

## Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* SARM en quesos frescos artesanales del mercado de Puerto Escondido

### Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* MRSA in fresh artisan cheeses from the Puerto Escondido market

Ixayana Gurgua-Gutiérrez<sup>1</sup> , Mónica Marcela Galicia-Jiménez<sup>1,5\*</sup> , Irma Gisela Nieto-Castañeda<sup>2</sup> , Serafín Jacobo López-Garrido<sup>1,5</sup> , Rafael Antonio Rojas-Herrera<sup>4</sup> , José Guadalupe Gamboa-Alvarado<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup>División de Posgrado, Maestría en Producción y Sanidad Animal. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Ciudad Universitaria, Carretera Vía Sola de Vega, Puerto Escondido, CP. 71980. San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca. México.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de Ecología. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Ciudad Universitaria, Carretera Vía Sola de Vega, Puerto Escondido, CP. 71980. San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca, México.

<sup>3</sup>Instituto de Investigación de Industrias. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Ciudad Universitaria, Carretera Vía Sola de Vega, Puerto Escondido, CP. 71980. San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca, México.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Ingeniería Química, Campus de Ingenierías y Ciencias Exactas. Periférico Norte Kilómetro 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburna de Hidalgo Inn, CP. 97203. Mérida, Yucatán. México.

<sup>5</sup>Instituto de Investigaciones de Genética. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Ciudad Universitaria, Carretera Vía Sola de Vega, Puerto Escondido, CP. 71980. San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca, México.

\*Autor de correspondencia: mmgalicia@gmail.com

#### Artículo científico

Recibido: 20 de marzo 2024

Aceptado: 08 de noviembre 2024

**RESUMEN.** El consumo de quesos frescos artesanales es una práctica común debido a su importancia en la cultura gastronómica de México y Oaxaca. Sin embargo, el queso fresco se ha asociado directamente con el desarrollo de intoxicaciones alimentarias y representa uno de los mayores riesgos en la transmisión de agentes patógenos multirresistentes a antibióticos, principalmente debido a la presencia de *Staphylococcus aureus*. Esta investigación se realizó con el objetivo de caracterizar la composición y diversidad genética de los factores de virulencia y los locus del gen *mecA* de *S. aureus* en quesos frescos artesanales comercializados en el mercado de Puerto Escondido, San Pedro Mixtepec, Oaxaca. Se adquirieron 4 quesos de aro y 4 quesos en hoja en tres queserías (24 quesos), luego se realizó un muestreo aleatorio simple: técnica de cuarteo para obtener seis muestras compuestas, las cuales fueron evaluadas mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos por PCR-múltiplex. Las variables fisicoquímicas analizadas fueron NaCl y Ca, con valores de calcio entre  $15.14 \pm 0.27$  y  $28.94 \pm 0.66$ , y de NaCl entre 4.2 y 6.5%, clasificando los quesos como muy salados. Se confirmó la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y resistente a meticilina, con el cassette cromosómico estafilocócico SCCmec IV, en todas las muestras. Los genes detectados codifican para enterotoxina E y TSST-1, presentes en todas las muestras y en dos de las muestras, respectivamente. Se concluye que existe un microambiente idóneo para el crecimiento de *S. aureus* y la producción de sus toxinas.

**Palabras clave:** Intoxicación alimentaria estafilocócica, productos lácteos, seguridad alimentaria, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

**ABSTRACT.** The consumption of artisanal fresh cheeses is a common practice due to their importance in the gastronomic culture of Mexico and Oaxaca. However, fresh cheese has been directly associated with the development of food poisoning and represents one of the greatest risks in the transmission of antibiotic-resistant pathogens, mainly due to the presence of *Staphylococcus aureus*. This research was conducted with the aim of characterizing the composition and genetic diversity of virulence factors and the *mecA* gene loci of *S. aureus* in artisanal fresh cheeses sold in the Puerto Escondido market in San Pedro Mixtepec, Oaxaca. 4 ring cheeses and 4 leaf cheeses were purchased from three cheese factories (24 cheeses), subsequently, a simple random sampling was carried out: quartering technique to obtain six composite samples, were purchased from three cheese factories and evaluated through physicochemical and microbiological analyses using multiplex PCR. The physicochemical variables analyzed were NaCl and Ca, with calcium values ranging from  $15.14 \pm 0.27$  to  $28.94 \pm 0.66$ , and NaCl values ranging from 4.2% to 6.5%, classifying the cheeses as very salty. The presence of coagulase-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with the SCCmec IV staphylococcal chromosomal cassette was confirmed in all samples. The detected genes encode for enterotoxin E and TSST-1, present in all samples and in two of the samples, respectively. It is concluded that there is an ideal microenvironment for the growth of *S. aureus* and the production of its toxins.

**Keywords:** Staphylococcal food poisoning, dairy products, food safety, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

**Como citar:** Gurgua-Gutiérrez I, Galicia-Jiménez MM, Nieto-Castañeda IGM, López-Garrido SJ, Rojas-Herrera RA, Gamboa-Alvarado JG (2024) Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* SARM en quesos frescos artesanales del mercado de Puerto Escondido. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. IV: e4064. DOI: 10.19136/era.a11nIV.4064.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) se disemina por todo el mundo, adaptándose a diferentes condiciones ambientales y modula su patogenicidad, debido a la capacidad de adquirir genes por transferencia horizontal o vertical (Schaberg y Zervos 1986), incluidos genes de resistencia a múltiples antibióticos. Desde los inicios de la era antimicrobiana se han seleccionado de manera gradual cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos de importancia para el uso clínico. SARM es uno de los principales patógenos infecciosos recientes y, por lo tanto, plantea un desafío para el control de infecciones (Liu *et al.* 2016). En 1959 surgió la meticilina; resistente a la penicilinasa que produce *S. aureus*. Dicho antibiótico pertenece al grupo de los β-lactámicos. Posee tamaño molecular mayor al de la penicilina (Aguayo-Reyes *et al.* 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina (VISA y VRSA), como un patógeno prioritario de Prioridad 2: Elevada para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (OMS 2024). Actualmente, se han aislado SARM de alimentos de origen animal en diferentes países; sin embargo, sólo unos pocos estudios monitorean SARM en los alimentos, principalmente en los productos lácteos (González *et al.* 2017).

La intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) es una de las enfermedades más comunes transmitidas por alimentos en todo el mundo como resultado del consumo de alimentos que contienen enterotoxinas estafilocócicas (ES) producidos principalmente por *S. aureus* (Queiroga *et al.* 2013). Se conocen cinco tipos de enterotoxinas (A, B, C, D y E), de las cuales A es la más prevalente en los brotes de IAE (Hennekinne *et al.* 2012).

La leche y los productos lácteos se relacionan directamente con la frecuencia de aparición en la intoxicación alimentaria por estafilococos (Torres *et al.* 2021), y es mayormente asociado con brotes de intoxicación alimentaria (Kümmel *et al.* 2016, Aragão *et al.* 2021). La presencia de los microorganismos en el queso depende fundamentalmente de la calidad y tratamiento térmico de la leche, limpieza en general de la quesería, calidad de los cultivos empleados, manejo de la cuajada durante el procesamiento, temperatura de almacenamiento, transporte y distribución del queso (González-Machado *et al.* 2024). La comercialización de productos lácteos elaborados a partir de leche cruda, son una realidad en Latinoamérica, sobre todo en México, tanto en las comunidades rurales como en las áreas periurbanas de las ciudades (Adame-Gómez *et al.* 2018). Lo que aumenta el riesgo de consumir alimentos contaminados. Por ello el objetivo del artículo fue caracterizar molecularmente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, Oaxaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Los quesos frescos artesanales utilizados se adquirieron en el mercado local ubicado en la ciudad de Puerto Escondido, municipio de San Pedro Mixtepec, en el estado de Oaxaca, México.

## Toma de muestras

Se efectuó un muestreo no probabilístico por conveniencia el día 24 de agosto de 2021 se realizó la compra de cuatro quesos de aro y cuatro de hoja (queso fresco envuelto en *Xanthosoma robustum*, Araceae) conocidos comúnmente como capote o colomo (Pacheco-Trejo *et al.* 2023), en tres queserías (A, B y C); mismas que aceptaron ser parte de dicho muestreo. Los quesos se etiquetaron y se transportaron en una bolsa de primer uso proporcionadas al vendedor y colocados en hielera para mantener una temperatura de aproximadamente 10°C y llevarlos para su posterior análisis a los laboratorios de Genética y Productos Pecuarios de la Universidad del Mar y al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias de la ciudad de Guadalajara.

## Obtención de muestras compuestas

Con la finalidad de poder realizar los análisis fisicoquímicos y microbiológicos correspondientes, fue necesario obtener muestras compuestas con cantidades superiores a 700 g, para ello se realizó un muestreo aleatorio simple: técnica de cuarteo, en cada uno de los quesos adquiridos (4 quesos aro y 4 quesos hoja por quesería), y posteriormente se agruparon por tipo de queso y quesería de origen; denominadas con la literal de cada quesería (A, B y C) más la designada para el queso de aro (A) y el de hoja (H), de tal forma que se obtuvieron seis grupos nombrados: AA, AH, BA, BH, CA y CH. Al finalizar se empacaron al vacío 500 g de cada muestra, los cuales fueron identificados con sus respectivas claves y enviados al laboratorio de Nutrición Animal del Centro Universitario del Sur para que se realizaran por duplicado los análisis de humedad, proteína cruda, grasa cruda y cenizas; quienes, en vinculación con el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias de la ciudad de Guadalajara, determinaron dos veces los valores de cloruro de sodio, calcio y conductividad eléctrica. El material restante se colocó en bolsas de plástico y se guardó en un congelador para su posterior análisis. Todos los análisis se hicieron por duplicado.

## Análisis fisicoquímicos

### Temperatura y pH

Para la determinación de estas variables se utilizó un potenciómetro/termómetro con electrodo de inserción Hanna® modelo HI 99161.

### Determinación de Lugol

Se tomaron 5 g de cada una de las muestras compuestas de queso y posteriormente se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 100 mL de agua destilada, a continuación, se colocó el matraz sobre la parrilla eléctrica de calentamiento y agitación; THERMO SCIENTIFIC; modelo SP88850100. Al llegar al punto de ebullición, se procedió a dejarlo enfriar, para añadir unas gotas de Lugol (yodo y yoduro 1:2). Una coloración azul oscura; habría indicado la presencia de almidón, mientras que la tonalidad marrón indica un resultado negativo, como lo señala la NMX-F-374-1983 (SE 2021).

### Calcio, cloruro de sodio y conductividad eléctrica

Cada una de las muestras compuestas se enviaron al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias en Guadalajara, Jalisco, donde se determinaron las variables Ca, NaCl

mediante digestión con ácido nítrico y cuantificación mediante espectrofotómetro de absorción atómica, mientras que Conductividad eléctrica (CE) fue medida a través de un Conductímetro.

### Análisis microbiológico

El análisis microbiológico se realizó en el laboratorio de Genética perteneciente a la Universidad del Mar Campus Puerto Escondido, donde se extrajo el ADN genómico de las muestras compuestas de los quesos y se realizó la amplificación por PCR multiplex utilizando primers para identificación y caracterización, virulencia y determinar el tipo de cassette cromosómico estafilocócico de resistencia a meticilina (*SCCmec*).

### Cepa control

La cepa de referencia utilizada es *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* (ATCC®43300™) proporcionada por el M.C. Carlos Alberto Castañón Sánchez del Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca. Una de las características importantes de *S. aureus* es su capacidad para secretar toxinas que dañan las membranas de las células del hospedero (Castañón-Sánchez 2012) cuyas características *mecA* positivo; *SCCmec* type II positivo; resistente a meticilina y oxacilina.

