

# CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINAS DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE LECHE CRUDA Y QUESO FRESCO ARTESANAL EN FINCAS DEL ESTADO ZULIA

**Biochemical Characterization and Enterotoxins Production by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw Milk and Traditional Fresh Cheese in Dairy Farms of Zulia State**

**Kutchynskaya Valero-Leal<sup>1</sup>, Jhoandry Rivera-Salazar<sup>2</sup>, Emiro Valbuena<sup>3</sup>, Leonardo Boscán<sup>4</sup>, Robert Valeris<sup>4</sup>, Gustavo Castro<sup>3</sup> y Wilfido Briñez<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Bacteriología Clínica, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. <sup>2</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Facultad Experimental de Ciencias. <sup>3</sup>Unidad de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UDICTA), <sup>4</sup>Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. [kutchynskaya@gmail.com](mailto:kutchynskaya@gmail.com)

## RESUMEN

Ciento catorce cepas de *Staphylococcus aureus* se caracterizaron en base a su patrón bioquímico y producción de enterotoxinas (EEs). Las cepas fueron aisladas en nueve fincas del estado Zulia donde se elabora queso fresco artesanal. El aislamiento se realizó a partir de 313 muestras de leche provenientes de cuartos mamarios con mastitis subclínica, nueve muestras de leche de cántara, nueve muestras de cuajada y nueve muestras de queso fresco. Diecinueve patrones bioquímicos diferentes fueron detectados en los aislamientos. El patrón bioquímico A fue el predominante, observándose en el 28,9% de los aislamientos. En todas las fincas se observaron más de dos patrones bioquímicos diferentes, con un máximo de siete patrones en la finca I. En 27 aislamientos (24%) fueron detectadas enterotoxinas estafilocócicas (EEs): 13 (48,15%) aislamientos fueron positivos para la EEB, 4 (14,81%) para la EEC, 3 (11,11%) para la EEA y 2 (7,40%) para la EED. Además, tres aislamientos fueron positivos para dos diferentes enterotoxinas. Según el origen de las cepas enterotoxigénicas, el 70,4% estaban asociadas con mastitis subclínica, el 14,8% fueron aisladas en leche de cántara y 7,4% se aislaron en cuajada y queso, respectivamente. Este estudio muestra que la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina subclínica son productoras de enterotoxinas y revelan el riesgo directo para la salud que tienen los consumidores de queso fresco artesanal.

**Palabras clave:** *S. Staphylococcus aureus*, mastitis, enterotoxinas, queso fresco artesanal.

## ABSTRACT

One hundred and fourteen strains of *S. Staphylococcus aureus* were characterized based on its biochemical pattern and production of enterotoxins (SEs). The strains were isolated in nine farms in Zulia State where artisanal cheese was made. The isolates were made from 313 quarters milk samples with subclinical mastitis, nine churn milk samples, nine curd samples and nine fresh cheese samples. Nineteen different biochemical patterns were detected among isolates. The biochemical pattern A was predominant, being observed in 28.9% isolates. In all dairy farms there were more than two different biochemical patterns with a maximum of seven patterns in dairy farms I. In 27 isolates (24%) staphylococcal enterotoxins (SEs) were detected: 13(41.15%) isolates tested positive for SEB, 4 (14.81%) for SEC, 3 (11.11%) for SEA and 2 (7.40%) for SED. Furthermore, three isolates were positive for two different enterotoxins. According to the origin of the isolates enterotoxigenic, 70.4% were associated with subclinical mastitis, 14.8% were isolated from churn milk and 7.4% were isolated from curd and cheese, respectively. This study showed that most *S. aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis produced enterotoxins, and reveal that there is a direct risk to the health of consumers of artisanal fresh cheese.

**Key words:** *S. Staphylococcus aureus*, mastitis, enterotoxins, artisanal fresh cheese.

## INTRODUCCIÓN

En los países subdesarrollados, la bacteria *Staphylococcus aureus* juega un rol importante como agente causal de la mastitis bovina subclínica (MBS) [29, 53, 60]. En Venezuela,

la prevalencia de MBS se encuentra entre el 36 y el 60% [4], siendo el estado Zulia la entidad federal donde se reporta el mayor porcentaje de infecciones intramamaria, las cuales son ocasionadas en su mayoría por *S. aureus* [4, 27].

En el humano, *S. aureus* puede producir intoxicación alimentaria por la ingesta de alimentos contaminados con las enterotoxinas (EEs) que produce [33]. Aunque en la actualidad se han definido veinte tipos de EEs, las más implicadas en intoxicaciones alimentarias son: la enterotoxina A (EEA), enterotoxina B (EEB), enterotoxina C (EEC), enterotoxina D (EED) y enterotoxina E (EEE). En Venezuela, *S. aureus* es el patógeno más implicado en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) [45], asociado principalmente con quesos blancos frescos de elaboración artesanal y distribuidos en condiciones deficientes de refrigeración [50], siendo el estado Zulia la entidad con el mayor número de casos reportados de ETAs [39].

En este sentido se ha señalado, que los animales con mastitis subclínica son probablemente una de las principales fuentes de contaminación de la leche cruda con cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas, al ser excretado el patógeno en la leche de los animales infectados [48].

El queso blanco fresco es uno de los alimentos de mayor consumo en Venezuela, de hecho el 60,8% de la leche producida a nivel nacional se destina a la elaboración de quesos, donde el 33,2% está representado por los quesos artesanales y semi-industriales 17,6 y 15,5%, respectivamente [13]. El mayor productor de leche a nivel nacional es el estado Zulia y las unidades de producción de ganadería doble propósito ubicados en los municipios la Cañada de Urdaneta, Jesús Enrique Lossada y Miranda destinan la mayor parte de la leche a la elaboración de quesos artesanales [32], los cuales son fabricados en forma tradicional sin emplear métodos estandarizados y en la mayoría de los casos, en deficientes condiciones higiénicas sin ningún control sanitario, aunado a una distribución y comercialización no sujeta a vigilancia, ni controles sanitarios, adicionalmente, el almacenamiento se realiza sin refrigeración o refrigeración no controlada, representando estos productos un riesgo potencial a la salud del consumidor [8, 11].

