



Oficio No. BIOSAC/C-884/2023
Asunto: Modalidad de Titulación

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de Administración Escolar, BUAP
PRESENTE

Por este conducto le envío un cordial saludo, así mismo me permito informarle que la **C. ANDREA MONTERRAT GARCIA BARRALES** con número de matrícula **201627239** de la Licenciatura en Biotecnología, presentará su Examen Profesional con el título de tesis: **Tipificación molecular de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de muestras de leche y queso mediante RAPD-PCR.** Bajo la Dirección de la Dra. Fabiola Avelino Flores. La asignación del Jurado quedará integrado por:

PRESIDENTE: DRA. EDITH CHAVEZ BRAVO
SECRETARIO: DRA. FABIOLA AVELINO FLORES
VOCAL: DR. CARLOS ALBERTO CONTRERAS PAREDES

El examen profesional se llevará a cabo **presencial el día 13 de julio de 2023 a las 11:00 horas.**

Sin otro particular por el momento, me despido de usted reiterándole la seguridad de mi consideración distinguida.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 06 de julio de 2023

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
Director

Oficio No. BIOSAC/C-884/2023

Asunto: Modalidad de Titulación



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Tipificación molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras de leche y queso mediante RAPD-PCR

ANDREA MONTSERRAT GARCIA BARRALES

DIRECTOR (A): DRA. FABIOLA AVELINO FLORES



JULIO 2023

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas involucradas en la creación de este trabajo, a la Dra. Fabi por confiarme su gran proyecto y por todo su apoyo durante el proceso, a mis compañeros y amigos de laboratorio, Omar, Jafet, gracias por hacerme todo este proceso mucho más llevadero.

A mi familia, mis papás, mis hermanos, abuelita, primos-hermanos, tíos, gracias por todo su apoyo incondicional, por siempre estar ahí para mí y saberme aconsejar, forman una parte clave en todo este proceso.

Y principalmente gracias a mi ángel que se encuentra en el cielo, sin todos tus consejos del tiempo que compartimos juntos me hubiera sido más difícil lograrlo.

Dedicatoria

Para mi ángel en el cielo, me hubiera gustado que me vieras terminar mi carrera como se debe. Y para mis ángeles en la tierra, sin su apoyo incondicional habría sido más difícil todo.

Índice

1. Resumen/Abstract	5
2. Introducción	7
3. Antecedentes generales	11
3.1 Queso	11
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.3 Resistencia a antibióticos de <i>S. aureus</i>	14
3.4 Enfermedades transmitidas por alimentos	14
3.5 Intoxicación estafilocócica	15
3.6 Mastitis bovina	16
3.7 Técnicas moleculares para la detección de patógenos en alimentos	18
3.8 Técnicas moleculares para <i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.9 Random Amplified Polimorphic (RAPD-PCR)	19
4. Antecedentes específicos	20
5. Justificación	22
6. Objetivo general	23
7. Objetivos específicos	23
8. Hipótesis	23
9. Metodología	24
10. Resultados	29
11. Discusión	53
12. Conclusión	57
13. Referencias	57
Anexo 1	65

1. Resumen

Staphylococcus aureus es un patógeno importante transmisor de importantes enfermedades, cuando este se encuentra en los alimentos, si se trata de una cepa virulenta, puede ocasionar intoxicación estafilocócica debido a que genera enterotoxinas t. El queso es un derivado de la leche, producto sustrato de esta bacteria. En este trabajo se realizó la tipificación molecular de 83 cepas provenientes de muestras de queso fresco de los estados de Puebla y Tlaxcala y muestras de leche, provenientes de vacas con mastitis, de la zona de la Comarca Lagunera. La mayoría de las cepas recuperadas de las muestras presentaron resistencia a los antibióticos Ampicilina, Penicilina y Gentamicina y gran parte de ellas fueron sensibles a Vancomicina. Se lograron obtener 3 grandes grupos (A, B y C) en los cuales se puede observar gran similitud genética entre diferentes muestras y estados, se pueden detectar porcentajes de similitud de 100%, 90%, 60%, 30% y menos de 30% por ejemplo, muestras de la Comarca Lagunera (K3, L3, K2) presentan similitud del 100%, colonias de la muestra 3 de Tlaxcala (TM35, TM36, TM37 y TM38) presentan similitud del 90% con una colonia de la muestra 3 de Puebla (PM37). En general se puede observar una gran diversidad genética entre aislados de diferentes estados y por consiguiente dos zonas diferentes de México.

Abstract

Staphylococcus aureus it's a pathogen that transmits important diseases, this can cause a staph intoxication as it generates enterotoxin in the product. The cheese is derivate from the milk, substratum of this bacteria. On this essay we run tests and molecular typing from 83 different cheese samples from fresh chesses that came from states like Puebla, Tlaxcala, and the Comarca Lagunera. Most of the samples presented resistance to the antibiotics Ampicillin, Penicillin and Gentamicin and a large part of them were sensitive to Vancomycin. We have obtained 3 large groups (A, B and C) in which there are a lot of genetic similarity between different samples

and states, we can see percentages of 100%, 90%, 60%, 30% and less than 30% as an example, the samples from the lagoon region (K3, L3, K2) presents similarities of 100, colonies from sample 3 from Tlaxcala (TM35, TM36, TM37 and TM38) have similarities of 90% with a colony from sample 3 taken from Puebla (PM37). In general, we can observe a great genetic diversity from samples taken on different states and regions of Mexico.

2. Introducción

Actualmente el riesgo de contaminación microbiológica en productos alimenticios frescos es muy alto debido a los grandes peligros de manufactura a los que son expuestos, desde la obtención de la materia prima para su elaboración hasta la adquisición y el consumo del producto.

Así pues, la higiene de los alimentos abarca todo el conjunto de condiciones y medidas necesarias para certificar su seguridad y salubridad incluida también la manipulación, desde el momento en el que se adquiere el alimento en un punto de venta hasta que se prepara y consume, por parte del consumidor. Esta seguridad alimentaria se logra mediante un adecuado control de calidad de la materia prima durante su elaboración hasta obtener un producto óptimo y de muy buena calidad, pero de igual forma es de suma importancia que se lleven a cabo condiciones adecuadas de almacenamiento, transporte y manipulación del producto final en los mercados o puntos de venta donde se comercializa (Delgado y Torres, 2003).

Los alimentos pueden contaminarse con diversos tipos de agentes que pueden llegar cambiar o no sus características organolépticas y fisicoquímicas, y de acuerdo con el agente contaminante se clasifican en contaminación física, química y biológica, esta última es la de mayor interés en el área de inocuidad ya que los microorganismos presentes en el alimento son los principales causantes de la mayoría de las intoxicaciones alimentarias (Eley y Fuente, 1992) En México, según la SENASICA, la intoxicación alimentaria alcanza los 500 mil casos al año lo cual es un grave problema de salud.

La leche y sus derivados constituyen una excelente base para la proliferación de microorganismos debido a su gran contenido de nutrientes, es por eso que es de suma importancia determinar la calidad higiénica y sanitaria de estos productos, entre ellos el queso, ya que este derivado es uno de los de mayor consumo popular. La presencia de patógenos en este producto, como es el caso de *S. aureus*, puede disminuir considerablemente por medio de una adecuada higiene y buenas prácticas de manufactura (Delgado y Torres, 2003).

En México la elaboración de quesos está regulada por las Normas Oficiales Mexicanas NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba y NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, Queso-denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba.

Se tiene bien sabido que existen alrededor de 40 diferentes patógenos de origen alimentario las cuales causan enfermedades humanas, dichos patógenos son asignados a bacterias entre las cuales las más comunes están *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp.* y *Staphylococcus aureus*, por mencionar algunos. Sin embargo, alrededor del 98% de los microorganismos encontrados en los productos alimenticios no son patógenos (Palomino y González, 2014).

La detección de este tipo de bacterias se hace principalmente con el uso de métodos microbiológicos clásicos los cuales implican el uso de enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos y después la confirmación con pruebas bioquímicas morfológicas y/o serológicas, aunado a esto, se han desarrollado métodos moleculares alternativos o complementarios los cuales son rápidos y sensibles para la detección, identificación y cuantificación de estos patógenos presentes en los alimentos, dentro de estos métodos se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polimerase Chain Reaction) (Palomino y González, 2014).

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena oportunista, presenta comportamiento adaptativo, aislada comúnmente de la leche cruda obtenida de las granjas de ganado vacuno con mastitis y una de las principales causas de infecciones en el torrente sanguíneo y enfermedades transmitidas por los alimentos. Dichas enfermedades se pueden deber por diferentes acciones como la capacidad de este patógeno de producir toxinas, así cuando se ingieren alimentos, como la leche y sus derivados contaminados por estas toxinas, es muy probable que ocurra una intoxicación (Zendejas-Mazo, *et al.*, 2014).

Esta bacteria está involucrada en una variedad de infecciones en humanos y en animales; siendo una causa importante de mastitis bovina la cual es una de las enfermedades más costosas en la industria láctea. Algunas cepas de esta especie bacteriana son responsables de la intoxicación alimentaria por la producción de sus enterotoxinas estafilocócicas (SE) las cuales causan dolor abdominal, náuseas, emesis y diarrea, y son resistentes a las proteasas gastrointestinales humanas (Zare, *et al.*, 2019).

Al presente, la identificación de cepas de *S. aureus* se puede realizar mediante la técnica de PCR; existen diferentes protocolos de esta técnica que se han llevado a cabo para la detección de esta bacteria, identificando genes como *nucA*, *coaA*, *femA* o *femB* (Hamdan, *et al.*, 2015). El gen *nucA* que codifica para la enzima termonucleasa extracelular (TNasa), es generada por casi todas las cepas de *S. aureus* con una frecuencia similar a las que producen la enzima coagulasa. Estas dos enzimas son de gran interés clínico ya que su presencia en las cepas de esta bacteria nos indica que el patógeno puede generar virulencia (Brakstad, *et al.*, 1992).

Sin embargo, aunque las pruebas para la identificación bacteriana son importantes para determinar la identidad del microorganismo, éstas no aportan información sobre la variabilidad genética entre las cepas bacterianas recuperadas (Meza, *et al.*, 2006). Es importante, cuando se estudia con una diversidad de cepas de patógenos, tener en cuenta técnicas moleculares que sean de ayuda para determinar su relación genética y eso se puede lograr gracias a técnicas de tipificación molecular.

Tradicionalmente, las técnicas de tipificación se han clasificado en fenotípicas, las cuales se basan en características bioquímicas o fisiológicas, y genotípicas o moleculares, basadas en el estudio de su ADN. A diferencia de las técnicas de tipificación fenotípicas, las de tipificación molecular pueden aplicarse a un mayor número de especies microbianas, son más reproducibles y tienen un gran poder de discriminación, el interés de ellas está en establecer la relación genética que existe entre los diferentes aislados implicados en un estudio. Los métodos moleculares de tipificación molecular se pueden clasificar en 3 diferentes categorías: 1) basadas en

perfiles de restricción del ADN, 2) las que se fundamentan en la amplificación de secuencias de ADN mediante PCR y 3) basadas en la secuenciación parcial de genes (Cuenca, *et al.*, 2013).

Basándonos en la segunda categoría, estas analizan una pequeña porción del cromosoma bacteriano, su amplificación se realiza usando como diana, secuencias de ADN polimórficas que se encuentran en todo el cromosoma. Una de las técnicas más usadas es la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR), esta técnica se ha descrito como una técnica rápida, poco laboriosa, de razonable poder de discriminación para la tipificación de cepas de una misma especie y permite un análisis sencillo de sus patrones de bandas (Pachá, 2015).

Es por eso que el objetivo de este trabajo es analizar, por medio de la técnica de RAPD-PCR, diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos obtenidos de diferentes mercados, tiendas y cremerías artesanales de los estados de Tlaxcala y Puebla, así como de muestras de leche de vacas con mastitis de la Comarca Lagunera, proporcionadas por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con el fin de determinar qué tan cercanas genéticamente se encuentran o si son parecidas o no.

3. Antecedentes generales

3.1 Queso

El queso es un producto derivado de la coagulación de la leche ya sea cruda o pasteurizada. Una definición más completa es la dada por la FAO/OMS en el *Codex Alimentarius* (1978), en donde definen al queso como el producto sólido o semisólido, madurado o fresco, en el que el valor de la relación proteínas del suero/caseínas no supera al de la leche y que es obtenido por medio de la coagulación de la leche con la acción del cuajo y de otros agentes coagulantes de tipo ácido (comúnmente ácido láctico).

El método de elaboración de un queso fresco se resume en el siguiente diagrama.

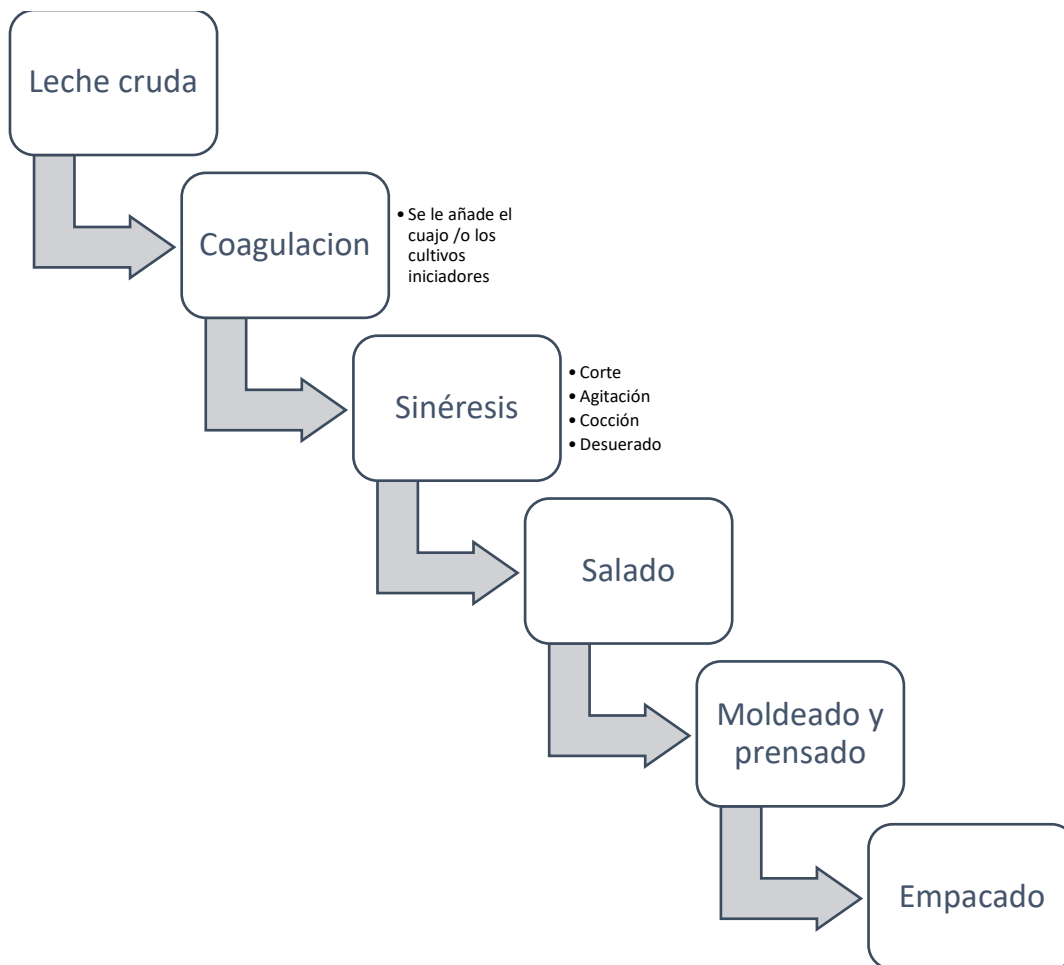


Diagrama 1. Elaboración general de un queso fresco (panela, blanco y fresco). Fuente: Ramírez y Vélez, 2012.

3.2 *Staphylococcus aureus*

Se trata de una bacteria que se encuentra ampliamente dispersa en el ambiente. Fue descubierta por el médico Alexander Ogston que en 1880 introdujo el nombre de *Staphylococcus* del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, y es considerado un patógeno con gran potencial para causar diversas infecciones en el humano y en los animales (Cervantes et al., 2014).

Pertenece al grupo de los estafilococos los cuales son cocos Gram + que miden de diámetro entre 0.5 y 1.5 μm , no móviles, no esporuladas, aerobios y anaerobios facultativos y fermentadores de glucosa. Crecen en rangos de pH de 4.8 a 9.4 a temperaturas de 25 a 43° C. Por su parte el género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes las cuales son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas (Aguas et al., 2017).

Su identificación puede realizarse con el empleo de tinción de Gram, pruebas bioquímicas como la de catalasa, fermentación de glucosa que permite poder diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus* la cual también se considera catalasa positiva, pero no fermenta la glucosa. Otra prueba, la cual es la más utilizada, es la coagulasa basada en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma, su detección permite diferenciar a *S. aureus* coagulasa positivo de otras especies de estafilococos coagulasa negativos. De igual forma se puede identificar a través de técnicas moleculares como la PCR punto final y PCR en tiempo real, aunque en ocasiones en las que se requiere identificar cepas o grupos de cepas epidemiológicos se emplean técnicas fenotípicas y genotípicas (Cervantes et al., 2014).

