

Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos

GRACIELA B. JORDÁ*¹, RAÚL S. MARUCCI¹, ADRIANA M. GUIDA¹, PATRICIA S. PIRES¹,
EDUARDO A. MANFREDI²

¹Cátedra de Microbiología General, Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Mariano Moreno 1375 (3300) Posadas, Misiones; ² INEI-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán".

Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

*Correspondencia. E-mail: gracielajordaj@hotmai.com

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una causa de intoxicaciones alimentarias por su capacidad de producir enterotoxinas. Los manipuladores de alimentos que portan *S. aureus* productores de enterotoxinas pueden provocar intoxicaciones alimentarias. Se estudiaron muestras tomadas de fosas nasales de 88 manipuladores de alimentos en la provincia de Misiones. El 37,5 % de los individuos analizados eran portadores de *S. aureus*. Mediante técnicas de amplificación (PCR), se detectaron genes que codifican la producción de enterotoxinas en 13 de los 33 aislamientos obtenidos (39,4 %) y en el 14,7 % de los manipuladores. De estos aislamientos, 10 portaban el gen *sea* y 3 el gen *sec*. El estudio de sensibilidad a los antibióticos mostró un 100 % de sensibilidad a teicoplanina, gentamicina y rifampicina; 2 aislamientos fueron resistentes a clindamicina y a eritromicina y 4 resultaron resistentes a la meticilina. Estos resultados son un alerta e indicarían la necesidad de desarrollar medidas racionales para reducir el riesgo potencial de intoxicaciones alimentarias.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, manipuladores de alimentos, intoxicaciones alimentarias

ABSTRACT

Carriage and characterization of *Staphylococcus aureus* in food handlers. *Staphylococcus aureus* causes food poisoning due to its ability to produce enterotoxins. Food handlers carrying enterotoxin-producing *S. aureus* can contaminate food, thus leading to food poisoning. Samples were obtained from 88 food handlers in the Province of Misiones, Argentina. *S. aureus* was isolated from nasal swabs and PCR amplification was performed for genes encoding staphylococcal enterotoxins. A total of 37.5 % food handlers were positive for *S. aureus*. Expression of enterotoxin genes was found in 13 of the 33 (39.4 %) *S. aureus* isolates studied, accounting for 14.7 % of food handlers. Gene *sea* was detected in 10 isolates followed by gene *sec* in 3 isolates. All isolates were susceptible to teicoplanin, gentamicin and rifampicin. Four isolates were resistant to methicillin whereas 2 isolates were resistant to clindamycin and erythromycin. These results constitute a critical alert and indicate the need for developing rational measures to reduce the potential risk of food poisoning.

Key words: *Staphylococcus aureus*, food handlers, food poisoning

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se encuentran ampliamente extendidas y constituyen un problema prioritario de salud pública, tanto en países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo (4).

El agente etiológico más frecuente de las intoxicaciones de origen alimentario es *Staphylococcus aureus*. La presencia de este microorganismo se asocia con la contaminación introducida por los manipuladores de alimentos, el incumplimiento de buenas prácticas de manufactura o la utilización de materia prima contaminada (2-5, 8, 12, 13).

S. aureus es un microorganismo ubicuo que puede colonizar la nasofaringe, la piel y las mucosas de hombres y animales, y puede establecerse en un medio

ambiente propicio. Suele contaminar alimentos y, eventualmente, producir una intoxicación aguda debido a la presencia de una toxina emética muy resistente al calor y a las enzimas proteolíticas. Las principales enterotoxinas involucradas son designadas con letras de la A a la U; dentro de la variedad C existen tres subtipos (4, 11). Al ingerirse el alimento contaminado, la enterotoxina se encuentra ya formada, por lo que el período de incubación es muy corto (menos de tres horas). Las manifestaciones clínicas características, que en general cursan sin fiebre, comprenden náuseas, vómitos intensos, espasmo abdominal y diarrea. En algunos casos se observa moco y sangre en los vómitos o en las heces (4, 11). El cuadro suele presentar una evolución favorable, con tendencia a la recuperación

en 24-48 h, aunque pueden producirse formas graves con hipotensión, hipotermia y shock (4).

Debido a que las enterotoxinas estafilocócicas son las responsables del cuadro clínico y persisten en los alimentos cocinados, aun cuando el microorganismo ya no resulte viable (5, 9, 14), no solo es importante investigar la presencia de la bacteria, sino también establecer si se trata de aislamientos productores de enterotoxina.