Hasta la fecha no existen reportes en Venezuela que señalen las características fenotípicas en cuanto a capacidades bioquímicas y enterotoxigénicas de *S. aureus* aisladas de casos de MSB y en productos lácteos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar en base a su patrón bioquímico y producción de enterotoxinas clásicas, las cepas de *S. aureus* aisladas de animales con mastitis subclínica, leche de cántara, cuajada y queso fresco procedentes de nueve fincas del estado Zulia donde se elabora queso artesanal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección y características de las unidades de producción

La fase de campo de la investigación se ejecutó durante el período comprendido entre los meses de abril 2008 y enero

2009. En esta etapa se ubicaron las nueve unidades de producción (UP) que participaron en el estudio, una vez obtenida la autorización del propietario. Para la selección de las fincas se tomó en cuenta su ubicación geográfica y el destino final de la producción de la leche, además debían presentar fácil acceso por la existencia de vías de penetración y a su vez contar con la colaboración del encargado de la finca durante la toma de las muestras.

De las nueve UP, cuatro estaban ubicadas en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, en el municipio Miranda; las cinco UP restantes se encontraban localizadas en el extremo Nor-occidental del Lago de Maracaibo; tres en el municipio Jesús Enrique Lossada y dos en el municipio La Cañada de Urdaneta. En estos Municipios predomina el bosque muy seco tropical y bosque seco tropical, en ellos existe dos periodos de lluvia durante el año (abril-junio y septiembre-noviembre) y dos secos (diciembre-marzo y julio-agosto), y se caracterizan por tener una temperatura promedio entre 22 a 29°C [59].

Las UP se caracterizan por destinar la producción de leche en un 85 a 94% a la elaboración de quesos frescos artesanales [32]. Cada finca fue visitada en una ocasión durante el ordeño vespertino. El rebaño de las nueve UP estuvo conformado por animales mestizos de doble propósito. El promedio de producción de leche diario en las fincas era de 436 L/d, el número de animales en producción en las fincas varió de 40 a 123 vacas, donde se realizaba un ordeño manual con apoyo del becerro (*Bos taurus*- *Bos indicus*).

### Diagnóstico de mastitis subclínica en el rebaño

Se evaluaron en total seiscientos cuarenta y dos vacas en ordeño para diagnosticar mastitis subclínica. En cada finca se realizó la prueba de California mastitis test (CMT) (Detek, Biofluidos de Occidente, Venezuela) durante el ordeño vespertino a todas las vacas en producción, evaluándose un total de 2.511 cuartos mamarios. Se excluyeron de la investigación las vacas con signos clínicos de mastitis, de manera que el criterio de inclusión de los animales fue, la presencia de mastitis subclínica en cualquiera de los cuartos mamarios, sin tomar en cuenta la fase de lactancia y número de partos. De acuerdo a la equivalencia de los resultados del CMT con el recuento de células somáticas (RCS), en este estudio las muestras con resultados de CMT negativos, traza y 1+ (equivalente a un RCS < 800.000 células/mL leche) fueron estimados como libres de mastitis subclínica, siendo excluidos de la investigación. Los cuartos mamarios con resultados de CMT positivos 2+ y fuertemente positivos 3+ (equivalente a un RCS entre 800.000 a > 5.000.000 células/mL de leche) se tomaron como indicativos de mastitis subclínica y fueron los seleccionados para la toma de muestra. Para mantener la consistencia en los resultados, la prueba de CMT fue realizada y leída por la misma persona en las nueve fincas.

### Recolección de las muestras para cultivo bacteriológico

De las 642 vacas en ordeño, 313 presentaron resultados de CMT  $\geq 2+$  en al menos un cuarto mamario. Con fines prácticos y para disminuir costos, en aquellos animales donde existía más de un cuarto mamario con una reacción al CMT  $\geq 2+$  se recolectó en el mismo tubo estéril una muestra de leche compuesta, la cual estaba conformada por la leche proveniente de los diferentes cuartos mamarios de la vaca con una reacción  $\geq 2+$ . En total se recolectaron 313 muestras de leche provenientes del mismo número de vacas con cuartos mamarios con mastitis subclínica.

Para la toma de la muestra de leche de cuarto mamario se siguió el procedimiento descrito por el National Mastitis Council (NMC) [43]. Los pezones de cada cuarto mamario escogidos fueron lavados, secados y desinfectados; para tal fin se utilizó una solución jabonosa, seguidamente el pezón se enjuagó con agua estéril y se secó con gasa estéril, posteriormente, se desinfectó la punta del pezón con una gasa impregnada en solución yodada. Una vez finalizada la asepsia del pezón se descartó el primer chorro de leche y se procedió a recolectar la leche de los cuartos mamarios en un tubo de vidrio estéril con tapa de rosca.

Una vez finalizado el ordeño, se tomaron muestras de leche de cada una de las cántaras existentes en la finca, obteniéndose de 2 a 4 muestras dependiendo del número de cántaras en cada finca, las cuales posteriormente en el laboratorio se mezclaron para conformar una sola muestra de leche a nivel de cántara, recolectándose en total nueve muestras de leche de cántara (una por finca). Previo a la recolección de la muestra, se agitó el contenido de la cántara por al menos 30 segundos, con un cucharón de aluminio de 50 mL de capacidad, con mango de 40 cm de largo y esterilizado por autoclave (Fanem®, 415, EUA). Éste a su vez se utilizó para recolectar y depositar la muestra de leche en frascos de vidrio estériles de hasta 200 mL de capacidad.

En cada finca se esperó el proceso de elaboración de queso fresco, para recolectar una muestra de cuajada y de queso recién elaborado. Las muestras fueron obtenidas de manera aséptica, para tal fin se utilizó un cuchillo esterilizado por autoclave. Se cortaron trozos de cuajada y queso en forma de cuña (desde la superficie hacia el interior) de aproximadamente 100 g. y se introdujeron en bolsas plásticas estériles.

En total se recolectaron 340 muestras (313 de cuartos mamarios, nueve de leche de cántara, nueve cuajadas y nueve quesos) las cuales fueron transportadas en una cava con hielo hasta su llegada al laboratorio, donde se colocaron en una cava de refrigeración (Tropicold, tipo vitrina, EUA) por un período no mayor de 12 horas previo a la siembra bacteriológica.

### Recolección de datos relacionados con la rutina de ordeño y condiciones de la quesera

Durante la visita se recolectaron datos relacionados con las características de las instalaciones del local de ordeño (tipo de piso y techo, presencia de pediluvio y drenaje, lavado de la

sala antes y después del ordeño), prácticas en la rutina de ordeño (preparación de los ordeñadores, lavado y desinfección de pezones antes del ordeño, desinfección de pezones post ordeño), información concerniente a la disposición de la leche luego del ordeño (tipo de cántara, ubicación, uso de tapa, filtrado de la leche antes de ser vertida en la cántara) e infraestructura de la quesera (ubicación, características de la instalación, tipo de utensilios utilizados y presencia de otros animales). La información se registró como se observó durante la visita. Al encargado de la finca sólo se le hicieron tres preguntas cerradas para determinar si realizaban diagnóstico de mastitis subclínica, si colocaban tratamiento de vaca seca y si utilizaban antibióticos como aditivos en el alimento concentrado.