### Extracción de ADN genómico

Las muestras de queso fueron desmoronadas con ayuda de guantes, se colocaron 2 g de muestra en un tubo Falcón de 50 mL estéril y se agregaron 10 mL de TEN (Tris-HCl 100 mmol, EDTA 50 mmol, NaCl 500 mmol a pH 8.0) y 5 perlas de vidrio para posteriormente ser agitadas en un vortex; DRAGONLAB MXS®, modelo 821200040000, durante 5 min, posteriormente se añadieron 20 mL de buffer lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2%) (relación 1:2) se agitaron durante 5 min, se agregaron 120 µL de proteinasa k y 120 µL de lisozima se invirtieron los tubos lentamente, con el objetivo de mezclar las muestras, durante 10 min. Posteriormente, se transfirió 1 mL de las muestras a tubos eppendorf estériles y se incubaron a 67°C durante 30 min, en una parrilla de calentamiento y agitación de la marca THERMO SCIENTIFIC; modelo SP88850100. Se agitaron los tubos cada 5 min para homogeneizar las muestras, al terminar se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min. Despues se procedió con la técnica de extracción fenol-cloroformo-isoamílico (Green y Sambrook 2012). Se verificó la extracción mediante electroforesis en gel de agarosa Promega, grado analítico al 0.8% (w/v) con buffer TAE 1X de la marca THERMO SCIENTIFIC®, como disolución de corrida. Se cargaron 5 µL del producto amplificado y 5 µL de buffer de carga a 60 volts por 37 min, utilizando para el proceso un equipo de electroforesis marca Bio-Rad®, modelo PowerPac™HC. Finalmente se tiñeron en bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 25 min, se observaron y fotografiaron en el transiluminador; UVP Benchtop® Variable Transilluminator.

### Caracterización de *Staphylococcus aureus*

La caracterización de *Staphylococcus aureus* se realizó por PCR multiplex; para ello se usaron primers específicos descritos en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Primers para identificación y caracterización de *Staphylococcus aureus*

Gen	Nombre del Primer	Secuencia del primer	Tamaño (pb)	Referencia
23S rRNA	StaphyF	ACGGAGTTACAAGGACGAC	1251	El-Sayed <i>et al.</i> (2006)
	StaphyR	AGCTCAGGCCCTAACGACTAC		
Gen factor de adhesión	clfAF	GGCTTCAGTGCTTGTAGG	900-1000	El-Sayed <i>et al.</i> (2006)
	clfAR	TTTCAGGGTCAATATAAGC		
Coagulasa (evasión inmunológica)	CoaF	ATAGAGATGCTGGTACAGG	580-660	Hookey <i>et al.</i> (1998)
	CoaR	GCTTCCGATTGTTCGATGC		
Termonucleasa (invasión)	nucF	AGTTCAGCAAATGCATCACA	400	Cremonesi <i>et al.</i> (2005)
	nucR	TAGCCAAGCCTTGACGAAC		

Para la amplificación se usó un termociclador BioRad®, la mezcla de reacción (50 µL) que contenía 1X de buffer (Promega®), 0.5 mmol de MgCl (BioTecMol), 1.25 u/µL TaQ polimerasa (Promega®), 0.2 mmol dNTP's (Sigma), primers 0.1 µM. Para el PCR multiplex de identificación y caracterización de *Staphylococcus aureus* las muestras se sometieron a ciclos térmicos donde la temperatura de alineación era de 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos, manteniendo desnaturalización a la misma temperatura por 1 min. Posteriormente hibridación a 64 °C por 2 min, 58 °C por 2 min y 57 °C por 2 min. Aunado a una extensión a 72° C por 90 seg y elongación final de 72 °C por 10 min; finalmente enfriar a -4° C. Posteriormente, se tomaron 5 µL de cada muestra resultante de la amplificación y se repitió el proceso con las mismas condiciones. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa grado analítico 2%, con buffer TAE 1X (40 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA/l, 1.14 µL/L de ácido acético glacial, pH 7.8), se cargaron 25 µL del producto amplificado y 5 µL de buffer de carga a 80 volts por 2 horas, finalmente se tiñó en bromuro de etidio durante 25 min y se observó el gel en el transiluminador.

### Perfil de virulencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Para el perfil de virulencia de *S. aureus* se usaron primers los descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Primers para el Perfil de virulencia

Proteína	Nombre del primer	Secuencia del primer	Tamaño (pb)	Referencia
Enterotoxina A	seaF	GGTTATCAATGTGGGGTGG	102	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	seaR	CGGCACTTTTCTCTCGG		
Enterotoxina B	sebF	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	164	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	sebR	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
Enterotoxina C	secF	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	451	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	secR	CACACTTTAGAACATCAACCG		
Enterotoxina D	sedF	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	278	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	sedR	ATTGGTATTTTTTCGTTC		
Enterotoxina E	seeF	AGGTTTTTCACAGGTATCC	209	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	seeR	CTTTTTTTCTCGGTCAATC		
Toxina etA	etaF	GCAGGGTGTGATTAGCATT	93	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	etaR	AGATGTCCCTATTTTGCTG		
Toxina etB	etbF	ACAAGCAAAAGAATACAGCG	226	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	etbR	GTTTTGGCTGCTTCTCTTG		
Toxina-1 del síndrome de choque tóxico	TSST-1	ATGGCTATATACATTCAATT	350	Mullarky <i>et al.</i> (2001)
	TSST-2	TTTCCAATAACCACCCGTTT		

Para la amplificación se empleó un termociclador BioRad®, la mezcla de reacción (50 µL) que contiene 1X de buffer, 0.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 u/µL TaQ polimerasa (Promega®), 0.2 mmol dNTP's (Sigma®), primers 0.08 µM. Las muestras fueron sometidas a ciclos térmicos donde la temperatura de alineación era de 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos adicionales, manteniendo desnaturización a la misma temperatura por 2 min. Posteriormente, se realizó hibridación a 55°C por 2 min. Además de una extensión a 72 °C por 1 min y una elongación final de 72°C por 5 min. Conservación a -4°C. Posteriormente se tomaron 5 µL de cada muestra resultante de la amplificación y se repitió el proceso con las mismas condiciones. Los productos de amplificación se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X (40 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA/L, 1.14 µL/L de ácido acético glacial, pH 7.8), se cargaron 25 µL del producto amplificado y 5 µL de buffer de carga a 80 volts por 2 horas, se tiñó el gel en bromuro de etidio y finalmente se observaron las bandas resultantes en el transiluminador.

#### Tipo de cassette cromosómico estafilocócico de resistencia a meticilina (SCCmec) en cepas de *Staphylococcus aureus*.

Para la amplificación se utilizó un termociclador BioRad, la mezcla de reacción (50 µL) compuesto por 1X de buffer, 0.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 u/µL TaQ polimerasa (Promega), 0.2 mmol dNTP's (Sigma), primers 0.08 µM. Las condiciones para la amplificación fueron 12 min para la elongación a 94°C, 30 ciclos de amplificación, 45 min para desnaturización a 94 °C, 1 min para la hibridación a 55 °C y 1 min a 72 °C para el proceso de extensión se concluyó con una elongación final de 10 min a 72 °C y conservación a -4 °C. Los primers utilizados se describen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Primers para determinar el tipo de cassette cromosómico estafilocócico de resistencia a meticilina (SCCmec).

