

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Presencia de *Staphylococcus* enterotoxigénico y detección de
enterotoxinas clásicas en queso manaba expendido en el Distrito
Metropolitano de Quito**

Ana Sofía Sosa Chiriboga

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 9 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Presencia de *Staphylococcus* enterotoxigénico y detección de enterotoxinas clásicas en queso manaba expendido en el Distrito Metropolitano de Quito

Ana Sofía Sosa Chiriboga

Nombre del profesor, Título académico

Lorena Mejía, PhD.

Quito, 9 de mayo de 2025

© 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: Ana Sofía Sosa Chiriboga

Código: 00320829

Cédula de identidad: 1722448873

Lugar y fecha: Quito, 9 de mayo de 2025

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

La presente investigación evaluó la presencia de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico y la detección de enterotoxinas clásicas en queso manaba expendido en el Distrito Metropolitano de Quito, motivada por la preocupación sanitaria ante la comercialización de productos artesanales sin control sanitario adecuado. El estudio aplicó técnicas microbiológicas, moleculares e inmunológicas para caracterizar la carga bacteriana y la potencial producción de enterotoxinas. Se analizaron 62 muestras de queso manaba recolectadas aleatoriamente entre enero y marzo de 2025. El 93,5% presentó niveles de *S. aureus* superiores a los permitidos por la normativa ecuatoriana, mientras que el 60% mostró presencia de *E. coli*, evidenciando contaminación fecal. Se aislaron 253 cepas de *Staphylococcus* mediante cultivos en medios selectivos y pruebas de confirmación, identificando 58.89% aislados como coagulasa positivos (CPS) y 41,11% como coagulasa negativos (CNS). Mediante PCR múltiple se detectaron genes de enterotoxinas clásicas en 6 de las muestras, predominando los genes *sea* y *sed*; sin embargo, no se detectaron toxinas mediante un ensayo ELISA. Todas las cepas enterotoxigénicas fueron CPS, con una prevalencia de genes del 2,37% a nivel de cepas y del 9,7% a nivel de muestras. Los resultados obtenidos ofrecen una perspectiva sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de este producto y resaltan la necesidad de implementar medidas de control más estrictas en su cadena de producción y distribución. Además, se evidencian deficiencias higiénicas en la producción y distribución de este alimento, así como un riesgo potencial de intoxicación alimentaria. Futuros estudios deberían profundizar en la expresión de genes no evaluados y analizar el impacto de factores ambientales sobre la producción de enterotoxinas en matrices alimentarias típicas del país.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, enterotoxigénico, enterotoxinas clásicas, queso manaba, contaminación microbiológica

ABSTRACT

This study assessed the presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and the detection of classical enterotoxins in manaba cheese sold in the Metropolitan District of Quito, driven by public health concerns related to the commercialization of artisanal products without proper hygienic control. Microbiological, molecular, and immunological techniques were employed to characterize bacterial load and potential enterotoxin production. A total of 62 samples of manaba cheese were randomly collected between January and March of 2025. Results showed that 93.5% exceeded the maximum levels of *S. aureus* established by Ecuadorian regulations, while 60% tested positive for *E. coli*, indicating fecal contamination. A total of 253 *Staphylococcus* isolates were obtained, of which 58.89% were coagulase-positive (CPS) and 41.11% coagulase-negative (CNS). Multiplex PCR revealed the presence of classical enterotoxin genes in 6 samples, with *sea* and *sed* being the most frequent; however, no enterotoxins were detected using ELISA. All enterotoxigenic strains were CPS, with a gene prevalence of 2.37% at the strain level and 9.7% at the sample level. The results provide a current perspective on the microbiological risks associated with the consumption of this product and highlight the need to implement stricter control measures throughout its production and distribution chain. Additionally, the findings underscore hygienic deficiencies and a potential risk of food poisoning. Future studies should focus on the expression of non-evaluated enterotoxin genes and assess the influence of environmental variables on enterotoxin production in typical Ecuadorian food matrices.

