el alimento, fuera del hospedero. Algunos ejemplos son las toxinas bacterianas, toxinas fúngicas y toxinas de origen marino como la ciguatoxina o la saxitoxina (9). Y por último, las toxiinfecciones que son el resultado de la ingestión de alimentos que contienen cierta cantidad de microorganismos patógenos que son capaces de producir o liberar toxinas una vez que han sido ingeridos (8). Este es el caso de algunas cepas de *Shigella* y *Escherichia coli*, que producen la toxina Shiga, asociada al síndrome urémico hemolítico (10).

En cuanto a las a las toxinas bacterianas, tres especies son las responsables de los casos más importantes de intoxicación alimentaria en humanos: *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

La neurotoxina de *Cl. botulinum*, conocida como toxina botulínica, es capaz de producir parálisis de los músculos respiratorios y las extremidades; en casos más graves, la toxina, puede producir insuficiencia respiratoria y llevar a la muerte (11).

La toxina emética de *B. cereus*, es una enterotoxina que provoca síntomas gastrointestinales como náuseas, vómito y diarrea. Esta toxina se encuentra con mayor frecuencia en el arroz frito (12).

*S. aureus*, es el principal patógeno de su género, ya que posee un alto potencial para provocar diversas infecciones en el ser humano y los animales. Debe su exitosa sobrevivencia a que ha logrado adquirir gran número de factores de virulencia y mecanismo de resistencia (21).

*S. aureus* es productor de lo que se conocen como enterotoxinas estafilocócicas, las cuales, al igual que la toxina emética de *B. cereus*, producen síntomas gastrointestinales. Debido a la similitud del cuadro clínico que producen se suelen confundir (12).

Epidemiológicamente, las intoxicaciones estafilocócicas se encuentran mundialmente distribuidas. Estudios realizados en los Estados Unidos por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), muestran a las enterotoxinas de *S. aureus* como una de las principales causas de brotes de origen alimentario, encontrándose en el tercer puesto junto a *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (13).

## Capítulo I: Características de *Staphylococcus aureus* y sus principales enterotoxinas.

### 1.1 Características del género *Staphylococcus* y de la especie *Staphylococcus aureus*

#### 1.1.1 Historia

El género *Staphylococcus* contiene cerca de 42 especies. Fue descrito por primera vez en 1880, por Alexander Ogston, un cirujano escocés, quién observó la presencia de *Micrococcus* en el pus de un absceso. Ogston decidió nombrarlo *Staphylococcus*, debido a la semejanza de las agrupaciones de esta bacteria con racimos de uvas (deriva del griego *staphyle*= racimo) (14, 15, 16).

En 1882, el físico alemán Friedrich Julius Rosenbach, logró observar las diferencias en las colonias producidas por *Staphylococcus*, con lo cual identifica que existen 2 tipos diferentes de colonias con respecto a su coloración. Rosenbach, describe colonias amarillas o doradas y nombra a la bacteria que las produce como *Staphylococcus aureus* (del latín *aurum*, que significa oro), y otras colonias blanquecinas por lo que les da el nombre de *Staphylococcus albus* (del latín blanco), que más tarde será nombrado *S. epidermidis*, debido a su relación con las infecciones en piel humana (15, 16).

Durante muchos años se creyó que los *Staphylococcus* pertenecían a la familia *Micrococcaceae*, debido a su semejanza con los *Micrococcus*. Sin embargo, años después, mediante el uso de pruebas bioquímicas, se logró diferenciar a estas dos especies. La prueba consistía en el uso de la gelatina por ambos géneros. Los resultados indicaron que los *Staphylococcus* licúan la gelatina (gelatinasa positivos), mientras que los *Micrococcus* daban resultados variables en cuanto al uso de esta. Otras pruebas realizadas fueron la

capacidad de utilizar el oxígeno y características como la relación parásito- hospedero (17, 18).

Es por estas pruebas, sumadas a los avances en investigación genética y molecular, que en 1950 se separa el género *Staphylococcus* de los *Micrococcus*. Además, los resultados obtenidos a los largo de los años, han logrado evidenciar que los *Staphylococcus* tienen mayor relación filogenética con los bacilos de las familias *Bacillaceae* y *Listeriaceae*, por lo que se decide colocarla en el orden *Bacillales* (Figura 1) (17, 18).

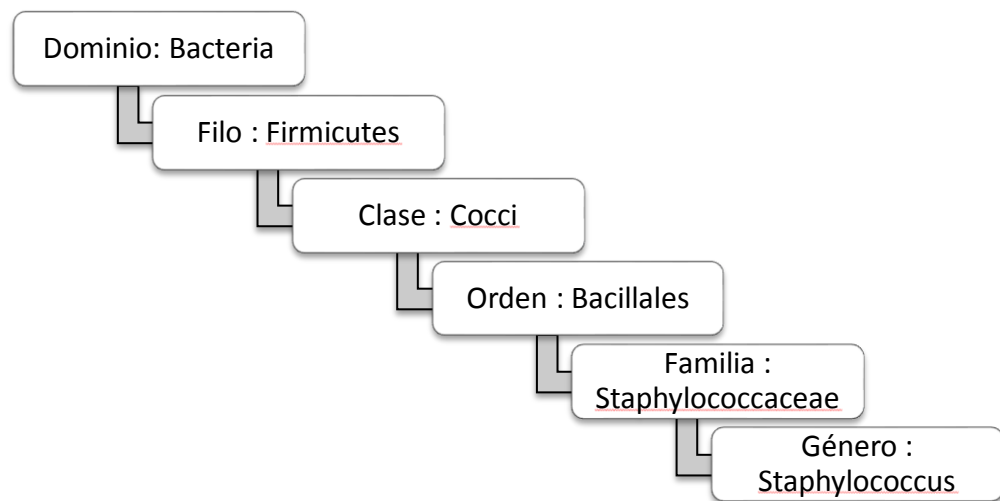


Figura 1. Taxonomía del género *Staphylococcus*

### 1.1.2 Hábitat

Los miembros del género *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*, son considerados flora normal del organismo del ser humano y otros mamíferos. Se puede encontrar como comensal, colonizando la mucosa nasal, la piel y la nasofaringe (5, 19). Sin embargo es capaz de causar enfermedades graves en personas con algún grado de inmunosupresión,

como lo son las infecciones en la piel, abscesos, septicemias, gastroenteritis, endocarditis, síndrome de shock tóxico e intoxicaciones alimentarias (2).

### **1.1.3 Características y condiciones de crecimiento**

Los *Staphylococcus* son cocos gram positivos, con un diámetro que oscila entre los 0.5 y 1.5 µm, no móviles, que no forman esporas y son aerobio facultativo, capaz de fermentar la glucosa en medios donde la concentración de oxígeno es baja (5, 20).

