

## 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

María José Suarez, María Laura Arias y María del Mar Gamboa

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

**RESUMEN:** *Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena, de amplia distribución en la naturaleza, asociada con infección general y brotes alimentarios. La relación de esta bacteria con cuadros alimentarios se ha realizado, históricamente, a partir de varias pruebas, incluyendo la coagulasa, termonucleasa, y en la actualidad, PCR para los genes que codifican específicamente por la enterotoxina responsable del cuadro. El presente trabajo pretende detectar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa la presencia del gen que codifica para la enterotoxina A en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de alimentos, así como correlacionar la presencia de este gen con la producción de las enzimas coagulasa y termonucleasa. Se analizaron 69 cepas de estafilococos, 58 provenientes de muestras de leche no pasteurizada de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata y 11 de la colección del Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Se les realizó a las cepas las pruebas de coagulasa, termonucleasa y enterotoxina A, y un análisis estadístico entre los resultados obtenidos para verificar su posible asociación. Los resultados demuestran que no existe correlación entre las tres variables, no obstante, todas las cepas coagulasa positivas fueron termonucleasa pero no así a la inversa y todas las cepas enterotoxina positiva son también coagulasa y termonucleasa positivas, no así a la inversa. Lo anterior pone de manifiesto el que utilizar pruebas presuntivas o indirectas para evidenciar enterotoxigenicidad en cepas de *S. aureus* no es confiable y por lo tanto es recomendable realizar el análisis directo de éstas utilizando técnicas altamente sensibles y específicas, como es el PCR.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, enterotoxina, coagulasa, termonucleasa, PCR.

### INTRODUCCION

*Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena, de amplia distribución en la naturaleza, asociada con infección general y brotes alimentarios (1). Los cuadros de origen alimentario son muy frecuentes, a pesar de que se da un importante subregistro y ocurren desde tiempos inmemorables. Esta bacteria es capaz de producir gran cantidad de toxinas extracelulares y factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad. Hasta hace algunos años, para asociar esta bacteria a un cuadro alimentario, se hacía una prueba de

**SUMMARY.** *Staphylococcus aureus* enterotoxin A detection using the polymerase chain reaction (PCR) and its correlation with coagulase and thermonuclease tests. *Staphylococcus aureus* is a pathogenic bacterium, widely distributed on nature and associated to general infection and food borne outbreaks. The relationship between this bacterium and food borne outbreaks has been done, historically, using several tests, including coagulase, thermonuclease and actually, PCR for the genes codifying for the enterotoxin responsible of clinical symptoms. The objective of this work is to detect enterotoxin A codifying gene through PCR in a group of *S. aureus* strains isolated from food samples, and also to correlate the presence of this gene with the production of coagulase and thermonuclease enzymes. A total of 69 staphylococcal strains were analyzed, 58 obtained from non pasteurized milk samples from the Estación Experimental Alfredo Volio Mata and 11 from the Food and Water Microbiology Laboratory collection, Universidad de Costa Rica. Coagulase, thermonuclease and enterotoxin A were analyzed in all the strains, and a statistical correlation was performed in order to verify possible associations. Results show that there is no correlation between the three variables, nevertheless, all coagulase positive strains were thermonuclease positive, and all enterotoxin positive strains were coagulase and thermonuclease positive, but not inversely. These results show that the use of presumptive or indirect tests for establishing enterotoxigenicity of *S. aureus* strains is not truthful, more sensible and specific analysis, as PCR, shall be performed.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, coagulase, thermonuclease, PCR.

coagulasa en tubo; no obstante, hoy se conoce de otras especies diferentes a *S. aureus* que también pueden dar esta prueba positiva, o bien, cepas que dan esta prueba negativa y son enterotoxigénicas, por lo que han surgido métodos más definitivos y específicos (2,3).

Seguidamente, surgió la prueba de termonucleasa como una alternativa rápida y precisa para la identificación de esta bacteria (4). Se ha descrito una relación entre la presencia de esta enzima y la producción de coagulasa y una correlación aún más estrecha entre la producción de la termonucleasa y la producción de enterotoxina (5). A diferencia de la coagulasa,

esta prueba es capaz de detectar cepas de *S. aureus* coagulasa negativas pero enterotoxina positivas. No obstante, también se ha sido discutida ampliamente su asociación con patogenicidad (4,5).

