

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección de genes de enterotoxinas clásicas de *Staphylococcus*
spp. en queso manaba expandido en Quito, Ecuador**

Analía Galarza Robalino

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de

Ingeniera en Biotecnología

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Detección de genes de enterotoxinas clásicas de *Staphylococcus* spp. en queso manaba expandido en Quito

Analía Galarza

Nombre del profesor, Título académico

Lorena Mejía, PhD.

Quito, 18 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos:	Analía Galarza Robalino
Código:	00321637
Cédula de identidad:	1725026635
Lugar y fecha:	Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) representan un desafío para la salud pública en todo el mundo. Una de las ETAs más común es la intoxicación alimentaria estafilocócica. Este estudio evaluó la presencia de *Staphylococcus aureus* y detectó de forma molecular los genes de enterotoxinas clásicas (SEs) en aislados bacterianos a partir de queso manaba, un alimento fresco tradicionalmente elaborado en Ecuador. Se analizaron 50 muestras de queso recolectadas en el Distrito Metropolitano de Quito durante julio y agosto de 2024. Se aislaron 169 cepas de *Staphylococcus* mediante cultivos en medios selectivos y pruebas de coagulasa y catalasa, identificando 44.38% aislados como coagulasa positivos (CPS) y 55.62% como coagulasa negativos (CNS). Los genes *sea*, *seb*, *sec* y *sed* fueron detectados mediante PCR múltiplex. Además, el 100% de las muestras superó los límites microbiológicos establecidos por la Norma NTE INEN 1529-14, con recuentos de *S. aureus* de hasta 5 logaritmos por encima del límite permitido. Todas las cepas portadoras de genes de SEs fueron CPS, con una prevalencia de genes del 7.1% a nivel de cepas y del 22.00% a nivel de muestras. Aunque no se detectaron genes de SEs en cepas de CNS, estas no deben subestimarse, ya que pueden portar genes de enterotoxinas. Estas toxinas son altamente resistentes a condiciones adversas, y el queso manaba es un ambiente propicio debido a su alto contenido de proteínas, sal y actividad de agua, además de prácticas de manipulación y almacenamiento inadecuadas. Los resultados subrayan la necesidad de mejorar las condiciones de higiene en la producción y conservación de este queso para prevenir intoxicaciones alimentarias. Además, destacan la importancia de reforzar la vigilancia y el control en la cadena de suministro.

Palabras clave: intoxicación alimentaria, *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas (SEs), queso manaba, genes, coagulasa positivo (CPS), coagulasa negativo (CNS), contaminación microbiológica, inocuidad.

ABSTRACT

Foodborne diseases (FBDs) represent a public health challenge worldwide. One of the most common FBD is staphylococcal food poisoning. This study evaluated the presence of *Staphylococcus aureus* and molecularly detected classical enterotoxin genes (SEs) in bacterial isolates from manaba cheese, a fresh food traditionally produced in Ecuador. Fifty cheese samples collected in the Metropolitan District of Quito during July and August 2024 were analyzed. A total of 169 *Staphylococcus* strains were isolated by selective media culture and coagulase and catalase tests, identifying 44.38% of the isolates as coagulase positive (CPS) and 55.62% as coagulase negative (CNS). *sea*, *seb*, *sec* and *sed* genes were detected by multiplex PCR. In addition, 100% of the samples exceeded the microbiological limits established by NTE INEN 1529-14, with *S. aureus* counts up to 5 logarithms above the permitted limit. All strains carrying SEs genes were CPS, with a gene prevalence of 7.1% at the strain level and 22.00% at the sample level. Although no SEs genes were detected in CNS strains, these should not be underestimated, as they may carry enterotoxin genes. These toxins are highly resistant to adverse conditions, and manaba cheese is a favorable environment due to its high protein content, salt and water activity, as well as inadequate handling and storage practices. The results underline the need to improve hygiene conditions in the production and preservation of this cheese to prevent food poisoning. In addition, they highlight the importance of reinforcing surveillance and control in the supply chain.

Keywords: food poisoning, *Staphylococcus aureus*, enterotoxins (SEs), manaba cheese, genes, coagulase-positive (CPS), coagulase-negative (CNS), microbiological contamination, food safety.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
MÉTODOS	15
Toma y preparación de las muestras. _____	15
Cultivo y aislamiento de las cepas. _____	15
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> . _____	15
Confirmación del género <i>Staphylococcus</i> . _____	16
Prueba de la Coagulasa. _____	16
Extracción de material genético. _____	16
Detección molecular del 16S rRNA. _____	16
Identificación de genes de enterotoxinas por PCR múltiplex. _____	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	24
TABLAS	25
FIGURAS	26
REFERENCIAS	28
ANEXOS	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras con cepas positivas para genes de enterotoxinas clásicas. _____ 25

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de genes de SEs clásicas de *Staphylococcus* generados por PCR multiplex. _____ 26
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de genes de SEs clásicas de *Staphylococcus* generados por PCR multiplex. _____ 27

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Puntos de muestreo en el Distrito Metropolitano de Quito _____	35
ANEXO 2: Distribución de los quesos con cepas de <i>Staphylococcus</i> toxigénicas en el Distrito Metropolitano de Quito _____	36

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos o ETAs se consideran uno de los problemas más importantes de salud a nivel mundial ya que son causa importante de mortalidad. La OMS estima que los alimentos contaminados causan aproximadamente 600 millones de enfermedades al año, ocasionando 420.000 muertes en todo el mundo (WHO, 2015). Una de las intoxicaciones alimentarias más comunes es la intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*. Usualmente la contaminación se genera durante las etapas de manipulación del alimento por portadores humanos, falta de barreras protectoras, e igualmente puede existir contaminación de origen animal (Yuliza et al., 2024). Las intoxicaciones consisten en una serie de síntomas como náuseas, dolor abdominal, diarrea, vómito y en pocas ocasiones fiebre (Fisher et al., 2018). Los síntomas tardan en aparecer entre 30 minutos a 8 horas después de la ingestión de un alimento contaminado con la toxina preformada (Yuliza et al., 2024). Sin embargo, es una enfermedad autolimitada, esto quiere decir que se controla por sí sola en un periodo de 1 a 3 días desde la aparición de los síntomas (Fisher et al., 2018).