### Aislamiento e identificación de *S. aureus*

El aislamiento de *S. aureus* a partir de las muestras de leche de cuartos mamarios se realizó en base a la metodología descrita por el NMC [44]. Un volumen de 0,01 mL de leche se sembró por superficie en un cuadrante de una placa con agar base de sangre (HiMedia Laboratories, India) suplementado con sangre desfibrinada de carnero (*Ovis aries*) al 5% v/v.

Para el tratamiento inicial de la leche de cántara se midieron 10 mL de leche para hacer diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  con agua peptonada al 0,1% p/v. En el caso de las muestras de cuajada y queso se pesaron en una balanza electrónica (Ohaus, TS2KS, EUA) 10 g. de cada una y se colocaron en bolsa de Stomacher que contenía 90 mL de agua peptonada al 0,1% p/v, la homogenización se realizó en un Stomacher (Seward®, 80 Biomaster, Inglaterra). Posteriormente, a partir del homogenizado que constituyó la primera dilución se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  para realizar el recuento de *S. aureus*. Para tal fin, un volumen de 0,1 mL de las respectivas diluciones de cada muestra se sembró por duplicado en placas con agar Baird Parker (HiMedia Laboratories, India) siguiendo la metodología descrita por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) [21]. Luego de la siembra, los medios de cultivo se incubaron en una estufa (Fanem® 002CB, Sao Paulo-Brasil) en condiciones de aerobiosis a 37°C y se examinaron a las 24 y 48 h de incubación.

En el medio de agar sangre, los aislados se seleccionaron y cuantificaron según su morfología colonial (tipo de hemólisis, pigmentación, tamaño), si en la misma muestra de leche se observaban colonias que se diferenciaban en al menos una de las características morfológicas antes mencionadas, fueron consideradas como cepas distintas y se cuantificaban por separado. Del crecimiento obtenido en el agar Baird Parker se seleccionaron por muestra, cinco colonias consideradas como típicas de estafilococos coagulasa positiva (colonias negras brillantes producidas por la reducción del telurito, rodeadas de una zona opaca y de un halo claro debido a la actividad lipolítica y proteolítica de la bacteria).

La identificación preliminar de todos los aislamientos se hizo en base a la morfología colonial, coloración de Gram, pro-

ducción de coagulasa por el método de coagulasa en tubo utilizando plasma de conejo (*Oryctolagus Cuniculos*) deshidratado (Difco, Detroit, MI, EUA) (la lectura de la prueba se realizó a las 4 y 24 h de incubación), reacción a la prueba de catalasa, DNAasa y Voges-Proskauer [51], se usó la galería de pruebas API STAPH (bioMérieux, Lyon, Francia) para una identificación bioquímica más completa.

### Identificación genotípica

La extracción del ADN se obtuvo cultivando las cepas en 3 mL de caldo soya tripticasa (HiMedia, India) suplementado con 1% p/v de glucosa a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por un tiempo no mayor a 24 h. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados (Labnet, Spectrafuge 7M, EUA) a 4.000 g a temperatura ambiente y la biomasa obtenida fue lavado tres veces con buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH: 7,5). El pellet obtenido se re-suspendió en H<sub>2</sub>O destilada estéril y se llevó a ebullición por 17 (min). transcurrido el tiempo se centrifugó, y el sobrenadante se diluyó en proporción 1:10 [2].

La identificación genotípica de las cepas de *S. aureus* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para amplificar una región de 482 pb. del gen *nuc*, codificante para una nucleasa específica de la especie: (Forward 3'-AAAGGGCAATACGCAAAGA-5' y Reverse 3'-TAGCCAAGCCTTGACGAACT-5') [49]. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix (Promega, EUA) conteniendo: 100  $\mu\text{M}$  de cada uno de los nucleótidos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2  $\mu\text{M}$  de cada cebador; 1  $\mu\text{L}$  del ADN total previamente extraído y diluido y 1,25 Unidades de Taq polimerasa.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Applied Biosystem, PCR 2720, EUA) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización previa del ADN a  $94^\circ\text{C}$  por 5 min., seguido de 35 ciclos de amplificación, cuyo programa incluía: Desnaturalización: a  $94^\circ\text{C}$  por 1 min., Alineamiento de primers: a  $55^\circ\text{C}$  por 1 min., Extensión: a  $72^\circ\text{C}$  por 1 min., adicionalmente, se hizo una extensión final a  $72^\circ\text{C}$  durante 8 min.

La separación de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa (1,5% p/v) sobre una cámara horizontal para electroforesis (Thermo Electron Corporation Midicell® Primo™, EC330, EUA) sumergidos en buffer TBE (Tris 90mM-Borate 90mM-EDTA 2mM) con Bromuro de Etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 65 voltios con fuente de poder programable (Bio-Rad, Power-Pac Basic, EUA) durante 1,5 h. Los geles fueron fotografiados sobre un transiluminador (UVP-White/UV-trasilluminator, Reino Unido) con una cámara digital (KODAK EasyShare, Z650, China).

### Detección inmunológica de enterotoxinas

Las cepas de *S. aureus* se inocularon en caldo tripticasa soya e incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 18-24 h. Tras el crecimiento, el caldo se centrifugó (Clay Adams, Dynac, EUA) a 900g durante 20 min, el sobrenadante se utilizó para la detección de las ente-

rotoxinas A, B, C y D mediante la técnica de aglutinación en látex en fase reversa, SET-RPLA (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Reino Unido), siguiendo las especificaciones del fabricante.

### Análisis de los resultados

Se utilizó estadística descriptiva para determinar los porcentajes de aislamientos, patrones bioquímicos y cepas enterotoxigénicas. Se construyó una tabla de contingencia 3 x 2 con el fin de determinar la relación entre las variables (variable dependiente, cepas enterotoxigénicas y variable independiente, Municipios) mediante el estadístico Ji-cuadrado ( $\chi^2$ ). Los resultados del análisis estadístico fueron interpretados con un nivel de confiabilidad del 95%. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa Statgraphics plus versión 5.1 [57].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Infección intramamaria (IIM) subclínica

De las 313 muestras con una reacción al CMT  $\geq 2+$ , 18 (6%) resultaron contaminadas, 60 (19%) fueron negativas y 235 (75%) presentaron crecimiento bacteriano. De las nueve fincas estudiadas, ocho presentaron IIM subclínica por encima del 70%, sólo la finca G arrojó resultados más bajos (57%). Se evidenció un porcentaje muy elevado de IIM subclínica (75%), el resultado obtenido es similar a los reportados en diversas investigaciones previas realizadas en el estado Zulia, que indican que la IIM subclínica es mayor en esta zona del país con cifras superiores al 52% [4, 27, 60].