Dentro de los métodos de diagnóstico de esta bacteria más actualizados y exactos, se encuentra la detección de enterotoxinas termoestables (6), destacándose la enterotoxina A, que es la que con mayor frecuencia se asocia a brotes de intoxicación alimentaria y que es extremadamente potente; una cantidad tan pequeña como 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación (7).

Existe un gran número de métodos fenotípicos para el análisis de esta enterotoxina, pero dado que las secuencias nucleótidas de los genes de ésta han sido localizados en bacteriófagos vectores (8) y secuenciados, es posible la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para su detección rápida y confiable (9).

El presente trabajo pretende detectar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa la presencia del gen que codifica para la enterotoxina A en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de alimentos, así como correlacionar la presencia de este gen con la producción de las enzimas coagulasa y termonucleasa.

## MATERIAL Y METODOS

### Localización del proyecto

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, durante los meses de Abril a Noviembre del 2006.

### Cepas utilizadas

#### Obtención de las cepas de *S. aureus*

Se utilizaron once cepas de *S. aureus* aisladas previamente de quesos de origen costarricense, y que pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Microbiología. Además se emplearon 58 cepas de *S. aureus*, aisladas de muestras de leche no pasteurizada provenientes de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata. Como control positivo de enterotoxina se utilizó la cepa ATCC 13565 y como control negativo la cepa ATCC 25923.

#### Prueba de coagulasa

Se realizó la prueba estandarizada de coagulasa en tubo utilizando plasma de conejo (10).

#### Prueba de termonucleasa

Se realizó según la metodología descrita por Lachica *et al.*, utilizando agar ADNasa (11).

### Extracción de ADN de las cepas de *Staphylococcus aureus*

La extracción de ADN de todas las cepas de *S. aureus* se realizó de acuerdo con la metodología utilizada por Johnson *et al.* (12). Brevemente, se cultivaron las cepas en caldo infusión de cerebro por 18 horas. Se transfirió 1 mL del cultivo y se centrifugó a 2000 rpm por 10 min; al sedimento se le agregó el mililitro de cultivo restante y se repitió la centrifugación. El sedimento se resuspendió en 0,3 mL de PBS con 1 mg de lisozima por mL. Se incubó a 37°C durante 1,5 horas. Se adicionó 0,3 mL de SDS 1% y se dejó la solución por 5 min. Luego se agregó 0,6 mL de fenol buferizado y se agitó por inversión por 10 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm por 20 min y se removió la fase superior acuosa y se transfirió a otro tubo limpio. Posteriormente se agregó 0,3 mL de fenol buferizado y 0,3 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó nuevamente por inversión por 10 min, se repitió la centrifugación y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se procedió a agregar 0,6 mL de cloroformo, se mezcló por inversión por 10 min y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se transfirió la fase superior a otro tubo limpio y se le agregó 1 mL de isopropanol. Se centrifugó a 15000 rpm por 1 hora. Se decantó y se descartó el sobrenadante.

El botón se lavó con 0,5 mL de etanol al 70% y se secó. Finalmente el botón se resuspendió en 0,1 mL de amortiguador TE y se dejó disolver a 4°C. El ADN se almacenó a -20°C.

Para confirmar la extracción de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador Mass Ruler ADN.

### Imprimadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron los imprimadores empleados por Johnson *et al.* (8, 12), los cuales están diseñados para amplificar una región interna del gen codificante para la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus*. En la Tabla 1 se muestra el detalle de estos imprimadores.

TABLA 1  
Imprimadores utilizados en el PCR

Imprimador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Contenido CG (%)
Sea1	TTGGAACGCT TAAAAC	120	35
Sea2	GAACCTCCCA TCAAAAACA		40
Sear1	GGTTATCAATGT GCGG	102	55
Sear2	CGGCACTTTTTC TCTTCGG		50

### Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de la enterotoxina A

Para la estandarización del método se trabajó únicamente con las cepas de *S. aureus* utilizadas como control tanto positivo como negativo en diferentes diluciones (1:1; 1:10; 1:50; 1:100). Se siguió el protocolo descrito por Johnson *et al.* (8) con las siguientes modificaciones: la mezcla de reacción final contenía un volumen de 25 µL compuesto por 1 µL de ADN, 1 µL de imprimadores, 10,5 µL de agua libre de nucleótidos para PCR y 12,5 µL de mezcla para PCR 2X. Esta mezcla incluye 0,05 U/µL de Taq polimerasa, los desoxirribonu-cleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0,4 mM y MgCl<sub>2</sub> 4 mM.