El género *Staphylococcus* consiste en 53 especies de las cuales algunas suelen estar involucradas en intoxicaciones alimentarias (Freitas et al., 2023). Son cocos Gram positivos, catalasa positivos, agrupados en forma de racimos, inmóviles, anaerobios facultativos y algunas especies pueden tener características virulentas (Marino et al, 2010). La catalasa rompe el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua y permite diferenciar este género de otros cocos Gram positivos, como *Streptococcus* y *Enterococcus*. Por otro lado, resisten el pH ácido, altas concentraciones de sal y baja actividad de agua (Cervantes et al., 2014). Algunas especies de este género forman parte de la microbiota animal y humana y pueden encontrarse en la piel, mucosas y tracto gastrointestinal (Fisher et al., 2018; Cervantes et al., 2014). *Staphylococcus aureus* es considerada la especie más patógena del género debido a que produce varios factores

de virulencia entre ellos las enterotoxinas, y se estima que es el tercer patógeno más común en el mundo entre los transmitidos por alimentos (Kou et al., 2021).

Los *Staphylococcus* se pueden clasificar en dos grupos basados en la producción de coagulasa. La coagulasa convierte el fibrinógeno en fibrina formando coágulos en la sangre, y se consideraba que existe una relación entre la producción de coagulasa y la producción de enterotoxinas (Argudín et al., 2010). Sin embargo, es importante mencionar que solamente existe información bien caracterizada para *S. aureus* (Fisher et al., 2018). Algunas especies de *Staphylococcus* coagulasa positivos son *S. aureus*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. hyicus* y *S. pseudointermedius* (Takashi et al., 2010).

Por otro lado, las enterotoxinas (SEs) son proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular que son producidas por las bacterias en el alimento, igualmente son consideradas como superantígenos. Los superantígenos provocan la proliferación de linfocitos T de manera no específica, lo que lleva a una activación excesiva de la respuesta inmune (Fisher et al., 2018). Esta activación descontrolada puede llevar a la producción masiva de citoquinas proinflamatorias, alterando la función inmunológica normal y llegar a desencadenar efectos que incluyen fiebre, falla de órganos y alta mortalidad. Según la FDA, la dosis infectiva de intoxicación por SEs es inferior a 1 μg y en el caso de *S. aureus* se alcanza cuando la población supera los 10^5 UFC/g en el alimento (Freitas et al., 2023). Además, estas toxinas tienen una gran resistencia a condiciones extremas como pH ácido, altas temperaturas y la digestión proteolítica (Le Loir y Hennekinne, 2014). Aunque es posible que las bacterias ya no estén presentes, la toxina puede causar enfermedad después de ser ingerida en cantidades suficientes (Pinchuk et al., 2010).

Los genes que codifican para las enterotoxinas se encuentran distribuidos en elementos móviles como transposones, plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad (SaPIs) (Zhu et

al., 2024). Además, es importante destacar la relevancia del locus EGC que contiene un operón de genes que codifica para diversas enterotoxinas y contribuye a la generación de nuevos tipos de SEs y variantes (Fisher et al., 2018). Actualmente se han descrito hasta 23 tipos de SEs en *S. aureus*, al igual que sus variantes, siendo las SEs clásicas SEA, SEB, SEC, SED, y SEE las más estudiadas (Yuliza et al., 2024). A lo largo de los años se ha estudiado el mecanismo de producción de enterotoxinas en *S. aureus*, el cual está regulado por el sistema Agr de *Quorum Sensing*, que se activa en altas densidades celulares (10^5 UFC/g) y modifica la expresión génica de la bacteria (Fisher et al., 2018). Además, factores como temperatura, pH, actividad de agua y concentración de sal son necesarios para inducir esta producción (Fisher et al., 2018).

Igualmente, las intoxicaciones alimentarias por *S. aureus* suelen asociarse a alimentos preparados listos para el consumo y alimentos ricos en proteínas como lo son los productos lácteos (Schelin et al., 2017). Por ejemplo, el queso es un gel que retiene la mayoría de los sólidos de la leche, pero es susceptible a la contaminación debido a alta actividad de agua y un pH cercano a la neutralidad (González et al., 2023). El queso manaba es un queso fresco originario de la provincia de Manabí. Tradicionalmente para su elaboración se utiliza leche sin pasteurizar en la que se coloca directamente el cuajo, es rico en sal, usualmente no se lo encuentra refrigerado y es altamente manipulado (Yuliza et al., 2024). Su proceso de manufactura, composición del queso, y condiciones de almacenamiento vuelven a este alimento un medio óptimo para el crecimiento bacteriano e igualmente para la producción de enterotoxinas (Silva et al., 2021).

En el Ecuador la información acerca de intoxicaciones por *Staphylococcus* es registrada pero no está disponible públicamente en la Gaceta Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública (MSP), a pesar de que se estima que es una de las intoxicaciones más comunes. En 2023 se registró un total de 9.765 casos de intoxicaciones alimentarias causadas por diversos

patógenos. Dentro de este total, 449 casos fueron intoxicaciones por *Staphylococcus* con 28 casos reportados en el Distrito Metropolitano de Quito (Ministerio de Salud, 2024). Sin embargo, no se conoce todo lo que el MSP incluye en el grupo de intoxicaciones alimentarias. Al tratarse de una enfermedad leve, es probable que muchos casos no hayan sido registrados, ya que las personas afectadas usualmente no buscan atención médica, por lo que se podría decir que el número real de casos podría ser significativamente mayor (Freitas, 2023). La ausencia de un registro detallado resalta la necesidad de mejorar la vigilancia epidemiológica, ya que estas cifras reflejan una problemática que, de no ser abordada adecuadamente, puede tener importantes repercusiones en la salud pública y en la inocuidad alimentaria del país. Principalmente porque para controlar un problema, primero es fundamental identificarlo.