Key words: *Staphylococcus aureus*, enterotoxigenic, classical enterotoxins, manaba cheese, microbiological contamination

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	10
Métodos.....	14
Resultados	17
Discusión.....	19
Conclusiones	23
Tablas	24
Figuras.....	25
Referencias bibliográficas.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras con cepas positivas para genes de enterotoxinas clásicas	24
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de genes de SEs clásicas de Staphylococcus generados por PCR múltiple	25
--	----

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial, con millones de casos reportados anualmente. El CDC estima que cada año aproximadamente 1 de cada 6 personas contrae una enfermedad transmitida por alimentos provocados por diversos patógenos. Dentro de este grupo de enfermedades, la intoxicación estafilocócica alimentaria (SFP) se ha identificado como una de las principales causas de brotes de origen bacteriano causando más de 241.000 casos, con 1.000 hospitalizaciones y 6 muertes (CDC, 2018). Sin embargo, se estima que solo se reporta entre el 1-5% de todos los casos, por lo cual es probable que las cifras sean significativamente mayores (Alarcón-Lavín et al., 2017). A pesar de ser una de las intoxicaciones alimentarias más comunes, las estadísticas de intoxicaciones por *Staphylococcus* en Ecuador no está disponible públicamente en la Gaceta Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública.

La intoxicación alimentaria estafilocócica resulta del consumo de alimentos que contienen cantidad suficiente de una o más enterotoxinas (SE por sus siglas en inglés) preformadas producidas por ciertas especies del género *Staphylococcus*. La FDA estima que 0,1 µg de SEs pueden causar intoxicación alimentaria estafilocócica en humanos (Freitas et al., 2023). Los síntomas aparecen rápidamente después de la ingestión, generalmente entre 2 y 8 horas e incluyen náuseas, vómitos intensos y cólicos abdominales, con o sin diarrea. La enfermedad suele ser autolimitada por lo que suele resolverse en un plazo de 1 a 2 días tras su aparición. En ocasiones, puede ser lo suficientemente grave como para requerir hospitalización, sobre todo en lactantes, ancianos o personas inmunocomprometidas (Argudín et al., 2010). La principal fuente de contaminación de los alimentos son los manipuladores de alimentos que portan *S. aureus* en sus manos y mucosas; sin embargo, también puede provenir de la leche de

animales con infecciones intramamarias, como resultado de malas condiciones de higiene durante el ordeño (Omwenga et al., 2019).

El género *Staphylococcus* consta de 53 especies que se caracterizan por ser Gram positivos con morfología cocoide, inmóviles y anaerobios facultativos, comúnmente agrupadas en racimos. Además, son catalasa positivos lo cual los diferencia de otros cocos Gram positivos como *Streptococcus* y *Enterococcus*. Se caracterizan por su capacidad de crecer en condiciones adversas, como altas concentraciones de sal, pH ácidos, baja actividad de agua y por su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas (Freitas et al., 2023; Grispoldi et al., 2021). Varias especies de este género son parte de la microbiota humana y animal. Se encuentran especialmente en la piel y las mucosas de los humanos, con estimaciones de un 20-30% de colonización persistente y un 60% de colonización intermitente (Argudín et al., 2010). *S. aureus* es una de las especies más patógenas del género ya que tiene la capacidad de producir varios factores de virulencia, entre ellos las enterotoxinas (SEs). Sin embargo, hay otras especies de *Staphylococcus* capaces de producir SEs como *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. epidermidis* (Medved'ová et al., 2017).

Las enterotoxinas estafilocócicas son exotoxinas gastrointestinales sintetizadas durante la fase logarítmica de crecimiento o durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria (Argudín et al., 2010). Son proteínas no glicolisadas, altamente estables, con una estructura globular homóloga y de bajo peso molecular (19-29 kDa) que tienen actividad superantigénica y emética. (Fisher et al., 2018). Se consideran superantígenos ya que, a diferencia de los antígenos convencionales, no necesitan ser procesados por las células presentadoras de antígenos (APCs). La mayoría se une al exterior de las moléculas del MHC II en las APCs y se une de manera inespecífica a los receptores de linfocitos T. Esta unión activa las APCs y la proliferación excesiva de linfocitos T, lo que resulta en una liberación incontrolada de citocinas

proinflamatorias (Podkowik et al., 2013). Por otra parte, los SEs afectan directamente al epitelio intestinal y al nervio vago provocando la estimulación del centro emético e induciendo vómito después de la ingestión oral (Kadariya et al., 2014). Las SEs se caracterizan por ser termoestables y resistentes a enzimas proteolíticas por lo que pueden conservar su actividad en el tracto digestivo después de la ingestión (Balaban & Rasooly, 2000). La termoestabilidad de las enterotoxinas las convierte en un peligro relevante incluso en alimentos que han sido sometidos a tratamiento térmico.