El ciclo de reacción con el primer par de imprimadores (sea1 y sea2) consistió en una desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, 30 ciclos constituidos a su vez de una desnaturalización de 2 min nuevamente a 94°C, alineamiento de los imprimadores a 55°C por 2 min y la extensión a 72°C por 1 min. Finalmente un último ciclo de extensión de 7 min a 72°C.

El segundo ciclo de reacción con el segundo grupo de imprimadores consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 35 ciclos constituidos a su vez de una desnaturalización de 2 min nuevamente a 94°C, alineamiento de los imprimadores a 57°C por 2 min y la extensión a 72°C por 1 min. Finalmente un último ciclo de extensión de 7 min a 72°C (12).

Se utilizó como control negativo la cepa *S. aureus* ATCC 25923 y un blanco con todos los reactivos de PCR excepto el ADN.

Para la visualización de los productos se realizó una electroforesis en una cámara Iotodyne con una fuente de poder BioRad. En este caso se empleó un gel con agarosa al 2% en amortiguador TBE 0,5X teñido con bromuro de etidio (1 mg/mL). Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador Mass Ruler ADN. Los productos se separaron a 150 V por 1 hora aproximadamente. Se tomó una fotografía con el programa Kodak IDLE y una cámara modelo DC290.

### Estudio de correlación entre la producción de enterotoxina A, coagulasa y termonucleasa

A partir de los resultados obtenidos en las tres pruebas se realizó un análisis de coeficiente de correlación (13) de coagulasa con termonucleasa, termonucleasa con enterotoxina A y finalmente coagulasa con enterotoxina A (95% significancia).

## RESULTADOS

Se analizó un total de 69 cepas, 58 provenientes de las muestras de leche no pasteurizada de la Estación Experimental Alfredo Volio y 11 provenientes de queso, todas de la colección del Laboratorio de Alimentos y Aguas. Los datos obtenidos para las pruebas de coagulasa, termonucleasa y PCR se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Comparación de los resultados obtenidos para las pruebas de coagulasa, termonucleasa y enterotoxina A por PCR

	Coagulasa	Termonucleasa	Enterotoxina A
Número de muestras positivas	24/69	46/69	7/69
Porcentaje (%)	35	67	10,14

### Prueba de coagulasa

Un total de 24 (35%) de las cepas analizadas presentaron la formación de coágulo.

### Prueba de termonucleasa

El 67% de las cepas evaluadas fue positivo para esta prueba.

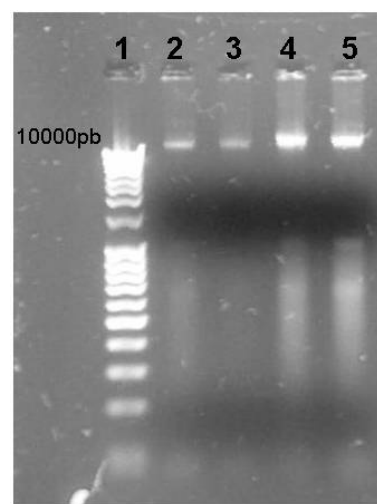
### Extracción de ADN

Inicialmente, después de realizar la extracción de ADN según Johnson *et al.* (9), la electroforesis y tomar la fotografía no se observó ningún producto. Sin embargo, después de aumentar la concentración de lisozima a 1 mg/mL y el tiempo de incubación a 1,5 horas, se logró obtener en todos los casos, una banda de aproximadamente 10000 pb, esto según la comparación con el marcador molecular Mass Ruler DNA® (Figura 1).

FIGURA 1

Gel de agarosa con los productos obtenidos después de una extracción de ADN en cepas de *Staphylococcus aureus*.

1) Marcador molecular Mass Ruler DNA®. 2,3) ADN ATCC 13565. 4,5) ADN ATCC 58.



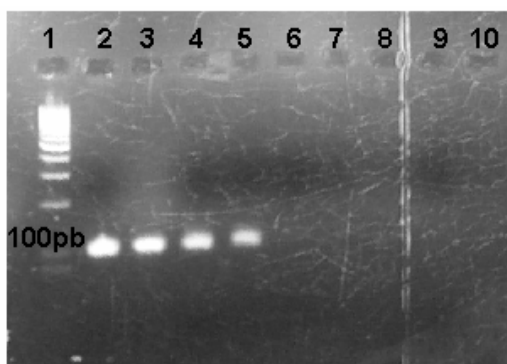
### Detección de enterotoxina A mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Se siguió la metodología descrita por Johnson *et al.* (8) con los imprimadores sea1 y sea2, pero pese a que se evaluó la concentración de magnesio variándola en 0,5 mM, desde 2,5 mM hasta 4 mM y temperatura de hibridación de 55°C a 50°C, no se logró obtener ningún producto.