Estos resultados permiten afirmar que la IIM subclínica continua siendo una problemática para los pequeños productores de la región, probablemente debido a la falta de implementación de buenas prácticas de ordeño (BPO), las cuales son una parte fundamental de una explotación lechera, donde uno de sus objetivos es garantizar que la leche producida provenga de animales sanos para que la leche y los productos lácteos sean seguros y adecuados para el uso al que se les destina [28].

Durante la visita se pudo notar que, ninguna de las fincas poseían salas de ordeño con un diseño adecuado, debido a la falta de pediluvio y canal de drenaje, lo cual impedía la limpieza continua y ocasionaba la acumulación de excrementos mientras transcurría el ordeño, inclusive en la finca I, el ordeño se practicaba al aire libre, en una vaquera sin techo y sin piso. Así mismo, se observó falta de preparación adecuada de los ordeñadores antes de efectuar su labor (los ordeñadores no usaban uniforme, botas de hule, ni lavaban sus manos antes del ordeño). En cuanto al aseo de los pezones se constató que el mismo se realizaba en forma incorrecta; la práctica más usual fue el lavado solo con agua sin desinfectar, incluso algunos ordeñadores lavaban los pezones con la leche que se encontraba en los baldes de ordeños previos. Fue también notable el hecho que, en ninguna de las fincas se utilizaba el sellado de los pezones una vez finalizado el ordeño, práctica necesaria para reducir los índices de mastitis subclínica.

Otra característica resaltante que se observó fue que, en ninguna de las UP se aplicaba un diagnóstico rutinario de mastitis subclínica, a pesar de que existe una norma para leche cruda que recomienda esta práctica [19] y la resolución sobre leche y sus derivados [38], donde se establece que los bovinos destinados a la producción de leche deberán estar libres de mastitis.

#### Aislamiento de *S. aureus*

*S. aureus* estuvo presente en todas las fincas a nivel de cuartos mamarios, en siete fincas el porcentaje de aislamiento de *S. aureus* en las muestras cultivadas de cuartos mamarios osciló entre 25 y 45%, sólo en las fincas D y F la frecuencia de aislamiento fue inferior, 6 y 7%, respectivamente (TABLA I). Estos resultados sugieren que, la mastitis de tipo contagiosa es un problema persistente en las UP de la región [60], donde patógenos contagiosos como *S. aureus* se transmiten fácilmente en el rebaño durante el ordeño debido a la falta de implementación de BPO relacionadas con la ausencia de programas de control y prevención de mastitis [55].

La TABLA I también presenta el porcentaje global de positividad y el recuento de *S. aureus* en las diferentes muestras analizadas. En las muestras de leche de cuartos mamarios el aislamiento de *S. aureus* fue de 25%, en la leche de cántara, cuajada y queso fresco el aislamiento fue positivo en un 56; 89 y 78%, respectivamente. El recuento de *S. aureus* en las muestras de cuajada y queso fresco fue mayor que en la leche de cántara, esta diferencia en el conteo puede ser debido a que, las bacterias quedan atrapadas en el gel durante la coagulación de la leche [33], también podría deberse a múltiples fuentes de contaminación. Jørgensen y col. [33] y André y col. [5] llegaron a la conclusión que, la leche de tanque era la principal fuente de contaminación. Otros autores [31, 46] han su-

gerido que, la piel de los pezones es el principal reservorio de *S. aureus* lo que favorece la persistencia de IIM y a su vez se incrementa el riesgo de contaminación de la leche y los productos lácteos. Por su parte, Rosengren y col. [52], al estudiar el biotipo de las cepas de *S. aureus* aisladas en quesos detectaron diferentes biotipos, los autores indicaron que la diversidad obtenida era el reflejo de diversos orígenes de contaminación con *S. aureus*.

#### Identificación molecular de las cepas de *S. aureus*

De acuerdo a la morfología colonial, celular, presencia de coagulasa libre, producción de las enzimas catalasa y deoxirribonucleasa (DNasa) y producción del acetil metil carbinol determinada mediante la prueba de Voges-Proskauer, 154 cepas fueron identificadas en forma preliminar como *S. aureus*, la identificación definitiva de las cepas mediante la amplificación por PCR del gen *nuc*, confirmó molecularmente como *S. aureus* a 114 cepas (74%). Estos resultados indican que el simple uso de pruebas bioquímicas convencionales limita la identificación solo a *S. aureus*, excluyendo a otras especies que se caracterizan por ser coagulasa positiva (*S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. delphini*, *S. lutrae* y *S. pseudointermedius*) y que a su vez son de importancia en muestras de origen animal [22].

En la mayoría de los laboratorios de microbiología se utiliza, para diferenciar *S. aureus* de otras especies coagulasa positivas de origen bovino, la producción de acetil-metil-carbinol y también se ha sugerido además la fermentación de manitol, maltosa y trehalosa [22, 44], debido a que, el uso de kits comerciales para la identificación es limitado por los altos costos y las técnicas moleculares no son aplicadas por requerir inversión en equipos y materiales específicos, además de mano de obra especializada. Todo esto muestra que la no discrimi-

TABLA I  
AISLAMIENTO Y RECuento DE *S. AUREUS* DE ACUERDO AL TIPO DE MUESTRA

Tipo de muestra	Fincas	Nº muestras	Nº muestras positivas <i>S. aureus</i> (%)	Recuento <i>S. aureus</i> (ufc/mL; ufc/g)
Leche cuartos mamarios (CMT ≥2+)	A	30	9 (30)	1,67 x 10 <sup>3</sup>
	B	29	10 (34)	2,12 x 10 <sup>3</sup>
	C	49	13 (27)	8,29 x 10 <sup>3</sup>
	D	33	2 (6)	1,25 x 10 <sup>3</sup>
	E	19	5 (26)	4,16 x 10 <sup>3</sup>
	F	44	3 (7)	2,47 x 10 <sup>3</sup>
	G	60	15 (25)	3,24 x 10 <sup>3</sup>
	H	22	10 (45)	2,69 x 10 <sup>3</sup>
	I	27	10 (37)	2,86 x 10 <sup>3</sup>
Leche cuartos mamarios (Total)		313	77 (25)	3,60 x 10 <sup>3</sup>
Leche cántara		9	5 (56)	3,65 x 10 <sup>4</sup>
Cuajada		9	8 (89)	1,57 x 10 <sup>5</sup>
Queso		9	7 (78)	1,73 x 10 <sup>5</sup>

nación entre las especies coagulasa positiva impide determinar en muchos casos el verdadero agente causal de las IIM y en determinados rebaños se puede estar sobredimensionando la importancia de *S. aureus* o subdimensionando a otras especies coagulasa positivas [22].