Staphylococcus aureus se puede aislar en medios de cultivo microbiológicos tradicionales después de incubarse durante 18-24 horas. Sus colonias se aprecian lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, con consistencia cremosa y pigmentación que va de amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides. Es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de cloruro de sodio (NaCl). Crece bien en medios de cultivos no selectivos como agar sangre, agar chocolate y medios líquidos para hemocultivo,

sin embargo, se recomienda usar el agar sal manitol para su aislamiento por su elevado contenido de sal que inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas, así mismo esta bacteria fermenta el manitol generando un cambio de color en el medio que vira de rojo pálido a amarillo (Cervantes et al., 2014).

S. aureus es una bacteria muy importante, no sólo porque ocasiona infecciones en diferentes partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias causante de enfermedades al ser transmitida por alimentos (ETA) (Zendejas et al., 2014).

El genoma de *S. aureus* es una molécula circular, con una longitud de aproximadamente 2.8 kb con contenido bajo de C-G (33%), presenta un gran número de elementos móviles (plásmidos, secuencias de inserción y transposones) que contienen factores de virulencia y resistencia a numerosos antimicrobianos (Cervantes et al., 2014).

Es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, es oportunista y forma parte del microbiota intestinal ya que poco después del nacimiento los neonatos son colonizados por *S. aureus* los sitios de colonización incluyen el muñón del cordón umbilical, el área perineal, la piel, y a veces el tracto gastrointestinal, aunque el área de mayor colonización es la mucosa nasal (Cervantes et al., 2014).

Su patogenicidad se relaciona con diferentes componentes de su superficie bacteriana que son de manera general, peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de proteína A. La patogenia se produce cuando existe la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped, esto propicia que *S. aureus* posea características de virulencia, aunado a esto la situación se agrava debido a que el patógeno ha ido desarrollando resistencia a los antibióticos causando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la sanación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (Zendejas et al., 2014), tanto que se le agrupa actualmente en las bacterias ESKAPE.

3.3 Resistencia a antibióticos de *S. aureus*

Hoy en día *S. aureus* posee una amplia resistencia a antibióticos, y puede haber cepas resistentes y multirresistentes, esto se debe principalmente al intercambio horizontal de genes transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción.

El uso de la penicilina a principios de los 40's para el tratamiento contra la infección de esta bacteria fue muy importante para vencer las enfermedades causadas por este microorganismo, no obstante, para mediados de 1950 se observó que aislamientos de *S. aureus* señalaron niveles elevados de resistencia y a principios de los 60' la mayoría de los estafilococos adquirieron resistencia a la mayoría de los antibióticos existentes.

Debido a esta resistencia se usó meticilina como antibiótico tratante de la enfermedad ocasionada por esta bacteria en 1959 y un año después se registró la primera cepa meticilina resistente.

La vancomicina se introdujo de manera global a principios de los años 90 cuando como único antibiótico positivo contra *S. aureus*, sin embargo, para 2002 se detectaron las primeras cepas resistentes a este antibiótico (Bustos, *et al.* 2006).

3.4 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Como se ha mencionado anteriormente *S. aureus* es uno de los principales agentes causantes de ETA a nivel mundial. Este patógeno causa intoxicación, la cual se debe a la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxinas termoestables producidas por esta bacteria (Aguas et al., 2017).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por consumir alimentos contaminados con toxinas microbianas o con una o varias bacterias patógenas. Esta contaminación generalmente se presenta por el contacto de los alimentos con los encargados en producirlos, es decir, con aquellas personas que están en contacto directo con ellos o de lo contrario la contaminación puede ser endógena o porque se contaminó en algún momento de su transformación (Zendejas et al., 2014).

La manifestación clínica más común de una ETA consiste en la generación de síntomas gastrointestinales (Aguas et al., 2017).

Existen dos categorías de ETAs, las intoxicaciones alimentarias que son causadas por toxinas producidas por estos microorganismos y las infecciones alimentarias las cuales son causadas por la colonización de los microorganismos en el cuerpo humano posterior a haber ingerido a los alimentos contaminados. Aunque los mecanismos de acción son diferentes principalmente se usa el término intoxicación alimentaria para referirse a cualquiera de los dos casos (Perdomo y Meléndez, 2004).

3.5 Intoxicación estafilocócica

La intoxicación provocada por esta bacteria se debe principalmente por brotes originados por *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva ya que muy pocas cepas que son coagulasa negativa son capaces de producir enterotoxinas. Es importante mencionar que las enterotoxinas estafilocócicas son de las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteica que presentan termorresistencia (Zendejas et al., 2014).

Las enterotoxinas son proteínas antigénicas las cuales representan una toxicidad por producir una reacción antígeno anticuerpo desencadenando un cuadro clínico de intoxicación. En este caso las toxinas estafilocócicas son denominadas así porque son producidas por el patógeno *Staphylococcus aureus* el cual es capaz de generar componentes superficiales como las toxinas y enzimas extracelulares, estos componentes son capaces de provocar severas intoxicaciones alimentarias dependiendo de la cantidad que se ingiera del alimento, por lo tanto la intoxicación estafilocócica se debe a las toxinas preformadas en los alimentos cuando el organismo causal crece en su interior. Los tipos de toxina que produce este microorganismo se clasifican en A, B, C, D y E siendo la más frecuentemente implicada en casos de intoxicación la enterotoxina A (Zendejas et al., 2014).

Los síntomas característicos de esta intoxicación son náuseas vómitos dolor abdominal y diarrea se pueden desarrollar entre 1 y 6 horas después de haber

consumido el alimento contaminado. Pueden llegar a ocurrir otros síntomas con menor frecuencia como dolor de cabeza y disnea, generalmente los síntomas no persisten más allá de 24 horas, pero en casos graves puede haber deshidratación originando descompensación electrolítica, las muertes por intoxicación estafilocócica son raras y puede llegar a ocurrir en ancianos niños o personas débiles por alguna otra enfermedad (Díaz y González, 2001).

Un alimento puede constituir un riesgo por intoxicación alimentaria por *S. aureus* cuando se confirma la presencia de alguna de sus enterotoxinas o se obtiene una carga de microorganismo igual o superior a 10^5 UFC/g. Según la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994 entre las razones para determinar *Staphylococcus aureus* en alimentos están, confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario, determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico, demostrar la contaminación postproceso usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.

Los alimentos que son propicios a contaminación post proceso tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva que normalmente prohíbe el crecimiento de éste y la producción de enterotoxina. En dichos alimentos se encuentran los perecederos como las carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche los cuales son los comúnmente asociados con la intoxicación estafilocócica (Borbolla et al., 2004).

3.6 Mastitis bovina

El término Mastitis se usa para referirse a la inflamación de la glándula mamaria y se caracteriza por cambios físicos, químicos y usualmente bacteriológicos en la leche, así como cambios patológicos en los tejidos glandulares de las vacas lecheras (Ruiz, 2015), dicha inflamación se produce como respuesta a la invasión de diferentes tipos de microorganismos (Corbellini, 2002). Durante la mastitis se forman grumos en la leche, debido a la agregación leucocitaria y factores de coagulación de la sangre que generan la obstrucción de los ductos e impiden la

remoción completa de la leche resultando en la cicatrización y proliferación de tejido conectivo ocasionando una pérdida permanente de la función de la glándula mamaria. Esto provoca la formación de pequeñas bolsas que dificultan el acceso a los antibióticos e impiden la eliminación completa de la leche (Ruiz, 2015).

Esta enfermedad es altamente dominante y es una de las más importantes que afecta mundialmente a la industria lechera porque ocasiona pérdidas muy fuertes a todos los productores de leche debido a la baja calidad y cantidad de leche producida y un aumento en los costos de tratamiento y servicios veterinarios además de pérdida de animales (Fernández et al., 2012).

La mastitis se puede clasificar en mastitis clínica y mastitis subclínica. La mastitis clínica es caracterizada por presentarse de manera súbita, hay inflamación y enrojecimiento de la ubre, dolor, disminución de la producción y alteraciones en la leche ya que pueden contener brumas grumos, coágulos y puede tener consistencia de agua y los animales presentan fiebre depresión y anorexia. Por su parte la mastitis subclínica se caracteriza por no presentar signos visibles de la enfermedad, la leche es superficialmente normal, pero existe una disminución en su producción y un aumento en el conteo de células somáticas, este tipo de enfermedad tiene mayor impacto en animales que tienen más de un ciclo de lactación que en animales jóvenes (Ruiz, 2015).

Esta enfermedad básicamente se definido como una “enfermedad polifactorial” ya que el riesgo de infección depende tanto de la habilidad de la vaca para rechazarla, del tipo, número y patogenicidad de las bacterias presentes en un rodeo de las condiciones del medio ambiente y del manejo en general de las vacas y del ordeño (Corbellini, 2002).

Se han identificado aproximadamente 140 especies causantes de mastitis los cuales se dividen en patógenos contagiosos y ambientales, dentro de los primeros los principales son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma* siendo su principal canal de entrada el canal del pezón, en el caso de la infección ocasionada por *S. aureus*, se trata de la principal causa de infección intramamaria en los rumiantes, es por eso que se le considera el agente causal más importante y

frecuente de la mastitis bovina. Este microorganismo no es un patógeno obligado de la ubre ya que también se pueden encontrar en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores o en las camas de los equipos de ordeño (Fernández et al. 2012).

3.7 Técnicas moleculares para la detección de patógenos en alimentos

Los principales avances en los ensayos moleculares de detección de patógenos en alimentos se produjeron a partir de 1980, estos métodos comprenden la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias de ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o Ribotipificación. En comparación con las metodologías fisiológicas y bioquímicas la identificación molecular trata en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión, estos métodos moleculares se usan a menudo en asociación en conjunto con la identificación microbiológica convencional. De esta forma se da paso a los métodos moleculares de segunda generación para la detección e identificación de géneros y especies como la PCR, la PCR múltiple, la secuenciación de genes específicos, entre otros (Palomino y González, 2014).

Las ventajas del uso de técnicas moleculares se tiene que las han vuelto cada vez más populares en aspectos de calidad y seguridad, presentan rapidez buen límite de detección, especificidad y sensibilidad, son de fácil automatización y su capacidad de procesamiento es para grandes cantidades de muestras (Palomino y González, 2014).

3.8 Técnicas moleculares para Staphylococcus aureus

En el caso de *Staphylococcus aureus* se puede identificar a través de técnicas moleculares como la PCR y PCR en tiempo real usando genes específicos de la especie. Su diagnóstico molecular es tan importante que se ha aumentado tanto para la detección del agente como para determinar su resistencia a antimicrobianos, los resultados se obtienen en muy pocas horas comparadas con las técnicas tradicionales (Cervantes et al., 2014).

3.9 Random Amplified Polimorphic (RAPD)

Este es uno de los sistemas más rápidos y sencillos de identificación de polimorfismos de ADN mediante PCR, estos marcadores detectan mutaciones aplicando aleatoriamente fragmentos del genoma empleando cebadores de secuencia corta y arbitraria (Picó y Pérez, 2012).

Los fragmentos que son amplificados se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y los polimorfismos son detectados después de una tinción con bromuro de etidio.

Dentro de las ventajas de los RAPD, tenemos que son rápidos y fáciles de analizar, solo se requieren de pequeñas cantidades de ADN molde y los RAPD tienen una abundancia genómica muy alta y están distribuidos aleatoriamente por todo el genoma.

Se usan para muchos objetivos que van desde estudios a nivel individual como la identidad genética hasta estudios que involucran especies estrechamente relacionadas.

4. Antecedentes específicos

Actualmente existen algunas investigaciones que llevaron a cabo la técnica de RAPD-PCR para la identificación de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de diferentes tipos de muestras.

Reinoso y colaboradores (2004) analizaron ochenta cepas (cuarenta aislamientos de muestras individuales de cuartos de leche de vacas de un hato lechero y cuarenta aislamientos de episodios clínicos de enfermedad en humanos) mediante RAPD-PCR para evaluar la relación genética entre aislamientos de *Staphylococcus aureus* de huéspedes bovinos y humanos ya que varios estudios sugieren que existen diferencias entre las cepas aisladas de las dos fuentes diferentes. Utilizaron tres oligonucleótidos (OLP6 (5'-GAGGGAAGAG-3'), OLP11 (5'-ACGATGAGCC-3') y OLP13 (5'-ACCGCCTGCT-3')) las cuales generaron un gran número de bandas dando como resultado fragmentos de amplificación de ADN que variaron en tamaño de 300 a 1900 pb. Al final de este estudio se observó que sólo 42 de 80 aislamientos de *Staphylococcus aureus* analizados podrían estar asociados a un biotipo específico de hospedador, Al igual que la diversidad genética de 0.36 entre los aislados de estafilococos aureus de huéspedes bovinos es relativamente baja en comparación con los aislados de huéspedes humanos. De esta forma sugieren que la transferencia de bacterias entre humanos y animales es posible y esto ha implicado a las manos del ordeñador en la propagación de cepas de *S. aureus* asociadas con infecciones intramamarias bovinas y también muestran que la técnica de RAPD-PCR se puede usar con éxito para evaluar la relación genética de aislamientos de *S. aureus* de diferentes hospedadores.

Pereira y colaboradores (2002) realizaron la tipificación molecular de *S. aureus* bovino y humano para investigar su diversidad genética y su dispersión geográfica para así poder hacer un seguimiento de infecciones ocasionadas por esta bacteria. En su caso ocuparon seis cepas aisladas de vacas lactantes aparentemente sanas de granjas y cinco aislamientos humanos, los cebadores que ocuparon fueron diferentes a los del primer estudio (786: 5' - GCG ATCCCCA - 3', 797: 5' - AGCGTCACTG - 3' y 798: 5' - TGACCCGCC - 3'). De igual forma se usó la técnica

RAPD-PCR la cual detecto heterogeneidad genética entre las cepas de humanos y bovinos, se encontró que dos cepas de origen humano y un aislado de origen bovino compartían el mismo perfil de amplificación específico para cada uno de los tres cebadores.

Otra hecha por Zare y colaboradores (2019) también realizaron la tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* pero en este trabajo lo hicieron a partir de diferentes fuentes como billetes, alimentos, infecciones humanas y mastitis bovina las cuales se sometieron a huellas dactilares de ADN mediante análisis de raps para examinar su polimorfismo genotípico investigar la cantidad de parentesco genético entre estos diversos aislamientos. En este estudio se usaron los mismos cebadores que Reinoso y cols. (2004) OLP6 (5'-GAGGGAAGAG-3'), OLP11 (5'-ACGATGAGCC-3') y OLP13 (5'-ACCGCCTGCT-3'). De esta forma se pudo observar que la mayoría de los polimorfismos obtenidos son de los aislados de mastitis bovina y que los más bajos se asociaron con aislados de infecciones humanas.

López y colaboradores (2006) caracterizaron 20 aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidas a partir de la glándula mamaria de vacas lactantes con mastitis en un sistema de producción de traspatio en Tarímbaro, Michoacán por medio de la técnica de RAPD-PCR, y su sensibilidad hacia 13 antibióticos. Los resultados que obtuvieron demuestran que todos los aislamientos fueron resistentes a penicilina y sensibles a cefalotina, eritromicina y trimetoprim, y con respecto a la caracterización molecular que 4 de los aislamientos presentaron similitud superior al 90% mientras que 2 fueron idénticos, el resto de los aislamientos presentaron perfiles de amplificación distintos. En el concluyen que sus aislamientos presentaron una diversidad de perfiles de amplificación.

De esta forma se puede observar con los resultados obtenidos en estas investigaciones la amplia diversidad genotípica de *S. aureus* y que la técnica de RAPD-PCR puede ser una herramienta necesaria y útil para evaluar la relación genética y la detección de polimorfismos en *S. aureus* (Zare et al., 2019).

5. Justificación

Actualmente en México, según SENASICA, la intoxicación alimentaria rebasa los 500 mil casos al año, se podría hablar de datos específicos de intoxicación causada por *Staphylococcus aureus* sin embargo, el país carece de esa información lo cual es muy alarmante para la salud pública.

Es de suma importancia tener un mejor control de calidad de los alimentos elaborados los cuales provienen de un alimento principal que es de fácil contaminación microbiana, en este caso el queso. No obstante, en México no existe algún trabajo que analice por medio de la técnica de RAPD-PCR las posibles cepas características de *S. aureus* aisladas de quesos frescos.

Es importante detectar el principio de la contaminación de esta bacteria en este tipo de alimentos para solucionar el problema desde el origen, ya que como bien se explicó con anterioridad, esta bacteria puede llegar a ocasionar intoxicaciones importantes en la salud del humano.