La mayoría de los genes de enterotoxinas se encuentran, solos o en grupos, en una amplia variedad de segmentos móviles de ADN incluidos profagos, plásmidos, transposones, islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPI) y grupos de genes de enterotoxinas (Grispoldi et al., 2021). La mayoría de estos son elementos móviles, por lo que la transferencia horizontal de estos genes entre cepas puede ocurrir. El conocimiento actual sobre la regulación de la producción de enterotoxinas aún es incompleto: sin embargo, se sabe que *S. aureus* es capaz de responder a factores de estrés activando el sistema *Agr*, un sistema de quorum sensing que se activa a altas densidades celulares (superiores a 10^5). De esta manera, le permite adaptarse rápidamente a las condiciones regulando la expresión de genes asociados con características fisiológicas importantes, incluida la producción de enterotoxinas (Grispoldi et al., 2021). La producción de enterotoxinas también está influenciada por otros factores ambientales como la temperatura, la concentración de sal, actividad de agua y el pH en el que se encuentra la bacteria (Medved'ová et al., 2017).

Los SE son una causa importante de intoxicación alimentaria, que generalmente ocurre después de la ingestión de diferentes alimentos, en particular carne procesada y productos lácteos (Argudín et al., 2010). El queso manaba, un producto tradicional ecuatoriano elaborado a partir de leche cruda, con un alto contenido de sal y usualmente comercializado sin

refrigeración adecuada, ofrece un entorno favorable para la proliferación de *Staphylococcus*. Además, su proceso de manufactura implica una alta manipulación del alimento por lo que su contaminación suele ser común (Lozano, 2022). Finalmente, al ser un alimento de producción artesanal, en muchos casos, puede carecer de controles sanitarios rigurosos o vigilancia por la calidad e inocuidad (Arteaga et al., 2021).

Los criterios diagnósticos concluyentes de la intoxicación estafilocócica se basan en la detección de enterotoxinas estafilocócicas en los alimentos (Kadariya et al., 2014). De 33 SEs identificadas y reportadas en la literatura, solo 5 (SEA, SEB, SEC, SED y SEE), conocidas como enterotoxinas clásicas, han sido bien definidas y son detectables utilizando ensayos o kits comerciales. No existen kits de detección inmunológica disponibles en el mercado para las otras SEs, a pesar de que se ha desarrollado una amplia variedad de métodos de diagnóstico para comprender su posible papel en la intoxicación. Hasta la fecha, el análisis molecular para detectar genes codificantes de SEs sigue siendo el método más común, aunque indirecto (Grispoldi et al., 2021). El kit RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E se basa en un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich (ELISA), que utiliza anticuerpos específicos inmovilizados en una placa de microtitulación para detectar la presencia de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D y E en muestras alimentarias o cultivos bacterianos. Durante la prueba, las enterotoxinas presentes en la muestra se unen a los anticuerpos fijados en los pocillos. Luego, un segundo anticuerpo marcado con biotina se une al complejo antígeno-anticuerpo, seguido por la adición de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa que permite la detección cromogénica. La intensidad del color, medida a 450/620 nm, es proporcional a la concentración de toxina en la muestra (R-Biopharm, 2025). Este método de detección destaca por su alta especificidad y sensibilidad, permitiendo la detección simultánea y semicuantitativa de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos de forma rápida y confiable (Park et al., 1994).

MÉTODOS

Recolección de muestras

Se recolectaron al azar 62 muestras de queso manaba refrigerado y no refrigerado expendido en el Distrito Metropolitano de Quito entre los meses de enero a marzo del 2025. Se realizó el muestreo en diferentes puntos de venta como carnicerías, micromercados, tiendas, fruterías, mercados y tercenas, y se transportaron las muestras a temperatura de refrigeración al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto de Microbiología de la USFQ.

Aislamiento de cepas

Inicialmente, se pesaron 25 g de queso manaba y se mezclaron con 225 mL de agua peptonada tamponada en una bolsa estéril, homogenizando bien la mezcla para obtener una dilución 10^{-1} . Posteriormente, se realizó una dilución 10^{-2} mezclando 1 mL de la dilución 10^{-1} con 9 mL de agua peptonada tamponada. La primera dilución (10^{-1}) fue inoculada en Agar Manitol Salado (Difco) mediante la técnica de estriación, incubándose a 37°C durante 48 horas. Tras la incubación, se seleccionaron entre 4 y 5 colonias con morfologías aparentemente distintas, manitol positivas o negativas, para realizar un subcultivo en agar nutritivo (Difco) el cual fue incubado a 37°C durante 24 horas.