SCCmec	Tipo	Nombre del Primer	Secuencia del primer	Tamaño (pb)	Referencia
Resistencia a meticilina	Control	mecAF mecAR	GAAATGGAACGTCCGATAA CCAATTCCACATTGTTCTAA	310	Rahmaniar <i>et al.</i> (2020)
locus A	I	CIF F2 CIF R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCAAGGACTACCAGC	495	Sánchez <i>et al.</i> (2013)
		KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGTGC CGAATGAAGTCAAAGAAAGTGG	284	Sánchez <i>et al.</i> (2013)
locus B	II	MECI P2 MECI P3	ATCAAGACTTGCATTCAAGGC GCGGTTCAATTCACTTGTC	209	Sánchez <i>et al.</i> (2013)
		DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	Sánchez <i>et al.</i> (2013)
locus C	II, III	RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTCGAGATATGTGG CGCITTTATCTGTATCTATCGC	243	Sánchez <i>et al.</i> (2013)
		RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	414	Sánchez <i>et al.</i> (2013)
locus D	I, II, IV	IS431 P4 pUB110R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	381	Olivera (2002)
		IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGAAAGCTTCAC	303	
locus E	III				
locus F	III				
locus G	IA				
locus H	IIIA				

## RESULTADOS

### Análisis fisicoquímicos

La prueba de Lugol que se realizó para determinar la presencia de almidón se traduce en un indicativo de si el producto es análogo o de leche. Los quesos de las tres queserías resultaron negativos para la prueba, por lo que se determina que son de leche. En el caso de los quesos frescos artesanales el valor mínimo registrado para la variable calcio fue de  $15.14 \pm 0.27$  resultado de la muestra AH y como máximo  $28.94 \pm 0.66$  obtenido de quesería CH (Tabla 4). Los quesos frescos artesanales adquiridos en el mercado de Puerto Escondido tienen altos contenidos de calcio. Para los niveles de NaCl, los valores encontrados para este compuesto van desde 4.2% que pertenece a la muestra de la quesería AH, hasta 6.5% encontrado en la quesería CH. Aun cuando los quesos del presente estudio cuentan con altos contenidos de NaCl, *S. aureus*. Con relación a la conductividad eléctrica es una medida indirecta de la concentración de sales de una solución y de su contenido bacteriano, la causa radica en que las sales son buenas conductoras de electricidad y las bacterias generan electricidad cuando respiran, el rango encontrado varió entre  $1.32 \pm 0.02$  dS/m, correspondiente a la quesería AH, y  $1.87 \pm 0.02$  dS/m, representando a la quesería B.

**Tabla 4.** Comparación entre parámetros de crecimiento de *S. aureus* y resultados fisicoquímicos.

Parámetros	Parámetros de crecimiento de <i>S. aureus</i> .		Muestras					
	Crecimiento de <i>S. aureus</i>	Producción de enterotoxinas						
			AA	AH	BA	BH	CA	CH
Temperatura (°C)	7-48	10-48	26.36	24.11	25.06	25.67	24.86	25.00
pH	4-10	4.0-9.6	6.01	6.12	6.27	6.22	6.20	6.44
aw	0.83- > 0,99 0.90- > 0,99	0.85 - > 0,99 0.90 - > 0,99	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NaCl (%)	0-20	0-10	5.77	4.19	4.25	4.84	4.61	6.45
Calcio (g/kg)	ND	ND	20.50 ± 7.05	15.14 ± 0.27	15.57 ± 0.42	16.30 ± 0.70	27.99 ± 5.38	28.94 ± 0.66
Conductividad eléctrica (dS/m)	ND	ND	1.48 ± 0.22	1.32 ± 0.02	1.58 ± 0.01	1.87 ± 0.02	1.54 ± 0.04	1.63 ± 0.02
Atmósfera	Aerobia- anaerobia	Aerobia-Anaerobia	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae

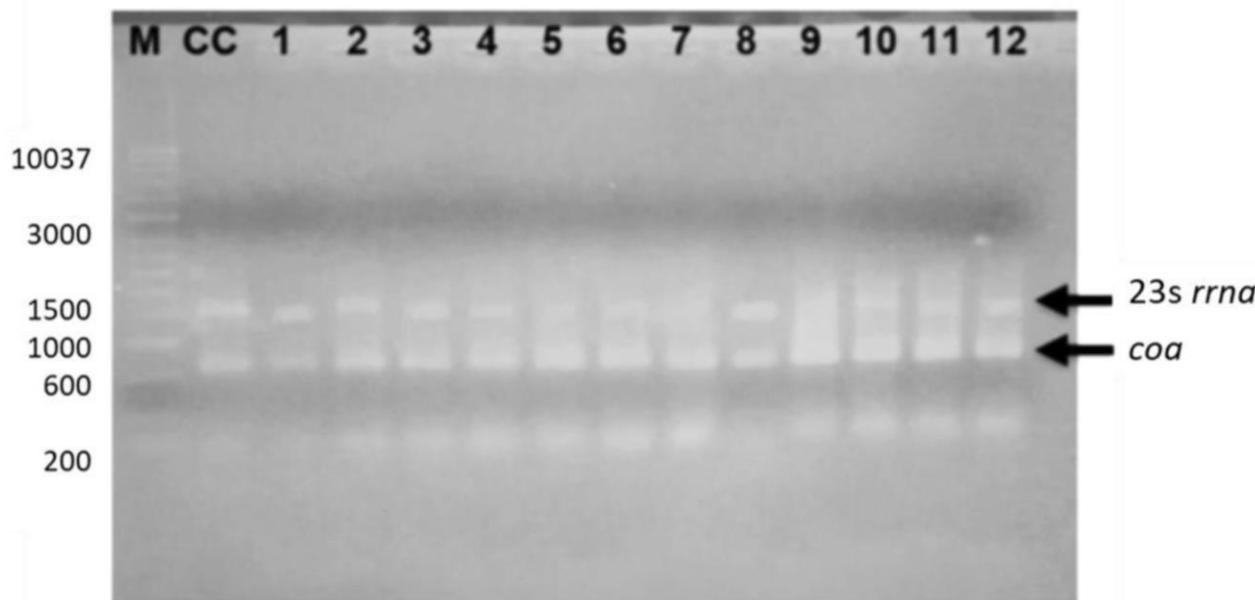
aw = Actividad de agua, NaCl = Cloruro de sodio, Ae = Aerobia, ND = No determinado.