Otro aspecto importante que resaltar con respecto a *S. aureus* es que forma parte del grupo denominado ESKAPE que a últimas fechas ha cobrado importancia debido a la multirresistencia que presenta los microorganismos que forman parte de este grupo, característica que también se abordó en el presente trabajo.

6. Objetivo general

- Realizar una tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* presente en diferentes muestras de leche y queso fresco por medio de la técnica RAPD-PCR para poder observar la diversidad genética de este patógeno.

7. Objetivos específicos

- Determinar el perfil de resistencia de las cepas de *S. aureus* recuperadas de quesos frescos y muestras de leche.
- Diseñar la técnica RAPD-PCR para tipificar molecularmente las cepas aisladas en este estudio.
- Analizar la diversidad genética de *Staphylococcus aureus* a través del análisis de la RAPD-PCR.

8. Hipótesis

Es posible que exista similitud genética entre aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de dos diferentes zonas de México, centro (Puebla y Tlaxcala) y la Comarca Lagunera.

9. Metodología

- Estructura de la investigación.

El presente trabajo ha sido elaborado en tres grandes partes, la primera fue una revisión bibliográfica sistemática a partir de diferentes bases de datos y de varios documentos en línea para obtener la información teórica que sustenta el trabajo, ya que gran parte de la tesis se elaboró en época de pandemia por lo que el único medio con el que se disponía fue consultar información en línea. La segunda parte consistió en la selección de un oligonucleótido seleccionado de la bibliografía para hacer la RAPD-PCR y el diseño de un segundo oligonucleótido con esta misma finalidad del cual se realizó un análisis *in silico*. La tercera parte se llevó a cabo de forma experimental en la cual se concluyeron los estudios de resistencia a antibióticos y el RAPD-PCR.

- Muestreo

Para la presente investigación se usaron muestras de queso fresco obtenidas de los estados de Tlaxcala y Puebla los cuales se transportaron en bolsa y en refrigeración. Estos se compraron en puestos de mercados, tiendas artesanales y de abarrotes escogidos al azar.

Las cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* de la Comarca Lagunera fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

- Aislamiento e identificación microbiana de nuevas cepas

El análisis microbiológico se realizó según la NOM-110-SSA1-1994 y NOM-115-SSA1-1994, se pesaron 10 gr. y se homogeneizaron en 90 ml de Agua Peptonada 0.1% con ayuda de una licuadora por 2 minutos, esta constituyó la dilución de 10^{-1} , a partir de esta se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-3} de la siguiente forma:

en un tubo aparte se tomó 1 ml de la primera dilución y se colocó en 9 ml de solución de agua peptonada estéril evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente y posteriormente se agitó manualmente con movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm en un tiempo de 7 segundos, esta constituyó la dilución 10^{-2} , y se repitió el mismo proceso hasta la dilución 10^{-3} .

Después, se sembró 0.1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de cada muestra en Agar Baird-Parker para distribuirlo sobre la superficie con una varilla de vidrio estéril, se esperó a que el inóculo se absorbió por el agar y se incubaron por 48 hr. a 35° C. Posteriormente se realizó conteo y selección de colonias.

A las placas que presentaron entre 15 y 150 colonias características de *Staphylococcus aureus*, se aislaron entre 5 a 8 colonias en placas de Agar Baird-Parker y se les realizó las pruebas de confirmación por medio de prueba bioquímica de coagulasa.

- Prueba bioquímica (coagulasa)

Una vez que se seleccionaron las colonias se sembraron cada una en un tubo con 0.2 ml de caldo de infusión cerebro-corazón a 36° C durante 24 horas.

A los 0.2 ml de cultivo se añadieron 0.2 ml de plasma de conejo diluido volumen-volumen con solución salina estéril, se incubaron en baño de agua de 35 a 37° C y se observaron a las 4 horas, si no hubo presencia de coágulo se observaron a las 24 horas. La prueba se consideró positiva si hubo presencia de coágulo.

- Pruebas de sensibilidad a antibióticos

La prueba de sensibilidad a antibióticos se realizó una vez que las cepas aisladas anteriormente dieron positivo a la prueba coagulasa.

Se llevó a cabo por medio de la técnica de Kirby Bauer (1984). Brevemente, se seleccionaron de 4 a 5 colonias del microorganismo y se transfirieron a un tubo con

3 ml de caldo estéril de Mueller-Hilton, estos se incubaron a 35° C por aproximadamente 4 horas o hasta que el grado de turbidez 0.5 escala de McFarland, posterior a esto se sumergió un aplicador estéril de algodón dentro de del caldo y se rotó por las paredes para remover el exceso de inóculo, se sembró uniformemente sobre la superficie de una placa de Mueller-Hilton en tres direcciones diferentes, se dejó secar de 5 a 20 minutos con la tapa cerrada y se colocó el multidisco PT-34 Multibac I.D. para bacterias Gram + que contiene 12 antimicrobianos con ayuda de una pinza estéril, finalmente se incubó a 35° C por 24 horas para después poder medir la circunferencia de los halos de inhibición.

- Extracción de ADN

La extracción del ADN bacteriano de las cepas de Tlaxcala y Puebla se realizaron por medio del kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección de presencia o ausencia de ADN se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% y como marcador de peso molecular el GenRuler 100 bp Plus ADN Ladder, el gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó por medio de luz UV.

- Diseño y prueba *in silico* de oligonucleótidos a utilizar

La elección de los oligonucleótidos se realizó con ayuda del programa bioinformático Primer3Plus usando el genoma completo de *Staphylococcus aureus* adquirido de la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information). Una vez elegidos se analizaron utilizando los softwares OligoAnalyzer y Blastn para estimar si los oligonucleótidos que se usarán son óptimos para la PCR.

- PCR confirmatoria para nuevas cepas (*nuc*)

Una vez que obtuvimos el ADN se realizó la PCR confirmatoria para las cepas aisladas de quesos por medio de la detección del gen *nuc* presentes en el genoma de esta bacteria, se usaron los oligonucleótidos para el gen *nuc* F(5'

GCGATTGATGGTGATACTGTTA 3') y *R(5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3')* proporcionado por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Para la reacción se ocupó el GoTaq® Green Master Mix (12.5 µl), Nuclease wáter free (5.5 µl), Oligonucleótidos F (1 µl) y R(1 µl) y ADN (3.5 µl) para tener una concentración final de 20 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador donde se colocaron las diferentes muestras de ADN obtenidas con anterioridad para empezar con los diferentes ciclos involucrados en la PCR, desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, desnaturalización a 94° C por 1 minuto, alineamiento a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto todo esto durante 37 ciclos, para al último una extensión final por 7 minutos a 72° C.

Los productos de amplificación se visualizaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con el mismo marcador de peso usado anteriormente, el cual se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.

- RAPD-PCR

Para el caso de la elaboración de la técnica de RAPD-PCR, se ocupó un oligonucleótido analizado con anterioridad (5' TGCTTGCGCGCCGT 3') y uno de la bibliografía OLP11 (5'-ACGATGAGCC-3') (Zare, S. et al. 2019).

Esta reacción se llevó a cabo en un volumen total de 19 µl con los siguientes reactivos: GoTaq® Green Master Mix (12.5 µl), Nuclease free water (5.5 µl), Oligonucleótido (1 µl) y ADN (3.5 µl) En el termociclador primero se hizo la desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos seguidos de 50 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94° C, 1 minuto de alineamiento a 35°C y 2 minutos de extensión a 72°C, por último, una extensión final de 7 minutos a 72°C.

De igual forma, una vez que se obtuvieron los productos amplificados estos se analizaron por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 3% el cual se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.

Cabe aclarar que hasta este paso se analizaron todas las muestras obtenidas de Tlaxcala, Puebla y las que fueron proporcionadas provenientes de la Comarca Lagunera.

- **Análisis de patrones**

Se identificaron todas las bandas existentes en el conjunto de muestras y se realizaron tablas de acuerdo con el lugar de las muestras y el oligonucleótido. Se analizaron los geles conforme a la presencia o ausencia de bandas, en este caso se asignó un valor de 1 si la banda está presente o un 0 si está ausente.

En el caso de este estudio, con la información obtenida a partir del RAPD-PCR se crearon dendrogramas con ayuda del programa en línea DendroUPGMA el cual al ingresar los datos calcula una matriz de similitud, transforma los coeficientes de similitud en distancias y realiza un agrupamiento utilizando el algoritmo Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA).

10. RESULTADOS

- Revisión bibliográfica

El presente trabajo ha sido elaborado a partir de revisiones bibliográficas de diversas bases de datos, como son PubMed, NCBI, Elsevier, Google Scholar, Scisearch, Springer, Scielo, entre otros.

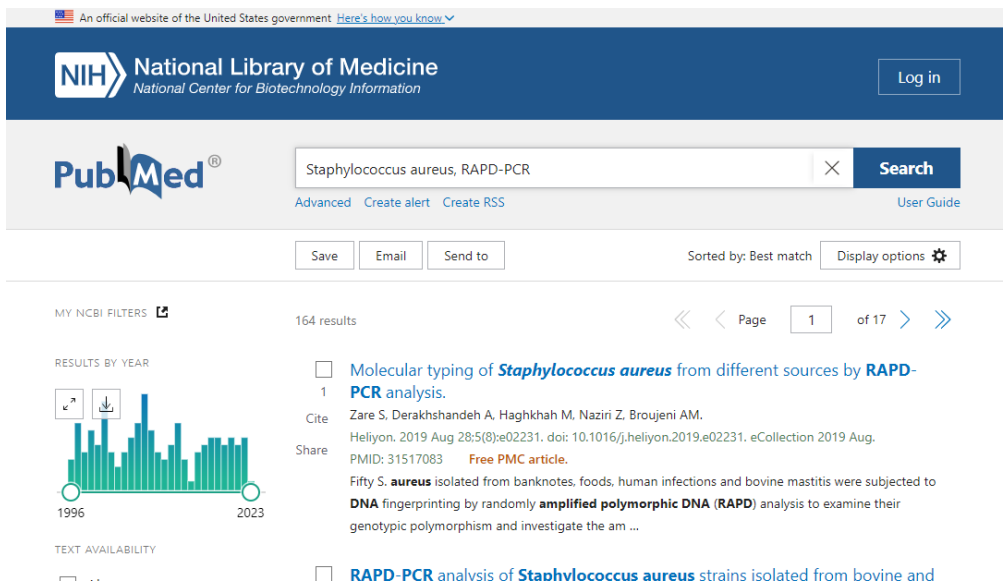


Figura 1. Resultados de búsqueda de artículos en PubMed utilizando palabras clave *Staphylococcus aureus* y RAPD-PCR.

Como se puede observar en la Figura 1, el resultado de la búsqueda de artículos usando como palabras clave "*Staphylococcus aureus*" y "RAPD-PCR" arrojó un total de 164 documentos para poder consultar, de los cuales se encontraron aproximadamente 25 documentos que hablaban sobre la bacteria *S. aureus* y su tipificación por medio de la técnica RAPD-PCR, 15 documentos sobre la tipificación de esta bacteria, pero haciendo uso de otras técnicas diferentes basadas en PCR y 30 documentos basados en la tipificación de acuerdo a resistencia de la bacteria a antibióticos. Los documentos restantes que fueron consultados arrojaron información general y molecular de *S. aureus*.

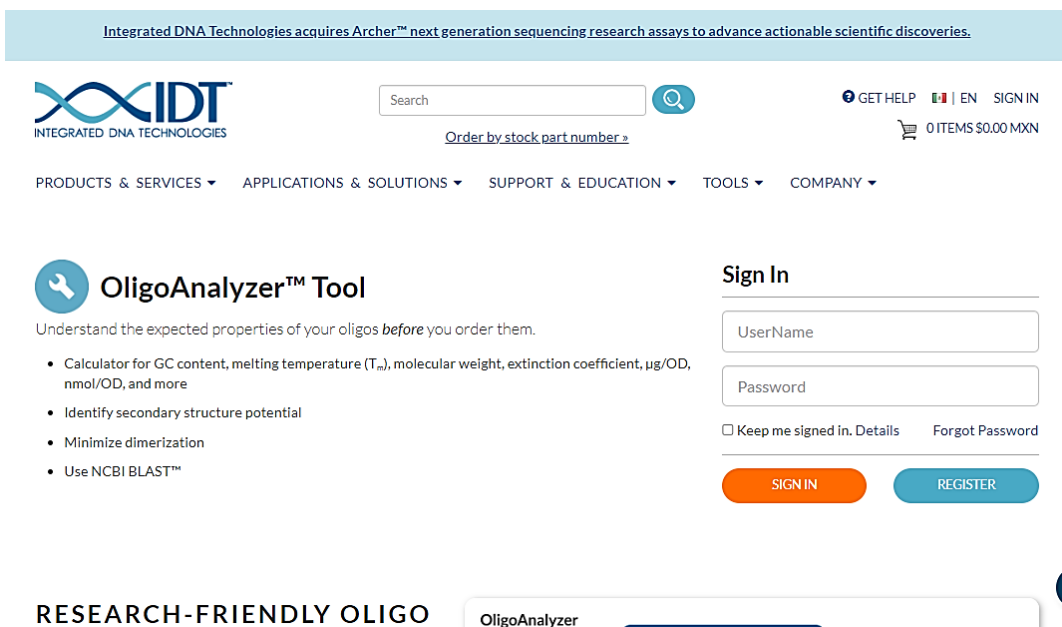


Figura 2. Programa Oligoanalyzer usado para analizar primers de este trabajo.

- Muestreo

Las muestras de queso fresco se obtuvieron de los estados de Puebla y Tlaxcala como se muestra en la Tabla 1, y las muestras de ADN de la Comarca Lagunera fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Tabla 2).

Tabla 1. Muestras adquiridas de Puebla y Tlaxcala, puntos de venta donde fueron adquiridos y origen de los quesos.

Quesos Tlaxcala			
Muestra	Tipo de queso	Local/Tienda/Mercado	Origen
Muestra 1	Queso panela	Local 1	Indefinido
Muestra 2	Queso panela	Local 2	Indefinido
Muestra 3	Queso de canasta	Local 3	Santa Ana Chiautempan
Muestra 4	Queso panela	Local 3	Santa Ana Chiautempan

Muestra 5	Queso panela	Local 4	Tlaxco
Quesos Puebla			
Muestra 1	Queso fresco	Mercado 1	Chipilo
Muestra 2	Queso panela	Tienda 1	Indefinido
Muestra 3	Queso panela	Tienda 2	Chipilo
Muestra 4	Queso panela	Local 1	Indefinido
Muestra 5	Queso panela	Mercado 1	Vigas, Veracruz

Tabla 2. Cepas de Comarca Lagunera proporcionadas por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana.

Cepas de Comarca Lagunera			
A1	C2	L3	L4
R	T2	L1	K3
M	C1	X1	C4
D2	L2	P1	G2
H2	K2	Y	2(+)

- Aislamiento e identificación microbiana

Una vez obtenidas las muestras se procedió a la identificación microbiana y al aislamiento de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994 y NOM-115-SSA1-1994.

Para su identificación, según la Norma Oficial Mexicana 115, una vez inoculada la muestra en placa Baird-Parker, se seleccionaron colonias típicas de *Staphylococcus aureus* las cuales son negras, circulares, convexas, brillantes, lisas y muestran un halo claro alrededor de la colonia. Posterior a eso, se aislaron de 5 a 8 colonias de cada muestra adquirida.

En las figuras 3 y 4 se muestran ejemplos de la identificación de la bacteria y de los aislamientos realizados para su posterior procesamiento para la tipificación.

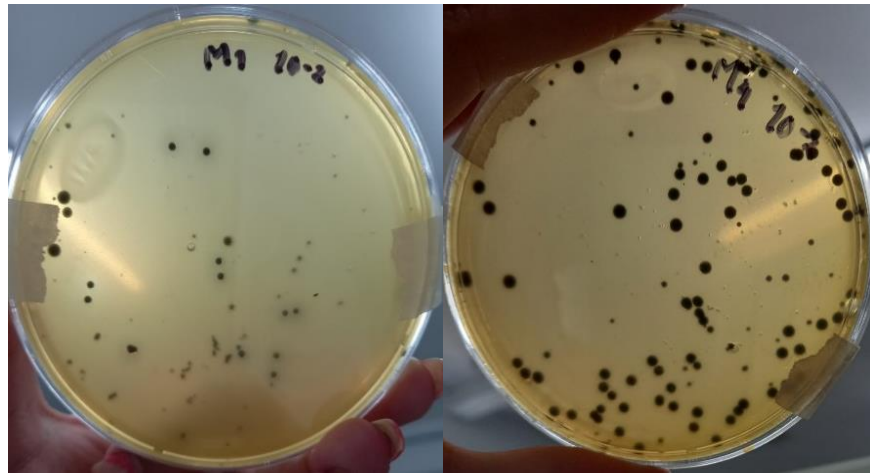


Figura 3. Placas Agar Baird-Parker con crecimiento de la muestra 1 (M1) de Puebla en las diluciones 10^{-2} (izquierda) y 10^{-3} (derecha).