Recuento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Para el recuento de *Escherichia coli*, como indicador de contaminación fecal, se sembró 1 mL de la primera dilución (10^{-1}) en placas Petrifilm EC (Neogen) por duplicado y para el recuento de *Staphylococcus aureus* se sembró 1 mL de la segunda dilución (10^{-2}) en placas Petrifilm STX (Neogen) por duplicado. Se incubó a 37°C durante 48 horas, tras lo cual se realizó un recuento de colonias. Si se observaban colonias negras en las placas Petrifilm

STX, se procedía a realizar la prueba de DNAsa (Neogen) mediante incubación durante 24 horas; la formación de un halo rosado indicaba la presencia de *Staphylococcus aureus*.

Pruebas de confirmación del género *Staphylococcus*

En primer lugar, la prueba de la catalasa consistió en aplicar una colonia bacteriana sobre una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos; la formación de burbujas se interpretó como una reacción positiva. Después, se realizó tinción de Gram siguiendo un protocolo estándar para luego observar la morfología al microscopio con lente de 100X; la presencia de cocos Gram positivos indicaba la identificación de *Staphylococcus*. Finalmente, se realizó la prueba de coagulasa utilizando el kit de Liofilchem Diagnostic, para la cual se rehidrató un vial con 4 mL de solución salina estéril, y se dispusieron 100 µL de plasma de conejo en tubos estériles junto con 3 a 4 colonias bacterianas. La incubación se realizó a 37°C por 3 horas y 24 horas, considerando la prueba positiva mediante la formación de coágulos.

Extracción del material genético

De todas aquellas cepas sugerentes del género *Staphylococcus*, se realizó la extracción del material genético utilizando el método de ebullición. Para ello, se colocó 300 µL de agua para PCR en tubos de 1,5 mL y se resuspendieron entre 3 a 5 colonias de cada aislado. Posteriormente, se llevó la mezcla a ebullición durante 15 minutos y se congeló a -20°C hasta su análisis.

Amplificación de 16S rRNA mediante PCR convencional

Como control interno, se realizó la detección molecular del gen 16S rRNA mediante PCR convencional. Se utilizó un volumen total de 10 µL que contenía agua, green buffer 5X, MgCl₂ (25 mM), dNTPs (2 mM), primers 27F y 1492R (10 µM), polimerasa GoTaq

(Promega) y ADN. Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 50°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% por 45 minutos a 80 V, usando un marcador de peso molecular de 100 pb.

Detección de genes de enterotoxinas A, B, C, D, E mediante PCR múltiple

Adicionalmente, se realizó una identificación de genes de enterotoxinas mediante PCR múltiple, utilizando un volumen total de 10 µL con agua, green buffer 5X, MgCl₂ (25 mM), dNTPs (4 mM), coctel de primers (2 µM), polimerasa GoTaq (Promega, 5U) y ADN. Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 90 segundos, extensión a 72°C por 90 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% por 90 minutos a 100 V, utilizando un marcador de peso molecular de 50 pb.

Inmunoensayo enzimático para la identificación de enterotoxinas clásicas

Finalmente, se realizó la detección de enterotoxinas clásicas (*Staphylococcus enterotoxins* A, B, C, D y E) utilizando el kit RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG). Las muestras fueron preparadas según el protocolo indicado por el fabricante para alimentos con un contenido de grasa inferior al 40%. El protocolo incluyó la homogenización de la muestra con PBS buffer, incubación de los micropocillos, adición de conjugado, lavados sucesivos y detección mediante la adición de sustrato y cromógeno, seguido de la lectura fotométrica a 450/620 nm.

RESULTADOS

En la evaluación de la calidad microbiológica mediante el recuento de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm STX, se determinó que el 93,5% de las muestras de queso analizadas excedía el límite establecido por la Norma NTE INEN 1529-14, la cual permite un máximo de 10 UFC/g. Los valores obtenidos oscilaron entre 2×10^2 UFC/g hasta recuentos mayores a 10^5 UFC/g. Además, 24 de las 62 muestras presentaron recuentos mayores a 10^5 lo que corresponde al 39% de las muestras. Por otra parte, el recuento de *Escherichia coli* en placas Petrifilm EC demostró que el 60% de las muestras de queso analizadas tenían recuentos mayores a 10 UFC/g con un rango entre 4×10^1 UFC/g y 1.02×10^3 UFC/g.