**Caracterización bioquímica de los aislamientos de *S. aureus***

A las 114 cepas identificadas molecularmente como *S. aureus* se les determinó las características bioquímicas utilizando la galería de pruebas API STAPH, se observó que, todos los aislamientos fermentaron glucosa, fructuosa, manosa, melobiosa, rafinosa, xilitol, xilosa, y metil- $\alpha$ -D-glucopiranosida, y además fueron capaces de producir fosfatasa alcalina. Los aislamientos variaron en las siguientes capacidades bioquímicas: fermentación de manitol, sacarosa, trehalosa y N-acetilglucosamina, producción de ureasa y arginina dihidrolasa. Dos cepas no fueron capaces de producir acetil-metil-carbinol, reducir nitratos a nitritos, y fermentar maltosa, solo 1 cepa no fermentó la lactosa. La variabilidad observada permitió obtener 19 patrones bioquímicos diferentes representados por las letras A–Q (TABLA II), el patrón bioquímico A fue el predominante, observándose en 33 (28,95%) de los aislamientos, otros patrones frecuentes fueron el H (13%), K (10%) y el E (9,6%). Los aislamientos de todas las fincas presentaron más

de dos patrones bioquímicos distintos con un máximo de siete patrones diferentes observados en la finca I (TABLA III). La amplia variabilidad de las capacidades metabólicas de las cepas de *S. aureus* de origen bovino ha sido reportada previamente por otros autores [35, 47] coincidiendo con los resultados aquí demostrados.

El aislamiento de cepas de *S. aureus* sin capacidad de producir acetil-metil-carbinol y fermentar manitol, maltosa y trehalosa sugiere la existencia de cepas con patrones bioquímicos atípicos (estos resultados se mantuvieron luego de tres repeticiones). Este hallazgo es importante si se toma en cuenta que, el reporte de cepas atípicas de *S. aureus* no es muy frecuente. No obstante, no deben pasarse por alto puesto que, se han aislado cepas atípicas de *S. aureus* en explotaciones lecheras del Brasil [54], también se ha notificado un caso de intoxicación alimentaria ocasionada por una cepa atípica de *S. aureus* no fermentadora del manitol [30]; Y recientemente se ha publicado [3], el aislamiento de dos cepas de *S. aureus* variantes coagulasa negativa en vacas con mastitis subclínica en Alemania. De manera que, no se puede confiar solamente en los marcadores bioquímicos, especialmente cuando un fenotipo atípico está implicado haciéndose cada vez más necesaria la utilización de las técnicas moleculares para la correcta identificación de los microorganismos.

**TABLA II  
DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES BIOQUÍMICOS DE LAS 114 CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS**

Patrón	Nº Aislamiento	Mal	Lac	Tre	Man	Nit	VP	Sac	NAG	Adh	Ure
A	33 (28,9)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	9 (7,8)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C	8 (7,02)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D	2 (1,7)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E	11 (9,6)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	1 (0,8)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
G	1 (0,8)	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
H	15 (13,1)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
I	1 (0,8)	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
J	7 (6,1)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
K	12 (10,5)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L	1 (0,8)	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
LL	2 (1,7)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
M	3 (2,6)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
N	1 (0,8)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ñ	1 (0,8)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
O	2 (1,7)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
P	2 (1,7)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Q	2 (1,7)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Mal= maltosa; Lac= lactosa; Tre= trehalosa; Man= manitol; Nit= nitratos; VP= producción de acetil-metil-carbinol; Sac= sacarosa; NAG= N-acetilglucosamina; Adh= producción de arginina dihidrolasa; Ure= producción de ureasa.

TABLA III  
DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES BIOQUÍMICOS DE LAS 114 CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS EN 9 FINCAS

Finca	N° Aislamiento (%)	Patrón Bioquímico	N° Patrón Bioquímico
A	11 (9,65)	A, B, C, D	4
B	13 (11,40)	A, B, E	3
C	15 (13,16)	A, D, E, F, G	5
D	3 (2,63)	A, E, H	3
E	15 (13,16)	C, E, H, I	4
F	8 (7,02)	E, J, K, L, LL	5
G	19 (16,67)	E, J, K, M, N	5
H	16 (14,04)	A, B, C, E, H, Ñ	6
I	14 (12,28)	A, B, E, LL, O, P, Q	7

### Producción de enterotoxinas

La diversidad de la producción de EEs y el origen de las cepas enterotoxigénicas se muestra en la TABLA IV, donde se aprecia que de las 114 cepas de *S. aureus* examinadas para la detección de EEs clásicas, 27 (24%) resultaron ser productoras de uno o más tipos de EEs, la EE más frecuentemente detectada en las 27 cepas enterotoxigénicas fue la EEB (13/27; 48,15%), seguida por la EEC (4/27; 14,81%), EEA (3/27; 11,11%) y EED (2/27; 7,41%). Dos cepas (2/27; 7,41%) produjeron EEB+EED, 2 sintetizaron EEB+EEC y sólo una cepa produjo EEA+EEB (1/27; 3,70%).

Los métodos inmunológicos para detectar cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas han sido ampliamente usados por investigadores [12, 16, 34, 36, 41, 48, 61] en aislamientos provenientes de vacas con mastitis subclínica, leche y quesos frescos, donde se ha reportado un porcentaje de cepas enterotoxigénicas que oscila entre 12,9 y 31,1%. El porcentaje de cepas enterotoxigénicas detectado en este estudio (24%) es un hallazgo importante si se toma en cuenta que se utilizó el método de SET-RPLA, el cual sólo permite detectar las enterotoxinas clásicas, el resto de las 15 enterotoxinas descritas y reportadas por diversos investigadores en aislamientos de origen bovino [6, 10, 23, 61] e incluso implicadas algunas de ellas en intoxicaciones alimentarias [18] no son detectadas por SET-RPLA, desconociéndose la verdadera capacidad enterotoxigénica de las cepas aisladas. Hay que considerar además que, bajo ciertas circunstancias (como: pH, temperatura, actividad de agua, concentración de NaCl, composición de aminoácidos en el alimento y competencia de la microflora), las EEs no son producidas o se producen a una concentración por debajo del límite de detección del SET-RPLA (0,5 ng/mL) lo que impediría su detección [36].