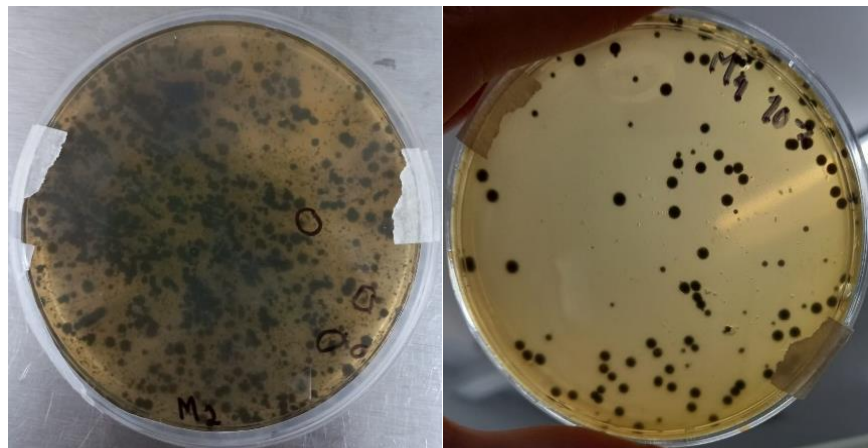


Figura 4. Placas Agar Baird-Parker con crecimiento de muestra 2 (M2) y muestra 4 (M4) en la dilución 10^{-3} de Tlaxcala.

- Prueba bioquímica (coa)

Después de haber seleccionado las colonias candidatas de ser *S. aureus*, se les realizaron las pruebas de la presencia de coagulasa en tubo y la detección del gen *nuc* que codifica para la term nucleasa, por PCR de punto final.

Los resultados obtenidos para la prueba de coagulasa se leyeron a partir de 4 horas de incubación y se observó la presencia de un coagulo haciéndole al tubo una pequeña inclinación (Figura 5 y 6). Todos los resultados fueron recopilados en la Tabla 3.



Figura 5. Pruebas confirmatorias de coagulasa para colonias aisladas de muestras de Tlaxcala de *Staphylococcus aureus*.



Figura 6. Pruebas confirmatorias de coagulasa para colonias aisladas de muestras de Puebla de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 3. Resultados de prueba *coa* y *nuc* de colonias aisladas de quesos de los estados de Puebla y Tlaxcala, así como cepas de la zona de la Comarca Lagunera.

TLAXCALA					
Muestra	Prueba <i>coa</i>	Prueba <i>nuc</i>	Muestra	Prueba <i>coa</i>	Prueba <i>nuc</i>
M1.1	+	-	M3.5	+	-

M1.2	+	-	M3.6	+	-
M1.3	+	-	M3.7	+	-
M1.4	+	-	M3.8	+	-
M1.5	+	-	M4.1	-	NA
M1.6	+	-	M4.2	+	-
M1.7	+	-	M4.3	+	-
M1.8	+	-	M4.4	+	-
M2.1	+	-	M4.5	+	-
M2.2	+	-	M4.6	+	-
M2.3	+	-	M4.7	-	NA
M2.4	+	-	M4.8	-	NA
M2.5	+	-	M5.1	+	-
M2.6	+	-	M5.2	+	-
M2.7	+	-	M5.3	+	-
M2.8	+	-	M5.4	+	-
M3.1	+	-	M5.5	+	-
M3.2	+	-	M5.6	+	-
M3.3	+	-	M5.7	-	NA
M3.4	+	-	M5.8	-	NA
PUEBLA					
M1.1	+	-	M3.5	-	NA
M1.2	+	+	M3.6	-	NA
M1.3	+	+	M3.7	+	-
M1.4	+	-	M3.8	-	NA
M1.5	+	+	M4.1	+	+
M1.6	+	+	M4.2	-	NA
M1.7	-	NA	M4.3	+	+
M1.8	+	-	M4.4	-	NA
M2.1	+	-	M4.5	-	NA
M2.2	+	-	M4.6	+	-
M2.3	+	-	M4.7	-	NA
M2.4	+	-	M4.8	-	NA
M2.5	+	-	M5.1	+	-
M2.6	+	-	M5.2	+	-
M2.7	+	-	M5.3	+	-
M2.8	+	-	M5.4	+	-
M3.1	-	NA	M5.5	+	+
M3.2	+	+	M5.6	+	+
M3.3	-	NA	M5.7	+	+
M3.4	-	NA	M5.8	+	+
COMARCA LAGUNERA					
A1	+	-	K2	+	+
R	+	+	L3	+	-
M	-	+	L1	+	-
D2	-	+	X1	-	+

H2	+	+	P1	+	+
C2	+	-	Y	+	-
G2	+	+	L4	+	-
T2	+	-	K3	+	+
C1	-	-	C4	+	-
L2	-	-	2(+)	-	+

Se observó que el 87.5% de las cepas de *S. aureus* que se eligieron provenientes de Tlaxcala fueron positivas a la prueba de coagulasa, este es el porcentaje de positividad más alto comparado con las cepas de Puebla y la Comarca Lagunera que sólo fue el 70% en ambos lugares (Tabla 3).

Es importante destacar que la presencia del gen *nuc*, en general fue baja, ya que se observó que ninguna de las cepas de Tlaxcala lo presentó, sólo el 27.5% de las cepas provenientes de Puebla y el 50% en las cepas de la Comarca Lagunera (Tabla 3). El 27.5% de las cepas de Puebla presentaron positividad tanto a la prueba de coagulasa como a la presencia del gen *nuc*, y sólo el 25% de las cepas de la Comarca Lagunera (Tabla 3).

- Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Como se sabe, la resistencia a antibióticos comunes está creciendo a nivel global. Datos recientes manifiestan que más del 90% de *S. aureus* muestra resistencia a Penicilina y más del 50% a Oxacilina (Chávez, 2020).

Los resultados obtenidos, como se puede observar en las figuras 7 y 8 se tomaron las medidas de los halos de inhibición y tomando como referencia los datos establecidos de cada antibiótico fue como se determinó si se trataba de Resistencia, Intermedia o Sensible.

Los datos obtenidos para la sensibilidad a antibióticos se adjuntan en la tabla 4 con todas las muestras analizadas. Como se puede observar la mayoría de las colonias aisladas y adquiridas presentan resistencia o resistencia intermedia a la penicilina (77.5%), ampicilina (68.6%), eritromicina (71.9%) y gentamicina (59.5%), y casi

todas las cepas presentaron sensibilidad ante el antibiótico vancomicina a excepción de algunas de la comarca lagunera que presentaron resistencia o resistencia intermedia para este antibiótico.

Figura 7. Resultados de antibiogramas realizados a las colonias aisladas positivas a coagulasa. En esta figura se muestran resultados de la colonia M1.4 (colonia 4 de la muestra 1) de Tlaxcala.

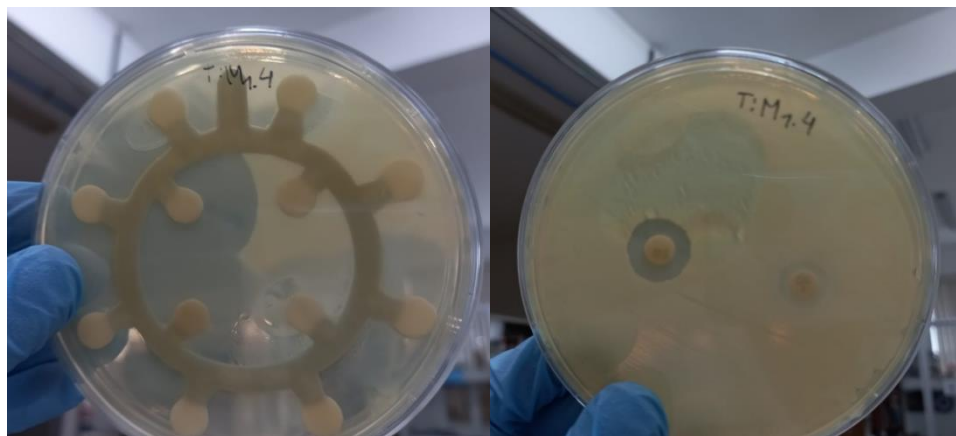


Figura 8. Resultados de antibiogramas realizados a colonias positivas a coagulasa. Se muestran resultados de las colonias M1.4 (colonia 4 de la muestra 1) y M4.6 (colonia 6 de muestra 4) de Puebla.

Tabla 4. Resultados de prueba de resistencia a antibióticos de colonias aisladas de los estados de Puebla y Tlaxcala, así como de la Comarca Lagunera. *AM=Ampicilina, E=Eritromicina, CF=Cefalotina, PE=Penicilina, GE=Gentamicina, SXT=Sulfametoxazol/Trimetroprim, TE=Tetraciclina, VA=Vancomicina, OX=Oxacilina, CLM=Clindamicina; R=Resistente, I=Resistencia intermedia, S=Sensible, NA=No aplica.

Cepa	Antibiótico	AM	E	CF	PE	GE	SXT	TE	VA	OX	CLM
	M 1.1	I	S	R	R	S	S	S	S	I	NA
	M1.2	S	I	S	R	S	S	S	S	R	NA
	M1.3	S	I	S	R	S	S	S	S	I	NA
	M1.4	S	I	S	R	S	S	S	S	R	NA
	M1.5	S	I	S	R	S	S	S	S	R	NA

T L A X C A L A	M1.6	S	I	S	R	S	S	S	S	R	NA	
	M1.7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NA	
	M1.8	I	S	S	S	R	S	S	S	S	NA	
	M2.1	I	S	S	S	R	S	R	S	NA	S	
	M2.2	I	S	S	I	I	S	S	S	NA	S	
	M2.3	I	S	S	I	R	S	S	S	NA	S	
	M2.4	I	S	S	I	R	S	S	S	NA	S	
	M2.5	I	S	S	S	S	S	I	S	NA	S	
	M2.6	I	I	S	I	R	S	S	S	NA	S	
	M2.7	R	S	S	I	R	I	S	S	NA	S	
	M2.8	I	S	S	S	S	S	S	S	NA	S	
	M3.1	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M3.2	R	I	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M3.3	R	I	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M3.4	R	I	R	R	R	S	I	R	NA	S	
	M3.5	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M3.6	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M3.7	R	I	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M3.8	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M4.2	I	S	S	I	I	S	R	S	NA	S	
	M4.3	I	S	S	I	R	R	R	S	NA	S	
	M4.4	I	S	S	I	R	S	R	S	NA	S	
	M4.5	S	S	S	S	R	I	R	S	NA	S	
	M4.6	I	I	S	I	R	I	R	S	NA	S	
	M5.1	R	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M5.2	R	R	R	R	R	S	S	R	S	NA	R
	M5.3	R	R	R	R	R	S	S	R	S	NA	R
	M5.4	R	R	R	R	R	S	S	R	S	NA	R
	M5.5	R	R	R	R	I	S	R	S	NA	R	
	M5.6	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
P U E B L A	M1.1	R	R	S	S	R	S	S	S	NA	S	
	M1.2	R	R	S	I	R	S	S	S	NA	S	
	M1.3	R	R	I	R	R	I	S	S	NA	R	
	M1.4	R	I	S	I	R	S	S	S	NA	S	
	M1.5	R	R	S	R	I	S	S	S	NA	I	
	M1.6	I	I	R	I	R	I	S	S	NA	S	
	M1.8	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M2.1	R	R	R	R	R	R	I	S	NA	R	
	M2.2	R	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M2.3	R	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M2.4	I	R	R	R	R	R	S	S	NA	R	
	M2.5	S	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M2.6	R	R	R	R	R	R	I	S	NA	R	
	M2.7	R	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M2.8	I	R	R	R	R	R	I	S	NA	R	
	M3.2	R	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M3.7	R	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M4.1	I	I	S	I	R	S	I	S	NA	S	
	M4.3	I	I	S	I	R	S	I	S	NA	S	
	M4.6	I	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M5.1	R	R	R	R	S	S	I	S	NA	R	
	M5.2	R	R	R	R	R	R	R	S	NA	R	
	M5.3	R	R	R	R	R	I	S	S	NA	R	
	M5.4	R	I	R	I	R	S	S	S	NA	S	
	M5.5	R	I	R	I	R	S	S	S	NA	S	
	M5.6	R	R	R	R	R	S	S	S	NA	R	
	M5.7	R	R	R	R	R	I	S	S	NA	R	
	M5.8	R	I	R	I	R	S	S	S	NA	R	
A1	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	NA	

C O M A R C A L A G U N E R A	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	NA	
	M	S	S	S	S	S	S	S	S	R	NA	
	D2	S	I	S	I	S	S	S	S	I	NA	
	H2	S	R	S	R	S	S	S	R	S	NA	
	C2	S	R	S	R	S	S	S	S	S	NA	
	T2	S	S	S	S	S	S	S	R	R	NA	
	C1	S	R	S	R	S	S	S	S	S	NA	
	L2	S	R	S	R	S	S	S	S	S	NA	
	K2	S	R	S	R	S	S	S	S	S	NA	
	L3	S	R	I	R	S	S	S	S	S	NA	
	L1	S	R	I	R	S	S	S	S	S	NA	
	X1	S	I	S	S	S	S	S	S	S	NA	
	P1	S	S	S	S	S	S	S	R	R	NA	
	Y	R	I	R	R	R	S	S	S	S	NA	
	L4	R	R	R	R	S	R	S	R	R	NA	
	K3	R	R	S	S	S	S	S	S	S	NA	
	C4	R	R	S	R	S	R	R	S	S	NA	
	G2	S	R	S	S	R	R	S	S	S	NA	
	2 (+)	S	R	S	R	R	R	S	R	S	NA	
	% R		68.6	71.9	46	77.5	59.5	29.9	30.3	7.86	13.4	37

Haciendo un análisis de los datos de las gráficas, se puede observar que las bacterias provenientes del estado de Puebla presentan una mayor resistencia a la mayoría de los antibióticos y las cepas recuperadas de Tlaxcala, presentan mayormente resistencia intermedia a un número considerable de antibióticos, es importante destacar que aunque las cepas de la Comarca Lagunera no presentaron resistencia tan frecuentemente, excepto a eritromicina y penicilina si es importante destacar la resistencia a Vancomicina y Oxacilina (Figuras 9 y 10).

Del total de cepas aisladas incluidas en el presente trabajo se observó que la mayoría de las cepas (63%) presentó multiresistencia, es decir resistencia a 4 o más antibióticos, es importante destacar que algunas hasta a siete antibióticos; el 19.3% presentó resistencia a tres antibióticos y sólo 1 cepa fue sensible a todos los antibióticos probados y fue recuperada de un queso proveniente de Tlaxcala (Figura 11).

Analizando la multiresistencia se puede observar que las cepas provenientes de Puebla mostraron una mayor frecuencia ya que el 96.4% (27/28) fueron resistentes a cuatro o más antibióticos, el 60% (21/35) de las cepas provenientes de Tlaxcala fueron multiresistentes y para la Comarca Lagunera la mayor frecuencia fue para la resistencia a 2 antibióticos que fue del 45% (9/20), esto se puede observar en la figura 12.

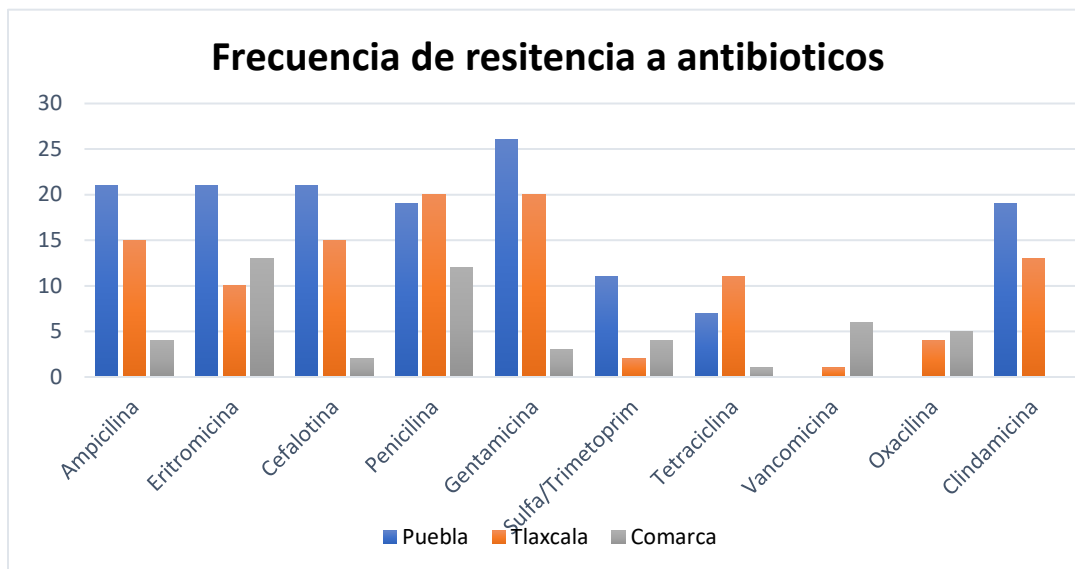


Figura 9. Antibióticos a los que las cepas de *S. aureus* recuperadas mostraron una mayor frecuencia de resistencia comparando Puebla, Tlaxcala y Comarca Lagunera. En Puebla es donde se observa mayor resistencia a antibióticos exceptuando a Penicilina y Tetraciclina, siendo Tlaxcala el estado con mayor resistencia a estos antibióticos. La Comarca presenta mayor resistencia para Vancomicina y Oxacilina.

