

Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana.

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVA AISLADAS EN ALIMENTOS Y MANIPULADORES

Yamila Puig Peña^{1¶}, María Espino Hernández^{2§}, Virginia Leyva Castillo^{3¶}, Neibys Apórtela López^{4¶}, Yoldrey Pérez Muñoz^{5¶}, Perla Soto Rodríguez^{6¶}.

RESUMEN

Justificación: La intoxicación estafilocócica es frecuente entre las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Preocupa a todos la resistencia a los anti-microbianos de las cepas de estafilococo coagulasa-positiva involucradas en brotes de ETAs. **Objetivo:** Establecer el fenotipo de resistencia a antimicrobianos de cepas de estafilococo coagulasa-positiva aisladas de alimentos o presentes en manipuladores de alimentos. **Material y método:** Se estudió la resistencia a diversos antibióticos de 317 cepas de estafilococo coagulasa-positiva aisladas en alimentos (89.0%) y manipuladores (11.0%) en el Departamento de Microbiología entre Noviembre del 2010 y Diciembre del 2012. La resistencia a los antibióticos de uso común se determinó mediante el método de Bauer-Kirby. En el caso de *Staphylococcus aureus* se determinó adicionalmente la resistencia a la meticilina después de tamizaje en agar con oxacilina. **Resultados:** *S. aureus* fue la especie predominante (86.4% de las cepas), seguida de *S. intermedius* (11.0%), *S. schleiferi subsp.coagulans* (1.6%) y *S. hycus* (0.9%). El 56.1% de las cepas fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos probados. La penicilina (52.9%), la eritromicina (30.3%) y la tetraciclina (24.4%) representaron los porcentajes de resistencia más altos. La quinta parte de las cepas de de *S. aureus* fueron resistentes a la meticilina. El 62.9% de las cepas aisladas fueron multirresistentes. Los patrones de resistencia antimicrobiana involucraron desde uno hasta cinco fármacos. **Conclusiones:** *S. aureus* fue la especie principal aislada. Se observó una alta proporción de aislamientos resistentes a los fármacos de uso común. La amplia diversidad de patrones de resistencia encontrados, así como el alto porcentaje de cepas multirresistentes identificadas, indican la necesidad de promover el uso racional de los antibióticos, la adopción de programas de higiene y prevención de ETAs, y la conducción de estudios epidemiológicos más profundos. **Puig Peña Y, Espino Hernández M, Leyva Castillo V, Apórtela López N, Pérez Muñoz Y, Soto Rodríguez P. Resistencia a los antimicrobianos en cepas de Staphylococcus coagulasa positiva aisladas en alimentos y manipuladores. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2015;25(2):245-260. RNP: 221. ISSN: 1561-2929.**

Palabras clave: *Farmacorresistencia bacteriana / Staphylococcus / Farmacorresistencia bacteriana múltiple.*

¹ Médico, Especialista de Segundo Grado en Microbiología. Máster en Nutrición en Salud Pública. Máster en Enfermedades Infecciosas. Profesora Auxiliar. Investigadora Auxiliar. ² Doctor en Ciencias de la Salud. Máster en Microbiología Clínica. Profesor Titular. Investigador Titular. ³ Bioquímica Especialista en Microbiología. Máster en Enfermedades Infecciosas. Profesor Asistente. Investigador Auxiliar. Jefa del Departamento de Microbiología de los Alimentos. ⁴ Licenciada en Ciencias de los Alimentos. ⁵ Licenciado en Microbiología. ⁶ Técnico en Microbiología.

¶ Departamento de Microbiología. Instituto de Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología.

§ Departamento de Microbiología y Parasitología Médica. Escuela Latinoamericana de Medicina.

Recibido: 5 de Julio del 2015. Aceptado: 20 de Agosto del 2015.

Yamila Puig Peña. Departamento de Microbiología. Instituto de Higiene. Epidemiología y Microbiología. Infanta 1151 e/t Llinás y Clavel. Centro Habana. La Habana. Cuba.

Correo electrónico: yamilapuig@infomed.sld.cu

INTRODUCCIÓN

La intoxicación estafilocócica es una de las más frecuentes entre las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) en el mundo. En Cuba, la intoxicación estafilocócica es la causa principal de las ETAs en varias regiones del país.¹⁻⁴ Entre las especies de estafilococo coagulasa-positiva que se aíslan de alimentos involucrados en brotes de ETAs y que son productoras de la enterotoxina causante de los síntomas de la intoxicación se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus hyicus*. Por su importancia clínica se destaca *Staphylococcus aureus*: especie cuya presencia se reporta en la mayoría de los pacientes intoxicados por esta causa.¹⁻⁵

El ser humano es la fuente más frecuente de contaminación estafilocócica de los alimentos por ser este microorganismo miembro de la microbiota de la piel y las mucosas. La mastitis del ganado también es una causa común de contaminación de los productos lácteos por *S. aureus*, evento que puede ocurrir durante las diferentes etapas del procesamiento de la leche, ya sea como consecuencia del uso de materia prima contaminada | sin pasteurizar, o debido a prácticas higiénicas deficientes durante el proceso de producción.⁶

La intoxicación estafilocócica se caracteriza por vómitos y diarreas, pero a pesar de estos síntomas, no requiere del tratamiento con antimicrobianos. No obstante, el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas tiene en la actualidad un interés especial dado la posibilidad de transferencia de los genes de resistencia a antimicrobianos entre los microorganismos de igual o diferente género y especie, y que, a su vez, pueden infectar al ser humano a través de la cadena alimentaria.⁷

En las últimas décadas la aparición y diseminación de *S. aureus* resistente a la meticilina (SAMR) ha convertido a este agente patógeno en el responsable de un elevado número de infecciones, aun cuando existen diferencias notables en cuanto a la frecuencia de aislamiento entre países, e incluso entre regiones de una misma localidad. Las cepas de SAMR se aíslan principalmente en los hospitales, pero en los últimos años se han extendido también a la comunidad (SARM-AC) donde pueden provocar infecciones graves.⁸