MÉTODOS

Toma y preparación de las muestras.

Se llevó a cabo un muestreo de queso manaba no refrigerado expendido en el Distrito Metropolitano de Quito durante los meses de julio y agosto de 2024. Se seleccionaron al azar 50 muestras de diferentes puntos de venta como fruterías, carnicerías, tiendas, entre otros, y se transportaron a temperatura de refrigeración al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto de Microbiología de la USFQ. Una vez en el laboratorio se pesaron 25 g de queso y se mezcló con 225 mL de agua peptonada tamponada (Difco) en una bolsa estéril, homogeneizando bien la mezcla.

Cultivo y aislamiento de las cepas.

La primera dilución fue inoculada mediante técnica de estriación en Agar Manitol Salado (Difco) e incubada a 37°C durante 48 horas. Tras la incubación, entre 4 y 5 colonias con morfologías aparentemente distintas, manitol positivas o manitol negativas, fueron seleccionadas. Se realizó un subcultivo en agar nutritivo (Difco) y se realizó una incubación a 37°C durante 24 horas.

Recuento de *Staphylococcus aureus*.

Para evaluar la calidad microbiológica de los quesos, se preparó una segunda dilución en agua peptonada y se sembró por duplicado en placas Petrifilm STX (Neogen), las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente, se realizó el recuento de colonias de *S. aureus*, identificadas como colonias moradas características del medio. En caso de crecimiento de colonias negras, se procedió a realizar la prueba de DNAsa, incubando las placas durante 4 horas, tras lo cual se observaron las colonias de *S. aureus* con un halo rosado. Los resultados obtenidos fueron registrados para su posterior análisis y comparación con los estándares de calidad microbiológica establecidos por la Norma NTE INEN 1529-14.

Confirmación del género *Staphylococcus*.

A las cepas aisladas a partir del agar manitol salado, se realizó una tinción Gram y la prueba de catalasa, que consiste en exponer a la bacteria al peróxido de hidrógeno. Para esto, se colocó una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos, y se añadió una porción de cada colonia bacteriana usando un palillo estéril. Un resultado positivo se obtiene al observar burbujas de forma inmediata.

Prueba de la Coagulasa.

Para la prueba de la coagulasa, se utilizó el kit de Liofilchem Diagnostic que contenía plasma de conejo deshidratado. Se tomó un vial y se lo rehidrató con 4 mL de solución salina estéril, luego se dispensó 100 µL del plasma de conejo en tubos pequeños estériles. En cada tubo se colocaron de 3 a 4 colonias con un palillo estéril y se incubó a 37°C por 3 horas y 24 horas, para observar la formación de coágulos si fuera el caso.

Extracción de material genético.

Se realizó la extracción del material genético mediante el método de ebullición. Brevemente se resuspendieron de 3 a 5 colonias de cada aislado en 300 µL de agua para PCR en tubos de 1.5 mL. Se llevó a ebullición durante 15 minutos, y los lisados fueron mantenidos en congelación para su posterior análisis. Las cepas aisladas también se almacenaron en Skim Milk (Difco) para garantizar su viabilidad y preservación a largo plazo.

Detección molecular del 16S rRNA.

Se realizó una amplificación por PCR en punto final del gen ribosomal 16S de cada cepa como un control interno. Para cada reacción se tomó en cuenta un volumen final de 10 µl, que contenía: 1X Green Buffer, 1.75 mM de MgCl₂, 0.12 mM de dNTPs, 0.8 µM de los primers universales 27F-1492R y 0.025U de GoTaq polimerasa. En cada reacción se colocó 1 µl de agua de PCR como control negativo o 1 µl de ADN de cada muestra. Las reacciones fueron

amplificadas en un termociclador Biorad bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando 1 µl de SybrSafe durante 45 minutos a 80V. Se usó 1.5 µl del marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Identificación de genes de enterotoxinas por PCR múltiplex.

Para la amplificación de los genes de enterotoxinas, se consideró un volumen final de 10 µL por reacción que contenía agua de PCR, 1X Green Buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.3 µM del cóctel de primers y 0.5 U de GoTaq polimerasa (Promega). En cada ensayo se colocó 1 µl de agua de PCR como control negativo. Los controles positivos fueron obtenidos a partir de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas, veterinarias o de alimentos.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador Biorad bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, hibridación a 57 °C por 90 segundos, y extensión a 72 °C por 90 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se utilizó 1 µL de intercalante SybrSafe, corriéndose junto con un marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen) a 100 V durante 1 hora y 30 minutos.

RESULTADOS

Para la estandarización de la metodología de detección de genes que codifican para enterotoxinas, se realizó una búsqueda de controles positivos en cepas de *Staphylococcus* spp. El control positivo para los genes *sea* y *sec* fueron aislados a partir de cepas de muestras clínicas donadas por el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto de Microbiología. El gen *seb* fue detectado en una cepa aislada a partir de queso y el control positivo para el gen para *sed* se obtuvo a partir de una muestra veterinaria. Lamentablemente, no se obtuvo un control positivo para *see*.