### Caracterización de *Staphylococcus aureus*.

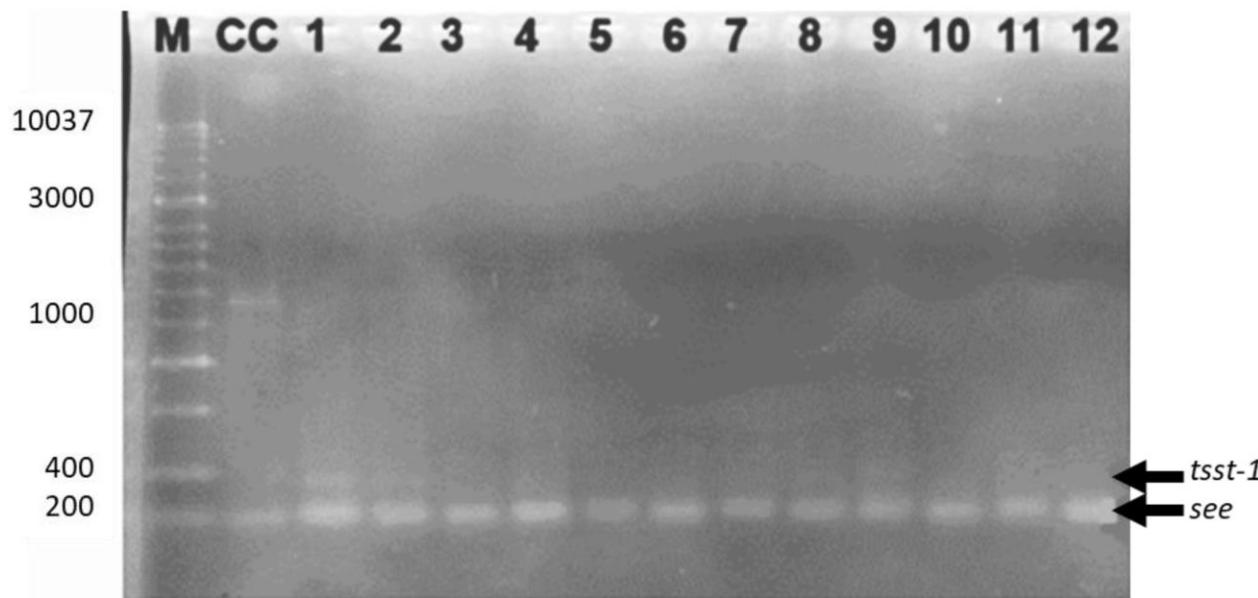
Se amplificaron los genes 23S *rrna* (1251 pb) y *coa* (660 pb) en todas las muestras (Figura 1). Sin embargo, no se logró la amplificación de los genes del factor de adhesión (*clfα*) y termonucleasa (*nuc*), probablemente debido a la variabilidad genética ya que algunos genes pueden estar ausentes o presentar mutaciones que impiden su amplificación.

### Perfil de virulencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Los genes que amplificaron (Figura 2) fueron el gen *tsst* (350 pb) que codifica para la toxina TSST-1 en todas las muestras que pertenecen a la quesería A (carril 1 y 2) y sólo 1 perteneciente a la quesería C (carril 9), el gen *see* (209 pb) que codifica para la enterotoxina E fue detectada en todas las muestras de las tres queserías.



**Figura 1.** Productos de PCR multiplex para la identificación de *S. aureus* en quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, mediante gel de agarosa al 2%. Carriles: M. Marcador Hyperladder 1Kb, CC. Cepa Control (ATCC 43300), 1. AA, 2. AA, 3. AH, 4. AH, 5. BA, 6. BA, 7. BH, 8. BH, 9. CA, 10. CA, 11. CH y 12. CH.

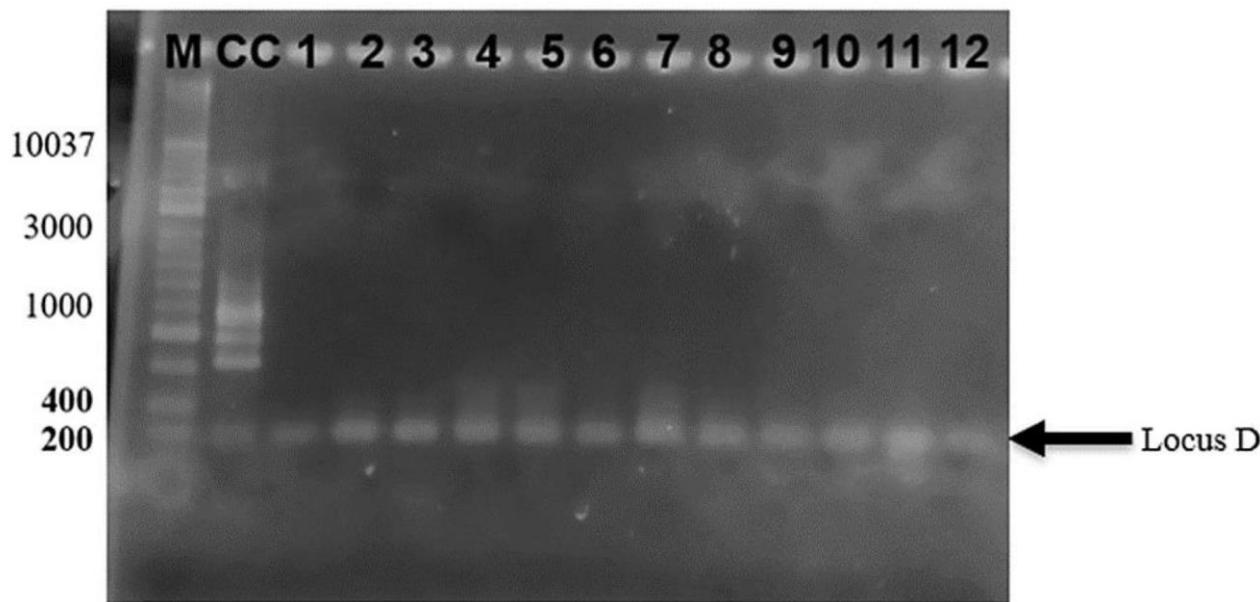


**Figura 2.** Producto de PCR multiplex para la determinación del perfil de virulencia. En quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, mediante gel de agarosa al 2%. Carriles: M. Marcador Hyperladder 1Kb, CC. Cepa Control (ATCC 43300), 1. AA, 2. AA, 3. AH, 4. AH, 5. BA, 6. BA, 7. BH, 8. BH, 9. CA, 10. CA, 11. CH y 12. CH.