Entre las características epidemiológicas de *S. aureus* se destaca la emergencia de la cepa SAMR ST 398, un clon asociado a los animales productores de alimentos, y que contribuye a la diseminación de un *pool* de genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos en las bacterias *Gram*-positivas.⁹⁻¹⁰

En Cuba, los estudios dirigidos a conocer la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de estafilococo coagulasa-positiva aisladas de fuentes alimentarias, involucradas o no en brotes de intoxicación, son muy escasos. Esta fue la razón principal que sustentó la necesidad de realizar este trabajo, y que tuvo como objetivo caracterizar por su resistencia a los antimicrobianos a las cepas de estafilococo coagulasa-positiva aisladas en alimentos objeto de la vigilancia sanitaria regular y/o provenientes de estudios de brotes de ETAs en diferentes regiones del país.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron 317 cepas de estafilococo coagulasa-positiva recibidas en el Departamento de Microbiología de la institución de pertenencia de la autora principal entre los meses de Noviembre del 2010 y Diciembre del 2012 (ambos incluidos). Doscientas ochenta y dos (89.0%) de ellas se aislaron de alimentos,

mientras que las 35 restantes se obtuvieron de manipuladores de alimentos.

El aislamiento de las cepas de estafilococo coagulasa-positiva presentes en los alimentos se hizo mediante los procedimientos establecidos en la norma NC/ISO 6888-1:2003.¹¹ El estudio de las cepas existentes en los manipuladores de alimentos conllevó el hisopado de las manos de los mismos realizado de manera sorpresiva durante el procesamiento y elaboración de los alimentos, y según el procedimiento descrito en las normas internacionales.¹²

Las muestras obtenidas se transportaron en caldo de corazón suplementado con NaCl al 6%. Una vez en el laboratorio, se inocularon en placas de agar-manitol salado (BIOLAIF, Italia) y se incubaron a 37°C por 48 horas. Las colonias presuntivas de estafilococo se tiñeron con colorante de Gram y se revelaron mediante las pruebas de catalasa y coagulasa. La actividad de la enzima coagulasa se determinó por la prueba en tubo.¹³ Todas las cepas identificadas se conservaron en medio de agar triptona semisólido.

Para la identificación fenotípica de las especies, las cepas se transfirieron desde el medio de conservación a caldo de cerebro-corazón (BioCen Centro Nacional de Biopreparados, Cuba) y después a cuñas de agar nutriente (Biolife, Italia). Posteriormente, se realizaron las pruebas de Voges-Proskauer, trehalosa, maltosa, manitol, hemólisis en agar-sangre y orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG).¹³

Tamizaje en placas con oxacilina: Para determinar las cepas SAMR, todos los aislamientos de *S. aureus* fueron sometidos a tamizaje en placas con agar de Mueller-Hinton suplementado con NaCl al 4% (m/v; 0.68 mol.L⁻¹) y 6 µg/mL de oxacilina, según lo establecido en la normativa seguida.¹⁴ La preparación del inóculo se realizó por el método directo equiparándose éste a una

suspensión equivalente al patrón 0.5 de la escala de McFarland. Posteriormente, mediante un asa de siembra de 1 µL, se extendió el inóculo en la placa en un área de 10 – 15 mm de diámetro. Las placas se incubaron a la temperatura requerida durante 24 horas. La presencia de pequeñas colonias (> 1 colonia), o la constatación de una película fina de crecimiento, se consideraron indicativos de resistencia al fármaco.

Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias a la oxacilina: Atendiendo a los recursos disponibles, esta prueba se realizó a 28 cepas de todas las identificadas como SAMR, y que fueron seleccionadas de forma aleatoria y teniendo en cuenta su procedencia (alimento | manipulador). Se aplicó el método de microdilución en caldo para la obtención de un rango de concentraciones entre 0.125 y 128.0 µg/mL. Las cantidades de la droga y el diluyente utilizados para la preparación de las soluciones patrones y las diluciones de trabajo se ajustaron a lo establecido en la normativa seguida.¹³

Las soluciones se prepararon con polvos comerciales de antimicrobianos (SIGMA, Alemania). Para la inoculación de las placas de microtitulación se realizaron suspensiones bacterianas en caldo de Mueller-Hinton ajustadas a la densidad del patrón de turbidez 0.5 de la escala de MacFarland. Posteriormente se realizó una dilución 1/200 para una concentración final (aproximada) del inóculo de 10⁶ UFC/mL. La incubación se realizó durante 24 horas. Concluida la incubación, se realizó la lectura de la concentración mínima inhibitoria (CIM).

Definición de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana: Los perfiles de susceptibilidad de las cepas aisladas a antimicrobianos selectos se determinaron por el método de Bauer-Kirby.¹⁴ Para los estafilococos sensibles a la oxacilina y las especies diferentes de *S. aureus* se evaluaron

los fármacos amikacina, cefazolina, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, penicilina G, sulfametoxazol/trimetoprima y tetraciclina. Para los SAMR se evaluaron los fármacos amikacina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, kanamicina, sulfametoxazol/trimetoprima y tetraciclina. Se consideraron multirresistentes todas las cepas resistentes (intermedia | total) a tres o más antimicrobianos. Por definición, todas las cepas aisladas de SAMR se consideraron multirresistentes. Los patrones de resistencia se establecieron teniendo en cuenta los antimicrobianos a los que las cepas fueron resistentes (de forma total | intermedia).

Se emplearon discos de ensayo de casas comerciales (CPM Scientifica, Roma, Italia). La calidad de los diferentes procedimientos se controló mediante la utilización de las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* ATCC 25923.¹⁴

Los resultados obtenidos se procesaron mediante el programa WHONET 5.4 (OMS, Geneva: 2008).¹⁵ La susceptibilidad al antimicrobiano se expresó como frecuencias absolutas | relativas, y porcentajes. Las cepas se distribuyeron ulteriormente según la susceptibilidad encontrada (Sensibles/Resistentes). Dada la naturaleza descriptiva del estudio, no se examinaron ni la naturaleza ni tampoco la fuerza de las asociaciones entre las variables del estudio.