Cinco cepas se caracterizaron por coproducir dos tipos diferentes de EEs este es un hallazgo que, ha sido descrito por otros autores [16, 56, 61] quienes señalan que una cepa puede abordar más de un gen se diferente.

En esta investigación se observó un predominio de producción de EEB (48,15%), resultados que coinciden con lo reportado por otros autores en leche de tanque y leche compuesta de animales con mastitis [1, 61]. No obstante, otros autores, han reportado principalmente la producción de EEC, EEA y EED por parte de las cepas de *S. aureus* aisladas en leche y quesos [12, 14, 16, 24, 37, 41, 42, 48]. Las diferencias en cuanto al tipo de EEs reportadas, indican que existe una variación geográfica en la distribución de las cepas enterotoxigénicas de *S. aureus*, lo cual puede ser el reflejo de los desiguales reservorios ecológicos en los diversos países, aunado a la sensibilidad de los métodos de detección utilizados que también pueden influir en las variaciones observadas en cuanto a los tipos de EEs producidas, sin embargo, es la diversidad del área geográfica, el tipo de manejo y el medio ambiente lo que determina a mayor grado las características de la cepa [12, 41, 42].

Aunque las cepas aisladas de *S. aureus* en brotes de intoxicación alimentaria principalmente producen EEA [29, 50], la EEB también ha sido implicada en brotes ocasionados en diversos países como Francia, Israel, Corea, Brasil y Venezuela, los cuales han estado asociados principalmente con el consumo de quesos de elaboración artesanal con leche cruda [15, 17, 25, 40].

Al analizar los resultados según el origen de las cepas enterotoxigénicas, en la TABLA IV se puede apreciar que el 70,4% (19/27) de las cepas estaban asociadas con mastitis subclínica (estos aislamientos provenían de diferentes vacas), mientras que el 14,8% (4/27) fueron aisladas en las muestras de leche de cántaras y sólo el 7,4% (2/27) se aislaron en cuajada y queso, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que las vacas con mastitis subclínica son una importante fuente de cepas enterotoxigénicas, la importancia de estas toxinas en la salud pública y en la seguridad de los alimentos ha hecho necesaria la determinación de la prevalencia de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* en mastitis bovina [41].

TABLA IV  
DISTRIBUCIÓN DE LAS EEs PRODUCIDAS POR *S. aureus* DE ACUERDO AL ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS

Enterotoxinas	Tipos de muestras					Total
	Leche Cuarto mamario	Leche cántara	Cuajada	Queso		
SEA	2	1	-	-		3
SEB	10	1	-	2		13
SEC	2	1	1	-		4
SED	2	-	-	-		2
SEA + SEB	1	-	-	-		1
SEB + SEC	2	-	-	-		2
SEB + SED	-	1	1	-		2
Total (%)	19/27 (70,4)	4/27 (14,8)	2/27 (7,4)	2/27 (7,4)		27 (100)

El recuento de *S. aureus* en los quesos analizados, estuvo entre  $1,4 \times 10^3$  UFC/g hasta  $7,8 \times 10^5$  UFC/g con un valor promedio de  $1,7 \times 10^5$  UFC/g (TABLA I), el 71% de los quesos presentaron niveles de  $10^5$  UFC/g y en los dos quesos donde se aisló *S. aureus* productor de EE la media del recuento fue de  $1,25 \times 10^5$  UFC/g. Es importante destacar que la Norma Venezolana [20] indica valores límite para la presencia de *S. aureus* en queso fresco, donde establece como requisito para *S. aureus* un recuento de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^3$  UFC/g. La cantidad de SE requerida para que se establezcan los síntomas típicos de una intoxicación alimentaria es muy baja, en el rango de 20 ng a 1  $\mu$ g, está concentración corresponde aproximadamente a  $10^5$  UFC/g de alimento [9], considerándose ese recuento como valor crítico a partir del cual es posible detectarlas.

Estos resultados destacan el riesgo potencial que tienen los consumidores de quesos frescos artesanales. En concordancia con los resultados obtenidos, otros investigadores en Venezuela han encontrado presencia de *S. aureus* en niveles importantes. Arispe y Westhoff [7] señalaron que, aproximadamente en uno de cada cuatro quesos blancos analizados (27%) encontraron presencia de *S. aureus* enterotoxigénico y que la incidencia fue mayor en los quesos blandos. Díaz y González [26] detectaron *S. aureus* en el 69% de las muestras de queso con un promedio de  $1,5 \times 10^5$  UFC/g. Ríos y Novoa [50], observaron que las muestras de queso para control sanitario y las implicadas en enfermedades transmitidas por alimento la mayoría de ellas presentaban niveles superiores a 4,0 Log.

Si bien es cierto que la presencia de *S. aureus* en los quesos artesanales está relacionada con la concentración inicial de la bacteria en la leche cruda, probablemente, el recuento evidenciado en las muestras de cuajada y queso fresco, guarden relación con las prácticas empleadas en la elaboración de los quesos a nivel de las fincas y contribuyan al aumento de la población de este patógeno. En la mayoría de las fincas (excepción, fincas F y G), las condiciones sanitarias de

la quesera no cumplían con las normas de higiene y seguridad. Se caracterizaban por ser sitios cuya infraestructura presentaba paredes y techo de laminas de zinc (finca A, B, E), y en ocasiones sólo tenían techo de zinc (fincas C, D, H, I), los materiales y utensilios usados en la fabricación tampoco cumplieron con las normas de higiene y seguridad; ejemplo de ello, era el uso de envases de plástico en lugar de tinajas de acero inoxidable para la coagulación de la leche, la cuajada era cortada con un cuchillo o en forma manual (se rompía con las manos). Otro hecho resalante era la presencia de diferentes tipos de animales en la quesera.

Al analizar los resultados por fincas se nota en la TABLA V que, en siete (78%) de las nueve fincas participantes en el estudio se aisló por lo menos una cepa enterotoxigénica de *S. aureus*, en la finca donde se aisló la mayor diversidad de cepas productoras de EEs fue la finca G, mientras que en la finca I sólo se aisló una cepa positiva para EEB. Estos resultados indican que es frecuente detectar cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* a nivel de fincas y que la producción de EEs varía entre rebaños en concordancia con lo reportado por otros autores previamente [1, 16, 33].

En base a la localización geográfica de las fincas en la región, se determinó que el porcentaje de aislamiento de cepas enterotoxigénicas varió entre los Municipios: el municipio La Cañada de Urdaneta presentó el mayor número de aislamientos (44%), seguido por el municipio Miranda (33%), mientras que el municipio Jesús Enrique Lossada presentó el menor porcentaje (23%), estos resultados fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) (TABLA V). Varios estudios muestran que existe una variación geográfica significativa en la incidencia de genes enterotoxigénicos en *S. aureus* aislados de mastitis bovina [3, 16, 24, 58, 62]. Estas observaciones indican que la producción de EEs por cepas de *S. aureus* de bovinos con mastitis puede estar influenciada por las condiciones ambientales, el área geográfica y tipo de manejo [24].