De las 62 muestras de queso manaba analizadas, se obtuvieron un total de 283 cepas bacterianas, de las cuales 253 fueron identificadas como pertenecientes al género *Staphylococcus* mediante la tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Posteriormente, con la prueba de la coagulasa, se determinó que 149 cepas (59%) eran coagulasa positivas y 104 cepas (41%) eran coagulasa negativas. Al examinar la relación entre la fermentación del manitol y la producción de coagulasa, se observó que de las 195 cepas manitol positivas, 120 cepas (61,5%) fueron coagulasa positivas y 75 cepas (38,5%) fueron coagulasa negativas. En el caso de las 58 cepas manitol negativas, se encontró una proporción equitativa, con 29 cepas (50%) coagulasa positivas y 29 cepas (50%) coagulasa negativas.

En cuanto a la detección de *Staphylococcus* enterotoxigénico, se identificaron 7 cepas portadoras de genes de enterotoxinas clásicas (Tabla 1), en 6 de las muestras de queso manaba lo que indica que el 9,7% de las muestras contenían una cepa enterotoxigénica. Es importante destacar que 2 de las cepas enterotoxigénicas se encontraban en el mismo queso y portaban el gen *sed*, por lo que se podría tratar de la misma cepa. Entre las cepas portadoras de SEs, 3 presentaban el gen *sea* y 4 presentaban el gen *sed* (Tabla 1 y Figura 2). Los genes *seb*, *sec* y

see no fueron detectados en ninguna cepa. Todas las cepas que presentaron genes de SEs, fueron positivas para la fermentación de manitol y para la prueba de coagulasa, confirmando su identidad como *Staphylococcus aureus*. Las muestras que contenían cepas enterotoxigénicas fueron recolectados en diferentes sectores del Distrito Metropolitano de Quito, como Yaruquí, Puembo, Cumbayá, El Condado, Puengasí y Florestal Baja (Tabla 1). En cuanto a la detección de enterotoxinas clásicas mediante el inmunoensayo enzimático, se encontró que ninguna de las muestras de queso manaban contenían enterotoxinas.

DISCUSIÓN

El análisis microbiológico de las 62 muestras de queso manaba reveló una alta carga bacteriana, superando en la mayoría de los casos los límites establecidos por la normativa ecuatoriana vigente. En el caso de *Staphylococcus aureus*, el 93,5% de las muestras presentaron recuentos superiores al límite máximo permitido por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-14, que establece un valor máximo de 10 UFC/g. Se han reportado resultados similares en estudios realizados por Feijó et al., (2023) y Villa et al. (2023) y Márquez (2012), donde se observó que entre el 88-95% de las muestras de queso fresco analizadas estaban contaminadas con *Staphylococcus aureus* en niveles que excedían los límites establecidos por la normativa. En el caso de *Escherichia coli*, la normativa vigente exige su ausencia en productos lácteos listos para el consumo. Sin embargo, se detectó su presencia en el 60% de las muestras analizadas lo que evidencia una contaminación fecal significativa en una proporción considerable de las muestras. La presencia de *Escherichia coli* advierte sobre la posible presencia de otros microorganismos patógenos intestinales en las muestras y alta prevalencia en este tipo de productos representa un riesgo significativo de enfermedades transmitidas por alimentos, especialmente cuando se consumen sin tratamiento térmico previo (Rodríguez et al., 2015).

Las principales fuentes de contaminación por *S. aureus* se han asociado tradicionalmente con los manipuladores de alimentos, quienes portan esta bacteria en sus manos y mucosas y pueden transmitirla a los alimentos debido a la ausencia de barreras protectoras (Alarcón-Lavín et al., 2017). Asimismo, se ha reportado que infecciones intramamarias en animales pueden provocar la excreción directa de *S. aureus* en la leche cruda (Kadariya et al., 2014). En el caso de *E. coli*, su presencia en los alimentos se relaciona con malas prácticas de higiene en la manipulación y falta de tratamiento térmico adecuado, así

como con el uso de agua contaminada en el procesamiento de alimentos (Hammad et al., 2022). Estos factores, junto con las condiciones artesanales de producción y la frecuente ausencia de refrigeración durante la venta, crean un entorno propicio para la proliferación bacteriana.