Una característica muy importante es que son bacterias catalasa positivas, lo cual es de utilidad a la hora de hacer la diferenciación con otros géneros de cocos (14). Además, son capaces de crecer en condiciones de altas concentraciones de sal (de hasta 10 %), por lo que los medios como el manitol sal, son de gran utilidad para el aislamiento de esta bacteria (21).

Son bacterias muy resistentes a las condiciones ambientales. Soportan temperaturas que van desde los 7 °C hasta los 48 °C, y un pH de 4 a 10. Sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C a un pH de 6 ó 7 (5, 20). El uso de altas temperaturas es uno de los métodos de control para prevenir el crecimiento de *S. aureus* en los alimentos.

### **1.1.4 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* es el principal representante del género. Gracias a que posee un gran potencial para provocar diversas infecciones, es el más importante a nivel de servicios de salud y de producción de alimentos (20). Debe su exitosa sobrevivencia a que ha logrado adquirir gran número de factores de virulencia y mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Los factores de virulencia de *S. aureus* se dividen en: factores que facilitan la adherencia a la célula hospedera, factores para la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero y los factores involucrados en la invasión de la célula y los tejidos (22). Sin embargo, no todas las cepas de *S. aureus* producen estos factores de virulencia, esto depende de la capacidad de la cepa para compartir o adquirir nuevo material genético. Entre los principales factores se incluyen:

- **Proteínas de membrana:** conocidas como MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). La principal proteína de membrana de *S. aureus* es la Proteína A (SpA), que tiene una potente capacidad para unirse a las inmunoglobulinas en el sentido opuesto al esperado, específicamente a las IgG. Con esto logra disminuir la opsonización y la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares. Otras son las proteína de unión a la fibronectina A y B (FnBPA y FnBPB), proteína de unión al colágeno (Cna) y las proteínas de unión al fibrinógeno ClfA y ClfB (factor aglutinante A y B) o coagulasa ligada (14, 23,24, 25).
- **Enzimas:** *S. aureus* posee una larga lista de enzimas para su invasión al hospedero, principalmente mediante degradación de tejidos. Entre estas enzimas se encuentran la catalasa, coagulasa, estafiloquinasas, hialuronidasa, lipasa, fosfolipasa C y DNAsas (20, 22).

Las más importantes para la identificación presuntiva de *S. aureus* son la catalasa y la coagulasa, ya que una prueba catalasa negativa descarta la posibilidad de que sea un miembro del género *Staphylococcus* y a excepción de unas pocas especies, el

principal productor de coagulasa es el *S. aureus*. Hay dos tipos de coagulasa, la coagulasa libre y el “clumping factor” o coagulasa ligada. Su función es formar una capa de fibrina que protege a la bacteria de la fagocitosis (24, 25).

- **Toxinas:** *S. aureus* es capaz de producir toxinas extracelulares, como lo son las toxinas exfoliativas A y B (ET-A y ET-B), las hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1) y las enterotoxinas (SEs) (22, 26). La TSST-1 y las SEs se conocen como superantígenos (SAg) (27).

**Cuadro 1.** Factores de virulencia de *S. aureus*.

<b>Proteína de membrana</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Toxinas</b>
Proteína A (FnBPA)	Catalasa	Toxinas exfoliativas A y B
Proteína B (FnBPB)	Coagulasa	(ET-A y ET-B)
Proteína Cna	Estafiloquinasas	Hemolisinas $\alpha$ , $\beta$ y $\delta$
Proteínas ClfA y ClfB	Hialuronidasa	Toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1)
	Lipasa	Enterotoxinas (SEs)
	Fosfolipasa C	
	DNAsas	

## 1.2 Enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus*

### 1.2.1 Nomenclatura y clasificación

Las enterotoxinas, son las responsables de las intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus* (SFPs). Son una familia de 23 toxinas, capaces de causar problemas a nivel del tracto gastrointestinal del ser humano. Los alimentos relacionados con las SFPs son principalmente productos de origen cárnico y lácteo, aunque también puede darse por el consumo de frutas y vegetales (19, 21).

La primera enterotoxina descubierta fue la SEA, en 1960 por Casman y Bergdoll. De ahí se han nombrado las demás en orden cronológico según su descubrimiento, desde la SEA hasta la SEV, excluyendo a las SEF que pasó a llamarse TSST (5).

Se han clasificado según su comportamiento en modelos primates como:

- Enterotoxinas, a las cuales se les ha demostrado actividad emética en modelos primates (SEA a SEE, SEG a SEI, SER a SET) (19).
- Proteínas semejantes a enterotoxinas (SEI), a las cuales no se les ha demostrado propiedades eméticas (SE/L y SE/Q) o no han sido probadas (SE/J, SE/K, SE/M a SE/P, SE/U y SE/V) (18).

De estas 23 toxinas producidas por la bacteria, cinco son las más importantes por ser las que se encuentran con más frecuencia en las SFPs. Se trata de la SEA, SEB, SEC, SED y la SEE, responsables de cerca del 95 % de los brotes de intoxicación alimentaria, por lo que se conocen como las enterotoxinas clásicas. El *S. aureus* es capaz de producir más de un tipo de enterotoxina (3).

### **1.2.2 Localización y regulación génica**

Todos los genes encargados de codificar las enterotoxinas de *S. aureus*, se encuentran ubicados en elementos accesorios, como plásmidos, profagos, islas de patogenicidad, cluster de genes y cassette cromosómicos. De ahí que no todas las cepas de *S. aureus* son capaces de producir enterotoxinas. Además, al ser elementos móviles, contribuye con la



evolución de este patógeno (19, 21, 28). Los principales genes y elementos móviles se detallan en el Cuadro 2.

Entre los más importantes, por tratarse de las SEs clásicas, se encuentran: el *sea*, el cual es codificado por una familia de bacteriófagos polimórficos, el bacteriófago se inserta dentro del cromosoma bacteriano y se comporta como parte del genoma; el *seb* está localizado en cromosomas o en plásmidos, dependiendo de las cepa de *S. aureus*; el *sec* es codificado en un gen localizado en una isla de patogenicidad; y *see* es acarreado por un fago defectuoso (19, 21, 28, 30).

El principal sistema regulador, encargado de controlar la expresión de los factores de virulencia en *S. aureus*, es el *agr* (gen regulador accesorio), que actúa en combinación con el *sarA* (regulador accesorio estafilocócico). No todos los genes que codifican para las SEs son controlados por el sistema *agr*. El *seb*, *sec* y *sed* se ha demostrado que son genes dependientes del sistema *agr*, mientras *sea* y *see* son *agr*-independientes (21, 30).

Un aspecto importante en la regulación de la expresión del sistema *agr*, es que este se encuentra relacionado al *Quórum Sensing* por parte de la bacteria, por lo tanto la producción de SEs *agr*-dependientes en alimentos esta ligado a la capacidad que tenga la cepa de *S. aureus* para alcanzar un gran número de densidad celular en el alimento (aproximadamente  $10^6$  UFC/g) (21).