#### Tipo de cassette cromosómico estafilocócico en cepas de *Staphylococcus aureus*

Se detectó una banda que corresponde al locus D (342 pb), tal y como se observa en la Figura 3. Dicho resultado es análogo para todas las muestras evaluadas. El locus D es un indicativo de la presencia de los SCCmec I, II y IV. Sin embargo, para que el cassette I se considere positivo, debe

también amplificarse el locus A, mientras que los locus B y C confirmarían la presencia del *SCCmec* II. A partir de lo anterior, al no haber amplificación del locus A, B y C.



**Figura 3.** Producto de PCR multiplex para la detección del tipo de *SCCmec*. En quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, mediante gel de agarosa al 2%. Carriles: M. Marcador Hyperladder 1Kb, CC. Cepa Control (ATCC 43300), 1. AA, 2. AA, 3. AH, 4. AH, 5. BA, 6. BA, 7. BH, 8. BH, 9. CA, 10. CA, 11. CH y 12. CH.

## DISCUSIÓN

### Análisis fisicoquímicos.

Aunque *Staphylococcus* no utiliza la respiración extracelular (Pasachova-Garzón *et al.* 2019), su actividad metabólica puede influir en la composición iónica del queso. Por ejemplo, la fermentación llevada a cabo por estas bacterias puede producir ácidos y otros compuestos que afectan la concentración de iones en el queso, alterando su conductividad eléctrica. La actividad del agua (aw) es una propiedad termodinámica principal en ciencia y tecnología de alimentos, el uso de la sal (NaCl) y otros componentes como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se utilizan para reducir la actividad del agua en el queso, limitando el crecimiento bacteriano que generalmente oscila entre 0.95 y 0.991 (Tapia 2020). Pero este rango permite el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la producción de las toxinas, 4.19 a 6.45% de NaCl de los quesos muestreados (Alejo *et al.* 2011). Los quesos analizados presentaron alto porcentaje de NaCl, superando lo reportado por Van-Hekken y Farkye (2003) donde el contenido de NaCl fue de 1 a 3% en quesos frescos.

El calcio fue de  $15.14 \pm 0.27$  como mínimo hasta  $28.94 \pm 0.66$  como máximo, por lo que de acuerdo con Domínguez *et al.* (2004), el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desempeña un papel vital en muchos procesos bacterianos, incluyendo la expresión genética y la virulencia. Al respecto King *et al.* (2020) reportan que el calcio regula la virulencia bacteriana actuando como un señalizador celular, permitiendo la comunicación y respuesta celular tanto en ambientes intracelulares como extracelulares. Además, mencionan como los patógenos bacterianos reconocen y responden al calcio del huésped, lo que desencadena

mecanismos moleculares de adhesión, formación de biopelículas, daño celular del huésped y resistencia a las defensas del huésped. El calcio también regula eventos clave en la colonización del huésped y la virulencia bacteriana, facilitando el desarrollo de infecciones persistentes. Al comparar estas variables con las condiciones de crecimiento de la bacteria (Tabla 4), se observa que los quesos artesanales comprados en queserías del mercado de Puerto Escondido, Oaxaca son microambientes idóneos para el crecimiento y la producción de toxinas de *S. aureus* (Alejo *et al.* 2011).

### Caracterización de *Staphylococcus aureus*

El 100% de las 6 muestras compuestas (24 quesos) presentaron presencia de *S. aureus* coagulasa positiva, lo cual es comparable con lo reportado en otras regiones de México. Por ejemplo, en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, en el estado de Oaxaca en México, González-Montiel y Franco-Fernández (2015), establecieron la composición de la microbiota del queso de aro que ahí se comercializa. Para ello analizaron 12 muestras de queso, la cantidad de *S. aureus* obtenidas por método tradicional fue de  $5.76 \pm 0.71$  Log<sub>10</sub> UFC/g, y en placa Petri fue de  $5.98 \pm 0.65$  Log<sub>10</sub> UFC/g,. Por otro lado, en Chilpancingo Guerrero, México, Adame-Gómez *et al.* (2018) reportaron que, el 56.4% de 78 quesos elaborados con leche de vaca no pasteurizada fueron positivos para *S. aureus*. Para el Golfo de México, Guzmán-Hernández *et al.* (2016) reportan que el 36% de las muestras analizadas contenían *S. aureus*. Por otro lado, se ha encontrado la presencia de esta bacteria en quesos frescos en Colombia (Vanegas *et al.* 2008, Herrera y Santos 2015); Ecuador (Saltos *et al.* 2018); Venezuela (Maldonado y Llanca 2008); Brasil (Komatsu *et al.* 2010) e Irán (Shanehbandi *et al.* 2014). Resaltando la presencia de esta bacteria en los quesos frescos artesanales

### Perfil de virulencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus*

El gen que codifica para la enterotoxina E (*see*) se identificó en el 100% muestras de queso, en contraste, Shanehbandi *et al.* (2014) hallaron que 34.8% de sus aislados provenientes de queso fresco, eran positivos para *sea*, 13% *seb*, 4.3% *sec* y 8.7% *see*. La enterotoxina estafilocócica E es un superantígeno que, como tal, posee características inmunomoduladoras, es termoestable, producida durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y es resistente a los jugos gástricos que se encuentran en el estómago de los hospedadores. Además de ser responsable de intoxicaciones alimentarias que presentan síntomas como diarrea y vómito, e incluso puede generar cuadros de enterocolitis. El principal medio de transferencia hacia los quesos de cepas enterotoxigénicas es por contaminación cruzada, mediante el personal que los elabora y manipula, seguido de animales que padecen mastitis clínica o subclínica (Alejo *et al.* 2011, Cervantes-García *et al.* 2014).