RESULTADOS

Durante la ventana de observación del estudio se analizaron 317 cepas de estafilococo coagulasa-positiva obtenidas de varias de las provincias del país. El 84.6% de estas cepas procedían de la provincia La Habana, mientras que el 15.4% restante fueron aportadas por 6 provincias, a saber:

Matanzas, Pinar del Río, Cienfuegos, Camagüey, Las Tunas y Santiago de Cuba.

De acuerdo con la especie, las cepas de estafilococo coagulasa-positiva se distribuyeron de la manera siguiente (en orden descendente): *S. aureus*: 86.4%; *S. intermedius*: 11.0%; *S. schleifeiri subsp. coagulans*: 1.6%; y *S. hycus*: 1.0%; respectivamente.

La Tabla 1 muestra la distribución de las especies identificadas de estafilococo coagulasa-positiva según la procedencia. Independientemente de la procedencia de la cepa, *S. aureus* fue la especie predominante: *Alimentos*: 86.2% vs. *Manos del manipulador de alimentos*: 88.6% ($\Delta = -2.4\%$; $p > 0.05$; test de comparación de proporciones independientes).

Las carnes y los derivados cárnicos, los quesos y los dulces de crema fueron los alimentos más contaminados por las cepas de estafilococo coagulasa-positiva. En las carnes frescas se aislaron las cuatro especies antes citadas.

De las 317 cepas analizadas el 56.1% fueron resistentes (o mostraron una resistencia intermedia) al menos a uno de los antibióticos probados. La procedencia de la cepa no influyó en la resistencia de la especie al antimicrobiano: *Alimentos*: 49.3% vs. *Manos del manipulador de alimentos*: 60.0% ($\Delta = -10.7\%$; $p > 0.05$; test de comparación de proporciones independientes).

La Tabla 2 muestra el estado de la resistencia antimicrobiana de las cepas estudiadas de estafilococo coagulasa-positiva. De acuerdo con la resistencia a los antimicrobianos ensayados, las cepas se distribuyeron de la manera siguiente (en orden descendente): *S. hycus*: 100.0%; *S. schleifeiri subsp. coagulans*: 100.0%; *S. aureus*: 63.5%; y *S. intermedius*: 62.5%; respectivamente.

Tabla 1. Frecuencia de las especies identificadas de estafilococo coagulasa-positiva según la procedencia. Para cada procedencia, se muestran el número y [entre corchetes] el porcentaje de ocurrencia de la especie correspondiente. Los subtotales se presentan después de ajustados según el total de las cepas estudiadas. Las cepas fueron aisladas de las manos del manipulador.

Especie	Procedencia		
	Alimentos	Manipuladores	Totales
	No. [%]	No. [%]	[%]
<i>S. aureus</i>	243 [86.2]	31 [88.6]	274 [86.4]
<i>S. intermedius</i>	31 [11.0]	4 [11.4]	35 [11.0]
<i>S. schleifeiri subsp. Coagulans</i>	5 [1.8]	0 [0.0]	5 [1.6]
<i>S. hycus</i>	3 [1.1]	0 [0.0]	3 [1.0]
Totales	282 [89.0]	35 [11.0]	317 [100.0]

Fuente: Registros del estudio.

Tamaño de la serie: 317.

En virtud del diseño experimental del estudio, no se evaluó la resistencia a la oxacilina de las especies diferentes de *S. aureus*. El 24.1% de las cepas de *S. aureus* fue resistente a la oxacilina. La resistencia a la oxacilina fue dependiente de la procedencia de la cepa: Alimentos: 84.9% vs. Manos del manipulador de alimentos: 15.1% ($\Delta = 69.8\%$; $p < 0.05$; test de comparación de proporciones independientes).

Las 66 cepas de SAMR también fueron resistentes al menos a uno de los restantes antibióticos probados. Como especie de mayor interés, los porcentajes de resistencia para *S. aureus* se obtuvieron para la penicilina G (52.9%); la eritromicina (30.3%); y la tetraciclina (24.1%). También se encontraron altos porcentajes para la ceftriaxona (35.4%); la cefazolina (27.0%); y la cefotaxima (23.1%), aunque estos últimos valores fueron esencialmente a expensas de las cepas de SAMR. De forma general, los antimicrobianos que mostraron la mejor efectividad fueron los aminoglucósidos (a saber: amikacina, gentamicina, y kanamicina) y una quinolona (ciprofloxacina).

La Tabla 3 muestra los valores de CMI para la oxacilina en 28 aislamientos de SAMR. Para una CMI₅₀ de 32 $\mu\text{g/mL}$, los valores de CMI fueron tan extremos como 4 (helados, dulces de crema, chorizo, queso) y +128 $\mu\text{g/mL}$ (salchicha, jamón, picadillo de carne, hamburguesa, leche, queso). Se ha de notar que una cepa de *S. aureus* aislada de las manos de un manipulador de alimentos mostró un valor de CMI $> 128 \mu\text{g/mL}$.

La Tabla 4 muestra los patrones de resistencia antimicrobiana encontrados en las 66 especies SAMR. La resistencia a la oxacilina concurrió con resistencia frente a un segundo antibiótico (35 cepas), otros 2 antibióticos (17 cepas), 3 antibióticos (8), y 4 antibióticos (6); respectivamente. Las cepas resistentes fueron aisladas prevalentemente en los alimentos listos para el consumo.

Por su parte, la Tabla 5 muestra la resistencia antimicrobiana en las 208 cepas de *S. aureus* que fueron sensibles a la oxacilina. El 71.1% de ellas fue resistente (al menos) a uno de los antibióticos diferentes de la oxacilina que fueron probados en este estudio. Igualmente, se observaron diferentes patrones de resistencia antimicrobiana, desde resistencia a un solo antibiótico, hasta resistencia a múltiples fármacos.