**Cuadro 2.** Ubicación de los genes que codifican las SEs de *S. aureus*.

Enterotoxina	Gen	Elemento en el cual se ubica	Regulación
SEA	<i>sea</i>	Profago	<i>agr</i> independiente
SEB	<i>seb</i>	Cromosomas, plásmidos, islas de patogenicidad	<i>agr</i> y <i>sar</i> dependiente
SEC <sup>(1, 2, 3)</sup>	<i>sec</i>	Plásmidos	<i>agr</i> y <i>sar</i> dependiente
SED	<i>sed</i>	Plásmidos	<i>agr</i> dependiente
SEE	<i>see</i>	Profagos	<i>agr</i> independiente
SEG	<i>seg</i>	<i>egc</i> ( <i>enterotoxin gene cluster</i> ), cromosomas	-
SEH	<i>seh</i>	Transposon	-
SEI	<i>sei</i>	<i>egc</i> , cromosomas	-
SER	<i>ser</i>	Plásmidos	-
SES	<i>ses</i>	Plásmidos	-
SET	<i>set</i>	Plásmidos	-
SEI (J, K, L, M, N, O, P, Q, U y V)	<i>sel</i> ( <i>j, k, l, m, n, o, p, q, u y v</i> )	Islas de patogenicidad, plásmidos, cromosomas, profagos o <i>egc</i>	-

### 1.2.3 Condiciones para la producción de SEs

Las SEs son proteínas de bajo peso molecular, sintetizadas por *S. aureus* a lo largo de la fase logarítmica de la curva de crecimiento bacteriano o en la transición a la fase estacionaria (19).

Son solubles en agua o solución salina, ricas en lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y residuos de tirosina (21, 28). Muchas poseen bucles de cisteína requeridos para su conformación la cual probablemente esté relacionada con su capacidad emética (21).

Son toxinas muy resistentes a las condiciones adversas del ambiente, como lo son la congelación, la desecación, las altas temperaturas y el pH bajo (5, 19, 21, 28). También

resisten la acción proteolítica de las enzimas digestivas, aunque esto depende de otros factores como el pH. Por ejemplo la SEB, puede ser destruida por la pepsina a pH 2, pero es resistente a pH más alto, lo cual es la condición normal del estómago después de que la persona ha ingerido alimentos (21). También, cabe señalar que el tratamiento térmico puede eliminar la bacteria pero no siempre las enterotoxinas, las cuales pueden quedar inactivadas, sin embargo se puede dar reactivación por condiciones inadecuadas de cocción o de almacenamiento (5).

En cuanto al requerimiento nutricional de *S. aureus*, aminoácidos como la valina son necesarios para el crecimiento de *S. aureus*, y la arginina y cisteína son necesarias tanto para el crecimiento como para la producción de las enterotoxinas como la SEA, SEB y SEC. Las necesidades de otros aminoácidos varían con las cepas (21).

La glucosa se ha demostrado que inhibe la producción de SEs, especialmente SEB y SEC. Este efecto inhibitorio se debe a la baja en el pH como consecuencia del metabolismo de la glucosa del medio. La producción de SEs es óptima a pH neutro y disminuye a pH ácido. Usualmente la producción de SE es inhibida a pH por debajo de 5 (21, 29, 30).

*S. aureus* es especialmente sensible a la competencia con otras bacterias, esto es más evidente en productos fermentados, debido a la producción de ácido láctico, peróxido, competencia por nutrientes y la síntesis de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas (21).

**Cuadro 3.** Factores importantes para la producción de SEs.

<b>Factor</b>	<b>Condición optima</b>	<b>Ámbito de producción</b>
<b>Temperatura</b>	34-40 °C	10-45 °C
<b>pH</b>	7-8	5-9.6
<b>Atmósfera</b>	Aerobia	Aerobia - Anaerobia
<b>Concentración de sal</b>	0 %	0-10 %
<b>A<sub>w</sub></b>	0.99	Mayor a 0.86

#### **1.2.4 Superantígenos**

Las SEs, junto a la TSST-1 y algunas toxinas producidas por *Streptococcus* del grupo A, pertenecen a una familia de toxinas conocidas como pirógenos. Las toxinas pirógenas poseen la capacidad de estimular el sistema inmune del ser humano de una manera distinta a la clásica y de provocar reacciones severas, por esto se clasifican como superantígenos (SAg). Estos SAg, lo que hacen es estimular la proliferación de células T de manera no específica, mediante el enlace de la región V $\beta$  de los receptores de células T (TCR) con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) de las células presentadoras de antígeno. Además, provoca la liberación masiva de citoquinas proinflamatorias, que puede llegar a causar un síndrome de shock tóxico potencialmente letal (5, 21, 27).

## Capítulo II: Importancia clínica y epidemiológica de las enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus*

### 2.1 Intoxicación alimentaria estafilocócica

#### 2.1.1 Alimentos asociados y fuentes de contaminación

Según el CDC, una intoxicación alimentaria estafilocócica es una enfermedad gastrointestinal, causada por el consumo de alimentos contaminados con enterotoxinas producidas por *S. aureus* (31). Estas enterotoxinas se forman en el alimento antes de ser ingerido (preformadas) y puede deberse al consumo de una o más de ellas (19).

En los casos de SFP, el alimento o uno de sus ingredientes se encuentran contaminados con una cepa de *S. aureus* productor de SEs y ha sido expuesto a temperaturas que permitan el crecimiento de la bacteria (13, 21). La mayoría de las veces los alimentos alcanzan estas temperaturas por un fallo en el proceso de refrigeración, o por el uso de temperaturas permisivas durante el proceso de producción (13, 21).

Muchos alimentos pueden ser considerados buenos medios para el crecimiento de *S. aureus*, por lo que pueden estar implicados en las SFP, incluyendo la leche, las cremas de relleno de pasteles, mantequilla, queso, salchichas, enlatados, carnes y ensaladas (19, 21). Los alimentos salados, como el jamón, están altamente relacionados con las SFP por la capacidad de *S. aureus* de crecer en condiciones de baja actividad de agua,  $a_w$  (19).

En algunos casos, la mayor fuente de contaminación de los alimentos son los humanos (los manipuladores contaminan los alimentos vía contacto manual o por vía respiratoria al toser

o estornudar), y la contaminación suele ocurrir después del tratamiento térmico (19, 21). Sin embargo, en alimentos como la carne cruda, leche, salchichas o quesos, podría darse la contaminación de origen animal, debido a que el animal suele acarrear infecciones (ejemplo mastitis) (19, 21). El aire, polvo y el contacto con las superficies también sirven como vehículo en la transferencia de *S. aureus* a los alimentos (19).