Como se mencionó anteriormente se seleccionaron al azar 50 muestras de queso de diferentes puntos de venta (Anexo 1). De las 50 muestras de queso manaba analizadas, se aislaron 193 cepas bacterianas. Mediante la tinción Gram y la prueba de catalasa, se determinó que 169 cepas pertenecen al género *Staphylococcus*. Después de la prueba de la coagulasa, se identificaron 75 cepas (44.38%) como coagulasa positivas (CPS) y 94 cepas (55.62%) como coagulasa negativas (CNS). Al analizar la relación entre la fermentación de manitol y la actividad de coagulasa, se encontró que de las 113 cepas manitol positivas, 55 (48.67%) fueron CPS y 58 (51.33%) CNS. Por otro lado, de las 56 cepas manitol negativas, 20 (35.71%) resultaron CPS, mientras que 36 (64.29%) fueron CNS. Este resultado indica una mayor proporción de cepas coagulasa negativas tanto en las cepas manitol positivas como en las cepas manitol negativas, y en los quesos en general.

En cuanto a la revisión de calidad microbiológica mediante recuento de *S. aureus* en placas Petrifilm se obtuvo que el 100% de los quesos analizados no cumplía la Norma NTE INEN 1529-14, que exige un recuento máximo de 10 UFC/g. El valor más bajo obtenido fue de 4×10^2 UFC/g y el más alto 1.54×10^6 UFC/g con un promedio de 5.38×10^4 UFC/g. De las 50 muestras de queso, 17 tenían recuentos superiores a 10^5 UFC/g.

En cuanto a las cepas toxigénicas, se detectaron 12 cepas portadoras de genes de SEs clásicas (Tabla 1), lo que representa una prevalencia del 7.1%. Entre las cepas portadoras, 5 contenían el gen *sea* (41.66%), 2 cepas portaban el gen *seb* (16.67%), 4 cepas el gen *sec* (33.33%) y 3 cepas presentaban el gen *sed* (25.00%) (Figura 1 y Figura 2). No se encontró el gen *see*. Además, 2 cepas portaban 2 genes de SEs, el gen *sea* y *sed* en ambos casos (16.67%). De las 12 cepas toxigénicas, todas resultaron manitol positivo y coagulasa positivo, lo que confirma que son aislados de *S. aureus*. A nivel de muestras de quesos, de las 50 muestras, 11 (22.00%) portaban cepas enterotoxigénicas. Es importante destacar que 2 cepas toxigénicas fueron aisladas del mismo queso (Tabla 1). Sin embargo, las otras 10 cepas estuvieron distribuidas en diferentes quesos obtenidos de distintos sitios del Distrito Metropolitano de Quito, como Alangasí, Cumbayá, Tumbaco, Carapungo, Tababela, Centro Histórico, Conocoto y La Luz (Tabla 1 y Anexo 2).

DISCUSIÓN

Según la Norma NTE INEN 1529-14, el límite máximo permitido de recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos es de 10 UFC/g (INEN, 2012). Sin embargo, en el presente estudio se observó que el 100% de las muestras de queso manaba excedieron este límite de 1 a 5 logaritmos más. En estudios realizados por Villa et al. (2023), Luján et al (2006), y Roldán et al. (2024), se encontró que el 80-90% de muestras de queso fresco presentaban contaminación por *S. aureus*, superando los límites permitidos, resultados que coinciden con los hallazgos del presente estudio. Es interesante mencionar que 17 muestras presentaron recuentos superiores a 10^5 UFC/g, densidad óptima para la producción de enterotoxinas (Arteaga et al., 2021).

Una de las principales fuentes de contaminación de este patógeno según Flores et al. (2020), es la transmisión a la leche desde la vaca por infecciones como la mastitis o contaminación durante el ordeño. Por otro lado, González y Franco (2015) y Martínez et al. (2016), destacan que la materia prima puede ser una fuente clave de contaminación para la elaboración de quesos frescos artesanales ya que a menudo la leche no pasteurizada presenta una mayor contaminación por microorganismos. Otras vías significativas de contaminación de *S. aureus* en el queso es la falta de refrigeración del queso y el proceso de elaboración en el cual portadores pueden transmitir la bacteria al producto debido a la ausencia de barreras protectoras (Díaz et al., 2013). Como se mencionó anteriormente *S. aureus* puede ser parte de la microbiota del ser humano, se estima que de 20 a 30% de la población es portador de esta bacteria y se transmite a los alimentos principalmente a través del contacto directo de las manos con el producto, así como por secreciones nasales o saliva (Fisher et al., 2018).

En base a los resultados obtenidos en la detección de genes de SEs se puede decir que su prevalencia a nivel de cepas aisladas de *Staphylococcus* del queso manaba es baja ya que solo

12 cepas portaban genes de enterotoxinas con una prevalencia de 7.1%. Por otro lado, a nivel de muestras de queso, 11 tuvieron la presencia cepas portadoras de genes de SEs con una prevalencia de 22.00%. Varios estudios han reportado que existe una alta prevalencia de genes de SEs clásicas de *Staphylococcus* aislados de muestras de leche y queso (Bellio et al., 2019; Wisniewski et al., 2024; Rosegeren et al., 2010). Esta alta prevalencia de genes de enterotoxinas ha motivado la realización de diversos estudios en alimentos lácteos, debido a que la leche cruda y el queso fresco ofrecen un ambiente rico en nutrientes que favorece el crecimiento de *Staphylococcus* (Maurin et al., 2004; Morandi et al., 2007).

De acuerdo a Koluman et al. (2011) y Even et al. (2010), el queso es un excelente medio de cultivo para bacterias debido a su alto contenido en sal, elevada actividad de agua y pH. De igual forma, la falta de control en el proceso de elaboración puede permitir la proliferación de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* (Wiśniewski et al., 2023). Además, se obtuvieron 2 cepas con más de un gen de SEs, la combinación *sea* y *sed* en ambos casos. Según Fisher et al. (2018), hay cepas de *Staphylococcus* que pueden producir múltiples genes de enterotoxinas siendo que una misma cepa puede portar hasta 6 genes de SEs. Pero hay que destacar que, en este estudio, se buscó específicamente la presencia de cepas con genes de SEs clásicas. Es posible que existieran otras cepas portadoras de diferentes genes de enterotoxinas que no fueron incluidas en este estudio.