En relación con la presencia de estafilococos coagulasa positivos (CPS) y coagulasa negativos (CNS) en las muestras analizadas, es importante recordar que *Staphylococcus aureus* se identifica comúnmente por ser manitol positivo y coagulasa positivo. En este estudio, la mayoría de las cepas aisladas (77%) fermentaron manitol y el 58,9% fueron clasificadas como CPS, lo que sugiere que una gran proporción corresponde a *S. aureus*. No obstante, también se detectaron cepas coagulasa negativas, lo que indica la presencia de otras especies del género *Staphylococcus* en el queso. Adicionalmente, todas las cepas enterotoxigénicas identificadas en este trabajo presentaron resultados positivos tanto para la fermentación de manitol como para la producción de coagulasa, lo cual es indicativo para *S. aureus*. Aunque otras especies coagulasa positivas como *S. intermedius* y *S. hyicus* también pueden producir enterotoxinas, *S. aureus* sigue siendo la especie más frecuentemente implicada en brotes de intoxicación alimentaria (Aragón-Alegro et al., 2007). De acuerdo con estudios previos, la producción de enterotoxinas se asocia principalmente con las cepas CPS, debido a su mayor capacidad patogénica y las cepas CNS fueron considerados bacterias comensales incapaces de causar infecciones (Banaszkiewicz et al., 2022). Sin embargo, varias investigaciones han demostrado que los CNS también pueden albergar genes codificantes de Ses por transferencia horizontal de genes, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel más significativo en intoxicaciones alimentarias (Podkowick et al., 2013; de Freitas et al., 2013).

En base en los resultados obtenidos de la detección de cepas enterotoxigénicas, se puede afirmar que la prevalencia de genes de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) en las cepas de *Staphylococcus* aisladas del queso manaba fue baja, ya que solo 7 cepas resultaron positivas,

lo que representa un 2,7% del total. Por otra parte, a nivel de muestras únicamente 6 de las 62 analizadas contenían cepas portadoras de genes de SEs, lo que equivale al 9,7% de las muestras. En contraste, diversos estudios han documentado una alta frecuencia de genes de enterotoxinas clásicas en cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche cruda y quesos frescos (Pelisser et al., 2009; Morandi et al., 2007). Esta elevada prevalencia ha impulsado múltiples investigaciones enfocadas en productos lácteos, ya que estos constituyen un medio favorable para el crecimiento y la expresión de los genes de enterotoxinas de *Staphylococcus*.

En este estudio se encontraron 3 cepas portadoras del gen *sea* y 4 cepas portadores del gen *sed*. Los genes *sea* y *sed* figuran entre los más comúnmente encontrados en cepas de *S. aureus* enterotoxigénico, siendo el primero particularmente prevalente en brotes de intoxicación alimentaria vinculados a productos lácteos y procesados (Argudín et al., 2010). Además, las enterotoxinas SEA y SED son las más comúnmente asociadas a brotes de intoxicación alimentaria a nivel mundial (Kadariya et al., 2014). Es relevante señalar que este estudio se enfocó exclusivamente en la detección de cepas que portaran genes de enterotoxinas clásicas. Por lo tanto, no se descarta la posible presencia de otras cepas con genes de enterotoxinas no evaluadas, las cuales no fueron consideradas dentro del alcance de este análisis.

En base a los resultados del inmunoensayo enzimático para la detección de enterotoxinas clásicas, se determinó que no hubo enterotoxinas en las 6 muestras de queso que tenían cepas enterotoxigénicas. Este hallazgo coincide con los resultados de un estudio realizado por Cremonesi et al., (2007), en el cual no se detectaron enterotoxinas en las muestras analizadas a pesar de que las muestras tenían cepas portadoras de SEs. Es relevante destacar que la presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento no implica necesariamente que se estén produciendo enterotoxinas (Fisher et al., 2018). La producción de enterotoxinas por cepas

enterotoxigénicas de *Staphylococcus* requiere alcanzar elevadas densidades celulares, generalmente mayores a 10^5 UFC/g. Además, la expresión de los genes que codifican estas toxinas depende de factores ambientales específicos como el pH, la actividad de agua (a_w), la concentración de sal (NaCl) y la temperatura, los cuales deben encontrarse dentro de ciertos rangos para activar su síntesis (Schelin et al., 2011). En este sentido, la composición fisicoquímica del queso puede crear un entorno favorable para la producción de enterotoxinas, al coincidir con las condiciones óptimas.