TABLA V  
DISTRIBUCIÓN DE LAS EEs PRODUCIDAS POR *S. aureus* DE ACUERDO A LA FINCA Y EL MUNICIPIO

Enterotoxinas	Fincas/Municipios									Total
	Jesús Enrique Lossada			Miranda			La Cañada de Urdaneta			
	A	B	E	C	D	H	I	F	G	
SEA	0	0	1	1	0	0	0	1	0	3
SEB	0	3	0	3	0	3	1	1	2	14
SEC	0	0	1	0	0	0	0	1	2	3
SED	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
SEA + SEB	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
SEB + SEC	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
SEB + SED	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
Total	0	3	3	4	0	4	1	4	8	27
Gran total	6 (23%)*			9 (33%)*			12 (44%)*			

\* Diferencia significativa P<0,05.

## CONCLUSIONES

El simple uso de las pruebas bioquímicas convencionales identifica erróneamente a un porcentaje considerable de cepas como *S. aureus*. Al utilizar la galería de pruebas API-STAPH las cepas de *S. aureus* aisladas en este estudio se caracterizaron por presentar un patrón bioquímico heterogéneo. La leche de cuartos mamarios con mastitis subclínica es una fuente importante de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* y aunque el porcentaje de las cepas enterotoxigénicas en las muestras de queso fue bajo, no se le debe restar importancia, puesto que los elevados recuentos obtenidos de este patógeno en el producto final lo convierten en un riesgo para la salud pública si se considera que durante la producción, distribución y venta de los quesos frescos no se toman en cuenta las medidas preventivas para evitar la producción de EEs en los alimentos.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto CC 1016-08.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADESIYUN, A.; WEBB, L.; ROMAIN, H. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **J. Food Protect.** 61: 629-632. 1998.
- [2] AGUIAR, F.; MEDEIROS, F.; FERNANDES, O.; GUDZIK, R.; PERDREAU, F.; RILEY, L. New *Staphylococcus aureus* genotyping method based on exotoxin (set) genes. **J. Clin. Microbiol.** 44: 2728-2732. 2006.
- [3] AKINEDEN, O.; HASSAN, A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. **J. Dairy Res.** 78(1):38-42. 2011.
- [4] ALONSO, F. R. Programas de control de mastitis subclínica bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo. **Rev. Vet. Venez.** XLVII: 11-67. 1981.
- [5] ANDRÉ, M.; HIDALGO, M.; BORGES, L.; ANDRÉ, K.; PIMENTA, F.; SERAFINI, Á. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Contr.** 19(2):200-207. 2008.
- [6] ARCURI, E.; ANGELO, F.; GUIMARÃES, M.; TALON, R.; BORGES, M.; LEROY, S.; LOISEAU, G.; LANGE, C.; ANDRADE, N.; MONTET, D. Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. **J Food Prot.** 73(12):2225-2231. 2010.
- [7] ARISPE, I.; WESTHOFF, D. Venezuelan white cheese: composition and quality. **J. Food Prot.** 47 (1): 27-35. 1984.
- [8] ATENCIO, O.; FARÍA, J. Propuestas para mejorar la industria quesera en Venezuela. En: **Manual de Ganadería Doble Propósito**. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Pp 676-680. 2005.
- [9] BATHIA, A.; ZAHOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A Review. **J. Clinical and Diagnostic Res.** 1 (2): 188-197. 2007.
- [10] BENDAHO, A.; ABID, M.; BOUTELDOUN, N.; CATELEJINE, D.; LEBBADI, M. Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, lben and jben, in northern Morocco. **J. Infect. Develop. Count.** 3:169-176. 2009.

- [11] BOSCÁN, M.; SANDREA, M. Análisis de los componentes del circuito lácteo venezolano. **Rev. Cien. Soc.** X (1): 131-147. 2004.
- [12] BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **Int. J. Food Microbiol.** 125: 209-211. 2008.
- [13] CÁMARA VENEZOLANA DE INDÚSTRIAS LÁCTEAS. (CAVILAC). La industria lechera en Venezuela su evolución. 2007. En Línea: <http://www.cavilac.org>. 03 de Sep. 2008.
- [14] CARDOSO, H.; SILVA, N.; SENA, M.; CARMO, L. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Let. Appl. Microbiol.** 29: 347-349. 1999.
- [15] CARMO, L.; SOUZA, R.; LINARDI, V.; SENA, M.; DOS SANTOS, D. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, Mg, Brazil. **Brazilian Arch. Biol. Tech.** 46 (4):581-586. 2003.
- [16] CENCI-GOGA, B.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P.; MORGANTE, R.; CULLOR, J. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cow. **J. Food Prot.** 66: 1693-1696. 2003.
- [17] CHA, J.; LEE, J.; YOO, J.; PARK, Y.; KIM, B.; LEE, Y. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. **J. Appl. Microbiol.** 101 (4):864-71. 2006.
- [18] CHIANG, Y.; LIAO, W.; FAN, CH.; PAI, W.; CHIOU, CH.; TSEN, H. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan International **J. Food Microbiol.** 121:66-73. 2008.
- [19] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. (COVENIN). Leche cruda. 903-93. Caracas, Venezuela. 1993.
- [20] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. (COVENIN). Queso Blanco. 3821-03. Caracas, Venezuela. 2003.
- [21] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. (COVENIN). Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. 1292-04. Caracas, Venezuela. 2004.
- [22] COSTA, G.; VILELA, L.; HILSDORF, R.; JUNQUEIRA, D.; DE PÁDUA, U.; SILVA, N. Evaluation of a simplified key for the identification of coagulasepositive *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Acta Scient. Biol. Sci.** 32 (4):403-406. 2010.
- [23] CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products **Mol. Cell. Probes** 19: 299-305. 2005.
- [24] DA SILVA, E.; SIMEÃO, L.; DA SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Vet. Microbiol.** 106:103-107. 2005.
- [25] DE BUYSER, M.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **Int. J. Food Microbiol.** 67:1-17. 2001.
- [26] DÍAZ-RIVERO, C.; GONZÁLEZ, G. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. **Rev. Salud Publ. Nutr.** 2 (3): 1-9. 2001.
- [27] FARÍA, J.; VALERO, K.; D'POOL, G.; GARCÍA, A.; ALLARA, M.; MORALES, D. Agentes bacterianos y conteo de células somáticas en leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica en cuatro fincas lecheras del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XV (1): 64-71. 2005.
- [28] FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LECHERÍA Y LA ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. (IDF-FAO). Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. Roma. Enero. 38 pp. 2004.
- [29] GIANNECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; MORENO, J. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. **Acta Vet. Scand.** 43: 221-230. 2002.
- [30] HAGA, S.; HISHINUMA, I.; ITOH, I.; KUMAGAI, N.; EGUCHI, H.; TANAKA, M. Food poisoning caused by mannitol nonfermenting *Staphylococcus aureus*: Case report. **Jpn. J. Infect. Dis.** 60: 145-146. 2007.
- [31] HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLÖF, A.; PYÖRÄLÄ, S. Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. **J. Clin. Microbiol.** 46 (11): 3728-3735. 2008.
- [32] INFOAGRO. Información agropecuaria para el estado Zulia. Ganadería de Doble Propósito. 2007. En Línea: <http://www.gdp.infoagro.info.ve/Principal.htm>. 15/01/2007.
- [33] JØRGENSEN, H.; MØRK, T.; RØRVIK, L. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. **J. Dairy Sci.** 88: 3810-3817. 2005.
- [34] KENNY, K.; REISER, R.; BASTIDA-CORCUERA, F.; NORCROSS, N. Production of enterotoxins and toxic