En cuanto a la toxina responsable del síndrome del choque tóxico (TSST-1), sólo en tres muestras de queso se detectó el gen *tsst* (25%), mientras que Ghasemi y Mahdavi (2018) determinaron que 2 de 22 aislamientos de *S. aureus* provenientes de quesos locales en el noreste de Irán, contenían el gen *tsst-1*. Mientras que Arcuri *et al.* (2010) al analizar 166 aislados de *S. aureus* de leche cruda de vaca contenida en tanques de enfriamiento de Minas en Brasil, identificaron el gen *tsst-1* en 8 aislamientos. Al respecto, *tsst-1* es uno de los agentes involucrados en causar la mastitis clínica y subclínica en animales domésticos como vacas, ovejas y cabras por lo que su presencia puede

considerarse proveniente de una ruta de transmisión de la leche hacia los alimentos que de ella se generan (Zschöck *et al.* 2000, Farahmand *et al.* 2013).

### Tipo de cassette cromosómico estafilocócico en cepas de *Staphylococcus aureus*

Se detectó el locus D tipo IV en todas las muestras compuestas de queso, caso similar fue reportado por Herrera *et al.* (2016) quienes por tipificación genética de 8 aislamientos de SARM de muestras de queso fresco (doble crema) producido con leche cruda de vaca en pequeñas lecherías, determinaron que todos los aislamientos albergaban el SCCmec tipo IV. Las distintas estructuras genéticas del complejo de genes *mec* y del complejo de genes *ccr* determinan los tipos y subtipos de SCCmec y, por otro lado, en las regiones J puede estar integrada información de resistencia a otros antibióticos y metales pesados (Liu *et al.* 2016). Los aislamientos del tipo IV provienen de personas no asociadas al ambiente hospitalario han demostrado una mayor agresividad, lo que agrava las infecciones causadas por SARM (Cavalcante *et al.* 2013). Aunque se creía que ciertos tipos de SCCmec solo podían identificarse en aislamientos hospitalarios o comunitarios, estas cepas se han aislado en ambos entornos. Esto facilita una diseminación eficiente, convirtiéndose en un problema de salud pública (Shankar *et al.* 2020).

## CONCLUSIONES

Los resultados indican que los quesos de queserías del mercado de Puerto Escondido, Oaxaca, son microambientes propicios para el crecimiento y la producción de toxinas de *Staphylococcus aureus*, lo que representa un riesgo para la salud pública local. Los datos obtenidos pueden servir como base para desarrollar estrategias de intervención que incluyan la capacitación de productores en buenas prácticas de higiene y la regulación sanitaria más estricta en los mercados locales. Este trabajo subraya la necesidad de educar a la población sobre los riesgos asociados al consumo de productos lácteos no pasteurizados y la importancia de adquirir alimentos de fuentes confiables. La colaboración entre autoridades sanitarias, productores y consumidores es esencial para mejorar la calidad y seguridad de los alimentos en la región.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

## LITERATURA CITADA

Adame-Gómez, Roberto, Toribio-Jimenez, Jeiry, Vences-Velazquez, Amalia, Rodríguez-Bataz, Elvia, Santiago Dionisio, Maria Cristina, Ramirez-Peralta, Arturo (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in artisanal cheeses in México. International Journal of Microbiology Article ID 8760357 <https://doi.org/10.1155/2018/8760357>

- Aguayo-Reyes A, Quezada-Aguiluz M, Mella S, Riedel G, Opazo-Capurro A, Bello-Toledo H, González-Rocha G (2018) Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. Revista Chilena de Infectología 35(1): 7-14.
- Alejo J, Cortes M, Correa D, Klotz C, Herrera C, Martinez J, Vanegas M (2011) Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigeno en alimentos preparados no industriales en Colombia. Instituto Nacional de Salud Subdirección de Investigación. Bogotá, Colombia. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2024.
- Carneiro Aguiar RA, Ferreira FA, Dias RS, Nero LA, Miotto M, Verruck S, De Marco I, De Dea Lindner J (2022) Graduate Student Literature Review: Enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of staphylococci from Brazilian artisanal raw milk cheeses. Journal of Dairy Science 105(7): 5685-5699. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21634>
- Aragão BB, Trajano SC, da-Silva RA, Silva BP, de Moraes-Peixoto R, Mota RA (2021) Occurrence of multi-resistant *Staphylococcus aureus* in Artisan goat coalho cheese in Northeastern Brazil. Acta Scientiae Veterinariae 49. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.117447>
- Arcuri EF, Angelo FF, Guimaraes MFM, Talon R, de Fatima-Borges M, Leroy S, Montet D (2010) Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. Journal of Food Protection 73(12): 2225-2231. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.12.2225>
- Castañón-Sánchez CA (2012) Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Evidencia Médica e Investigación en Salud 5(3): 79-84.
- Cavalcante F, Schuenck R, Caboclo R, Ferreira D de C, Nouér S, Dos Santos K (2013) Tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole at clinical laboratory: Can they help to characterize *Staphylococcus aureus* carrying different SCCmec types? Da Socieda de Brasileira de Medicina Tropical 46(1): 100-102. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-868216062013>
- Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM (2014) Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio 61(1): 28-40.
- Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM (2014) Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio 61(1): 28-40.
- Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B (2005) Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes 19(5): 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.03.002>
- SE (2021) NMX-F-374-1983. Alimentos. Almidón. Determinación cualitativa (prueba del Lugol). Método de prueba. [https://nanopdf.com/download/nmx-f-374-1983-alimentos-almidon-determinacion-cualitativa\\_pdf](https://nanopdf.com/download/nmx-f-374-1983-alimentos-almidon-determinacion-cualitativa_pdf). Fecha de consulta: 15 de marzo de 2024.
- Dominguez DC. (2004). Calcium signalling in bacteria. Molecular Microbiology 54(2): 291-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04276.x>
- Domínguez J, Aira M, Gómez-Brandón M (2009) El papel de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes: Ecosistemas 18(2). <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/61>. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2024.
- El-Sayed A, Alber J, Lämmler C, Jäger S, Wolter W, Castañeda-Vázquez H (2006) Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. Veterinaria México 37(2): 165-179.
- Farahmand AS, Ahmadi M, Dastmalchi SH, Anassori E (2013) Identification of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (tsst-1) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk, Archives of Razi Institute 68(1): 17-22.