Finalmente se procedió a utilizar la metodología descrita por Johnson *et al.* (12) utilizando los imprimadores sear1 y sear2. En este caso sí se logró obtener un producto con un peso molecular de aproximadamente 100 pares de bases de acuerdo a la comparación con el marcador molecular Mass Ruler DNA® (Figura 2).

FIGURA 2

Gel de agarosa con los productos obtenidos a partir del PCR en las cepas control. 1) Marcador Molecular Mass Ruler DNA®. 2) Control positivo (1:1). 3) Control positivo (1:10). 4) Control positivo (1:50). 5) Control positivo (1:100). 6) Control negativo (1:1). 7) negativo (1:10). 8) Control negativo (1:50). 9) Control negativo (1:100). 10) Blanco



Al analizar las cepas, se observó la banda correspondiente al gen de la enterotoxina A en 7 de éstas cepas, es decir en un 4,8%.

### Análisis de correlación entre las variables analizadas

Con los datos obtenidos y una precisión del 95% se observa que no existe correlación entre las pruebas de coagulasa-termonucleasa, coagulasa-enterotoxina A y termonucleasa-enterotoxina A.

## DISCUSION

Debido a que las enterotoxinas estafilocócicas son una de las principales causas de intoxicación alimentaria, su detección es un factor esencial tanto para un diagnóstico preciso como para el rastreo de productos contaminados. En muchos laboratorios se realizan pruebas enzimáticas para detectar la producción de coagulasa o de termonucleasa como una medida

presuntiva para cepas enterotoxigénicas; sin embargo, la asociación entre éstas ha sido muy discutida (14). Al respecto, Boothby *et al.* (15) destacan que la producción de coagulasa y termonucleasa representan alternativas confiables para la identificación del *S. aureus*, aparte de que no requieren mucho tiempo ni dinero para su realización, pero su correlación con la producción de enterotoxinas no es posible debido a que son frecuentes en cepas de *S. aureus* no enterotoxigénicas. Igualmente, Gandra *et al.* señalan que especies como *S. intermedius* y *S. hyicus* también son tanto coagulasa como termonucleasa positivas por lo que en una detección indirecta de enterotoxinas éstas resultarían en falsos positivos (16). Por otro lado, Jablonsky y Bohac (17) añaden el que la situación se complica con la aparición de nuevas cepas enterotoxigénicas pero coagulasa negativas, las cuales podrían considerarse variantes o mutantes de las especies *S. aureus* productoras de enterotoxinas.

Dado lo anterior, la evaluación directa de enterotoxina resulta muy importante. Existen diversos métodos para su detección, incluyendo métodos inmunoenzimáticos (ELISA) y de radioinmunoensayo (RIA), pero con una sensibilidad variable. Ante esta realidad, el diseño de protocolos moleculares como la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) resulta una valiosa alternativa para la identificación de estas cepas toxigénicas.

Dentro de las ventajas de la técnica de PCR, cabe resaltar su alto grado de especificidad, y en el caso de la enterotoxina de *S. aureus*, los imprimadores están diseñados tomando en cuenta el alto grado de homogeneidad que existe entre los genes de las diferentes enterotoxinas (8).

Dado lo anterior, se procedió a determinar tanto la producción de coagulasa y termonucleasa como los genes que codifican por la enterotoxina A en cepas de *S. aureus*, así como un análisis de correlación entre las mismas.

Después de analizar todas las cepas se obtuvo una banda del tamaño esperado en siete de ellas demostrando así la efectividad del procedimiento para detectar, en este caso, la enterotoxina A. Esto es de suma importancia ya que la cantidad de enterotoxina necesaria para causar los síntomas en un paciente es mínima (menos de 1µg) por lo que se necesita un método altamente sensible, característica que cumple el PCR (14).

Posteriormente, al analizar los resultados de las tres pruebas para cada cepa, no se observó ninguna correlación estadística entre las mismas. Sin embargo, todas las cepas coagulasa positivas fueron termonucleasa positivas (con una única excepción) pero no así a la inversa. Lo mismo ocurre con la presencia del gen de la enterotoxina A, todas las cepas que resultaron enterotoxina positiva son también coagulasa y termonucleasa positivas, no así a la inversa.