### **2.1.2 Cuadro clínico y dosis requerida**

El período de incubación de la enfermedad tiene un rango de 30 minutos a 8 horas, con un promedio entre 2 y 4 horas (5, 13, 19, 21). La presencia de los síntomas depende de la susceptibilidad a las SEs, la cantidad de alimento ingerido, la cantidad de toxina en el alimento y la salud en general del paciente (13).

Los síntomas incluyen náuseas, vómito, dolor abdominal acompañado de diarrea y algunas veces fiebre. En casos severos, el paciente puede presentar dolor de cabeza, dolor muscular, pérdida severa de líquidos y electrolitos, mareos, escalofríos, debilidad, presión baja o shock (5, 13, 19, 21).

Con respecto a las dosis requerida, muchos estudios se refieren a la SEA. Estos han demostrado que dosis alrededor de 0.5 µg de SEA son suficientes para causar los síntomas como el vómito (32). Otros estudios citan que la dosis emética es alrededor de 0.2 µg por kg de peso, lo que indica que un adulto podría necesitar ingerir de 10-20 µg de SE para sufrir los síntomas (33).

Este cuadro se presenta como una enfermedad autolimitada y usualmente resuelve en 24-48 horas después del comienzo de los síntomas, sin requerir un tratamiento específico, pero hay casos en los que se requiere hospitalización (5, 13, 19, 21). La mortalidad es rara, pero pueden ocurrir en personas susceptibles a la deshidratación como ancianos, niños y personas con el sistema inmune debilitado (5, 14).

El período corto de incubación, la brevedad de la enfermedad y la usual falta de fiebre ayudan a distinguir las SFP de otros tipos de intoxicación alimentaria, como las producidas por las toxinas de *Vibrio parahaemolyticus* o las infecciones por *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, donde la presencia y multiplicación de la bacteria es requerida para que se dé la enfermedad (13).

### **2.1.3 Mecanismo de acción de las SEs**

La intoxicación alimentaria inducida por SEs se cree, que inicialmente, es causada por la interacción local de la toxina con las células intestinales, ya que la toxina estimula centros nerviosos en el intestino a través de la liberación de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5HT) (34). La serotonina se une a los receptores 5-HT<sub>3</sub>, los cuales abren los canales iónicos ubicados en las terminales aferentes del nervio vago (19). Esta unión de la serotonina al receptor, al abrir los canales, envía una señal al centro del reflejo emético en el cerebro generando náuseas y vómito (21, 34).

El reflejo emético es básicamente un mecanismo de defensa contra la absorción de sustancias tóxicas ingeridas y dan lugar a la rápida expulsión del contenido gástrico (35).

En los casos severos, los pacientes con intoxicación por SEs, están expuestos a daño gastrointestinal como hiperemia de la mucosa, edema, petequias y exudados purulentos (36). Las SEs cruzan las barreras del epitelio intestinal con lo que tienen acceso a tejido linfoide local y sistémico, se sugiere que la activación del tejido inmune linfoide local (placas de Peyer) puede ser el responsable del daño gastrointestinal (19, 37). La lesión más severa aparece en el estómago y en la parte inicial del intestino. La diarrea asociada a las SEs puede ser debido a la inhibición de la reabsorción de agua y electrolitos en el intestino delgado (19).

En un intento por ligar las dos actividades de las SEs, las enterotóxica y la superantigénica, se ha postulado que la actividad enterotóxica facilita la transcitosis permitiendo a la toxina entrar al sistema sanguíneo y circular a través del cuerpo, y así permitir la interacción con el MHC II de las células presentadoras de antígenos y células T que median la actividad superantigénica (19, 21, 37). Por este motivo, la circulación de SEs podría tener efectos más profundos en el paciente, que si la toxina permaneciera en un sitio localizado.

El síntoma característico de la SFP es la emesis. Las SEs poseen bucles de cisteína y un enlace disulfuro que son probablemente los responsables de estabilizar la molécula en la conformación necesaria para inducir la actividad emética (21, 36, 38, 39). Se sabe que la actividad superantigénica y la actividad emética de las SE se encuentran en 2 dominios separados de la molécula. Un ejemplo de esto es la TSST-1, la cual posee una gran capacidad para estimular la proliferación de células T y fue inicialmente clasificada como una SE, la SEF, ya que se creyó que poseía actividad emética (38). Sin embargo, después se propuso que esta actividad podría ser el resultado de la contaminación con otras SE (38). La



TSST-1 es más susceptible a las enzimas en el tracto digestivo, como la pepsina, y carece de los residuos de cisteína y de los enlaces disulfuro, esta podría ser la razón de la falta de actividad emética, por lo que fue reclasificada y generalmente no se acepta como una verdadera SE (36, 38, 39).

La patología del síndrome de shock tóxico generado por la actividad superantigénica, involucra muchas vías de señalización extra e intracelulares, y en algunos casos dichas vías son desconocidas. Estudios realizados en los 90's muestran que la toxicidad de la SEB es debido a la masiva proliferación de células T y la producción de citoquinas proinflamatorias (36, 40). Investigaciones que utilizaron la reconstitución de células T en ratones SCID inmunodeficientes confirmaron el papel de la activación de las células T en la letalidad inducida por SEs (41). Además, estos estudios indican que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) juega un papel crucial en la letalidad, ya que una inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha/\beta$  protege al animal contra los cambios inducidos por las SEs (41).

Aunque el mecanismo preciso por el cual las citoquinas proinflamatorias inducen el síndrome de shock tóxico (TSS) es desconocido, estos estudios e investigaciones adicionales proveen evidencia abrumadora que el daño al tejido, shock y fallo de múltiples órganos es causado por la producción de concentraciones patológicas de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , interleuquina 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleuquina 6 (IL-6) y la proteína 1 quimioatrayente de macrófagos (MCP-1) (21, 36, 39).

## 2.2 Epidemiología

Según datos de la OMS, se estima que en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1 500 millones de casos y 3 millones de niños menores de 5 mueren anualmente (7).

Un brote por intoxicación alimentaria es definido como un incidente en el cual 2 o más personas experimentan síntomas similares después de haber ingerido un alimento en común (13). En la mayoría de los casos, la pobre higiene de los manipuladores de alimentos es el factor que causa estos brotes (13).

### 2.2.1 Situación en el mundo

Históricamente, el primer dato que se tiene sobre un brote de intoxicación estafilocócica fue descrito por Vaughan y Sternberg, en Michigan en el año 1884, y se relacionó al consumo de queso cheddar contaminado con *Staphylococcus*. En ese entonces los autores describieron al agente causante como un *Micrococcus* (5, 30).

Las SFPs se encuentran mundialmente distribuidas. Estudios realizados en los Estados Unidos por el CDC, muestran a las enterotoxinas de *S. aureus* como una de las principales causas de brotes de origen alimentario, encontrándose en el tercer puesto junto a *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (13).