Se ha visto que las toxinas SEA y la SED son las más frecuentes en intoxicaciones alimentarias debido a su capacidad para producirse en diversas condiciones de crecimiento (Balaban y Rasooly, 2000). En este caso el gen *sea* fue el más común (41.66%), seguido del gen *sec* (33.33%). Aragón et al. (2007) determinaron que la SEA y SEC son las más comunes en *Staphylococcus* aislados de queso fresco. Debido a que estas toxinas tienen mayor afinidad por entornos ricos en proteínas y grasas, como quesos los cuales tienen un contenido de 15-

20% de grasa, favoreciendo su persistencia (Etter et al., 2020). Además, su presencia en estos alimentos puede atribuirse a diferentes fuentes de contaminación, la SEA y SEB se asocian a la contaminación por manipuladores humanos, mientras que la SEC y SED están más vinculadas a la contaminación por animales (Salamandane et al., 2022). Por otro lado, las enterotoxinas presentan diferencias significativas en cuanto a su estabilidad, dosis infecciosa y efectos biológicos (Nazari et al., 2014). La SEC y SED requieren dosis más altas para causar enfermedad aproximadamente 5 μg , mientras que la SEA, SEB y SEE son altamente virulentas incluso en dosis bajas menores a 1 μg (Yuliza et al., 2024).

En cuanto a la presencia de CPS y CNS en el alimento, hay que recordar que *S. aureus* se caracteriza por ser manitol positivo y coagulasa positivo (Shields y Tsang, 2006; Aung et al., 2017). En este caso la mayoría de las cepas fueron manitol positivo (66.86%) y de igual forma se encontró en su mayoría CNS (55.62%). Estos resultados indican la presencia de otras especies de *Staphylococcus* en el queso (Kloos y Schleifer, 1975). Además, las 12 cepas portadoras de genes de SEs todas resultaron manitol y coagulasa positivo, sugiriendo que podría tratarse de *S. aureus* (Shields y Tsang, 2006). Según, Jablonski y Bohach (1997), Hennekinne et al. (2011), y Maurin et al. (2004), se ha documentado que las enterotoxinas están principalmente relacionadas con CPS debido a su mayor potencial infeccioso. Especies de CPS como *S. intermedius* y *S. hyicus*, aparte de *S. aureus* pueden ser enterotoxigénicos, aunque *S. aureus* es la principal especie involucrada en las intoxicaciones alimentarias (Aragón et al., 2007). Por otro lado, los CNS tienden a aparecer con mayor frecuencia en alimentos en comparación con CPS, destacando que los CNS podrían desempeñar un papel más significativo de lo que se creía (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020; Minutillo et al., 2023). A pesar de que en el presente estudio no se encontró ninguna cepa coagulasa negativa con genes de SEs clásicas, estudios recientes, como los de Wisniewski et al. (2024), Kahya et al. (2016) y Salamandane et al. (2022), han encontrado que los CNS también portan genes de SEs y otros

factores de virulencia, sugiriendo la posibilidad de su participación en intoxicaciones alimentarias (Maurin et al., 2004).

Es importante señalar que la presencia de la bacteria en el alimento no garantiza la producción de enterotoxinas (Fisher et al., 2018). Para que los genes de SEs se expresen, se requieren condiciones específicas de pH, actividad de agua (*aw*), concentración de NaCl y temperatura que activan el mecanismo de producción de enterotoxinas (Schelin et al., 2017; Adams et al., 2013). La composición del queso puede favorecer la producción de enterotoxinas por *S. aureus* debido a que sus características físicas y químicas se ajustan a las condiciones óptimas descritas por Adams et al. (2013).

Los quesos frescos como el manaba tienen un pH que oscila entre 6 y 7, lo que favorece la producción de enterotoxinas B, C, D y E, ya que estas toxinas se generan en este rango de pH. En el caso de la enterotoxina A, su producción es óptima en un pH de 5.3 a 6.8. Además, el queso manaba presenta un alto contenido de sal, que varía entre 1.5% y 3.5%, lo que puede facilitar la proliferación de *Staphylococcus* ya que toleran altas concentraciones de NaCl hasta 20% (Cervantes et al., 2014). La actividad de agua en los quesos frescos, que suele ser cercana a 0.99, también favorece la producción de enterotoxinas, ya que el nivel óptimo para su formación es superior a este valor (Yuliza et al., 2024). Finalmente, el hecho de que el queso es conservado a temperatura ambiente es otro factor crítico, ya que se encuentra dentro del rango de producción de SEs (Pinchuk et al., 2010). Por lo tanto, el queso manaba es un sustrato ideal para la proliferación de *S. aureus* y la producción de enterotoxinas, representando un riesgo significativo para la salud pública si no se manejan adecuadamente las condiciones de elaboración y conservación.

CONCLUSIONES

Se determinó que el 100% de las muestras de queso analizadas presentaron contaminación por *Staphylococcus aureus*, excediendo los límites establecidos por la Norma NTE INEN 1529-14. Aunque la prevalencia de cepas con genes de enterotoxinas clásicas (SEs) fue baja a nivel de cepas aisladas (7.1%), todas las cepas portadoras de estos genes fueron manitol positivo. A nivel de muestras de queso, la prevalencia fue mayor, ya que 11 muestras (22.00%) contenían cepas con genes de SEs. Cabe destacar que una de las limitaciones de este estudio fue la búsqueda de 5 genes de enterotoxinas clásicas, sin embargo, se han identificado hasta 23 enterotoxinas en *S. aureus*.