Los quesos frescos como el queso manaba presentan un pH que varía entre 6-7, lo cual crea un entorno favorable para la síntesis de enterotoxinas B, C, D y E, ya que estas se producen eficientemente dentro de ese rango. En el caso de la enterotoxina A, su producción alcanza niveles óptimos cuando el pH se encuentra entre 5.3 y 6.8 (Adams et al., 2016). Además, el queso manaba contiene una elevada concentración de sal, que puede oscilar entre el 1.5% y el 3.5%. Esta característica favorece el desarrollo de *Staphylococcus*, ya que estas bacterias toleran concentraciones de NaCl de hasta 12% (Schelin et al., 2011); sin embargo, no está dentro del rango óptimo para la producción de enterotoxinas que corresponde a 0.5%. Por otro lado, la actividad de agua (a_w) de los quesos frescos suele aproximarse a 0.99, valor que también estimula la formación de enterotoxinas, dado que el umbral mínimo para su producción se encuentra por encima de ese nivel. A esto se suma el hecho de que este tipo de queso a menudo se conserva a temperatura ambiente, lo cual favorece el crecimiento de *Staphylococcus* pero no necesariamente coincide con el rango térmico favorable para la producción de enterotoxinas que es entre 35-40°C. En conjunto, estas condiciones hacen del queso manaba un medio altamente favorable para la proliferación de *S. aureus*; sin embargo, la producción de enterotoxinas únicamente se llevará a cabo si las condiciones del queso se alinean con los parámetros óptimos.

CONCLUSIONES

El presente estudio evidenció una alta carga microbiológica en el queso manaba expendido en el Distrito Metropolitano de Quito, con una alta prevalencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, lo cual sugiere deficiencias sanitarias significativas en su cadena de producción y comercialización. Aunque se detectaron cepas portadoras de genes de enterotoxinas clásicas en el 9,7% de las muestras, no se hallaron toxinas mediante el ensayo inmunoenzimático, lo que indica que, si bien existe un riesgo potencial, no necesariamente se manifiesta en condiciones habituales de venta. Los hallazgos de este estudio reflejan la necesidad de implementar controles microbiológicos más rigurosos en la producción artesanal y una mayor capacitación a manipuladores de alimentos. Futuros estudios podrían centrarse en la caracterización de otros genes de enterotoxinas y en evaluar el efecto de variables ambientales específicas sobre su expresión en matrices alimentarias típicas del Ecuador.

TABLAS

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

# de muestra	Código	Ubicación	<i>S. aureus</i> UFC/g	Gen
1	SA013	Puembo	$>10^5$	<i>sea</i>
2	SA022	Yaruquí	$>10^5$	<i>sed</i>
3	SA022	Yaruquí	$>10^5$	<i>sed</i>
4	SA029	El Condado	1.08×10^5	<i>sea</i>
5	SA048	Florestal Baja	6.7×10^4	<i>sed</i>
6	SA049	Puengasí	$>10^5$	<i>sed</i>
7	SA058	Cumbaya	1.27×10^5	<i>sea</i>

Se presentan las muestras con cepas positivas para genes de enterotoxinas incluyendo el código de la muestra, la ubicación, recuento de *S. aureus* y gen correspondiente. Como se observa, se encontraron 7 cepas enterotoxigénicas en 6 muestras de queso.