La SEA, sola o junto con otras SEs, es la enterotoxina más reportada en alimentos, y es también considerada la que causa mayor número casos de SFP (19). Un estudio realizado sobre 359 brotes ocurridos en el Reino Unido durante los años de 1969 y 1990, reveló que

el 79 % de las cepas *S. aureus* involucradas eran productoras de SEA (19, 21). SEA también fue la enterotoxina más frecuentemente encontrada en brotes de SFP ocurridos en Francia entre 1981 y 2002 (19, 21). En Australia, un brote de SFP que afectó a 40 niños en el 2007 fue atribuido a *S. aureus* productor de SEA y SED (19). También hay estudios de brotes en países asiáticos como Japón, Corea y Taiwán, donde la mayoría de cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes contenían el gen *sea* (13, 19).

SEB, SEC o SED también se han encontrado implicadas en brotes de SFP alrededor del mundo. En cuanto a la SEE, es la que se encuentra con menor frecuencia en los brotes (19). Sin embargo, 6 casos ocurridos en Francia a finales del 2009, fueron causados por SEE presente en queso fabricado con leche sin pasteurizar (19).

En 1985, en los Estados Unidos, el consumo de leche con chocolate originó un brote de SFP, el cual afectó a 850 estudiantes en una escuela (13, 21). Este chocolate fue contaminado y almacenado durante 5 horas antes de su pasteurización (13, 21). La pasteurización mató al *S. aureus*, pero no tuvo efecto sobre las SEs (21).

En Inglaterra, el 1.5 % de los brotes de ETAs entre los años 1992 y 2009 se relacionaron a *S. aureus*; esto corresponde a un total de 2 530 casos reportados (13). En Brasil, en el año 2004 se presentó un brote masivo que afectó a más de 4000 personas (13).

En Japón, en el año 2000, se reportó un importante brote de SFP, este se dio en el distrito de Kansai y afectó cerca de 13 400 personas, estudios posteriores indicaron que la fuente de la intoxicación fueron productos derivados de la leche (13, 30). Posteriormente, en el

2009, se reportaron 536 brotes de intoxicación alimentaria causados por bacterias, de ellos un 7.6 % fueron causados por *S. aureus* (13).

En Hong Kong, dos brotes importantes fueron reportados en los años 2004 y 2006. El primer brote afectó a 101 estudiantes en una escuela primaria. En este caso el alimento implicado fue el sushi, y el *S. aureus* fue aislado en el alimento y en los manipuladores. En el segundo brote, se vieron implicadas cerca de 65 personas y fue asociado al consumo de lo-mei y sui-mei (13).

En Latinoamérica también se han dado gran número de casos asociados a *S. aureus* y sus enterotoxinas. En el 2007, se reportó un brote en Paraguay, que fue asociado al consumo de leche, en el cual se logró aislar una cepa de *S. aureus* productora de enterotoxinas de los pacientes afectados y de 3 muestras de leche (42). En Nicaragua, en el año 2001, el Ministerio de Salud reportó un brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de agua no potable, el cual afectó a 182 personas y del que se aisló como agente causal a *S. aureus* (43).

Los alimentos comúnmente involucrados en SFP difieren de un país a otro. De los casos mencionados anteriormente los que ocurrieron en el Reino Unido estuvieron principalmente relacionados al consumo de productos cárnicos; en Francia la mayoría se relacionó a la leche y sus derivados, especialmente quesos; y los casos reportados en Estados Unidos se asocian al consumo de carne roja (21). Estas diferencias se deben a los hábitos de consumo de los diferentes países (13, 36).

### 2.2.2 Situación en Costa Rica

En nuestro país desde el año 2003 se estableció, por decreto ejecutivo, la notificación obligatoria de los casos de diarreas e intoxicaciones alimentarias (Decreto No. 30945-S, La Gaceta No. 18, lunes 27 de enero del 2003) (44).

En el Duodécimo Informe del Estado de la Nación en el que se incluían datos de los años 2000 al 2005, se menciona que hubo cerca de 445 casos de intoxicación alimentaria, sin embargo, no se incluye cuál fue el tipo de intoxicación. Las intoxicaciones producidas por el consumo de alimentos son la ETA de mayor incidencia en Costa Rica, sin embargo los registros no ofrecen los datos sobre los agentes implicados (45).

En cuanto a *S. aureus*, los alimentos de los cuales se ha aislado con mayor frecuencia son leche, pollo y pescado (45). En una revisión de casos realizada por Arias y Antillón en el año 2000, se encontró *S. aureus* presente en un 94 % de las ensaladas muestreadas en servicios de comida tipo buffet (46).

En el año 2005, un estudio sobre 3 brotes de SFP realizado por el Ministerio de Salud, con la colaboración del INCIENSA y el INISA, se determinó que el principal alimento del que se aísla *S. aureus* en nuestro país, son los quesos de fabricación artesanal. En estos brotes se logró determinar la toxina implicada, tratándose de SEA (47, 48).

En el año 2012, durante las festejos populares de Zapote, el Ministerio de Salud recolectó 365 muestras de los puestos de ventas de comidas, en el 21 % de las muestras se logró aislar *S. aureus*. Este año fue el primero en el cual se recolectaron muestras para el

aislamiento de la bacteria (49). En los mismos festejos, pero en el año 2013 se encontró *S. aureus* en las muestras tomadas de un puesto de ventas de mango (50).

Aunque se han reportado casos de intoxicación alimentaria causados por *S. aureus*, estos son muy pocos debido al subregistro. Este subregistro se debe a que en la gran mayoría de los casos, no se hace consulta médica o no se le solicita una muestra al paciente para que el laboratorio identifique al agente etiológico, y cuando se logran realizar los análisis correspondientes, no siempre se reportan al centro de vigilancia (45).

En Costa Rica, las boletas epidemiológicas para registrar los brotes, son completas en cuanto a los datos personales del paciente, pero deben ser complementadas con los resultados de los laboratorios de alimentos y aguas, y en este paso es que se pierde la información, porque no siempre se realizan los análisis correspondientes (45).

Estos aspectos, son una gran limitación para obtener información actualizada sobre la situación de las ETAs en Costa Rica y otros países. Son puntos importantes que deben ser tomados en cuenta para un mejor manejo de las enfermedades en las comunidades y el país en general.

### **Capítulo III: Métodos de detección e identificación de *Staphylococcus aureus* y sus enterotoxinas.**

Con el paso de los años, se ha hecho de suma importancia el diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades, tal es el caso de las ETAs, entre las que se incluye la SFP.