Los resultados obtenidos indican que el queso Manaba, debido a sus características fisicoquímicas, como su pH cercano a la neutralidad, alto contenido de sal, elevada actividad de agua, así como por su proceso de elaboración y almacenamiento a temperatura ambiente, constituye un medio ideal para la proliferación de *Staphylococcus* spp. y la producción de enterotoxinas. Esto representa un riesgo significativo de intoxicación alimentaria en caso de contaminación con cepas portadoras de estos genes. No obstante, la mayoría de las cepas aisladas en este estudio fueron CNS, las cuales forman parte de la microbiota normal del ser humano. Sin embargo, diversos estudios han señalado que estas cepas también pueden portar genes de enterotoxinas, lo que no debe subestimarse.

Estos hallazgos destacan la necesidad de fortalecer las medidas de higiene y control durante la producción y conservación del queso manaba para prevenir la introducción o proliferación de cepas patógenas. Por tanto, es crucial implementar prácticas adecuadas de manejo en toda la cadena de producción con el fin de proteger la salud del consumidor y minimizar los riesgos asociados.

TABLAS

Tabla 1. Muestras con cepas positivas para genes de enterotoxinas clásicas.

# de muestra	Código	Ubicación	<i>S. aureus</i> UFC/g	Cepa	Gen
1	SGL-02	Alangasí	7.6×10^3	B	<i>sea</i>
2	CBY-03	Cumbayá	5×10^4	A	<i>sea/sed</i>
3	TMB-04	Tumbaco	3.6×10^3	C	<i>sea/sed</i>
4	TMB-05	Tumbaco	$> 2 \times 10^5$	A	<i>sea</i>
5	CPG-03	Carapungo	6×10^2	A	<i>sea</i>
6	LLZ-02	La Luz	6.7×10^4	A	<i>seb</i>
				C	<i>seb</i>
7	LG-01	La Gasca	5.7×10^4	C	<i>sec</i>
8	LG-03	La Gasca	$> 2 \times 10^5$	C	<i>sec</i>
9	TBL-01	Tababela	1.12×10^5	B	<i>sec</i>
10	CQ-01	Centro Histórico	1.81×10^5	A	<i>sec</i>
11	ARM-01	Armenía	6.5×10^2	A	<i>sed</i>

Nota: Se presentan las muestras con cepas positivas para genes de enterotoxinas, se presenta el código de la muestra, la ubicación, recuento de *S. aureus*, cepa y gen correspondiente. Como se observa, 10 cepas están presentes en diferentes quesos y hay 2 cepas en una misma muestra de queso, de igual forma todos los recuentos son superiores al límite permitido.

FIGURAS



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de genes de SEs clásicas de *Staphylococcus* generados por PCR multiplex.

Nota: Se observa un gel de agarosa con distintos patrones que corresponden a las cepas positivas para genes de SEs. En el carril 1 y 12 se observa el marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen). En el carril 2 se encuentra el control negativo. En el carril 3 se observa el control positivo para el gen *sea*, en los carriles 4, 7 y 8 se encuentran las cepas positivas para *sea*. En los carriles 5 y 6, se observan cepas positivas para *sea/sed*. En el carril 9 se encuentra el control positivo para *seb*, mientras que en los carriles 10 y 11 se encuentran las cepas positivas para *seb*.



Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de genes de SEs clásicas de *Staphylococcus* generados por PCR multiplex.

Nota: Se observa un gel de agarosa con patrones que corresponden a las cepas positivas para genes de SEs. En el carril 1 y 12 se observa el marcador de peso molecular de 50 pb Invitrogen. En el carril 2 se encuentra el control negativo. En el carril 3 se observa el control positivo para *sec*, en los carriles 4, 5, 6 y 7 se encuentran las cepas positivas para *sec*. En el carril 8 se encuentra el control positivo para *sed*, en el carril 9 se encuentra la cepa positiva para *sed* y en los carriles 10 y 11 se encuentran las cepas positivas para *sea/sed*.

REFERENCIAS

- Adams, M., Moss, M., y Mclure, P. (2013). *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry.
- Aragón-Alegro, L.C., Konta, E.M., Suzuki, K., Silva, M.G., Júnior, A.F., Rall, R., y Rall, V.L.M. (2007). Presencia de *Staphylococcus* coagulasa-positivo en varios productos alimenticios comercializados en Botucatu, SP, Brasil y detección de toxinas en alimentos y cepas aisladas. *Control de alimentos*, 18 (6), 630-634. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.02.010>
- Argudín, M.A., Mendoza, M.C. y Rodicio, M.R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2(7). <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
- Arteaga-Solórzano, R. A., Armenteros-Amaya, M., Colas-Chávez, M., Pérez-Ruano, M., y Fimia-Duarte, R. (2021). Calidad sanitaria de la leche y quesos artesanales elaborados en la provincia de Manabí, Ecuador. *Revista de producción animal*, 33(3), 54-66. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2224-79202021000300054&script=sci_arttext&tlng=en
- Aung., M. S., San, T., Aye, M. M., Mya, S., Maw, W. W., Zan, K. N., Htut, W. H., Kawaguchiya, M., Urushibara, N., y Kobayashi, N. (2017). Prevalence and Genetic Characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* Isolates Harboring Panton-Valentine Leukocidin, Enterotoxins, and TSST-1 Genes from Food Handlers in Myanmar. *Toxins*, 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9080241>
- Balaban, N., y Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00377-9)
- Bellio, A., Chiesa, F., Gallina, S., Bianchi, D. M., Macori, G., Bossi, D., Nia, Y., Muetal. I., Messio, S., Hennekinne, J. y Decastelli, L. (2019). Insight into the distribution of

