

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus* ENTEROTOXIGÉNICOS AISLADOS DE QUESOS EN BOGOTA**

### **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Staphylococcus* ENTEROTOXIGENIC STRAINS FROM CHEESE IN BOGOTA**

María Vanegas L\*, M.Sc, Lina González G, M.Sc, Aida Martínez L, M.Sc,  
Francisco Buitrago, Microbiólogo.

Universidad de Los Andes, Laboratorio de ecología microbiana y alimentos - LEMA, Bogotá, Colombia. \*Correspondencia. mvanegas@uniandes.edu.co

Recibido: Febrero 4 de 2008; Aceptado Julio 30 de 2008

#### **RESUMEN**

**Objetivo.** Caracterizar cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos provenientes de quesos distribuidos en supermercados, tiendas y en ventas callejeras en la ciudad de Bogotá, Colombia. **Materiales y métodos.** Se recolectaron muestras de quesos provenientes de tiendas, supermercados y ventas callejeras. Se detectó la presencia del gen para enterotoxina A usando un set de primers reportado en estudios previos. Un total de 50 quesos fueron analizados, 13 comercializados en tiendas y en ventas callejeras y 37 en supermercados. **Resultados.** De las trece muestras de quesos de tiendas y ventas callejeras se aisló *Staphylococcus aureus*. No hubo presencia de *Staphylococcus* spp en muestras de quesos de supermercados (n=37). Todos los aislamientos amplificaron para toxina A. **Conclusión.** Existen diferencias en la calidad de los quesos según sean distribuidos en tiendas de mercado, plazas, ventas callejeras o distribuidos por supermercados, con una alta frecuencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y productor de toxina A en quesos distribuidos en tiendas y en ventas callejeras.

**Palabras clave:** *Staphylococcus* enterotoxigenico, quesos, PCR.

#### **ABSTRACT**

**Objective.** *Staphylococcus* is one of the principal food-borne pathogens in Colombia. The aim of this study was to identify and characterize enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains from cheese obtained from retail butchers, supermarket stores and street food vendors in Bogotá, Colombia. **Material and methods.** Isolates of *Staphylococcus* species were obtained from cheeses from retail butchers, supermarket stores and street food vendors.

PCR was used to identify the SEA gene. A total of 50 commercially available cheeses were analyzed from 13 street food vendors and retail butchers and from 37 supermarkets. **Results.** *Staphylococcus aureus* was isolated from the whole cheese samples from retail butchers and street food vendors. There were no *Staphylococcus* spp from supermarket samples (n=37). All of the isolates were PCR positive for the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* gene. **Conclusions.** Differences in the occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from cheese depended on the vendor type. This study revealed a very high frequency of *Staphylococcus aureus* coagulase-positive and enterotoxin A gene strains from cheeses commercially available from retail butchers and street food vendors.

**Key words:** *Staphylococcus* enterotoxigenic, chesses, PCR.

## INTRODUCCIÓN

Las intoxicaciones causadas por *Staphylococcus* tienen alta frecuencia en Colombia. Los principales agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Colombia son *Salmonella sp* y *S. aureus*, los cuales ocupan los primeros lugares de los reportes anuales de la red de vigilancia en salud pública en Colombia. Productos lácteos y aquellos que requieren de manipulación y están listos para el consumo humano, pueden estar contaminados con cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus spp.* (1).

Existen veinte tipos diferentes de enterotoxinas en *Staphylococcus aureus* y algunos autores coinciden en que SEA-SEE son las enterotoxinas más comúnmente relacionadas en intoxicaciones por *Staphylococcus aureus* (2,3).

Comunicaciones internacionales coinciden en que la enterotoxina A es la más prevalente en las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen humano y por tanto también en productos que requieren manipulación y están listos para el consumo humano (4,5). La contaminación de alimentos por *S. aureus*, produce gastroenteritis que se manifiesta por un cuadro caracterizado por vómitos y diarrea (6).