Antes de que aparecieran las técnicas modernas, el procedimiento de rutina para el diagnóstico de las SFP incluía la identificación de *Staphylococcus* mediante el aislamiento en agar manitol sal y agar Baird-Parker (24-48 horas a 37 °C) (51). Luego a las colonias sospechosas se les realizaban pruebas como la coagulasa y confirmación mediante métodos bioquímicos (51). Los *Staphylococcus* coagulasa positivos usualmente requieren de pruebas adicionales para diferenciar los *S. aureus* de otras especies coagulasa positivos. Ejemplo de esto es la prueba de Voges-Proskauer la cual es usada para diferenciar los *S. aureus* de especies como *S. hyicus* y *S. intermedius* (51).

En estos casos el diagnóstico era poco específico, ya que el método detecta al *S. aureus* presente en el alimento, pero no indica si hay SE o si la cepa aislada es productora de SEs.

Los métodos desarrollados actualmente responden a la necesidad de análisis con mayor especificidad y sensibilidad (30). Entre ellos se encuentran:

- Bioensayos
- Inmunoensayos
- Técnicas moleculares
- Métodos basados en espectrometría de masas

A pesar de sus ventajas, la mayoría de los ensayos mencionados podrían dar resultados falsos positivos o diagnósticos incompletos cuando se utilizan para la detección de toxinas en alimentos (30). En algunos casos, el diagnóstico de SFP es difícil, ya que la bacteria es sensible al tratamiento térmico mientras que las SEs no lo son (5, 30, 52). Esto representa un problema para caracterizar, en un brote de intoxicación alimentaria, el número de *S. aureus* coagulasa positivos o la detección de los genes *se* en las cepas aisladas (5). Por este motivo, el diagnóstico concluyente para las SFPs está basado principalmente en demostrar la presencia de las SEs en el alimento usando inmunoensayos enzimáticos (5).

Sin embargo, los métodos para la detección de SE también tienen sus limitaciones. Las matrices alimentarias poseen gran cantidad de componentes proteicos que pueden interferir con la detección de las SE (30). Además, la baja concentración de SEs en el alimento disminuye la probabilidad de un diagnóstico certero, debido a que no alcanzan el umbral de detección de algunas técnicas.

Por esto, se ha hecho uso de metodologías adicionales para concentrar las SEs, tal es el caso de la separación y concentración por diálisis, la cual fue aprobada por la Unión Europea, para la extracción de SEs en los alimentos; y los métodos cromatográficos recomendados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) (5, 52).

### **3.1 Bioensayos**

Los bioensayos se basan en la capacidad de un extracto del alimento o de cierta cantidad de toxina, para generar los síntomas característicos de la intoxicación (5). En cuanto a las SE, este síntoma es la emesis o la actividad superantigénica (5, 53). El efecto emético es



principalmente estudiado con el uso de bioensayos en monos y gatos, a los cuales se les administra, por vía intravenosa, cierta concentración de la toxina (5, 53, 54). Según investigaciones llevadas a cabo con la SEA (la más frecuente en los brotes de SFP), los síntomas aparecen al administrar 2.3 µg, la cual es una dosis mucho mayor que la requerida en humanos (5).

Estos procedimientos tienen una baja sensibilidad y poca reproducibilidad, además del uso de animales lo que involucra cuestiones éticas (53).

La actividad superantigénica es probada mediante la utilización de técnicas de cultivo celular, donde se mide la capacidad de la SE para activar la proliferación de las células T (5, 53). Este método ha demostrado ser más sensibles que los bioensayos en animales y no requiere el uso de gran número de estos (53).

Sin embargo, el uso de estas dos modalidades de bioensayo, es principalmente orientado al área de la investigación más que a la de diagnóstico.

### **3.2 Inmunoanálisis**

Existen kits comerciales para detectar la presencia de las SEs más comunes (SEA-SEE) en análisis de rutina (5, 30, 39, 52). Están basados principalmente en el reconocimiento inmunológico de las SEs por anticuerpos específicos (anti-enterotoxinas). Los kits comerciales pueden ser desarrollados de acuerdo a 2 diferentes principios:

1. Un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) o un ensayo fluorescente ligado a enzima (ELFA) (5, 30).

2. Una aglutinación pasiva de látex en fase reversa usando microesferas de látex recubierta (RPLA) (5, 30).

El ELISA ha sido el método de preferencia debido a su bajo costo y alto rendimiento para la detección y cuantificación de componentes proteicos cuando el número de muestras es elevado (5). Sin embargo presenta ciertas limitaciones como la dificultad en la obtención de anticuerpos específicos para cada tipo de SEs, ya que las toxinas purificadas son costosas y difíciles de obtener (5, 30).

Por otra parte, sólo los anticuerpos contra SEA al SEE, SEG, SEH y SEIQ están disponibles (5, 30, 39). El test de ELISA no detecta las otras SEs, lo cual podría explicar porque algunos brotes permanecen sin conocer el agente etiológico (5).

**Cuadro 4.** Inmunoensayos disponibles para la detección de SEs.

<b>Nombre</b>	<b>SE detectada</b>	<b>Casa comercial</b>
VIDAS <sup>®</sup> Staph enterotoxin	A-E	BioMérieux
TECRA Staphylococcal enterotoxin VIA	A-E	3M Microbiology
RIDASCREEN	A-E	r-Biopharm
Transiatube y TransiaPlate	A-E	Diffchamb
SET RPLA	A-D	Oxoid

Otro inconveniente es la baja especificidad de algunos kits comerciales, por lo que pueden dar resultados falsos positivos dependiendo del componente del alimento, ya que es conocido que algunas proteínas, tales como la proteína A, pueden interferir con la unión a

la porción Fc (y, en menor medida, a la porción Fab) en IgG de varias especies de animales, tales como ratones y conejos (5).

Se está experimentando con el desarrollo de pruebas para algunas SEs nuevas (SEG, SEH y SEI), pero no han sido comercializados debido a las dificultades para purificar y preparar los anticuerpos específicos (39).

### **3.3 Métodos moleculares**

Los métodos de biología molecular a menudo involucran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos usualmente detectan genes que codifican por SEs en cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos contaminados (5, 39). El PCR es un método específico, altamente sensible y rápido para caracterizar las cepas de *S. aureus* involucradas en un brote de SFP (5).

Sin embargo, estos métodos tienen 2 grandes limitaciones: primero, es necesario aislar las cepas de *Staphylococcus* del alimento, y segundo, el resultado informa sobre la presencia o ausencia de genes que codifican por SEs, pero no provee ninguna información de la expresión de estos genes en el alimento (5, 55). Por lo tanto, estos métodos no pueden utilizarse para la confirmación de *S. aureus* como agente causal de un brote.

Más recientemente, el PCR múltiple (Multiplex PCR) se ha utilizado para la tipificación de toxinas de *S. aureus* (39, 51). Este método se basa en la combinación de un *primer* de inicio universal y con un *primer* reverso específico, lo cual ayuda a la detección de varias SEs con un solo procedimiento (39, 55).