- Ghasemi P, Mahdavi S (2018) Study of prevalence of toxic shock syndrome toxin (TSST-1) and methicillin resistance (MecA) genes of *Staphylococcus aureus* isolates from local cheese in northwest of Iran. *Gene, Cell and Tissue* 5(4): 1-5. <https://doi.org/10.5812/gct.82372>
- González AGM, Marques LMP, Gomes MDSA, Beltrão JCDC, Pinheiro MG, Esper LMR, Aguiar-Alves F (2017) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in fresh mine cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. *FEMS Microbiology Letters* 364(23): 232. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx232>
- González-Machado, Camino, Rosa Capita, Alonso-Calleja C (2024) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy products and bulk-tank milk (BTM). *Antibiotics* 13(7): 588. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070588>
- González-Montiel L, Franco-Fernández MJ (2015) Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology* 18(3): 250-257.
- Green M, Sambrook J (2012) Molecular cloning. A laboratory manual 4<sup>th</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. USA. 2028p.
- Guzmán-Hernández RL, Hernández-Vélez RM, Morales-Estrada AI, Fernández Rendón E, López-Merino A, Contreras-Rodríguez A (2016) Aislamiento e identificación de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos no pasteurizados de una zona tropical del golfo. *Revista Científica de Veterinaria* 26(5): 324-331.
- Hennekinne JA, De-Buyser ML, 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>
- Herrera F, Santos J (2015) Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes en queso doble crema artesanal. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 18(1): 29-37.
- Herrera F, García-López ML, Santos JA (2016) Short communication: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk fresh cheese in Colombia. *Journal of Dairy Science* 99(10): 7872-7876. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11322>
- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD (1998) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *Journal of Clinical Microbiology* 36(4): 1083-1089. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.1083-1089.1998>
- King MM, Kayastha BB, Franklin MJ, Patrauchan MA (2020) Calcium regulation of bacterial virulence. In: Islam M (eds) Calcium signaling. Advances in Experimental Medicine and Biology 1131. Springer, Cham. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-12457-1\\_33](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-12457-1_33). Fecha de consulta: 15 de marzo de 2024.
- Komatsu RS, Rodrigues MAM, Loreno WBN, Santos KA (2010) Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo minas frescal produzido em Uberlândia-MG. *Bioscience Journal* 26(2): 316-321.
- Kümmel J, Stessl B, Gonano M, Walcher G, Bereuter O, Fricker M, Ehling-Schulz M (2016) *Staphylococcus aureus* Entrance into the Dairy Chain: Tracking *S. aureus* from Dairy Cow to Cheese. *Frontiers Microbiology* 7: 1603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603>
- Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, Shirliff ME (2016) Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis* 101: 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.028>
- Maldonado R, Llanca L (2008) Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el Municipio Girardot, Estado Aragua, Venezuela. *Revista Científica* 18(4): 431-436.
- Marcos A (1993) Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. In: Fox PF (ed) Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_11)

- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 38(3): 1032-1035. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1032-1035.2000>
- Mullarky IK, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM (2001) *Staphylococcus aureus* agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infection and Immunity* 69(1): 45-51.
- Oliveira DC, Lencastre HD (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: <https://doi.org/10.1128/aac.46.7.2155-2161.2002>
- OMS (2024) La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2024.
- Pacheco-Trejo J, Aquino-Torres E, Prieto-Méndez J, Reyes-Santamaría MI, Pérez-Ríos SR (2023) Pises (*Xanthosoma robustum*, Araceae): Traditional knowledge and sustainable farming practices of a neglected and underutilized crop in a mexican indigenous community. *Economic Botany* 77: 1-17 <https://doi.org/10.1007/s12231-022-09562-7>
- Pasachova-Garzón J, Ramírez-Martínez S, Muñoz-Molina L (2019) *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova* 17(32): 25-38. <https://doi.org/10.25058/24629448.3631>
- Queiroga RCRE, Antos BM, Gomes AMP, Monteiro MJ, Teixeira SM, Souza EL, Pereira CJD, Pintado MME (2013) Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and Technology* 50: 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.011>
- Rahmaniar RP, Yunita MN, Effendi MH, Yanestria SM (2020) Encoding gene for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from nasal swab of dogs. *Indian Veterinary Journal* 97(2): 37-40.
- Ramírez-Navas JS, Aguirre-Londoño J, Aristizabal-Ferreira VA, Castro-Narváez S (2017) La sal en el queso: Diversas interacciones. *Agronomía Mesoamericana* 28(1): 303-316. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>
- Saltos SJV, Márquez BYJ, López AAI, Martínez AJ, Guerrero PDG (2018) La implementación de procedimientos estandarizados en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos. Conteo microbiológico del *Staphylococcus aureus* en quesos frescos. *Revista Médica Electrónica* 40(2): 371-382.
- Sánchez M, Orville H, Astrid VL, Rivas D, Marín A, González LA, Duque C (2013) Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. *Infectio* 17(12): 66-72. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(13\)70165-6](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(13)70165-6)
- Shankar N, Soe PM, Tam CC (2020) Prevalence and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among households: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases* 92: 105-113. <https://doi.org/10.1155/2014/129580>
- Schaberg DR, Zervos MJ (1986) Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 30(6): 817-22. <https://doi.org/10.1128/aac.30.6.817>
- Shanehbandi D, Baradaran B, Sadigh-Eteghad S, Zarredar H (2014) Occurrence of methicillin resistant and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in traditional cheeses in the North West of Iran. *International Scholarly Research Notices* 2: 129580. <https://doi.org/10.1155/2014/129580>
- Tapia MS (2020) Contribución al concepto de actividad del agua (aw) y su aplicación en la ciencia y tecnología de alimentos en Latinoamérica y Venezuela. *Boletín de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales* 80(2): 18-40.

- Torres-Segarra, Silvia-Monserrath, Pacheco-Cárdenas KE (2021) *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en alimentos. Vive Revista de Salud 4(12): 23-35. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.106>
- Uehara Y (2022) Current status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*)" Antibiotics 11(1): 86. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010086>
- Vanegas M, González L, Martínez A, Buitrago F (2008) Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos en Bogotá. Revista MVZ Córdoba 13(2): 1288-1293.
- Van-Hekken DL, Farkye N (2003) Hispanic cheeses: The quest for cheese. Food Technology Chicago 57: 32-38.
- Zschöck M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J, Hamann HP (2000) Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. International Dairy Journal 10(8): 569-574. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00084-4)