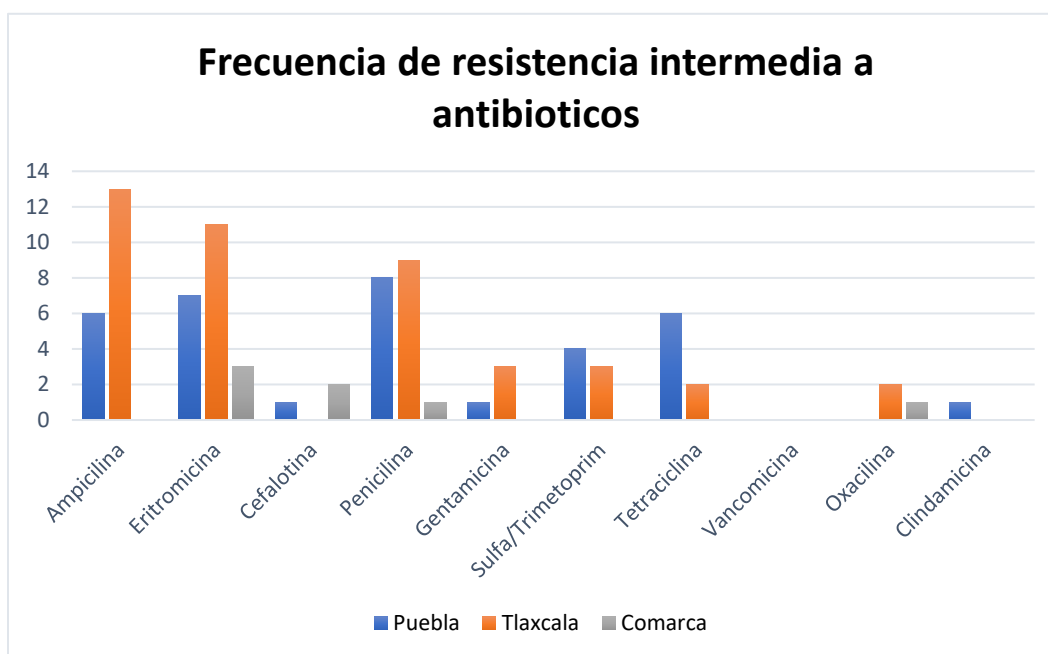


Figura 10. Frecuencia de resistencia intermedia comparando Puebla, Tlaxcala y Comarca Lagunera. Se observa que para los antibióticos Ampicilina, Eritromicina, Penicilina, Gentamicina y Oxacilina, el estado de Tlaxcala presenta mayor resistencia intermedia en comparación con Puebla

y Comarca. Para el antibiótico Vancomicina no se obtuvo alguna muestra con resistencia intermedia.

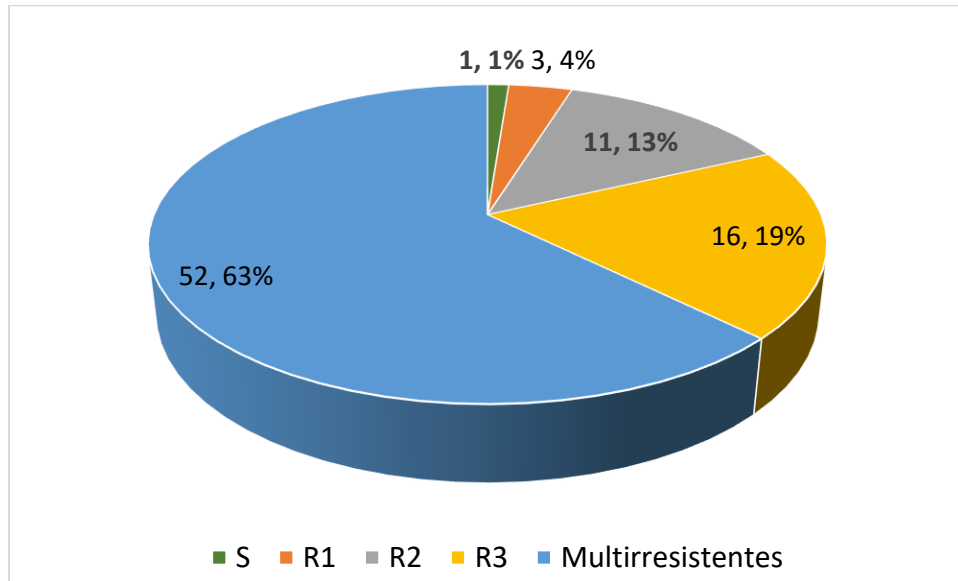


Figura 11. En el gráfico se pueden observar que el 63% de las cepas aisladas incluidas en el estudio fueron multirresistentes en contraste con las sensibles que sólo fue una cepa.

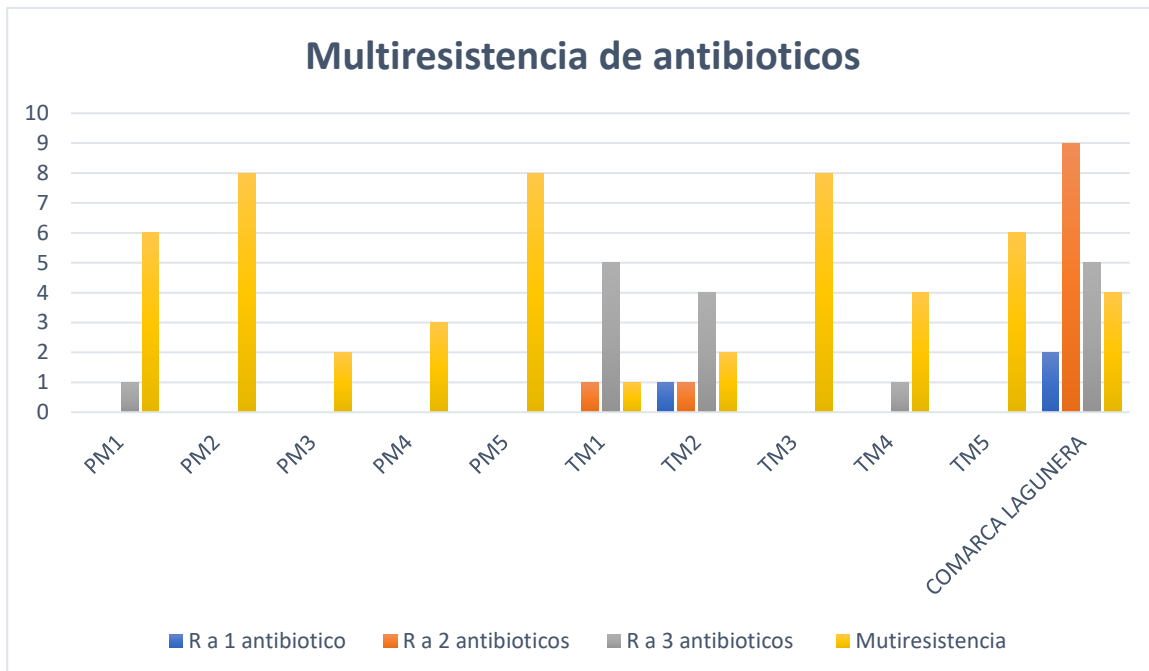


Figura 12. Multiresistencia a antibióticos de acuerdo con muestras de Puebla, Tlaxcala y Comarca Lagunera.

- Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las colonias se utilizó el Kit ZymoBIOMICS ADN Miniprep y posteriormente se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% con la finalidad de visualizar una extracción exitosa del ADN (Figura 13).

Una vez obtenido el ADN se procedió a realizar el diseño del oligonucleótido *in silico* y posteriormente la prueba confirmatoria (*nuc*) y RAPD-PCR.

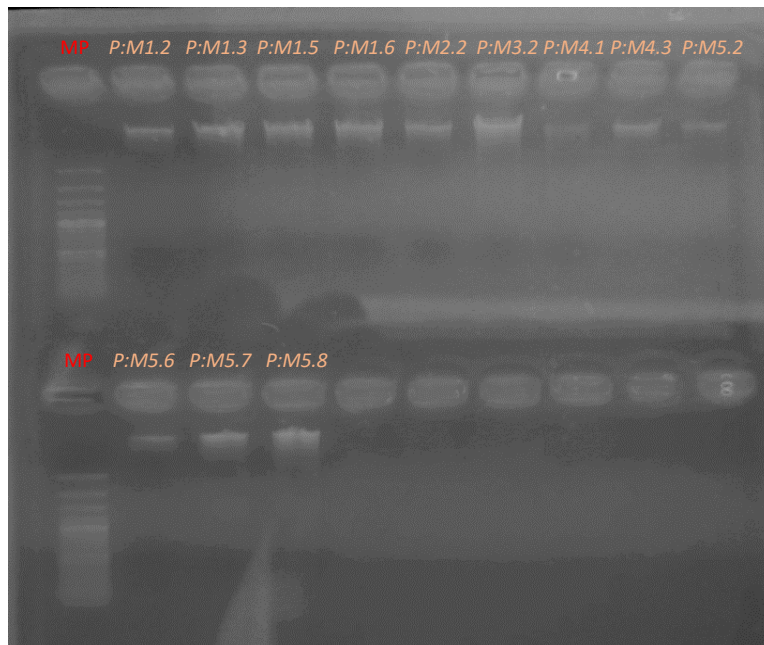


Figura 13. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En él se pueden observar el ADN de las colonias aisladas del estado de Puebla de la muestra 1, 2, 3, 4 y 5.

- Diseño y prueba *in silico* de oligonucleótidos a utilizar

El diseño del oligonucleótido se obtuvo utilizando el programa bioinformático Primer3Plus, para el RAPD-PCR (5' TGCTTGCGCGCCGT 3').

Primero con ayuda de la base de datos NCBI se buscó el genoma completo de *Staphylococcus aureus* para descargarlo en formato FASTA y poder ocuparlo en el programa Primer3Plus, este programa busca y muestra los mejores resultados para

oligonucleótidos dando valores específicos como el %G-C, Tm, su longitud, etc., como se observa en la figura 14.

Una vez que se obtuvo el oligonucleótido, se analizó en dos programas bioinformáticos, Oligoanalyzer y Blastn, para detectar si se trata de un oligonucleótido con buenas características y si existe alineamiento con el genoma de *Staphylococcus aureus*.

Como se puede observar en la figura 15, el programa Oligoanalyzer muestra resultados específicos del primer que se está analizando.

Y en el caso de Blastn muestra si existen o no alineamientos entre la secuencia de interés, en este caso el oligo, y el genoma de la bacteria. Como se puede observar en la figura 16 si existió alineamiento con cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* en su base de datos.

News: Try out our new tool: [Wiley-DNA-Editor](#) - A DNA/Plasmid editor running in your browser!

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence	More...	Source Code
	Help	About

< Back

Pair 1: Primer

Left Primer 1:

[Start:](#) 270249 [Length:](#) 14 bp [Tm:](#) 60.0 C [GC:](#) 71.4 % [Any:](#) 30.8 [End:](#) 0.0 [TB:](#) 10.0 [HP:](#) 39.6 [3' Stab:](#) 5.7 [Penalty:](#) 4.021

Right Primer 1:

[Start:](#) 270377 [Length:](#) 15 bp [Tm:](#) 60.0 C [GC:](#) 73.3 % [Any:](#) 0.0 [End:](#) 0.0 [TB:](#) 11.0 [HP:](#) 0.0 [3' Stab:](#) 3.7 [Penalty:](#) 5.022

Pair: [Product Size:](#) 129 bp [Any:](#) 13.6 [End:](#) 6.8 [TB:](#) 21.0 [Penalty:](#) 9.043

Figura 14. Resultado de la búsqueda de oligonucleótidos para RAPD-PCR en Primer3Plus.

Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- TGC TTG CGC GCC GT -3'
COMPLEMENT	5'- ACG GCG CGC AAG CA -3'
LENGTH	14
GC CONTENT	71.4 %
MELT TEMP	59.8 °C
MOLECULAR WEIGHT	4246.8 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	117100 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀ :	8.54
µg/OD ₂₆₀ :	36.27

Figura 15. Resultados del análisis del oligo para RAPD-PCR en Oligoanalyzer.

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 195 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2754414	gi 2108847713 CP077931.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 196 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2754404	gi 2108844849 CP077928.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 197 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2754402	gi 2108842274 CP077926.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 200 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2719166	gi 2108837207 CP077924.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 201 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2719235	gi 2108834633 CP077923.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 276 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2730804	gi 2108829426 CP077921.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 277 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2749120	gi 2108826542 CP077920.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 278 plasmid unnamed	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2732781	gi 2108824004 CP077919.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 282 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2732780	gi 2108816241 CP077915.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 328 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2764234	gi 2108794564 CP077897.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 329 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2795787	gi 2108791902 CP077894.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 332 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2745575	gi 2108789269 CP077893.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 356 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2855358	gi 2108778283 CP077889.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 358 chromosome .complete.genome	Staphylococcus aureus	28.2	28.2	100%	22	100.00%	2855863	gi 2108772634 CP077888.1

Figura 16. Resultado de análisis del oligo para RAPD-PCR en Blastn.

- PCR confirmatoria (*nucA*)

Esta prueba molecular confirmatoria se realizó con primers diseñados anteriormente por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana los cuales son *F* 5' (GCG ATT GAT GGT GAT ACT GTT A) 3' y *R* 5' (AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC) 3'.

Los productos de PCR se visualizaron bajo luz UV en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio en luz UV como se observa en las figuras 17 y 18. El amplicón obtenido para *nuc* es de 239 pb, todos los resultados obtenidos se resumieron en la Tabla 3 junto con los resultados de la prueba *de* coagulasa. Como se observa, todas las colonias aisladas del estado de Tlaxcala no amplificaron el gen *nuc*, para las cepas de Puebla 4 colonias de la muestra 1 amplificaron para *nuc*, 1 colonia de la muestra 3 (M3.2), 2 colonias de la muestra 4 (M4.1 y M4.3) y 4 colonias de la muestra 5 (M5.5, M5.6, M5.7 y M5.8). De la Comarca Lagunera, el 50% (10/20) de las muestras fueron positivas al amplicón de *nuc*.

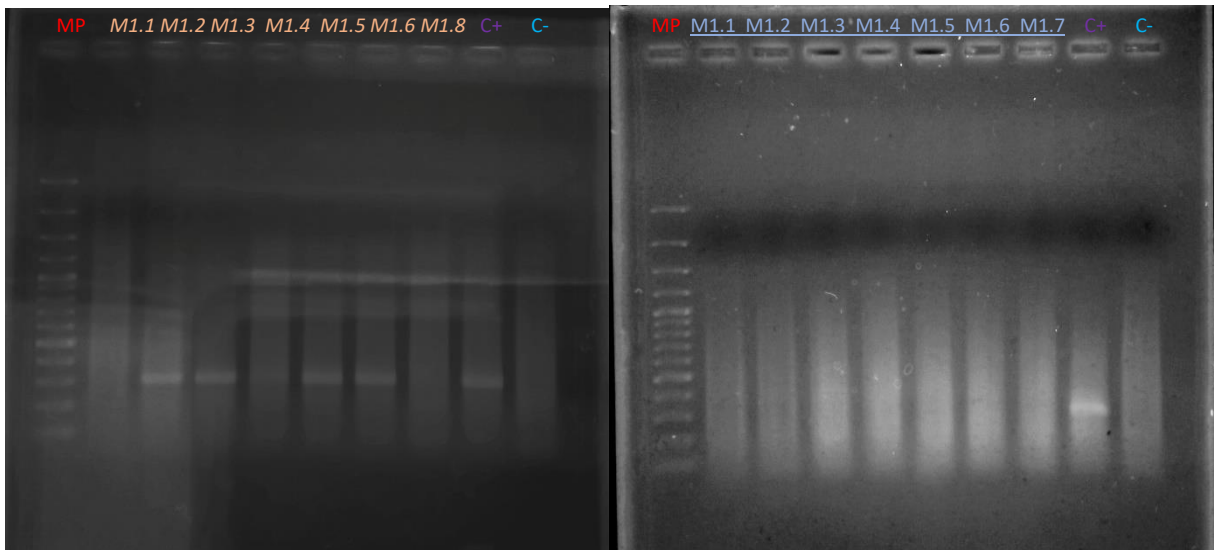


Figura 17. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio con resultados de PCR para detectar gen *nuc* de *Staphylococcus aureus*. Colonias aisladas de la muestra 1 de Puebla (izquierda), colonias aisladas de la muestra 1 de Tlaxcala (derecha).