Resultados semejantes han sido citados en la literatura, donde se destaca la creciente aparición de cepas de *S. aureus*

coagulasa negativas pero enterotoxina positivas (18) así como una correlación negativa entre la síntesis de producción de termonucleasa y enterotoxina, donde se reporta la producción de termonucleasa a través de toda la curva de crecimiento de la bacteria y no así de las enterotoxinas, donde la producción se da a nivel de fase exponencial e inicios de la fase estacionaria (19).

Por otro lado Neil *et al.* (20) encontraron una correlación mayor al 93% entre el genotipo y el fenotipo para los genes de las enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sec* y *see*; no obstante, destacan que la confiabilidad y reproducibilidad de esta correlación depende de la expresión genética (8).

Se evidencia por lo tanto que existe una discrepancia entre cepas coagulasa y termonucleasa positiva, las cuales no necesariamente son enterotoxigénicas y viceversa. Lo anterior pone de manifiesto el que utilizar pruebas presuntivas o indirectas para evidenciar enterotoxigenicidad en cepas de *S. aureus* no es confiable y por lo tanto es recomendable realizar el análisis directo de éstas utilizando técnicas altamente sensibles y específicas, como el PCR.

#### REFERENCIAS

- Hsiao M, Chen T & Tsen H. Novel PCR primers for specific detection of C1, C2 and C3 enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus*. J Food Drug Anal. 2003.11: 338-343.
- Kloos, W & Schleifer K. Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species. J Clin Microbiol. 1975. 1: 82-88.
- Watts J, Nickerson S & Pankey J. Evaluation of the API Staph-Ident system for identification of staphylococci isolated from bovine intramammary sources. Dairy Research Report, Hill Farm Experiment Station. 1983. 1: 253-282.
- Ratner, H & Stratton C. Thermonuclease test for same day identification of in blood cultures. J Clin Microbiol. 1990. 21: 995-996.
- Post D. Food-borne pathogens. Monograph Number 6. *Staphylococcus aureus*. Oxoid. 1999.
- Pepe o, Blaiotta G, Bucci F, Anastasio M, Aponte M & Villani F. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. Appl Environ Microbiol. 2006. 72: 7057-7062.
- Dinges M, Orwin P & Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000. 13: 16-34.
- Johnson W, Tyler F, Ewan E, Ashton F, Pollard D and Roxee K. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991. 29: 426-430.
- Becker, K., Roth, R. & Peters, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* by two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative genes, and toxic shock syndrome toxin one gene. J Clin Microbiol. 1998. 36: 2548-2553.
- Jasper D, Infante F & Dellinger J. Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin and thermonuclease tests on Staphylococci from cow milk. J Clin Microbiol. 1985. 21: 582-584.
- Lachica R, Genigeorgis C & Hoepflich P. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl Microbiol. 1971. 21: 585-587.
- Johnson W, Mehrotra M. & Wang G. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. J Clin Microb. 1999. 38: 1032-1035.
- Walpole R, Myers R & Myers S. 1999. Probabilidad y estadística para ingenieros. Prentice Hall Hispanoamericana, SA. México. 6 Ed. 730p.
- Beuchat L, Doyle M & Montville T. 2001. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 785p.
- Boothby J, Geniceorgis C. & Fanelli M. Tandem coagulase/thermonuclease agar method for detection of *S. aureus*. Appl Environ Microbiol. 1998. 37: 298-232.
- Gandra E, Silva J, Macedo M, Araujo M, Mata M & Silva W. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. Arch Vet Sci. 2005. 10: 75-87.
- Jablonsky L & Bohac G. 1997. *Staphylococcus aureus*. Food Microbiology. Editorial Press. Washington, EEUU. 353-376.
- Udo E, Al Bustan M, Jacob L & Chugh T. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. J Med Microb. 1999. 48: 819-823
- Otero A, García M, García C, Moreno B & Bergdoll S. Production of Staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. Appl Environ Microbiol. 1990. 56: 555-559.
- Neil R, Fanning G, Delahoz F, Wolff R & Gemski P. Oligonucleotide probes for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* strains containing genes for enterotoxins A, B, and C and toxic shock syndrome toxin 1. J Clin Microbiol. 1990. 28: 1514-1518.

Recibido: 22-10-2007

Aceptado: 17-12-2007