Tabla 2. Resistencia antimicrobiana de las cepas estudiadas de estafilococo coagulasa-positiva.

	<i>S. aureus</i> *	<i>S. intermedius</i>	<i>S. schleiferi</i> <i>subsp.coagulans</i>	<i>S. hycus</i>
Tamaño	274	35	5	3
Cepas resistentes	63.5	62.9	100.0	100.0
OXA	24.1	N/P	N/P	N/P
PEN	52.9	38.2	20.0	33.3
CZO	27.0	2.9	0.0	33.3
CTX	23.1	2.9	0.0	33.3
CRO	35.4	26.5	0.0	33.3
KAN	2.9	11.4	0.0	0.0
GEN	0.7	2.9	0.0	0.0
AMK	1.1	2.9	0.0	0.0
TCY	24.4	28.6	20.0	66.7
SXT	6.6	2.9	0.0	33.3
CHL	11.3	22.9	0.0	33.3
ERY	30.3	14.3	60.0	33.3
CIP	4.4	8.6	0.0	0.0

* Sesenta y seis cepas de SAMR se consideraron resistentes a fármacos β -lactámicos (PEN, CZO, CTX, CRO) según lo establecido en la norma CLSI (2011).

Leyenda: OXA: Oxacilina. PEN: Penicilina G. CZO: Cefazolina. CTX: Cefotaxima. CRO: Ceftriaxona. KAN: Kanamicina. GEN: Gentamicina. AMK: Amikacina. TCY: Tetraciclina. SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprima. CHL: Cloranfenicol. ERY: Eritromicina. CIP: Ciprofloxacina. N/P: No probado en virtud del diseño experimental del estudio.

Fuente: Registros del estudio.
Tamaño de la serie de estudio: 317.

Según el número de antibióticos resistentes, las cepas de *S. aureus* sensibles a la oxacilina se distribuyeron como sigue: 1 antibiótico: 72 cepas; 2 antibióticos: 33 cepas; 3 antibióticos: 25; 4 antibióticos: 14; y 5 antibióticos: 2 cepas; respectivamente. De forma similar, las cepas resistentes se aislaron con mayor frecuencia en los alimentos listos para el consumo.

Finalmente, la Tabla 6 muestra la resistencia a los antibióticos diferentes de la oxacilina que fueron ensayados en las restantes 43 cepas de estafilococo coagulasa-positiva de especies diferentes de *S. aureus*. El 69.8% de ellas fue resistente al menos a un antibiótico. También predominó el patrón de resistencia a uno (11 cepas), 2 (14 cepas),

3 (3 cepas), y 4 antibióticos (2 cepas); respectivamente.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizaron en base al fenotipo de resistencia a los antimicrobianos las especies de estafilococo coagulasa positiva que fueron aisladas tanto de alimentos (como parte de las actividades de vigilancia sanitaria requeridas en el control de las ETAs) como de brotes de intoxicación alimentaria en Cuba durante un período de observación que abarcó dos años.

Tabla 3. Valores de concentración mínima inhibitoria de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina según la fuente de aislamiento. Se estableció una CMI50 de 32 µg/mL.

Número de la cepa	Fuente de aislamiento	CMI, µg/mL
119-6	Helado	4
122-6	Dulce elaborado con crema	64
182-9	Manos	16
188-9	Carne de cerdo fresca	64
6-10	Queso	32
11-10	Jamón	>128
15-10	Helado	32
34-10	Mortadella	64
195-10	Queso	>128
53-10	Chorizo	4
63-11	Salchicha	>128
117-11	Jamón	>128
119-11	Croqueta	64
204-11	Picadillo de carne	>128
232-11	Salchicha	32
247-11	Manos	16
248-11	Manos	16
249-11	Manos	>128
266-11	Dulce elaborado con crema	4
271-11	Queso	4
283-11	Manos	8
322-11	Manos	16
325-11	Manos	32
329-11	Ensalada fría	64
351-11	Hamburguesa	>128
362-11	Jamón	8
372-11	Leche	>128
751-11	Salchicha	>128

Fuente: Registros del estudio.

Tamaño de la serie: 28.

S. aureus fue la especie coagulasa positiva que se aisló con mayor frecuencia en los alimentos, hecho que se explica por ser el humano el principal reservorio de esta bacteria y, por ende, la fuente principal de contaminación de alimentos y otros productos elaborados para el consumo.

No obstante, y tal y como se notifica en otros estudios, otras especies de estafilococo coagulasa positiva diferentes de *S. aureus*, como *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. schleiferi*, pueden también identificarse en

estos aislamientos debido al inadecuado procesamiento de los alimentos y/o la contaminación cruzada. Estos microorganismos son morfológicamente similares a *S. aureus*, y de ahí la elevada similitud de comportamiento en los medios selectivos y diferenciales de cultivo que se emplean habitualmente en el laboratorio para revelar la presencia de los mismos. De ahí la importancia de la correcta diferenciación de las especies presentes de estafilococo coagulasa positiva.¹⁶⁻¹⁷

Tabla 4. Patrones de resistencia identificados en las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina según la fuente de aislamiento.