- shock syndrome toxin by bovine mammary isolated of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** 31: 706-707. 1993.
- [35] LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Vet. Microbiol.** 67 (2): 127-41. 1999.
- [36] LIM, S.; JOO, Y.; MOON, J.; LEE, A.; NAM, H.; WEE, S.; KOH, H. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **J. Vet. Med. Sci.** 66: 581-584. 2004.
- [37] LONCAVERIC, S.; JØRGENSEN, H.; LØVSETH, A.; MATHISEN, T.; RØRVIK, L. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxina types with single samples of raw milk and raw milk products. **J. Appl. Microbiol.** 98: 344-350. 2005.
- [38] MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. (M.S.A.S). Reglamento General de Alimentos y Resoluciones Generales. Gaceta Oficial No. 25.864-16 de Enero de 1959. Leche y sus derivados. Eduven. Caracas. 48 pp. 1976.
- [39] MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD. (MPPS). República Bolivariana de Venezuela. Dirección de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Epidemiológico. 25 pp. 2006.
- [40] MIRÓ, A.; RÍOS, M. Calidad microbiológica de los quesos blancos venezolanos, analizados en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Período: Enero 1988 a Junio 1998. **Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel.** 30: 14-20. 1999.
- [41] MOON, J.; LEE, A.; KANG, H.; LEE, E.; JOO, Y.; PARK, Y.; KIM, M.; KOO, H. Antibigram and Coagulase Diversity in Staphylococcal Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. **J. Dairy Sci.** 90:1716-1724. 2007.
- [42] MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxina genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Vet. Microbiol.** 124:66-72. 2007.
- [43] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Procedures for the collection of milk samples. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection.** 3th. Ed. Pp. 1-3. 1990a.
- [44] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Procedures for the identification of specific groups or species of microorganisms that cause mastitis. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection.** 3th. Ed. Pp. 7-34. 1990b.
- [45] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (OPS). Evaluación decenal de la iniciativa Regional de Datos Básicos de Salud. **Bol. Epidem.** 25 (3):1-16. 2004.
- [46] PICCININI, R.; CESARIS, L.; DAPRÀ, V.; BORROMEO, V.; PICOZZI, C.; SECCHI, C.; ZECCONI, A. The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. **J. Dairy Res.** 76:36-41. 2009.
- [47] RABELLO, R.; SOUZA, C.; DUARTE, R.; LOPES, R.; TEIXEIRA, L.; CASTRO, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Dairy Sci.** 88:3211-3219. 2005.
- [48] RAHIMI, E. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. **Vet. Microbiol.** 141: 393-394. 2010.
- [49] RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.; CHRASHEKAR, A.; VARADARAJ, M. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Mol. Cell. Probes.** 16: 307-314. 2002.
- [50] RIOS, A.; NOVOA, M. Apoyo del departamento de microbiología de alimentos del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) a la investigación de las enfermedades transmitidas por alimentos. **Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel.** 30: 8-13. 1999.
- [51] ROBERSON, J.; FOX, L.; HANCOCK, D. Evaluation methods for differentiation of coagulase positive staphylococci. **J. Clin. Microbiol.** 30: 3217-3219. 1992.
- [52] ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVÉN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **Int. J Food Microbiol.** 144 (2):263-9. 2010.
- [53] SHITANDI, A.; STERNESJÖ, Å. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large and small scale producers in Kenya. **J. Dairy Sci.** 87: 4145-4149. 2004.
- [54] SILVA, W.; DESTRO, M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of brazilian dairy farms. **Braz. J. Microbiol.** 31:103-106. 2000.
- [55] SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Vet. Microbiol.** 96: 91-102. 2003.
- [56] SRINIVASAN, V.; SAWANT, A.; GILLESPIE, B.; HEADRICK, S.; CEASARIS, L.; OLIVER, S. Prevalence of enterotoxina genes in *Staphylococcus aureus* isolated

- from milk of cow with mastitis. **Foodborne Pathog. Dis.** 3:274-283. 2006.
- [57] STATGRAPHICS PLUS. Paquete estadístico para windows. Versión 5.1. Warrenton, Virginia. USA. 2005.
- [58] STEPHAN, R.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.; LÄMMLER, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Vet. Microbiol.** 78(4):373-82. 2001.
- [59] URDANETA, F.; MARTÍNEZ, E.; DELGADO, H.; CHIRINOS, Z.; OSUMA, D.; ORTEGA, L. Caracterización de los sistemas de producción de ganadería bovina de doble propósito de la Cuenca del Lago de Maracaibo. En: **Manejo de la Ganadería Mestiza de Doble Propósito.** Madrid, N. y Soto E. (Eds). Maracaibo, Venezuela. Ediciones Astro Data. Pp 22-43. 1995.
- [60] VALERO-LEAL, K.; VALBUENA, E.; CHACÓN, F.; OLIVARES, Y.; CASTRO, G.; BRIÑEZ, W. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XX (5): 498 – 505. 2010.
- [61] ZOUHAROVA, M.; RYSANEK, D. Multiplex PCR and RPLA Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. **Zoonoses Pub. Health.** 55(6):313-9. 2008.
- [62] ZSCHÖCK, M.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; HAMANN, H.; LÄMMLER, CH. Pattern of enterotoxina genes *seg*, *she*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet. Microbiol.** 108: 243-249. 2005.