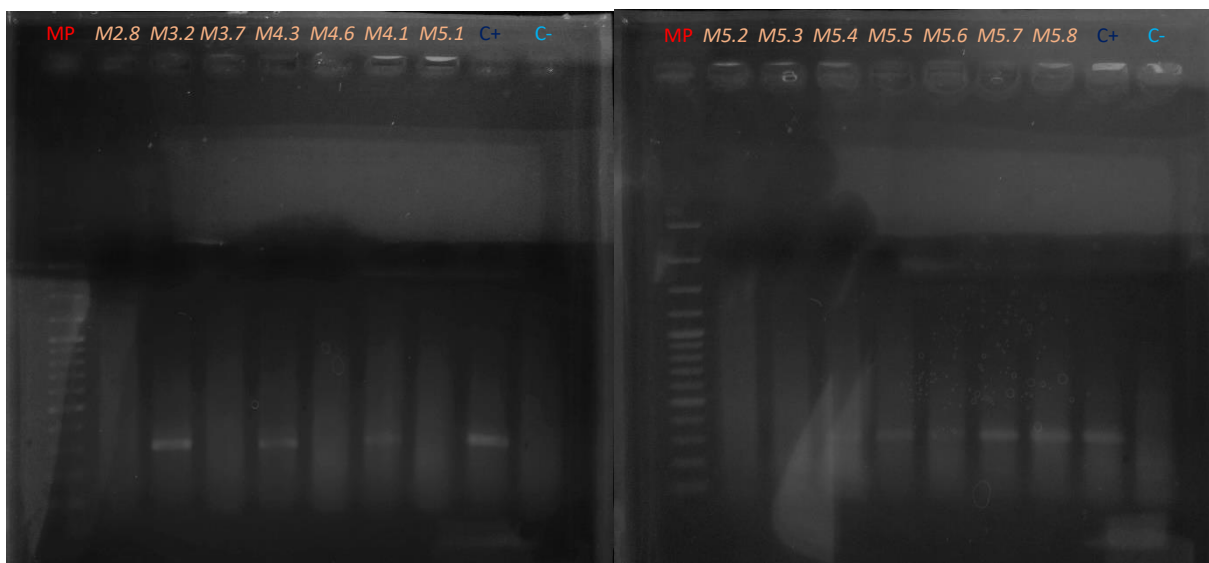


Figura 18. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio con resultados de PCR para detectar gen *nuc* de *Staphylococcus aureus*. Colonias aisladas de las muestras 2, 3, 4 y 5 del estado de Puebla.

- RAPD-PCR y análisis de dendrogramas

La reacción de RAPD-PCR se realizó con la finalidad de poder observar si todas las muestras obtenidas y analizadas con anterioridad presentaban polimorfismos o no para detectar si tienen relación, se parecen entre sí o existen un alejamiento ya sea entre colonias de las mismas muestras o muestras del mismo estado. Al usar un solo primer al azar, tanto el sacado de la literatura OLP11 (5' ACGATGAGCC 3') como el elaborado en este trabajo (5' TGCTTGCGCGCCGT 3'), se observó una infinidad de bandas y se esperaba que, en cuanto a bandeo, entre las mismas colonias de cada muestra hubiera gran similitud, sin embargo, en muchas colonias de una muestra se logró apreciar que no sucedió así.

El producto de estas reacciones se visualizó en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV, como se puede apreciar en las figuras de ejemplo (Figuras 19, A B y C), las demás imágenes se pueden visualizar en el Anexo 1. Posterior a la obtención del bandeo en los geles de agarosa, se procedió a realizar tablas en donde se recabó, mediante un sistema binario donde 1 representa presencia y 0 ausencia, el número total de bandas de cada colonia de cada muestra.

Y una vez recabados todos los datos, se crearon los dendrogramas con ayuda del programa en línea DendroUPGMA el cual utiliza el método UPGMA para la creación de árboles filogenéticos. Este método admite que las especies son grupos por sí mismos, relaciona los dos grupos más cercanos sustentado en la matriz de distancias, vuelve a calcular la matriz de distancia y repite el proceso hasta que todas las especies están conectadas a un mismo grupo.

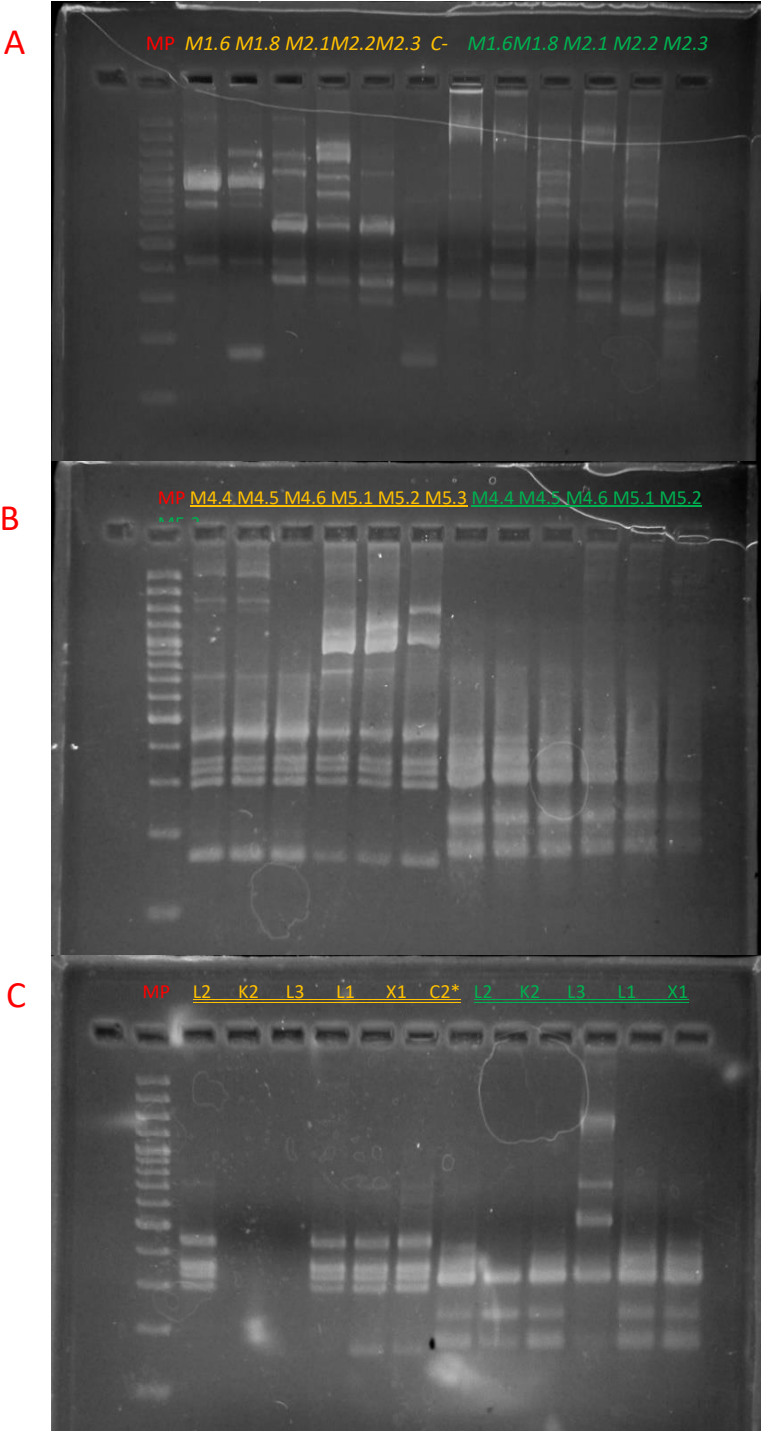


Figura 19. Geles de Agarosa con reacciones de RAPD-PCR. A) se aprecian muestras del estado de *Puebla*, B) muestras del estado de Tlaxcala y C) de la Comarca Lagunera. Las reacciones marcadas por **naranja** son las realizadas con el primer de la literatura y las de **verde fuerte** realizadas con el primer de este trabajo.

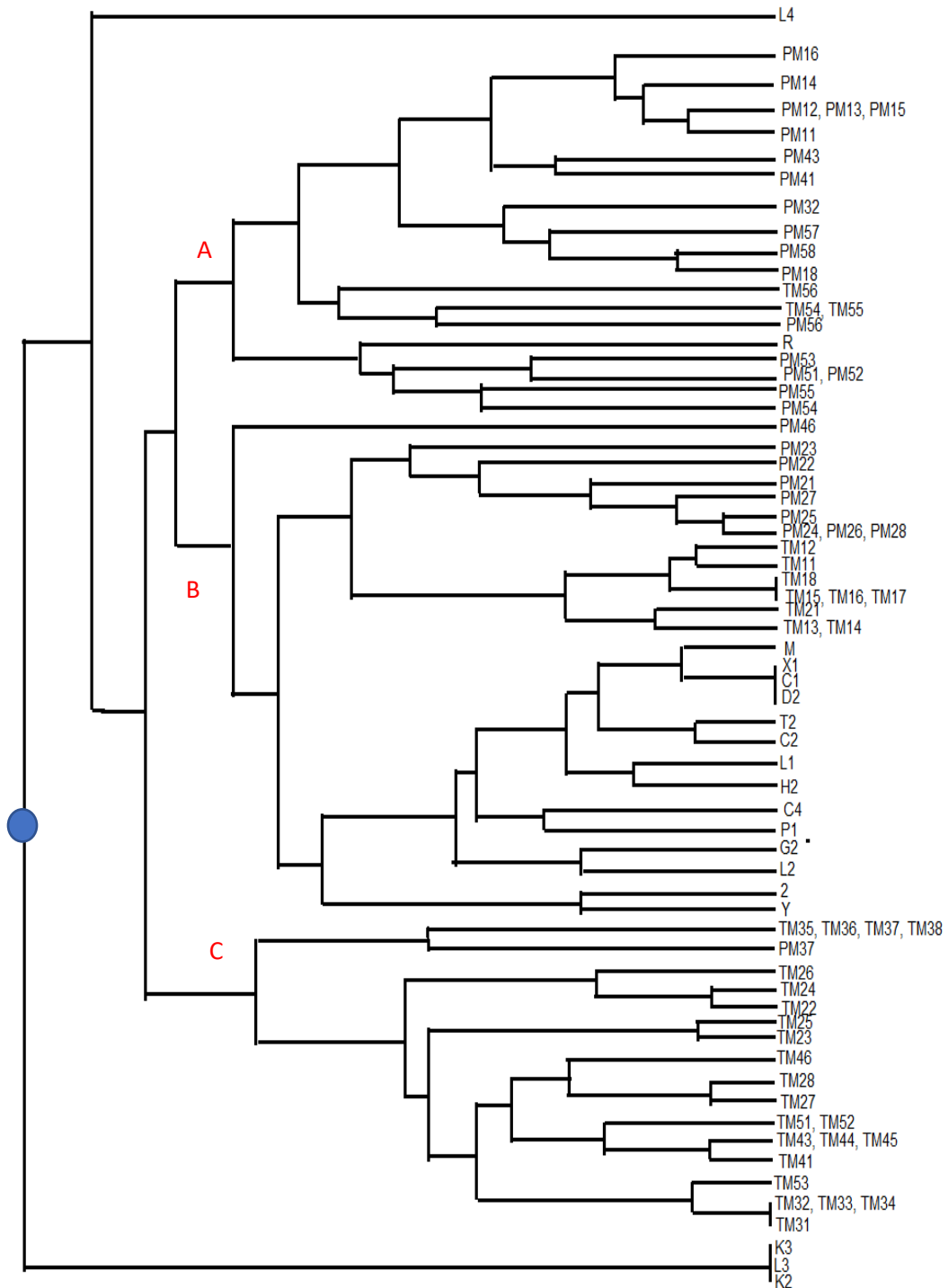


Figura 20. Dendrograma obtenido por el programa DendroUPGMA, contiene los aislados de las muestras de Puebla, Tlaxcala y de la zona de la Comarca Lagunera.

En este trabajo se relacionaron todas las muestras (Puebla, Tlaxcala y Comarca Lagunera) analizadas con el oligonucleótido reportado en la literatura ya que se consideró que con este primer se obtuvo una mejor relación genética en cuanto a las muestras.

En la figura 20 se presenta el dendrograma obtenido por el programa mencionado anteriormente (dendroUPGMA) donde se relacionan las muestras aisladas de Puebla, Tlaxcala y la Comarca Lagunera, como se puede observar se logró dividir en tres grandes subgrupos (A, B y C). En el grupo A, se encuentran relacionadas muestras de Puebla, solamente 2 colonias de Tlaxcala y 1 de la Comarca Lagunera. Lo importante a resaltar de este grupo es que, si bien algunas colonias pertenecientes a una misma muestra comparten similitudes de al menos el 90%, como algunas colonias de la muestra 5 (PM51, PM52, PM53, PM54 y PM55), también se puede encontrar similitud entre colonias de la misma muestra de diferente estado por ejemplo de la muestra 5 del estado de Puebla (PM56) y Tlaxcala (TM54 y TM55). La única cepa de la Comarca Lagunera presente en este grupo (R) presenta al menos 30% de similitud con colonias aisladas del estado de Puebla de la muestra 5. Otra cosa importante de recalcar es que existen cepas aisladas de una misma muestra que comparten entre sólo aproximadamente un 60% de similitud como aislados de la muestra 2 de Puebla (M2.3, M2.2, M2.1, M2.7 y M2.5)

En el caso del grupo B se desglosan dos subgrupos grandes, en uno se encuentra una sola colonia de la muestra 4 de Puebla (PM46) y del otro se ramifican otros dos subgrupos pequeños dentro de los cuales se encuentran relacionados aislados de los tres lugares del trabajo (Puebla, Tlaxcala y Comarca Lagunera), sin embargo, aunque se llegan a encontrar en el mismo grupo existe una notable separación entre los aislados de los diferentes lugares. Lo único importante a recalcar es que en uno de los subgrupos pequeños existe una similitud de por lo menos 90% entre colonias, aunque del mismo estado Tlaxcala, de diferentes muestras 1 y 2 (TM21 y TM13,

TM14). De igual forma se muestran similitudes del 100% entre aislados del mismo lugar, por ejemplo, de Tlaxcala de la muestra 1 (TM15, TM16, TM17 y TM18) y de la Comarca Lagunera con las muestras X1, C1 y D2.

Y por último está el grupo C. Este se encuentra ramificado en dos subgrupos pequeños, el primero muestra una similitud de aproximadamente 90% entre aislados de diferente estado, pero número igual de muestra los cuales son de la muestra 3 del estado de Tlaxcala (TM35, TM36, TM37, TM38) y una colonia de la muestra 3 de Puebla (PM37). Y en el segundo subgrupo se encuentran puros aislados del estado de Tlaxcala. Lo importante a destacar de este subgrupo es que se encuentran similitudes de por lo menos el 90% entre aislados de diferentes muestras, por ejemplo, entre colonias de la muestra 5 (TM53) y colonias de la muestra 3 las cuales entre ellas presentan similitud del 100% (TM31 y TM32, TM33, TM34).

Por otro lado, es importante destacar la resistencia a los antibióticos Oxacilina y Vancomicina los cuales son antibióticos importantes a la hora de detectar a *S. aureus*. Es por eso que se realizaron los siguientes dendrogramas (figuras 21 y 22) para poder detectar la relación genética entre cepas resistentes a estos antibióticos.

En la figura 21 se representa el dendrograma de cepas que presentaron resistencia a Oxacilina. En él se destaca la división de tres grupos grandes (A, B y C), donde el grupo A solo contiene a una sola cepa de la Comarca (R), en el grupo B se observa la relación entre cepas de la misma muestra del estado de Tlaxcala del 100 % entre TM16 y TM15 y aproximadamente el 90% entre estas cepas y TM12, a su vez este subgrupo presenta una relación de aproximadamente 60% con otra cepa de la misma muestra del estado de Tlaxcala (TM14). Y el grupo C representa una similitud escalonada entre cepas de la Comarca Lagunera (L4, P1, T2) terminando en una relación de aproximadamente del 90% entre las cepas D2 y M. Este dendrograma solo presentó similitud de por lo menos el 10% entre cepas de diferentes lugares que fueron Tlaxcala y la Comarca Lagunera.