Número	Patrón	Alimentos	Manipuladores	Fuente de aislamiento
1	OXA-ERY	12	2	Manos, queso, carne elaborada, carne fresca, dulce con crema, pescado fresco, suplemento alimentario, chocolate
2	OXA-TCY	11	2	Manos, productos lácteos, queso, mariscos, pescado y mariscos elaborados, carne elaborada, carne fresca
3	OXA-SXT	5	1	Manos, queso, carne elaborada, carne fresca, dulce con crema
4	OXA-CHL	0	2	Manos
5	OXA-ERY-TCY	9	0	Productos lácteos, dulce con crema, carne fresca
6	OXA-TCY-SXT	3	0	Queso
7	OXA-AMK-SXT	0	1	Manos
8	OXA-CHL-ERY	1	0	Embutido, hortaliza procesada
9	OXA-CHL-TCY	1	0	Carne fresca
10	OXA-CIP-SXT	1	0	Dulce con crema
11	OXA-ERY-SXT	1	0	Carne elaborada
12	OXA-CHL-TCY-SXT	4	0	Productos lácteos, queso
13	OXA-CHL-ERY-TCY	2	1	Manos, queso
14	OXA-ERY-GEN-KAN	1	0	Carne fresca
15	OXA-CHL-ERY-TCY-SXT	2	1	Manos, queso
16	OXA-CHL-ERY-KAN-TCY	1	0	Queso
17	OXA-CIP-ERY-KAN-TCY	1	0	Queso
18	OXA-ERY-GEN-TCY-SXT	1	0	Hortaliza procesada
Totales		56	10	

Leyenda: OXA: Oxacilina. ERY: Eritromicina. TCY: Tetraciclina. SXT: Sulfametoxazol/trimetoprima. CHL: Cloranfenicol. AMK: Amikacina. CIP: Ciprofloxacina. GEN: Gentamicina. KAN: Kanamicina.

Fuente: Registros del estudio.
Tamaño de la serie: 66.

Tal y como se encontró en este estudio, las carnes frescas, los productos cárnicos en general, y los quesos frescos (además de los dulces con crema) son algunas de las principales fuentes de las cuales se aíslan con mayor frecuencia estafilococos coagulasa positiva.¹⁸⁻²¹ Estos alimentos en particular representan una importante fuente de nutrientes para los

microorganismos mencionados, y son el sustrato ideal para el crecimiento y desarrollo de los mismos.

En lo que respecta a Cuba, los dulces que contienen crema y los productos cárnicos de todo tipo son los alimentos más involucrados en los brotes de intoxicación alimentaria por estafilococo.

Tabla 5. Patrones de resistencia identificados en las cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina según la fuente de aislamiento.

Número	Patrón	Alimentos	Manipuladores	Fuente de aislamiento
1	PEN	32	2	Manos, queso, carne elaborada, carne fresca, dulce con crema, marisco, suplemento alimentario, chocolate, hortalizas elaboradas.
2	ERY	12	0	Productos lácteos, alimento compuesto, dulce con crema, pescado fresco.
3	CRO	9	0	Productos lácteos, dulce con crema.
4	TCY	8	0	Alimento compuesto, suplemento alimentario, carne elaborada.
5	SXT	4	1	Manos, queso, carne elaborada, dulce con crema.
6	CIP	3	0	Queso, carne elaborada, carne fresca.
7	CTX	3	0	Queso, carne elaborada, dulce con crema.
8	ERY-PEN	9	2	Manos, queso, alimento compuesto, pescado fresco, carne fresca, carne elaborada, suplemento alimentario.
9	TCY-PEN	4	0	Carne elaborada, mariscos, pescado elaborado, carne fresca.
10	PEN-CRO	3	1	Manos, dulce con crema, carne elaborada, suplemento alimentario.
11	CZO-PEN	3	0	Queso, carne elaborada
12	ERY-CRO	2	1	Manos, queso, carne fresca
13	CTX-TCY	2	0	Queso, carne fresca
14	CTX-PEN	1	1	Manos, hortaliza elaborada
15	CTX-CRO	1	0	Queso
16	CZO-CTX	1	0	Carne elaborada
17	ERY-TCY	1	0	Productos lácteos
18	TCY-CRO	1	0	Carne fresca

Leyenda: PEN: Penicilina. ERY: Eritromicina. CRO: Ceftriaxona. TCY: Tetraciclina. SXT: Sulfametoxazol/trimetoprima. CIP: Ciprofloxacina. CTX: Cefotaxima. CZO: Cefazolina. CIP: Ciprofloxacina. KAN: Kanamicina. AMK: Amikacina.

Fuente: Registros del estudio.

Tamaño de la serie: 208.

Tabla 5. Patrones de resistencia identificados en las cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina según la fuente de aislamiento (Continuación).

Número	Patrón	Alimentos	Manipuladores	Fuente de aislamiento
19	ERY-TCY-PEN	5	0	Queso, carne elaborada, carne fresca, dulce con crema
20	CTX-ERY-TCY	2	0	Productos lácteos, mariscos.
21	CHL-ERY-PEN	2	0	Carne elaborada, dulce con crema.
22	CIP-ERY-PEN	2	0	Queso, carne elaborada
23	ERY-PEN-CRO	1	0	Queso
24	CHL-TCY-SXT	1	0	Carne fresca
25	CHL-ERY-TCY	1	0	Carne elaborada
26	CTX-TCY-CRO	1	0	Queso
27	CTX-ERY-CRO	1	0	Productos elaborados a base de huevo
28	CTX-ERY-PEN	1	0	Carne fresca
29	CZO-TCY-CRO	1	0	Carne elaborada
30	CZO-CIP-PEN	1	0	Carne elaborada
31	CHL-ERY-TCY	1	0	Pescado fresco
32	CHL-ERY-CRO	1	0	Queso
33	CIP-KAN-PEN	1	0	Carne elaborada
34	ERY-KAN-SXT	1	0	Dulce con crema
35	CHL-PEN-CRO	1	0	Queso
36	CZO-ERY-TCY	1	0	Queso
37	CHL-TCY-PEN-CRO	4	0	Queso, carne elaborada, carne fresca
38	CTX-CIP-TCY-SXT	2	0	Queso
39	CZO-CHL-TCY-PEN	2	0	Dulce con crema
40	CTX-CHL-ERY-TCY	1	0	Carne fresca
41	CTX-CIP-CHL-PEN	1	0	Queso
42	CHL-ERY-TCY-PEN	1	0	Mariscos
43	CZO-CHL-PEN-AMK	1	0	Carne elaborada
44	CHL-SXT-PEN-CRO	1	0	Carne fresca
45	ERY-TCY-PEN-CRO	0	1	Manos
46	CHL-ERY-SXT-PEN-CRO	1	0	Productos lácteos
47	CTX-ERY-TCY-SXT-PEN	1	0	Carne elaborada
Totales		139	9	

Leyenda: PEN: Penicilina. ERY: Eritromicina. CRO: Ceftriaxona. TCY: Tetraciclina. SXT: Sulfametoxazol/trimetoprima. CIP: Ciprofloxacina. CTX: Cefotaxima. CZO: Cefazolina. CIP: Ciprofloxacina. KAN: Kanamicina. AMK: Amikacina.