- staphylococci and their enterotoxins in cheeses under natural conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03233>
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Patología Clínica*, 61(1). <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Gajewska, J., Wiśniewski, P., y Zadernowska, A. (2020). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci from ready-to-eat food. *Pathogens*, 9(9), 734. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090734>
- Díaz, M., Chávez, M., y Saucedo, E. (2013). *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. *Revista Ciencia y Tecnología*. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/pgm/article/view/268>
- Etter, D., Schelin, J., Schuppler, M., Johler, S. (2020). Staphylococcal Enterotoxin C—An Update on SEC Variants, Their Structure and Properties, and Their Role in Foodborne Intoxications. *Toxins*, 12(9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551944/#B111-toxins-12-00584>
- Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Zakour, N. B., Chacornac, J. P., Lebert, I., ... y Le Loir, Y. (2010). Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International journal of food microbiology*, 139(1-2), 87-95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- Fisher, E. L., Otto, M., y Cheung, G. Y. C. (2018). Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Frontiers in Microbiology*, 9, 436. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00436>
- Freitas, J. K. G. R., Assis, C. F. D., Oliveira, T. R. M. D., Maia, C. M. D. M., De Sousa, B. J., Medeiros, G. C. B. S. D., Seabra, L. M. J., y Chaves Damasceno, K. S. F. D. S. (2023).

- Prevalence of staphylococcal toxin in food contaminated by *Staphylococcus* spp.: Protocol for a systematic review with meta-analysis. *PLOS ONE*, 18(2), e0282111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282111>
- González, L. y Franco, M. J. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(3), 250-257. <https://www.scielo.br/j/bjft/a/jLGgkMhFgD3MxS8BVRybM5K/?lang=es>
- González, R., Gurado, F., y Mendoza, L. (2023). Desarrollo de un modelo predictivo del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en queso costeño cubierto con película activa. *Revista U.D.C.A.*, 26(2). <https://repository.udca.edu.co/server/api/core/bitstreams/105c243d-3a91-488f-9787-f74cddb2f945/content>
- Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., y Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS microbiology reviews*, 36(4), 815-836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- INEN. (2012). *Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 063:2012*. INEN. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/reglamentos/RTE-063.pdf>
- Jablonski, L.M, y Bohach G. (1997). *Staphylococcus aureus*. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers (Doyle MP, Beuchat LR & Montville TJ, eds). American Society for Microbiology Press.
- Kahya, S., Guran, S., y Ardicli, O. (2016). PCR and ELISA for staphylococcal enterotoxins and detection of some exotoxins from *Staphylococcus* spp. strains by PCR. *Medycyna Weterynaryjna*, 72(1). <http://www.medycynawet.edu.pl/images/stories/pdf/pdf2016/012016/201601028033.pdf>

- Kloos, W., y Schleifer, K. (1975). Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jcm.1.1.82-88.1975>
- Koluman, A., Unlu, T., Dikici, A., Tezel, A., y Z. T, B. (2011). Presence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in different foods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1). doi:10.9775/kvfd.2010.3233
- Kou, X., Cai, H., Huang, S., Ni, Y., Luo, B., Qian, H., Ji, H., y Wang, X. (2021). Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Raw Milk in Northern Xinjiang, China. *Frontiers in Microbiology*. doi: [10.3389/fmicb.2021.705947](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705947)
- Luján, D., Valentín M. y Molina, M. (2006). Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima-Perú. *Revista Salud Pública y Nutrición*. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=13245>
- Le Loir, Y., y Hennekinne, J. (2014). Detection of Staphylococcal Enterotoxins. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00319-0>
- Marino, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., y Maifreni, M. (2011). Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments: Safety-related properties of staphylococci. *Journal of Applied Microbiology*, 110(2), 550-561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04909.x>
- Martínez, A., de Oca, N. M., Armenteros, M., Uffo, O., Riverón, Y., González, D., Remón, D., Paes, S. B., Adrião, M., de Andrade, S. F., y Villoch, A. (2020). Identification of bacterial hazards in the production of artisan fresh cheese in Cuba. *Journal of Dairy Research*, 87(2), 263-265. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000217>
- Maurin, F., Mazerolles, G., Noel, Y., y Kodjo, A. (2004). Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their

in vitro ability to produce enterotoxins. *Revue Med Vet*, 155(2), 92-6.
<https://www.researchgate.net/publication/283826063> Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci CPS in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins

Minutillo, R., Pirard, B., Fatihi, A., Cavaiuolo, M., Lefebvre, D., Gérard, A., ... y Clinquart, A. (2023). The Enterotoxin Gene Profiles and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Artisanal Cheeses in Belgium. *Foods*, 12(21), 4019.
<https://doi.org/10.3390/foods12214019>

Ministerio de Salud. (2024). *Intoxicaciones por Staphylococcus*. Archivo no publicado.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., y Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary microbiology*, 124(1-2), 66-72.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.014>

Nazari, R., Godarzi, H., Rahimi Baghi, F., y Moeinrad, M. (2014). Enterotoxin gene profiles among *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15(4), 409-412. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175141/>

Omoe, K., Hu, D.L., Takashi-Omoe, H., Nakane, A. y Shinagawa, K. (2005). Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 246(2).
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.007>

Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., y Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*, 2(8), 2177-2197. <https://doi.org/10.3390/toxins2082177>