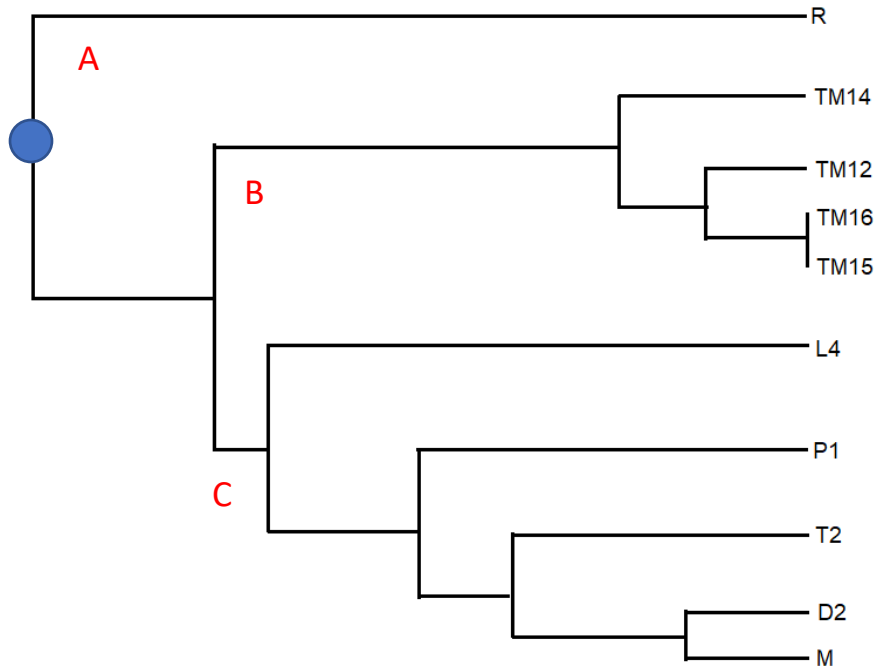


Figura 21. Dendrograma de cepas resistentes a Oxacilina de Tlaxcala y Comarca Lagunera.

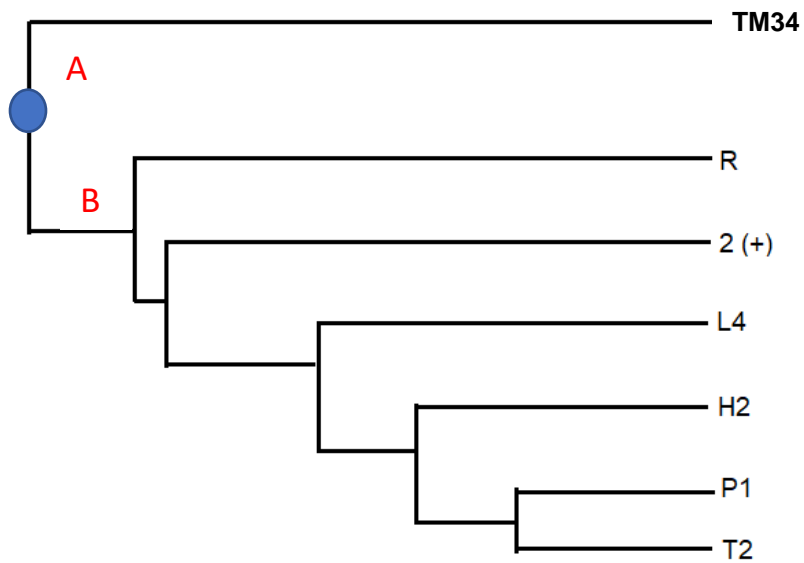


Figura 22. Dendrograma de cepas resistentes a Vancomicina de Tlaxcala y Comarca Lagunera.

Por otro lado, en la figura 22 se representa el dendrograma obtenido al comparar las cepas con resistencia a Vancomicina. En este se obtuvieron dos grandes grupos

A y B. En el grupo A solamente se encuentra la cepa TM34, y en el grupo B se obtuvo una similitud escalonada entre cepas de la Comarca Lagunera (R, 2 (+), L4, H2) y otras dos cepas que a su vez obtuvieron una similitud de aproximadamente el 90% también de la Comarca Lagunera (P1 y T2).

Por último, se realizó un análisis comparando cepas de un mismo lugar tanto de Puebla como de Tlaxcala y que todas las cepas fueran homólogas. En el caso de la figura 23 se presenta el dendrograma de las cepas de la muestra 2 de la Tienda 1 del estado de Puebla. Como se puede observar se obtuvieron dos grupos A y B, sin embargo, en el grupo A solo se posicionó una sola cepa (PM22) la cual tiene una relación un poco alejada de las demás cepas. En el caso del grupo B se obtuvo una relación escalonada entre las cepas PM23, PM21, PM27 Y PM25, seguido de por lo menos el 90% de similitud entre las cepas PM25 y cepas que obtuvieron 100% de similitud (PM28, PM26 y PM24). Algo muy importante de mencionar es que todas las cepas de esta muestra son *coa +* y *nuc -* y con respecto a la resistencia a antibióticos solo hay dos diferencias, para el antibiótico ampicilina solo la cepa PM25 resultó sensible en comparación con todas las demás resistentes y para el antibiótico Tetraciclina la cepa PM24 resultó ser sensible y las demás resistentes.

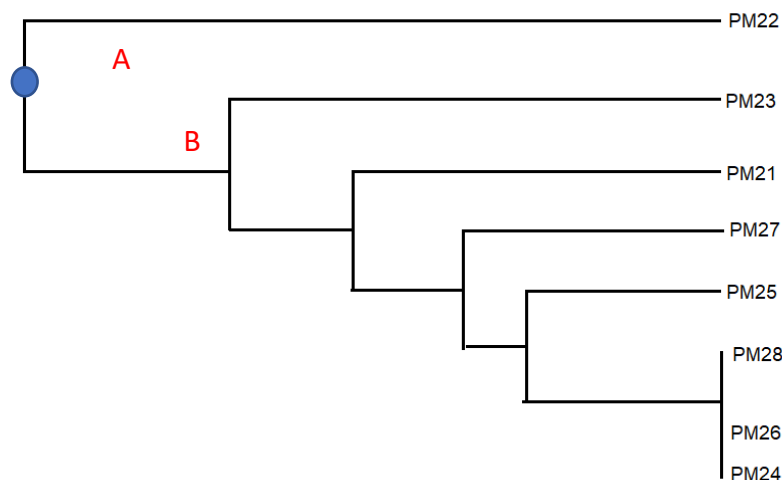


Figura 23. Dendrograma de cepas de Tienda 1 del estado de Puebla.

Por otra parte, se obtuvo el dendrograma con las cepas del Local 3 del estado de Tlaxcala. En este caso es muy notable los dos grupos obtenidos A y B, en el grupo A con una similitud del 100% se encuentran las cepas TM34, TM33, TM32 y TM31 y en el grupo B de igual forma con una similitud del 100% se encuentran las cepas TM38, TM37, TM36 y TM35. Comparándolas de manera completa, todas las cepas de esta muestra obtuvieron resultados de *coa +* y *nuc -* y refiriéndonos a sus resistencias a antibióticos, solo en el caso de la cepa TM34 para los antibióticos Tetraciclina, Vancomicina y Clindamicina resultó diferente a las demás cepas siendo para Tetraciclina con resistencia intermedia a diferencia de las demás sensibles, para Vancomicina resistente en comparación con las demás sensibles y para Clindamicina sensible en comparación con las demás resistentes (Figura 24).

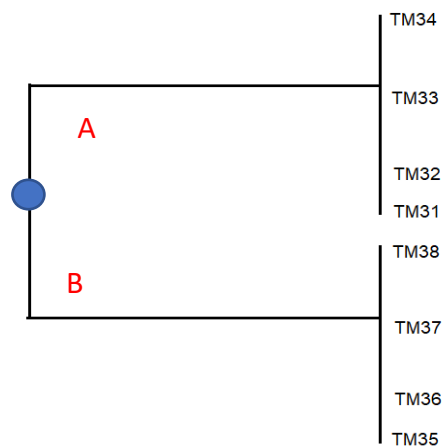


Figura 24. Dendrograma de cepas del Local 3 del estado de Tlaxcala.

11. Discusión

Staphylococcus aureus es una de las principales bacterias patógenas causantes de ETA's ya que, al consumirla, puede llegar a causar intoxicación debido a la ingestión de alimentos contaminados con sus enterotoxinas termoestables producidas por ella, como es el caso de la enterotoxina B estafilocócica (EBE) (CFSPH, 2007).

Dentro de la gama de alimentos en los que puede estar presente esta bacteria son los lácteos (Borbolla-Sala, *et al.* 2004) debido a que esta bacteria puede encontrarse en el ganado bovino, del cual se obtienen estos productos, y puede llegar a propiciar mastitis. Es por eso que en este trabajo se estudiaron y analizaron quesos frescos provenientes de los estados de Puebla y Tlaxcala.

Al encontrar *S. aureus* en muestras recolectadas directamente de los puntos de venta esto denota que tal vez las vacas de las cuales fue extraída la leche y posteriormente elaborado el queso puede llegar a presentar a la bacteria o una infección importante debido a ella, o bien, al momento de elaborarlos y manipularlos no se tomaron las normas de seguridad alimentaria correctas para garantizar su inocuidad (Perdomo y Meléndez, 2004).

Realizar las pruebas bioquímicas, en este caso coagulasa, fue con el fin de determinar si las colonias aisladas de las diferentes muestras aisladas tienen la capacidad de coagular dicha enzima. Esta prueba es muy sensible y específica para esta bacteria ya que la presencia de esta proteína representa un importante factor de virulencia (Zandejas-Manzo *et al.* 2014). En este estudio se observó que la mayoría de las colonias de las muestras obtenidas son coagulasa positiva, lo cual es un indicativo de que se tratan del patógeno *Staphylococcus aureus* y de que tal vez se pueda tratar de bacterias virulentas.

Por su parte la prueba molecular para detectar el gen *nucA* se realizó con el fin de confirmar si las colonias aisladas de las diferentes muestras adquiridas se trataban de *S. aureus* productoras de enterotoxinas y virulentas. El gen *nucA* codifica para la enzima termonucleasa también es producida por la mayoría de las cepas de esta

bacteria y de igual forma es usado como un principio para la detección de *S. aureus* (Hamdan-Partida, *et al.*, 2016).

La prueba de resistencia a antibióticos es importante realizarla ya que se tiene registrado que *S. aureus* es resistente a la penicilina y vancomicina (Bustos, *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque la mayoría obtuvieron resistencia o resistencia intermedia a Penicilina, por lo menos todos los aislados de los estados de Puebla y Tlaxcala fueron sensibles al antibiótico vancomicina, esto quiere decir que, aunque se puede tratar de esta bacteria son cepas no resistentes a este antibiótico y podría llegarse a utilizar como tratamiento para las vacas con mastitis, si es que de ahí proviene la bacteria en cuestión.

De acuerdo con los datos de resistencia a antibióticos obtenidos en este trabajo, se detectó una mayor resistencia bacteriana en el estado de Puebla en comparación con Tlaxcala y la Comarca Lagunera para los antibióticos Gentamicina, Ampicilina, Eritromicina, Cefalotina, Clindamicina y Trimetoprim/Sulfametoxazol. La resistencia a estos antibióticos concuerda con lo publicado por Novales (2011) donde hace énfasis en que de las cepas obtenidas para su estudio presentaron un alto nivel de resistencia para los mismos antibióticos.

El uso excesivo y constante de los antibióticos ha ocasionado el surgimiento de bacterias que son resistentes a múltiples antibióticos o multirresistentes que ocasionan que aún los fármacos más eficientes ya no lo sean. Existe un grupo bacteriano denominado ESKAPE el cual incluye seis patógenos que presentan multirresistencia a antibióticos y dentro de ellos se encuentra la bacteria de estudio: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp (Guevara, *et al.*, 2021).

Por otro lado, hablando de la prueba PCR para la detección de *nuc*, en el caso de las muestras obtenidas del estado de Puebla solamente 11 colonias aisladas, las cuales son de las muestras 1, 3, 4 y 5, salieron positivo a esta prueba. En el caso de las colonias de las muestras de Tlaxcala no se encontró ninguna cepa que

resultara positiva y para la Comarca Lagunera, en los archivos del Laboratorio de Patogenicidad, se tuvo registrado que 7 de 20 cepas dieron positivo a la prueba molecular. Esto nos abre una brecha en nuestro panorama ya que entonces hablamos de que no todas las cepas que dan positivo a la prueba coagulasa dan positivo a prueba termonucleasa. Es posible que en un futuro trabajo puedan detectarse otro tipo de genes, como *femB*, el cual también es otro indicador clínico para la detección de *Staphylococcus aureus* (Hamdan, *et al.*, 2015).

Existen varios métodos para la tipificación molecular como la biotipificación, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y las basadas en PCR han manifestado ser confiables, pero son costosas, laboriosas y técnicamente exigentes. RAPD-PCR es una técnica que tiene como principio la PCR y es efectiva para relación clonal entre cepas, además de que una técnica muy sencilla, económica y útil que ha sido empleada para la tipificación de aislados de *S. aureus* (Reinoso, *et al.*, 2004; Pereira, *et al.*, 2002; Zare, *et al.*, 2019; Meza, *et al.*, 2006).

La tipificación molecular hecha en este trabajo expuso que existen polimorfismos genéticos en las colonias aisladas de *Staphylococcus aureus* de las diferentes muestras recolectadas de Puebla y Tlaxcala y de las muestras de la zona de la Comarca Lagunera. Esto se puede deber debido a que los aislamientos están sometidos a muchos factores de presión selectiva como el uso de antibióticos contra una infección (Meza, *et al.*, 2006).

Con el uso del oligonucleótido hallado en la literatura OLP11 el polimorfismo genético de las pruebas aisladas se observó que está presente gracias a la técnica de RAPD-PCR, que mostró patrones de bandas claros y en mayoría de los casos comunes en casi todas las muestras. Esto concuerda con el trabajo hecho por Zare y colaboradores (2019) donde de igual forma hicieron uso de este oligonucleótido para la tipificación de *S. aureus* de aislamientos de infecciones en humanos, billetes de banco, alimentos y leche de vacas con mastitis.

El dendrograma obtenido como resultado de los polimorfismos encontrados por la amplificación, refleja que los aislamientos de este trabajo pertenecientes a diferentes lugares de México presentan una gran diversidad de polimorfismos, generando 3 grandes grupos los cuales se dividen a su vez en subgrupos pequeños presentando similitudes de 100%, 90%, 60% y hasta 30%. Lo más importante a destacar es que existieron similitudes entre muestras distintas de un mismo estado y entre diferentes muestras de diferentes estados lo cual es un indicativo de la existencia de diversidad genética.

Tomando en cuenta los dendrogramas obtenidos a partir de resistencia a los antibióticos vancomicina y oxacilina donde resultaron ser algunas cepas de Tlaxcala y Comarca Lagunera para el caso de oxacilina y solo una cepa de Tlaxcala y unas cuantas de la Comarca para vancomicina es importante recalcar que, aunque coinciden tener en común esta característica en la mayoría de las cepas no se logran apreciar grandes similitudes entre cepas de los dos diferentes lugares. Esta relación se realizó con la finalidad de hacer una comparación entre antibióticos que se han descrito como importantes en la detección de *Staphylococcus aureus* MRSA (resistente a la meticilina) (Elkady, *et al.*, 2022).

Por último, es importante recalcar que con los dendrogramas realizados para las cepas de un mismo lugar y muestras en el caso de Puebla se observó diversidad esperando que por ser cepas de la misma muestra fueran mayormente semejantes por los resultados obtenidos de las pruebas de *coa* y *nuc* y la sensibilidad de antibióticos. Caso contrario con las cepas de Tlaxcala, en este caso si se obtuvo una mayor similitud en cuanto a cepas de una misma muestra, sin embargo, algo de llamar la atención es la cepa TM34 la cual solo resultó ser diferente en cuanto a resistencia a ciertos antibióticos y en el dendrograma de resistencia a Vancomicina tuvo similitud con una cepa de la Comarca Lagunera (R). Se podría pensar que los genes productores de estas resistencias podrían no encontrarse de forma endógena en el genoma de la bacteria, sin duda esta cepa podría ser de interés para futuras investigaciones.

12. Conclusiones.

Es de importancia hacer conciencia en que elaborar alimentos con altos índices de bacterias patógenas puede conllevar a grandes problemas de salud pública. Existe mucha desinformación acerca de este tema.

Por otro lado, se piensa que las bacterias aisladas de todas las muestras obtenidas de diferentes zonas del país pueden resultar ser virulentas y productoras de toxinas debido a todos los resultados de las pruebas hechas en este trabajo. Al realizar la tipificación genética con la técnica de RAPD-PCR, los aislados de diferentes muestras y lugares presentaron polimorfismos lo cual es un indicativo de que entre ellos existe diversidad genética.

La cepa TM34 extraída del estado de Tlaxcala y de la muestra 3 podría llegar a ser de interés para futuras investigaciones debido a las diferencias obtenidas respecto a las demás cepas de su mismo grupo.

RAPD-PCR es una técnica que puede ser utilizada para poder detectar las fuentes de la infección y el manejo de estas por *Staphylococcus aureus*, así como estudios epidemiológicos.

13. Referencias

Aguas, E. M., Jiménez, I. N., Iguaran, E. M., y Morales, K. P. (2017). Importancia en Salud Pública y modelamiento de *Staphylococcus Aureus* en alimentos. *Mente Joven*, 6, 36-53.

Alvarado, V. H., Mora, M., Arias, M. L., Rojas, N., y Chaves, C. (2011). Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 20(2), 102-106.

Anangonó Martínez, D. T. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis en tres estratos lecheros del cantón Mejía.

Boothby, J., Genigeorgis, C., y Fanelli, M. J. (1979). Tandem coagulase/thermonuclease agar method for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology*, 37(2), 298-302.