Fuente: Registros del estudio.

Tamaño de la serie: 208.

El uso extensivo de los antibióticos sin dudas ha influido de manera notable en el incremento de la virulencia de *S. aureus* como agente causal de graves infecciones en el ser humano, además de los animales.

El incremento de la resistencia a los antimicrobianos de uso común, junto con la aparición de resistencia a los fármacos de última generación, suelen ser el resultado de la adquisición por la bacteria de múltiples genes de resistencia que le permiten sobrevivir al ataque de una amplia variedad de estas drogas.

Los estudios realizados en otras latitudes notifican tasa variables de resistencia antimicrobiana de *S. aureus* aislado de la carne animal fresca destinada para el consumo humano y de una amplia diversidad de productos.²²⁻²⁶ La frecuencia de resistencia antimicrobiana puede ser mayor del 60% para al menos uno de los antibióticos probados.^{23,25-26} En el presente trabajo la cifra estimada fue del 56.1%. De forma similar también a lo hallado aquí, entre los fármacos más afectados están β -lactámicos como la penicilina, macrólidos como la eritromicina; y la tetraciclina.^{22,23-26} Muchos de los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, entre otros, conservan todavía su efectividad terapéutica.^{22-23,25} Con excepción de *S. intermedius* (cuya susceptibilidad a los antimicrobianos fue similar a la de *S. aureus*), las otras dos cepas identificadas en este trabajo fueron sensibles a la mayoría de los fármacos probados.

Según muestran los resultados de diversas investigaciones, el aislamiento de cepas de SAMR a partir de los alimentos se comporta de forma variable. El número de cepas encontradas en esta investigación fue comparables a las notificadas por varios investigadores.^{19,23,25,27} Sin embargo, algunos autores pueden informar cifras más elevadas de aislamientos de SAMR en los alimentos.^{26,29} Otros, por su parte, han declarado porcentajes escasos de

aislamiento, o no lo han hecho en lo absoluto.^{28,30-31}

Tal disparidad de estimados se pudiera atribuir a las muestras investigadas en cada estudio, las características propias de los ambientes donde se realiza el muestreo, y los procedimientos técnicos utilizados.

La aparición de las cepas de SAMR en los alimentos es como, en otros casos, el resultado de la extensión desde los hospitales hacia la comunidad de los genes de resistencia a la meticilina. Si bien es cierto que, en este trabajo, de las 66 cepas de SAMR identificadas, 10 procedían de manipuladores; la proporción de estas cepas respecto del tamaño de cada subgrupo fue muy similar. No obstante, las cepas aisladas procedían en su mayoría de alimentos elaborados, y es muy probable la contaminación de los mismos a través de la manipulación humana. Los valores de CMI a la oxacilina en las 28 cepas de SAMR estudiadas fueron superiores en todos los casos a los 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (con un valor de CMI₅₀ de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Este hallazgo refuerza la presencia del gen *mec A* en estas cepas, si bien este hallazgo no fue corroborado independientemente mediante pruebas específicas.

Respecto de la importancia del consumo de alimentos contaminados con SAMR como riesgo de infección humana y/o aparición de una ETA, tanto en la comunidad como en los hospitales, no hay evidencias que indiquen un mayor riesgo de colonización (y por extensión, de infección humana) después de entrar en contacto o consumir alimentos contaminados por esta bacteria. A pesar de ello, la vigilancia y el seguimiento epidemiológicos son fundamentales para las estrategias de control de la diseminación de los SAMR.

Tabla 6. Patrones de resistencia antimicrobiana identificados en las especies de estafilococo coagulasa-positiva diferentes de *Staphylococcus aureus* según la fuente de aislamiento.

Número	Patrón	Alimentos	Manipuladores	Especie	Fuente de aislamiento
1	CIP	1	0	<i>S. intermedius</i>	Carne fresca
2	CZO	2	0	<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	Carne fresca
3	PEN	2	0	<i>S. intermedius</i>	Queso, carne fresca
4	ERY	3	0	<i>S. intermedius</i> (1 cepa) <i>S. schleiferi subsp. coagulans</i> (2 cepas)	Queso, pescado fresco.
5	TCY	3	0	<i>S. intermedius</i>	Queso
6	CHL-TCY	1	0	<i>S. intermedius</i>	Queso
7	CIP-PEN	1	0	<i>S. intermedius</i>	Carne fresca
8	ERY-PEN	1	0	<i>S. intermedius</i>	Queso
9	ERY-TCY	1	2	<i>S. intermedius</i>	Manos, carne fresca
10	GEN-PEN	2	0	<i>S. intermedius</i>	Carne fresca
11	PEN-AMK	1	0	<i>S. intermedius</i>	Queso
12	PEN-CRO	1	0	<i>S. hycus</i>	Carne fresca
13	PEN-KAN	2	0	<i>S. intermedius</i>	Queso
14	TCY-SXT	1	0	<i>S. hycus</i>	Suplemento alimenticio (materia prima)
15	TCY-PEN	1	0	<i>S. intermedius</i>	Carne fresca
16	CHL-TCY-PEN	1	0	<i>S. intermedius</i>	Queso
17	CTX-CHL-ERY	1	0	<i>S. hycus</i>	Carne fresca
18	ERY-TCY-PEN	1	0	<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	Carne fresca
19	CTX-CHL-TCY-PEN	1	0	<i>S. intermedius</i>	Carne fresca
20	CHL-SXT-PEN-CZO	1	0	<i>S. intermedius</i>	Carne fresca
Totales		28	2		

Leyenda: CIP: Ciprofloxacina. CZO: Cefazolina. PEN: Penicilina. ERY: Eritromicina. TCY: Tetraciclina. CHL: Cloranfenicol. GEN: Gentamicina. AMK: Amikacina. KAN: Kanamicina. SXT: Sulfametoxazol/trimetoprima.