*Staphylococcus* coagulasa positivo se encuentra entre los diez patógenos causales de ETA más implicado en salud pública a nivel mundial. Asimismo muchos estudios a nivel mundial indican que la enterotoxina A es la más frecuentemente relacionada con

intoxicaciones alimentarias. En Europa *S. aureus* fue el responsable del 5.1% de las enfermedades transmitidas por alimentos durante 1993 y 1998 (7). En Estados Unidos el número anual de casos por intoxicación por *Staphylococcus* es de 185.000 con 1750 hospitalizaciones. En Colombia en 1999, según registros del Sistema Alerta Acción del área de Vigilancia en Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, se presentaron 35 brotes que afectaron grupos de 2 a 120 personas (8). En el año 2000 se reportaron un total de 34 brotes, ocupando los primeros lugares de notificación las localidades de Kennedy, Teusaquillo y Engativa. Según datos de la Secretaría Distrital de Salud los grupos de alimentos implicados con intoxicaciones por *Staphylococcus spp* son alimentos lácteos (46%) y preparados con carne (37%).

Los alimentos que requieren considerable manipulación durante la preparación y que se mantienen a temperatura ligeramente elevada después de ésta, frecuentemente están involucrados con la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positivo o su enterotoxina (8). Lo anterior evidencia que en Colombia se reporta una alta frecuencia de quesos contaminados con *S. aureus* coagulasa positivo (8). Sin embargo, aun no se conoce si las cepas circulantes son enterotoxigénicas, ni el tipo de enterotoxina que causan las intoxicaciones en la población. Por lo anterior se hace necesario determinar si las cepas de *Staphylococcus aureus* circulantes en quesos en Colombia son enterotoxigénicas. Por tal razón, es

importante determinar la existencia de cepas enterotoxigénicas circulando en quesos frescos y si son productores de enterotoxina A, la cual es la más reportada a nivel mundial (9).

Las enterotoxinas de *Staphylococcus* spp pueden ser identificadas por diferentes métodos rutinarios como ELISA, ensayos de inmunodifusión, etc., (10). Los resultados con estos métodos, dependen de la cantidad de toxina presente, por lo cual es posible los falsos negativos cuando es baja. La PCR ha demostrado ser una técnica específica y sensible para la detección de *Staphylococcus* spp y los genes que codifican para sus enterotoxinas (11).

El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras del gen que codifica para enterotoxina A provenientes de quesos de la ciudad de Bogotá.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas de referencia.** Las cepas de referencia utilizadas en este estudio fueron: *Staphylococcus aureus* no enterotoxigénico cepa ATCC 27692, *Staphylococcus aureus* productora de SEA (Donada por la Secretaría Distrital de Bogotá). La cepa de *Staphylococcus epidermidis* (Donada por la Secretaría Distrital de Bogotá) fue utilizada como control negativo. Las cepas fueron conservadas a -20°C y para cada análisis se cultivaron en caldo *Brain heart infusion* (BHI, Oxoid Ltda., Basingstoke, Hampshire, England).

**Muestreo.** Las cepas de *Staphylococcus* spp fueron aisladas de quesos distribuidos tanto en grandes cadenas de supermercados, como en tiendas, plazas de mercado y ventas callejeras de Bogotá. Un total de 50 quesos fueron analizados (13 entre tiendas y ventas callejeras y 37 distribuidos en supermercados de Bogotá). Las plazas de mercado muestreadas en este estudio fueron Paloquemado, Codabas, Ferias, Plaza Corabastos y 12 de Octubre. También se tomaron muestras de queso expedido en

Monserate y alrededores del estadio el Campin. Las muestras fueron procesadas dos horas después de su recolección y mantenidas en condiciones de refrigeración. Los quesos distribuidos en supermercados analizados en este estudio correspondieron a marcas comerciales reconocidas en Colombia.

**Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*:** Se aisló *Staphylococcus* spp coagulasa positivo en medio selectivo *Baird Parker*, (Scharlau-Chemie S.A) incubado a 37°C por 48 horas. Según protocolo del manual de procedimientos del INVIMA. Se tomaron 5 colonias presuntivas de *Staphylococcus* spp en agar *Baird Parker* y se les realizó pase a agar nutritivo para obtener cultivos puros (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England). Se realizó la identificación de las colonias sospechosas a través de pruebas de coagulasa según manual de procedimientos del INVIMA (Coagulase Plasma Rabbit BD BBL), DNAsa (Scharlau-Chemie S.A), fermentación de la glucosa en anaerobiosis y aerobiosis, manitol y producción de hemolisina en agar sangre (Scharlau-Chemie S.A).