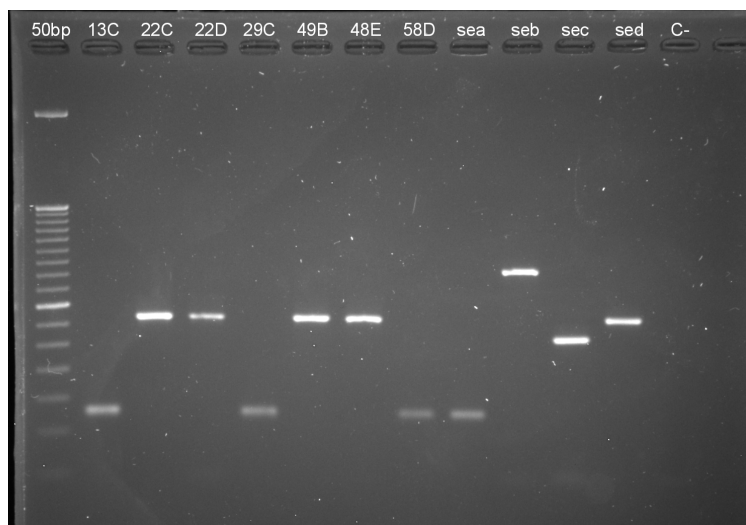
FIGURAS

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

Se observa un gel de agarosa con distintos patrones que corresponden a las cepas positivas para genes de SEs. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., Moss, M., y Mclure, P. (2013). Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry.
- Alarcón-Lavín, M.P., Oyarzo, C., Escudero, C., Cerda-Leal, F., & Valenzuela, F.J. (2017). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. *Revista médica de Chile*, 145(12), 1559-1564. <https://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872017001201559>
- Aragon-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. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–1773. doi: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
- Banaszkiewicz, S., Walecka-Zacharska, E., Schubert, J., Tabiś, A., Król, J., Stefaniak, T., Węsierska, E., & Bania, J. (2022). Staphylococcal Enterotoxin Genes in Coagulase-Negative Staphylococci-Stability, Expression, and Genomic Context. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2560.
- 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)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018). *Estimates of foodborne illness in the United States*. U.S. Department of Health & Human Services. <https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>
- Cremonesi P, Perez G, Pisoni G, Moroni P, Morandi S, Luzzana M, Brasca M, Castiglioni B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Dec;45(6):586-91. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02231.x. Epub 2007 Oct 4. PMID: 17916131.
- de Freitas Guimarães, F., Borin Nóbrega, D., Richini-Pereira, V.B., Merlo Marson, P., de Figueiredo Pantoja, J.C. & Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*; 96: 2866–2872. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5864>

- Feijoó Armijos, S. P., Pinos Sarmiento, E. S., & Ortiz Tejedor, J. G. (2023). Identificación de *Staphylococcus aureus* a partir de queso fresco expendido en mercados y centros comerciales de la ciudad de Cuenca. *Anatomía Digital*, 6(3.3), 103-118. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i3.3.2708>
- 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>
- Grispoldi, L., Karama, M., Armani, A., Hadjicharalambous, C. & Cenci-Goga, B.T. (2021). *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table, *Italian Journal of Animal Science*, 20:1, 677-690, DOI: 10.1080/1828051X.2020.1871428
- Hammad, A. M., Eltahan, A., Hassan, H. A., Abbas, N. H., Hussien, H., & Shimamoto, T. (2022). Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant *Escherichia coli* in Fresh Raw Milk Cheese. *Foods*, 11(3), 332. <https://doi.org/10.3390/foods11030332>
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/827965
- Lozano, A. (2022). Comercialización del queso manaba: Análisis de estrategias comerciales para la distribución europea en el período 2017- 2021. Universidad Tecnológica Ecotec. <https://repositorio.ecotec.edu.ec/handle/123456789/527>
- Márquez Ramos, J.G. (2012). Recuento de *Staphylococcus aureus* y detección de enterotoxinas estafilocócicas en queso blanco venezolano artesanal tipo “telita” expendido en mercados de la ciudad de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 32(2):112-115. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000200007&lng=es&tlng=es.
- Medvedova, A., Havlíková, A., & Valík, L. (2017). Staphylococcus aureus Enterotoxin Production in Relation to Environmental Factors. *InTech*. doi: 10.5772/66736
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., & 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. doi:10.1016/j.vetmic.2007.03.014

- Omwenga, I., Aboge, G. O., Mitema, E. S., Obiero, G., Ngaywa, C., Ngwili, N., ... Bett, B. (2019). Staphylococcus aureus enterotoxin genes detected in milk from various livestock species in northern pastoral region of Kenya. *Food Control*, 103: 126–132. doi:10.1016/j.foodcont.2019.04.005
- Park, C. E., Akhtar, M., & Rayman, M. K. (1994). Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods. *Applied and environmental microbiology*, 60(2), 677–681. <https://doi.org/10.1128/aem.60.2.677-681.1994>
- Pelisser, M. R., Klein, C. S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R., & Arisi, A. C. (2009). Ocurrance of Staphylococcus aureus and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 40(1), 145–148. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090001000025>
- 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>
- Rodríguez Pacheco, J. E., Borrás Sandoval, L. M., Pulido Medellín, M. O., & García Corredor, D. J. (2016). Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja, Colombia. *Revista Cubana De Higiene Y Epidemiología*, 53(3). <https://revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/47>
- R-Biopharm AG. (2025). *Product Info about RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E* (REF. R4101). <https://food.r-biopharm.com/products/ridascreen-set-abcde/>
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M. T., Lindqvist, R., Barker, G. C., & Rådström, P. (2011). The formation of Staphylococcus aureus enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6), 580–592. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.18122>
- Villa Cárdenas, K. P., Peralta Rodríguez, K. I., & Torres Segarra, S. M. (2023). Identificación de Staphylococcus aureus en quesos expendidos 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>