Fuente: Registros del estudio.

Tamaño de la serie: 43.

En las cepas aisladas en este estudio se encontró una amplia variedad de resistencia antimicrobiana (total | intermedia) que abarcaba desde uno hasta los cinco fármacos probados. Así, el porcentaje de

cepas multirresistentes alcanzó la cifra del 62.9%, lo cual significa que más de la mitad de los aislados resistentes obtenidos poseían resistencia total o intermedia al menos a tres de los fármacos probados. Estos resultados

se corresponden con los mostrados en otros estudios que informan sobre el predominio de cepas resistencia a uno y dos antibióticos, así como la alta prevalencia de cepas multirresistentes.^{22-23,25}

Finalmente se debe comentar la similitud encontrada entre los patrones de resistencia de 17 aislamientos obtenidos de manipuladores con sus homólogos hallados en muestras de alimentos, entre los que se destacan, por su relevancia, siete cepas de SAMR. Aunque se considera que los manipuladores constituyen una fuente importante de contaminación de los alimentos por *Staphylococcus*, los métodos de correlación fenotípica no son en la actualidad los más adecuados para hacer una evaluación epidemiológica sobre la posible circulación de una cepa específica en un ambiente determinado, ya que los microorganismos pueden sufrir modificaciones en el medio como parte de sus propios mecanismos adaptativos. No obstante, la correspondencia fenotípica entre cepas procedentes de diversas fuentes en un mismo sitio | región podría ser indicativo de la posible circulación de un clon determinado. La diversidad de localidades y centros del país involucrados en la investigación impidieron avanzar en esta dirección. Futuros estudios deberán centrarse entonces en el análisis de aquellas fuentes alimentarias más relacionadas con los brotes de ETA en el país, e incorporar procedimientos de epidemiología molecular que permitan determinar los genotipos de las cepas circulantes.

CONCLUSIONES

Staphylococcus aureus fue la especie principal de estafilococo coagulasa-positiva aislada en alimentos y manos de manipuladores, y se distinguió por una alta proporción de aislamientos resistentes a la oxacilina concurrentes con porcentajes

también elevados de resistencia a la penicilina, eritromicina y tetraciclina. La amplia diversidad de patrones de resistencia encontrados, así como el alto porcentaje de cepas multirresistentes identificadas, indican la necesidad de profundizar en el tema, e incorporar procedimientos de avanzada para estudios epidemiológicos de mayor alcance.

SUMMARY

Rationale: Intoxication by staphylococci is frequent among food-borne diseases (FBD). It is worrisome the antimicrobial resistance exhibited by coagulase-positive strains of staphylococci involved in FBD outbreaks. **Objective:** To establish the antimicrobial resistance phenotype of coagulase-positive strains of staphylococci isolated from food or present in food handlers. **Methods:** Resistance of 317 isolates of coagulase-positive *Staphylococcus* spp. isolated either from foods (89.0%) or food handlers (11.0%) to several antimicrobials were assayed at the institution's Department of Microbiology between November 2010 and December 2012. These activities are mandated as part of the sanitary surveillance and control of FBD outbreaks in different regions of Cuba. Susceptibility to drugs of common clinical use was determined by the Kirby-Bauer method. In the case of *S. aureus* strains, resistance to methicillin was additionally assayed after screening in agar plate with oxacilline. Minimum inhibitory concentrations were determined by broth microdilution in 28 resistant isolates to this drug. **Results:** *S. aureus* was the predominant strain (86.4%), followed by *S. intermedius* (11.0 %), *S. schleiferi* subsp.coagulans (1.6 %) and *S. hycus* (0.9 %). Fifty-six point one percent of isolates were resistant to at least one of the antibiotics tested. Penicillin (52.9%), erythromycin (30.3%) and tetracycline (24.4%) showed the higher percentages of antimicrobial resistance. A fifth of the *S. aureus* strains were resistant to methicillin. Sixty-two point nine percent of isolated strains were multiresistant. Antimicrobial resistance patterns involved from one up until 5 drugs. **Conclusions:** *S. aureus* was the main strain isolated. A high proportion

of isolates resistant drugs of common use was observed. The wide diversity of resistance patterns found, as well as the high percentage of multidrug resistant strains, calls for the necessity to promote the rational use of antimicrobials, the adoption of programs for hygiene and prevention of FBD, and the conduction of more in-depth epidemiological studies. **Puig Peña Y, Espino Hernández M, Leyva Castillo V, Apórtela López N, Pérez Muñoz Y, Soto Rodríguez P.** Antimicrobial resistance of coagulase positive strains of staphylococci isolated from foods and food handlers. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2015;25(2):245-260. RNP: 221. ISSN: 1561-2929.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informes técnicos sobre ingeniería agrícola y alimentaria de la FAO. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. FAO/OMS. Ginebra: 2008. Disponible en: <http://www.earthprint.com/productfocus.php?id=FAO109911>. Fecha de última visita: 11 de Junio del 2015.
2. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. Biomed Research International 2014. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/827965>. Fecha de última visita: 8 de Septiembre del 2014.
3. López Aday D, Rivero Álvarez E, Martínez Torres A, Alegret Rodríguez M. Enfermedades transmitidas por alimentos en Villa Clara. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2013;51(2):0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000200009. Fecha de última visita: 8 de Septiembre del 2014.
4. Barreto Argilagos G, Sedrés Cabrera M, Rodríguez Torrens H, Guevara Viera G. Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por Alimentos (ETA) en Camagüey, Cuba, durante el período 2000-2008. REDVET [Revista Electrónica de Veterinaria] 2010;11(2):1695-7504.
5. Argudín MA, Mendoza MC, González-Hevia MA, Bances M, Guerra B, Rodicio MR. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Appl Environm Microbiol* 2012;78:2930-5.
6. Árquez-Ramos JG. Recuento de *Staphylococcus aureus* y detección de enterotoxinas estafilocócicas en queso blanco venezolano artesanal tipo telita expandido en mercados de la ciudad de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol* 2012;32:112-5.
7. Cartelle Gestal M, Villacís JE, Alulema MJ, Chico P. De la granja a la mesa. Implicaciones del uso de antibióticos en la crianza de animales para la resistencia microbiana y la salud. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2014;24:129-39.
8. Cobos-Trigueros N, Pitart C, Marco F, Martínez JA, Almela M, et al. Epidemiología y forma de presentación clínica de las infecciones originadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina productor de leucocidina de Pantón-Valentin. *Rev Esp Quimioter* 2010;23:93-9.
9. Jamrozy DM, Fielder ME, Butaye P, Coldham NG. Comparative genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from animals and humans. *PLOS/One* 2012. DOI: [10.1371/journal.pone.0040458](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040458). Fecha de última visita: 8 de Septiembre del 2014.