Otro problema importante que presentan los métodos de PCR, es que los nuevos genes de SEs pueden llevar a resultados falsos positivos o falsos negativos. Por ejemplo, el primer descrito en la literatura para el gen sea, también puede ampliar el gen sep (39). Esto podría llevar a conclusiones erróneas sobre los genes presentes en las muestras.

### **3.4 Métodos basados en espectrometría de masas**

Debido a la frecuencia de los inconvenientes con los métodos de detección disponibles y a la falta de anticuerpos contra las nuevas SEs descritas, otras estrategias basadas en técnicas fisicoquímicas están siendo utilizadas recientemente (5). Entre ellas, la espectrometría de masas (MS) ha emergido como una técnica prometedora para el análisis de mezclas de péptidos y proteínas (5, 56, 57).

Esta técnica se encuentra entre las más sensitivas disponibles actualmente, ya que provee especificidad, rapidez y un análisis cuantitativo exacto de la cantidad de SEs (5).

Entre los principales métodos se pueden mencionar:

- La Ionización en Electrospray (ESI=Electrospray ionization) (5, 56, 57).
- *La* desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI=Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) (5, 56, 57).

El MALDI puede ser utilizado junto a análisis de masas como el Tiempo de Vuelo (TOF=Time of Flight) (56).

Un método llamado cuantificación absoluta estándar de proteína (PSAQ), usa enterotoxinas marcadas con isótopos como estándar interno para el análisis de espectrometría de masas (30, 56).

En el caso de los análisis de alimentos, la situación es compleja ya que a la matriz puede contener muchas proteínas, lípidos y muchas otras moléculas que interfieren con la detección de la toxina blanco y puede afectar la cuantificación (5).

En el caso de las SEs, algunos autores han desarrollado herramientas de MS para la detección de la toxina en el sobrenadante del cultivo (como en agua o jugos de frutas). Se ha utilizado la cromatografía líquida (HPLC) acoplada a ESI/MS para la detección y cuantificación de SEB en jugos de manzana (5, 57).

Estas técnicas basadas en MS superan las limitaciones que existen en la caracterización de SEs por ELISA, sin embargo su costo es muy elevado comparado con este último, por lo cual no puede ser usado como método de rutina (5).

## Conclusiones

- *Staphylococcus aureus* es una bacteria considerada como flora normal del ser humano. A pesar de esto, es capaz de producir gran número de enfermedades graves en personas con algún grado de inmunosupresión, debido a la evolución de su patogenicidad por la acumulación de elementos móviles.
- Uno de los cuadros más importantes causados por *S. aureus*, es la intoxicación alimentaria, la cual se debe al consumo de sus enterotoxinas y causa síntomas gastrointestinales dejando pérdidas millonarias por incapacidades, estadías hospitalarias, ausentismo escolar, además de causar desprestigio en la compañía alimentaria involucrada en el brote, sea esta una industria, restaurante o comedores escolares.
- Las SEs clásicas, especialmente la SEA, son las que se encuentran relacionadas a la mayoría de los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica. Además, *S. aureus* es capaz de producir más de un tipo de enterotoxina, lo cual dificulta su identificación.
- Los alimentos relacionados con las SFPs son principalmente productos de origen cárnico y lácteo, aunque también puede darse por el consumo de frutas y vegetales. La mayor fuente de contaminación de los alimentos son los humanos, por la falta de buenas prácticas de manipulación de los alimentos.
- Las SEs pueden generar 2 patologías diferentes. La actividad enterotóxica, relacionada con el reflejo de la emesis, y la actividad superantigénica, ligada al síndrome de shock tóxico.

- Es importante tener un mejor registro de las enfermedades por intoxicación alimentaria, no solo las causadas por *S. aureus*, sino en general, ya que como bien se sabe existe un gran subregistro en lo que a estas se refiere, tanto en nuestro país como a nivel mundial.
- Aún falta un método rápido y específico que pueda, simultáneamente, detectar e identificar enterotoxinas, tanto para el diagnóstico como para propósitos epidemiológicos. Muchas veces los métodos son sensibles y específicos pero costosos, tal es el caso de la MS. En los métodos inmunoenzimáticos, su sensibilidad es baja pero su costo es menor y son usados cuando se trabaja con gran número de muestra. El PCR apunta a ser una opción muy favorable, sin embargo, faltan perfeccionar el método para darle mayor especificidad a la técnica y así reducir los procesos y materiales requeridos para poder identificar cual es la SE presente en el alimento.

## Referencias bibliográficas

1. **González T, Rojas R.** 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: Prevención y diagnóstico. *Salud Pública Mex.* **47**:388-390.
2. **Kateete D, Kimani C, Katabazi F, Okeng A, Okee M, Nanteza A, Joloba M, Najjuka F.** 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **9**:23-29.
3. **Rahimi E, Alian F.** 2013. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow , camel , sheep, goat , and buffalo bulk tank milk. *Veterinarski Arhiv.* **83**:23-30.
4. **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS).** 2009. Higiene de los alimentos. Textos Básicos. 4 ed. Roma. pp 141
5. **Hennekinne J, De Buyser M, Dragacci S.** 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* **36**:815-836.
6. **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO); Organización Mundial de la Salud (OMS).** Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos. 2003.
7. **Olea A, Díaz J, Fuentes R, Vaquero A, García M.** 2012. Foodborne disease outbreaks surveillance in Chile. *Rev Chil infectología.* **29**:504-510.
8. **Muñoz A.** 2014. Generalidades de las intoxicaciones, infecciones y toxiinfecciones producidas por alimentos en Costa Rica. *Revista Científica Médica OMNIA.*
9. **Reynolds E, Schuler G, Hurst W, Tybor P.** 2003. Preventing Food Poisoning And Food Infection. *Univ Georg Coll Agric Environ Sci.* **1**:1-11.
10. **Sanabria S, Lara P.** 2009. Síndrome Urémico Hemolítico. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica.* **588**:213-217.
11. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** 1999. Clostridium botulinum. International Programme on Chemical Safety.
12. **Sandoval A, Natividad D, Quiñonez E.** 2005. Bacillus cereus : peligro bajo el tenedor. *Rev Digit Univ la UNAM.*
13. **Center for Health Protection (CHP).** 2011. Review of Staphylococcal Food Poisoning in Hong Kong.