**Extracción de ADN.** Las cepas de *Staphylococcus* fueron cultivadas en 1 ml de caldo BHI (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C por 12 horas. Los cultivos fueron centrifugados a 12.000 rpm durante 5 minutos y el ADN fue extraído con Kit de extracción de ADN para Procariotas proDNA 2003 (Corporación Corpogen. Carrera 5a No 66A-34, Bogotá, Colombia) según las instrucciones del proveedor. El ADN extraído fue mantenido a -20°C para análisis posteriores.

**Detección de gen enterotoxigénico para toxina A por PCR.** El gen SEA fue amplificado utilizando los *primers* previamente reportados por McLaughlin (12). Sea 1: TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA y Sea 2: GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA. (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road-Madison, United States of America). Las reacciones de PCR fueron amplificadas en un volumen final de 25 µl que contenía: 12.5 µl de 2X PCR Green Master Mix (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road- Madison, United States

of America), 1  $\mu$ M de cada primer, 240 ng of DNA templado (3  $\mu$ l). La amplificación se realizó en un Gene-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

## RESULTADOS

De todas las muestras de quesos distribuidos en tiendas, plazas de mercado y ventas callejeras (n=13) se recuperaron cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo. De las muestras de quesos distribuidas en supermercados (n=37) no se recuperaron cepas de *Staphylococcus* spp. De las 13 muestras de quesos distribuidos en tiendas, mercados y ventas callejeras se aislaron 50 cepas, de las cuales todas fueron *S. aureus* coagulasa positivo y enterotoxigénicas debido a que se encontró la presencia del gen que codifica para la enterotoxina A.

## DISCUSIÓN

Se recuperaron cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo de todas las muestras de quesos distribuidos en tiendas, plazas de mercado y ventas callejeras (n=13). Este resultado era de esperarse debido a las condiciones de comercialización de las muestras, pues aunque no se investigó la forma de elaboración de los quesos, se pudo evidenciar que estos se comercializaban sin envoltura, solo cubiertos por una bolsa plástica o en hojas de plátano, mantenidos bajo condiciones inadecuadas de temperatura, entre otros factores importantes que exige el Decreto 3075 de 1997 (13). En pocos casos el producto se conservó en vitrinas o en refrigeración, lo que indica que durante la manipulación de la materia prima o su procesamiento no se implementaron medidas sanitarias de rigor.

La alta frecuencia de *S. aureus* en queso campesino se debe a la falta de un estricto control en su distribución, almacenamiento y venta del producto. Otras fuentes de contaminación pueden ser el material, el equipo de trabajo y las materias primas. La presencia de *S. aureus* coagulasa positivo

en los quesos artesanales puede indicar una contaminación a partir de piel, boca o fosas nasales de personas portadoras que manipularon el alimento. De las trece muestras de quesos distribuidos en tiendas, mercados de barrio y en ventas callejeras se aislaron cincuenta cepas, de las cuales todas fueron coagulasa positivo, correspondían a cepas de *S. aureus* y eran enterotoxigénicas debido a que se encontró la presencia del gen que codifica para la enterotoxina A. Del porcentaje de muestras que tenían *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, todas amplificaron para el gen SEA lo que sugiere que las cepas de *S. aureus* circulantes en quesos mal conservados en Colombia son una posible causa de intoxicaciones alimentarias. Estos datos coinciden con lo reportado en la literatura ya que las cepas enterotoxigénicas más frecuentemente reportada son la enterotoxina A (8,9).

Por otro lado de las muestras de quesos distribuidas en supermercados (n=37) no se recuperaron colonias típicas de *Staphylococcus* spp. Los resultados anteriores corresponden a lo esperado debido a que estos quesos corresponden a marcas de calidad reconocidas en nuestro país y distribuidos y comercializados bajo estándares estrictos de calidad que garantiza la ausencia de microorganismos patógenos en los alimentos.