10. Suk-Kyung L, Hyang-Mi N, Gum-Chan J, Hee-Soo L, Suk-Chan J, Hyo-Sun K; *et al.* The first detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs in Korea. *Vet Microbiol* 2012; 155:88-92.
11. NC-ISO 6888-1: 2003. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la enumeración de *Staphylococcus coagulasa* positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica utilizando el medio Agar Baird Parker.
12. Norma ISO 18593: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. ISO 18593: 2004. ISO International Standards Organization. Geneva: 2004.
13. Schleifer KH, Bell JA. Family *Staphylococcaceae*, Genus I. *Staphylococcus*. En: Bergey's. Manual of Systematic Bacteriology. Volumen III. Segunda Edición. Georgia: 2009 pp. 392-421.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Supplement. 2011;26(3):M100-S16.
15. Organización Mundial de la Salud. WHONET 5.4. Software para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana y control de infecciones. Ginebra: 2008. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/whonetsoftware/>. Fecha de última visita: 21 de Junio de 2014.
16. Faría J, García A, Márquez A, Manzanilla B, Morales D, García A. Resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus* aislados de leche cruda. *Revista Científica* 2012;9(4):0-0. Disponible en: <http://www.fcv.luz.edu.ve>. Fecha de última visita: 12 de Febrero del 2014.
17. Ávila G E, Silva JA, Pegoraro de Macedo MR, Ribeiro de Araújo M, Magalhães Mata M, Padilha da Silva W. Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PCR. *Alim Nutr Araraquara*. 2005;16:99-103.
18. Otalú O Jr, Kabir J, Okolocha ECh, Umoh VJ. Multi-drug resistant coagulase positive *Staphylococcus aureus* from live and slaughtered chickens in Zaria, Nigeria. *Int J Poultry Sci* 2011;10:871-5.
19. Forough A, Ebrahim R, Amir S, Hassan M, Majid R, Manochehr M. antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine, sheep and goat raw milk. *Global Veterinaria* 2012;8:111-4.
20. Sina H, Baba-Moussa F, Kayodé AP, Noumavo PA, Sezan A, Hounhouigan JD, Kotchoni SO, Prévost G, Baba-Moussa L. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from street foods: Toxin profile and prevalence of antibiotic resistance. *J Appl Biosci* 2011;46:3133-43.
21. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A; *et al.* Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy. *Int J Food Microbiol* 2007;115:290-6.
22. Waters AE, Contente-Cuomo T, Buchhagem J, Liu CM, Watson L, Pearce K; *et al.* Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. *Clin Infect Dis* 2011;52:1-4.
23. Schlegelova J, Vlkova H, Babak V, Holasova M, Jaglic Z, Stosova T; *et al.* Resistance to erythromycin of *Staphylococcus* spp. isolates from the food chain. *Veterinarni Medicina* 2008; 53:307-14.

24. Al-Ghamdi AY. Incidence of *Staphylococcus aureus* contamination of marketed processed chicken products with special reference to its antibiotics sensitivity collected from Al Baha city markets, Saudi Arabia. *Pak J Food Sci* 2012;22:168-70.
25. Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:6489-94.
26. Zouhairi O, Saleh I, Alwan N, Toufeili I, Barbour E, Harakeh S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* species isolated from Lebanese dairy-based products. *EMHJ* 2010;16:1221-5.
27. Charlene R. Jackson, Johnnie A. Davis, Barrett J. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat and humans in Georgia. *J Clin Microbiol* 2013;51:1199-1207.
28. Wang W, Guo Y, Pei X, Hu Y, Bai L, Sun A, et al. Genetic characterization and antimicrobial susceptibility analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat food and pig-related sources in China]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2013;42:925-31.
29. Manoharan M, Jayaraman S, Illanchezian S, Jayasekar J. Homologous resistant groups (HRGs) in multidrug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail foods in Vadapalani, Chennai. *The Internet Journal of Microbiology* 2013;7(1):0-0. Disponible en: <http://ispub.com/IJMB/7/1/7182>. Fecha de última visita: 8 de Septiembre del 2014.
30. Thaker HC, Brahmabhatt MN, Nayak JB. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat, *Vet World* 2013;6(1):10-13. DOI: [10.5455/vetworld.2013.10-13](http://dx.doi.org/10.5455/vetworld.2013.10-13). Fecha de última visita: 8 de Septiembre del 2014
31. Wang W, Guo Y, Pei X, Hu Y, Bai L, Sun A; et al. Genetic characterization and antimicrobial susceptibility analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat food and pig-related sources in China. *Wei Sheng Yan Jiu* 2013;42:925-31.