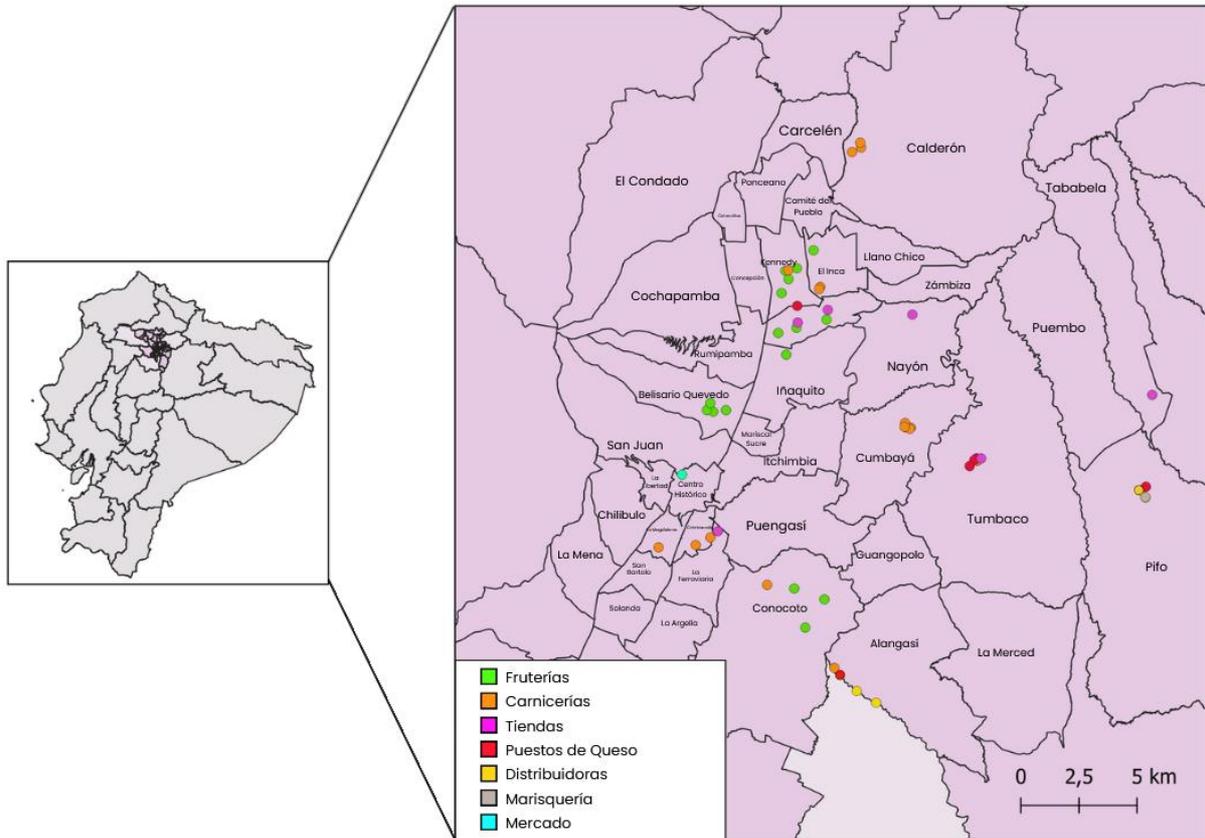
Podkowik, M., Park, J., Seo, K., Bystrón, J., y Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 163.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005>

- Roldán, G., Carolina, M. y Torres, S. (2024). Determinación de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos del mercado 9 de octubre de la ciudad de Cuenca. *Tesla*, 1. <https://doi.org/10.55204/trc.v4il.e295>
- Rosengren, Å., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S., y Lindqvist, R. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International journal of food microbiology*, 144(2), 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004>
- Sahebkhitiari, N., Nochi, Z., Eslampour, M., Dabiri, H., Bolfion, M., Taherikalani, M., Khoramian, B., Zali, M., y Emaneini, M. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58(2), 113-121. <https://doi.org/10.1556/amicr.58.2011.2.4>
- Salamandane, A., Oliveira, J., Coelho, M., Ramos, B., Cunha, M. V., Malfeito-Ferreira, M., y Brito, L. (2022). Enterotoxin-and antibiotic-resistance-encoding genes are present in both coagulase-positive and coagulase-negative foodborne *Staphylococcus* strains. *Applied Microbiology*, 2(2), 367-380. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2020028>
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T., y Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 765-769. <https://doi.org/10.1128/JCM.01232-09>
- Schelin, J., Susilo, Y., y Johler, S. (2017). Expression of Staphylococcal Enterotoxins under Stress Encountered during Food Production and Preservation. *Toxins*, 9(401). doi:[10.3390/toxins9120401](https://doi.org/10.3390/toxins9120401)

- Shields, P y Tsang, A. (2006). *Mannitol Salt Agar Plates Protocols*. American Society of Microbiology. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Mannitol-Salt-Agar-Plates-Protocols.pdf?ext=.pdf>
- Silva, M., Carvalho, A., Andretta, M., y Nero, L. (2021). Presence and growth prediction of *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese, a soft fresh cheese produced in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 104(12). <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20633>
- Villa Cárdenas, K. P., Peralta Rodríguez, K. I., y Torres Segarra, S. M. (2023). Identificación de *Staphylococcus aureus* en quesos expandidos en el mercado el Arenal Cuenca-Ecuador en el período marzo 2023. *Anatomía Digital*, 6(3.1), 6-18. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i3.1.2628>
- Wiśniewski, P., Gajewska, J., Zadernowska, A., y Chajęcka-Wierzchowska, W. (2023). Identification of the Enterotoxigenic Potential of *Staphylococcus* spp. from Raw Milk and Raw Milk Cheeses. *Toxins*, 16(1), 17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03233>
- World Health Organization (WHO). (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. *Encyclopedia of Parasitology*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/199350/?sequence=1>
- Zhu, Z., Hu, Z., Li, S., Fang, R., Ono, H. K., y Hu, D.-L. (2023). Molecular Characteristics and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* Exotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 395. <https://doi.org/10.3390/ijms25010395>

ANEXOS

ANEXO 1: Puntos de muestreo en el Distrito Metropolitano de Quito



ANEXO 2: Distribución de los quesos con cepas de *Staphylococcus* toxigénicas en el Distrito Metropolitano de Quito