14. **Cervantes E, García R, Salazar P.** 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol. **61**:28-40.
15. **Orenstein A.** 1998. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*. Infect Dis Antimicrob agents. pp 1880-1881.
16. **Gilden, D.** 2013. Neuroinfections (What Do I Do Now?). Emerg Infect Dis, CDC. **19**:1553.
17. **Tille P.** 2012. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12 ed. Elsevier. Pag 230.
18. **Gotz F, Bannerman T, Schleifer K.** 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Prokaryotes. **4**:5-75
19. **Argudín M, Mendoza M, Rodicio M.** 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins. **2**: 1751-1773
20. **Costa A, Batista D, Ribas R, Sousa A, Pereira O, Botelho C.** 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. Formatex. pp 702-710.
21. **Le Loir Y, Baron F, Gautier M.** 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. **2**:63-76.
22. **Velázquez M.** 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. Salud Pública Mex. **47**:381-387.
23. **Gómez M, O'Seaghdha M, Magargee M, Foster T, Prince A.** 2006. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. J Biol Chem. **281**:20190-20196.
24. **Castañón C.** 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Evid Med Invest Salud. **5**:79-84.
25. **Betancourt H, Cuesta U, Méndez R, Galdós C.** 2005. *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios microbiológicos. Arch Médico Camagüey. **9**.
26. **Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M.** 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno. Rev Biomed. **17**:287-305.
27. **Spaulding A, Salgado-Pabón W, Kohler P, Horswill A, Leung D, Schlievert P.** 2013. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin Microbiol Rev. **26**:422-447.
28. **Schelin J, Wallin N, Thorup M, Lindqvist R, Barker C.** 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence. **2**:580-592.
29. **Bécquer A, Mota de la Garza L, Lara C.** 1996. Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. Rev Cubana Aliment Nutr. **10**: 1-6

30. **Cretenet M, Even S, Loir Y.** 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. Dairy Sci Technol. **91**:127-150.
31. **Centro de Control y Prevención de Enfermedades(CDC).** 2006. Staphylococcal Food Poisoning. Visto en [http://www.cdc.gov/NCIDOD/dbmd/diseaseinfo/staphylococcus\\_food\\_g.htm](http://www.cdc.gov/NCIDOD/dbmd/diseaseinfo/staphylococcus_food_g.htm)
32. **Bergdoll M.** 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (Ed). Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp 463-523
33. **Mossel D, Corry J, Struijk C, Baird R.** 1995. Essentials of the microbiology of foods. A Textbook for Advanced Studies. pp. 146–150.
34. **Hu D, Zhu G, Mori F, Omoe M, Wakabayashi K, Kaneko S, Shinagawa K, Nakane A.** 2007. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. Cell Microbiol. **9**: 2267-2277.
35. **Mulén B, Torres P, Ropero R.** 2002. Bases fisiológicas y tratamiento de la emesis inducida por radiaciones. Rev Cubana Med. **41**:289-296
36. **Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A.** 2010. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. Toxins. **2**:2117-2131
37. **Shupp J, Jett M, Pontzer C.** 2002. Identification of a Transcytosis Epitope on Staphylococcal Enterotoxins. Infect Immun. **70**:2178-2186
38. **Schlievert P, Jablonski L, Roggiani M, Sadler I, Callantine S, Mitchell D, Ohlendorf D, Bohach G.** 2000. Pyrogenic Toxin Superantigen Site Specificity in Toxic Shock Syndrome and Food Poisoning in Animals. Infect Immun. **68**:3630-3634.
39. **Vasconcelos N, Lourdes M, Souza R.** 2010. Staphylococcal enterotoxins : Molecular aspects and detection methods. J Public Heal Epidemiol. **2**:29-42.
40. **Marrack P, Blackman M, Kushnir E, Kappler J.** 1990. The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. The Journal of Experimental Medicine. **171**:455-464.
41. **Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H.** 1992. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. J Exp Med. **175**:91-98.
42. **Weiler N, Leotta G, Zarate M, Manfredi E, Alvarez M, Rivas M.** 2011. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. Rev Argent Microbiol. **43**:33-36.

43. **Gutiérrez G.** 2009. Estudio de caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Nicaragua. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). pp 159-178
44. **Campos E, Bolaños H, Chanto G, Jiménez A, Acuña M, Duarte F.** 2010. Guía para la vigilancia de laboratorio de enfermedades bacterianas y otros eventos de importancia en salud pública. INCIENSA.
45. **Kopper G.** 2009. Estudio de caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Costa Rica. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). pp 13-46
46. **Arias M, Antillón F.** 2000. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. Rev Biomédica. **11**:113-122.
47. **Blanco A, Acuña M, Montero M, Bolaños H.** 2012. Vigilancia sanitaria de los alimentos en Costa Rica. pp 311-338. Tomado de <http://www.saludpublica.ucr.ac.cr/Libro/17%20Vigilancia%20sanitaria.pdf>
48. **Bolaños H, Acuña M, Duarte F, Salazar W, Oropeza G, Sánchez L, Campos E.** 2007. Brotes de diarrea e intoxicaciones transmitidas por alimentos en Costa Rica, 2005. Acta Med Costarric. **49**:205-209.
49. **Contreras G.** Fiestas de Zapote cierran con mejores resultados en salud y seguridad. CRHoy, 6 enero 2013. Tomado de <http://www.crhoy.com/fiestas-de-zapote-cierran-con-mejores-resultados-en-salud-y-seguridad>
50. **Cabezas Y.** Encuentran bacteria que produce vómito y diarrea en las fiestas de Zapote. CRHoy, 31 diciembre 2013. Tomado de <http://www.crhoy.com/encuentran-bacteria-que-produce-vomito-y-diarrea-en-puesto-de-mango-de-zapote/>
51. **Marouf S, Ata N, Abdel E, El-moez S, Samy A, El-sayed W.** 2013. Rapid Method for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins in Food. Glob Vet. **11**:335-341.
52. **Bennett R, Hait J.** 2011. Bacteriological Analytical Manual. Staphylococcal Enterotoxins: Microslide Double Diffusion and ELISA-based Methods. Food and Drug Administration. Tomado de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm073674.htm>
53. **Rasooly R, Do P.** 2009. In vitro cell-based assay for activity analysis of staphylococcal enterotoxin A in food. FEMS Immunol Med Microbiol. **56**:172-178.
54. **Chiang Y, Liao W, Fan C, Pai W, Chiou C, Tsen H.** 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. Int J Food Microbiol. **121**:66-73.

55. **Sharma N, Rees C, Christine E, Dodd C.** 2000. Development of a Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for *Staphylococcus aureus* Strains Development of a Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for *Staphylococcus aureus* Strains. *Appl Environ Microbiol.* **66**:1347-1353.
56. **Hennekinne J, Brun V, Buyser M, Dupuis A, Ostyn A, Dragacci S.** 2009. Innovative application of mass spectrometry for the characterization of staphylococcal enterotoxins involved in food poisoning outbreaks. *Appl Environ Microbiol.* **75**:882-884.
57. **Bao K, Letellier A, Beaudry F.** 2012. Analysis of *Staphylococcus* enterotoxin B using differential isotopic tags and liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* **26**:1049-1057.