Los resultados evidencian que los quesos comercializados en los mercados presentan condiciones higiénicas deficientes que afectan la calidad de los quesos. Mientras que los quesos que son distribuidos en grandes cadenas de mercado cuentan con los estándares de calidad necesarios para mantener los quesos libres de *Staphylococcus* spp.

Existen claras diferencias entre los quesos distribuidos en tiendas de mercado, plazas y por ventas callejeras en Bogotá y los de supermercados siendo los primeros distribuidos sin ningún control de calidad aparente debido a la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo.

Los quesos distribuidos en supermercados, que corresponden a marcas reconocidas en

el comercio, son seguros para el consumidor. Por otro lado, los quesos distribuidos en tiendas de mercado, plazas y en ventas callejeras presentaron *S. aureus* coagulasa positivo lo genera un riesgo para la población debido a que es un reconocido patógeno humano implicado en intoxicaciones.

La PCR es una técnica específica y sensible para determinar las cepas que tienen el gen para la toxina A. Todas las cepas identificadas tienen el gen para la toxina A lo que indica su potencial virulencia.

Aunque en el estudio no se incluyó la forma de preparación de los quesos ni los niveles de calidad de las materias primas, los resultados demuestran que falta de implementación de métodos de calidad como

la aplicación del decreto 3075/97 o el Decreto 60/2000 para el control en higiene, control de temperaturas, empaques, limpieza de equipos, utensilios, manipulación, mantenimiento etc permiten el desarrollo del patógeno y la producción de su toxina por lo tanto la industria y las entidades de vigilancia y control deben ser mas estrictos con la inspección de estos productos para reducir el riesgo de intoxicaciones por quesos frescos.

La información de este estudio puede ser útil para los programas de control de calidad, sistemas de análisis de riesgos y vigilancia epidemiológica para aplicar medidas preventivas y oportunas que permitan el control y prevención de este microorganismo en Colombia.

## REFERENCIAS

1. Kitai S, Shimizu A, Kawano J, Sato E, Nakano C, Kitagawa H, Fujio K, Matsumura K, Yasuda R, Inamoto T: Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. *J Vet Med Sci* 2005; 67(3): 269-274.
2. Fueyo M. Frecuencia y Tipos de Toxinas Superantigenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes. Relacionado con tipos genéticos. [Tesis doctoral]. Oviedo: Universidad de Oviedo, Biblioteca Universitaria; 2005. URL Disponible: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/4806/1/tesis%20fueyo.pdf>
3. Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (egc) polymorphism and spa typing analyses. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(9): 6117-6123.
4. Hatakka M BK, Asplund K, Maki-Petays N, Korkeala H. Genotypes and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J Food Prot* 2000; 63: 1487-1491.
5. Marin M DLRM, Cornejo I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. *Appl Environ Microbiol* 1992, 58: 1067-1069.
6. Naffa RG, Bdour SM, Migdadi HM, Shehabi AA: Enterotoxicity and genetic variation among clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Jordan. *J Med Microbiol* 2006, 55(2):183-187.
7. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch CD, Daum RS Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children No Identified Predisposing Risk. *JAMA* 1998; 279(8): 593-598.
8. Matamoros PRDM: Estafilococo coagulasa positivo en alimentos analizados en el laboratorio de salud pública de junio de 2000 a junio de 2001. Secretaria distrital de salud de Bogotá, laboratorio de salud pública; 2007.



9. Jay JM. Microbiología Moderna de Los Alimentos. Zaragoza, España: Acribia; 1973.
10. Nema V, Agrawal R, Kamboj DV, Goel AK, Singh L: Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *Int J Food Microbiol* 2007, 117(1): 29-35.
11. Rooney RM, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM, Benembarek PK: A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: evidence for risk management. *Public Health Rep* 2004, 119(4): 427-434.
12. McLauchlin J, Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G.: The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J Food Prot* 2000, 63: 479-488.
13. Decreto 3075. Por el cual se reglamenta la ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones. Presidencia de la República de Colombia. 1977.