Borbolla-Sala, M. E., del Rosario Vidal-Pérez, M., Piña-Gutiérrez, O. E., Ramírez-Messner, I., y Vidal-Vidal, J. J. (2004). Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. *Salud en Tabasco*, 10(2), 221-232.

Brakstad, O. G., Aasbakk, K., y Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of clinical microbiology*, 30(7), 1654-1660.

Bustos, J., Hamdan, A., y Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*, 17(4), 287-305.

Cervantes-García, E., García-González, R., y Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.

Contreras, G. L. P., Pérez, E. M., Pacheco, S. V., y Almazán, S. E. G. (2003). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. *Revista Médica del Hospital General de México*, 66(1), 13-21.

Corbellini, C., Lechero, P., y de la Enfermedad, I. E. (2002). La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. *Argentina: Instituto de Tecnología Agropecuaria, Proyecto Lechero, EEA INTA Pergamino. Recuperado el, 15.*

Cotaquispe, R., Sarmiento, R., Lovón, S., y Rodríguez, J. (2021). Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus* spp con resistencia a metilina en pollos comerciales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(3).

Crespo, A., Blanco, O., Cubero, O. F., Molina, M. C., y Cubas, P. (1999). Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones

especiales para el análisis de los hongos liquenizados. *Botanica Complutensis*, 23, 13-51.

Cuenca, F. F., Cerero, L. L., y Hernández, Á. P. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 20-25.

Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23.

Delgado, R. L. C., y Torres, D. J. M. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 14(3), 158-164.

Denso Pepper, C. (1988) National Center of Biotechnology Information. Windows. Bethesda, Maryland: Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos.

Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., y Palacios, E. S. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 53.

Díaz-Rivero, C., y de García, B. G. (2001). *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Revista salud pública y nutrición*, 2(3).

Eley, A. R. (1992). Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. In *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana* (pp. 208-208).

Elkady, F. M., Al-Askar, A. A., Tawab, A. A., Alkherkhisy, M. M., Arishi, A. A., y Hashem, A. H. (2022). Comparative Genotypic Analysis of RAPD and RFLP Markers for Molecular Variation Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Medicina*, 58(9), 1245.

Fernández Bolaños, O. F., Trujillo Graffe, J. E., Peña Cabrera, J. J., Cerquera Gallego, J., y Granja Salcedo, Y. T. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista electrónica de Veterinaria*, 13(11), 1-20.

Foster, T. J., y Geoghegan, J. A. (2015). Staphylococcus aureus. *Molecular Medical Microbiology*, 655-674.

Guevara Díaz, J. A., Maldonado, M. R., Valadez Padilla, D. E., Muro Díaz, R., Palomares, M., y Rikimatsu, I. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 41(3), 111.

Hakimi Alni, R., Mohammadzadeh, A., Mahmoodi, P., y Alikhani, M. Y. (2017). RAPD-PCR analysis of Staphylococcus aureus strains isolated from different sources. *Comparative Clinical Pathology*, 26(4), 823-830.

Hamdan-Partida, A., González García, S., y Bustos-Martínez, J. (2015). Identificación de Staphylococcus aureus utilizando como marcadores los genes nucA y femB. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 37-41.

Iza, B., y Pamela, D. (2021). *Detección de Staphylococcus aureus y perfil fenotípico de resistencia a antibióticos en alimentos de restaurantes aledaños a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Central del Ecuador* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

Jasper, D. E., Infante, F. I. D. E. L., y Dellinger, J. D. (1985). Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. *Journal of clinical microbiology*, 21(4), 582-584.

Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R., y Rozee, K. R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in Staphylococcus aureus by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), 426-430.

Lachica, R. V. F., Genigeorgis, C., y Hoeprich, P. D. (1971). Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Applied microbiology*, 21(4), 585-587.

Lakhundi, S., y Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>

López-Pueyo, M. J., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., y Garnacho-Montero, J. J. M. I. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*, 35(1), 41-53.

Luján, D., Valentín, M., y Molina, M. (2006). Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima-Perú. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(2).

Manjarrez López, A. M., Díaz Zarco, S., Salazar García, F., Valladares Carranza, B., Gutiérrez Castillo, A. D. C., Barbabosa Plliego, A., ... y Velázquez Ordoñez, V. (2012). Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(2), 265-274.

Martínez Jiménez, L. (2021). Resistencia a daptomicina en el género *Staphylococcus*: Análisis lipídico y genético. *Proyecto de investigación*.

Mellenberger, R., y Kirk, J. (2001). Vacas lecheras infectadas con *Staphylococcus aureus*.

Meza, J. E. L., Ramos, J. E. H., Zarzosa, A. O., Noria, O. C., Alarcón, J. J. V., Patiño, A. B., y Aguirre, V. M. B. (2006). Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Técnica pecuaria en México*, 44(1), 91-106.

Munive, M. G. R., González, A. G., y Dugua, X. A. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 101.

Novalés, M. G. M. (2011). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 68(4), 262-270.

Pachá Becerra, P. A. (2015). Evaluación de la diversidad genética de *Staphylococcus aureus* aislados desde leche de estanque de rebaños lecheros de las provincias de Bio Bío y Ñuble, región del Bio Bío, Chile.

Palomino-Camargo, C., y González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 535-546.

Perdomo, I., y Meléndez, P. (2004). Determinación y aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* enterotoxigénicos a partir de alimentos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 33(1).

Pereira, M. S. V., Leal, N. C., Leal, T. C. A., Sobreira, M., De Almeida, A. M. P., Siqueira-Júnior, J. P., y Campos-Takaki, G. M. (2002). Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *Letters in applied microbiology*, 35(1), 32-36.

Picó Sirvent, M. B., y Pérez de Castro, A. M. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA).

Ramírez-López, C., y Vélez-Ruiz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6(2), 131-148.

Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., DiRenzo, M., Calzolari, A., y Bogni, C. (2004). RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiological research*, 159(3), 245-255.

Restrepo, J., Ortiz, L., Cardona, X., y Olivera, M. (2012). Evaluación de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular del *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis. *Biosalud*, 11(2), 40-51.

Ruiz, A. R. (2015). Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. *Recuperado de http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf*.

Salto, I. (2013) Identificación y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en queso cotijo artesanal madurado.

Saltos Solórzano, J. V., Márquez Bravo, Y. J., López Apolinario, A. I., Martínez Abreu, J., y Guerrero Proaño, D. G. (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.

Stephen, J., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., y Sautter, R. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. *Seattle: University of Washington*.

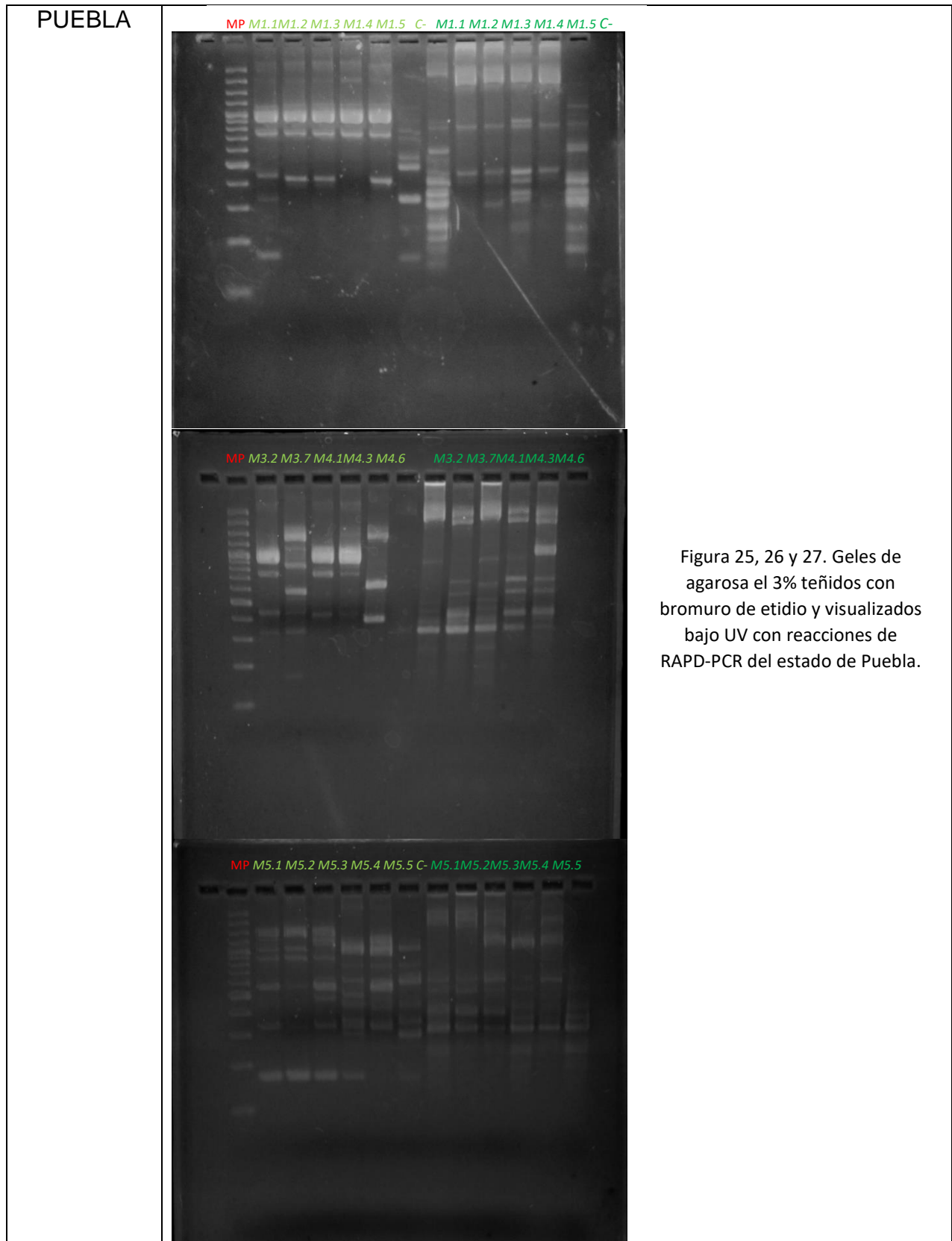
Suarez, M. J., Arias, M. L., y Gamboa, M. D. M. (2008). Detección de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su correlación con las pruebas de coagulasa y termonucleasa. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 58(1), 59-63.

Velásquez, S. D. C. J., Higuera, L. D. T., Arango, J. L. P., Bautista, J. L. R., Castro, F. E. G., y Burbano, R. E. P. (2020). Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121-130.

Zare, S., Derakhshandeh, A., Haghkhah, M., Naziri, Z., y Broujeni, A. M. (2019). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* from different sources by RAPD-PCR analysis. *Heliyon*, 5(8), e02231.

Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., y Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

ANEXO 1. Fotografías de geles de agarosa 3% con reacciones de RAPD-PCR



TLAXCALA

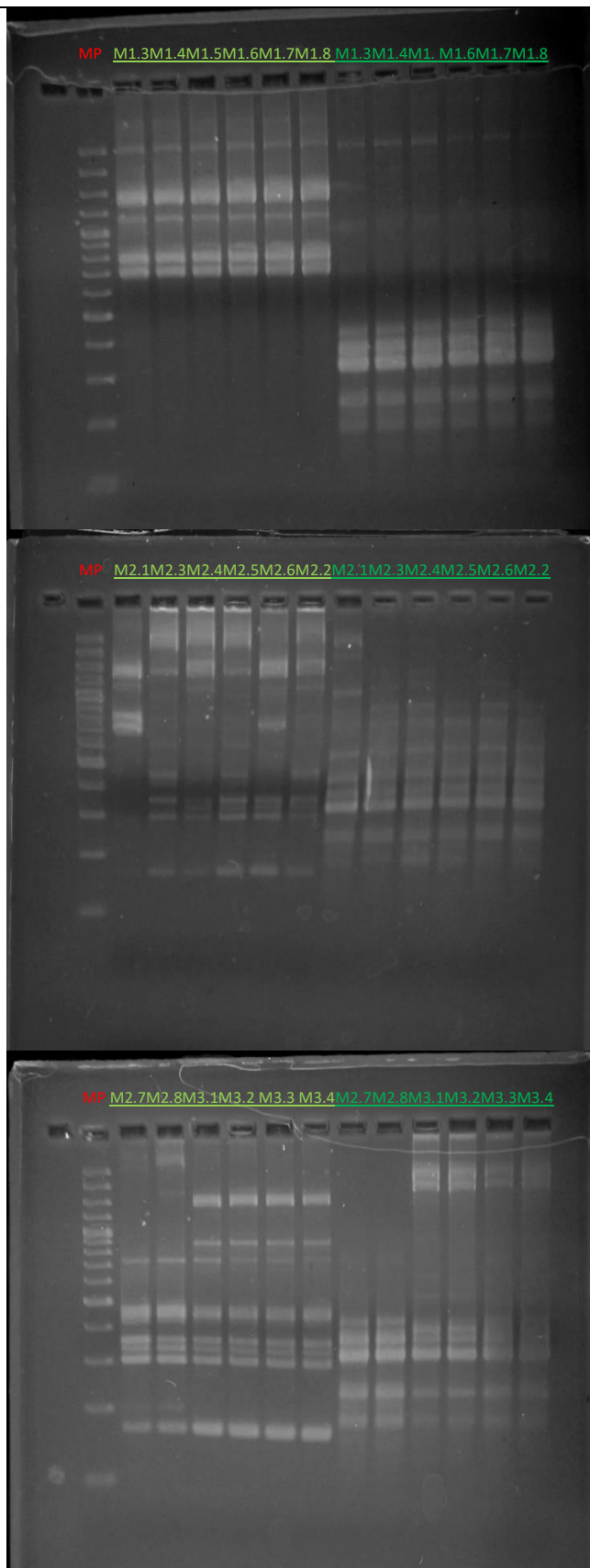


Figura 28, 29 y 30. Geles de agarosa el 3% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo UV con reacciones de RAPD-PCR del estado de Tlaxcala.

COMARCA
LAGUNERA

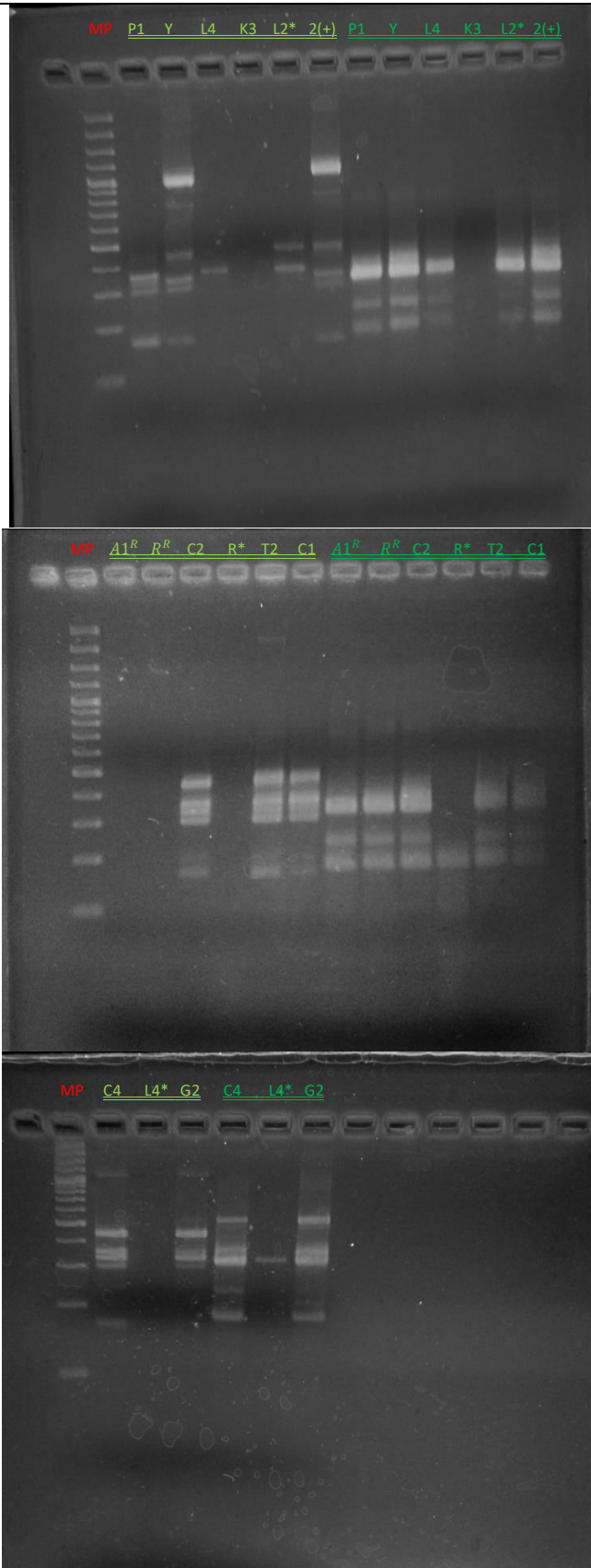


Figura 31, 32 y 33. Geles de agarosa el 3% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo UV con reacciones de RAPD-PCR de Comarca Lagunera.