El sistema regulador de la expresión de los factores de virulencia de *S. aureus* se asocia fuertemente a la capacidad de este microorganismo de multiplicarse hasta niveles aproximados a 10^6 UFC/g. Los factores ambientales, entre otros la temperatura, desempeñan un papel importante en la expresión de los genes de las enterotoxinas estafilocócicas (4).

Dado que la presencia de *S. aureus* en las fosas nasales, las fauces y la piel del hombre es frecuente, los manipuladores de alimentos que no utilizan correctamente guantes y barbijos o que no cumplen con otras recomendaciones de buenas prácticas potencian el riesgo de contaminación de los alimentos en los procesos de elaboración y comercialización (4).

En la actualidad, Misiones es una de las provincias argentinas de mayor afluencia turística y este hecho demanda optimizar las pautas de calidad en los servicios de gastronomía. Por lo tanto, es necesario que el personal involucrado en la manipulación de los alimentos conozca la importancia de los procedimientos que permiten reducir los riesgos de transmisión de este microorganismo, a fin de preservar la salud de los consumidores.

Al no existir informes nacionales ni locales, se diseñó el presente trabajo con el objetivo de detectar la portación de *S. aureus* en manipuladores de alimentos en la provincia de Misiones, evaluar la producción de enterotoxinas y determinar la sensibilidad a los antibióticos en los aislamientos obtenidos.

Se incluyeron en el estudio 88 manipuladores de alimentos afectados a dos restaurantes de la ciudad de Posadas y a uno de la ciudad de Puerto Iguazú (restaurantes I, III y II, respectivamente, en la Tabla 1), y de cuatro sucursales de una panadería de Posadas. Los establecimientos cumplimentaban los requerimientos legales de habilitación. La autorización para la toma de muestra al personal afectado a las distintas tareas se logró con la firma de un acta-acuerdo con los propietarios de los establecimientos, que incluyó la invitación a participar, el consentimiento del personal involucrado, la confidencialidad de los resultados y la implementación de actividades de capacitación sobre la importancia de las buenas prácticas de manufactura, en la modalidad de talleres.

Las edades de los manipuladores fluctuaron entre los 24 y 59 años; 22 eran mujeres y 66 eran hombres. Las muestras se obtuvieron de la zona nasofaríngea mediante hisopos de dacrón estériles (Eurotubo, Deltalab) y se remitieron inmediatamente al Laboratorio de Microbiología General que funciona en el Módulo de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Las muestras se inocularon en placas de agar manitol salado (Britania) y se incubaron a 37 °C durante 24-48 h (5).

Las colonias compatibles con *S. aureus* fueron sometidas a la observación microscópica con tinción de Gram e identificadas mediante las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, coagulasa, DNasa, Voges Proskauer, sensibilidad a la novobiocina y fermentación anaeróbica de la glucosa. El estudio de la sensibilidad a los antibióticos se efectuó mediante la técnica de difusión en agar, según la metodología recomendada por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Se utilizaron discos (Britania) con los siguientes agentes antibacterianos: oxacilina (1 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), cefoxitina (30µg),

Tabla 1. Distribución de *S. aureus* y presencia de genes productores de enterotoxinas en aislamientos obtenidos de manipuladores de alimentos de la provincia de Misiones

Origen y tamaño muestral		Portación de <i>S. aureus</i>		Genes productores de enterotoxinas				
	N	N	%	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
Establecimiento								
Restaurante I (Posadas)	23	10	43,5	3	-	2	-	-
Restaurante II (Pto. Iguazú)	16	6	37,5	4	-	-	-	-
Restaurante III (Posadas)	16	3	18,8	-	-	-	-	-
Panaderías (4 locales) (Posadas)	33	14	42,4	3	-	1	-	-
Total	88	33	37,5	10	0	3	0	0

teicoplanina (30 µg), rifampicina (5 µg) y gentamicina (10 µg).

Los aislamientos de *S. aureus* se conservaron en agar tripteína de soja semisólido hasta su derivación al Servicio Fisiopatogenia del Departamento de Bacteriología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", cumpliendo con las normas de envío vigentes.

Los genes que codifican las enterotoxinas A, B, C, D y E, más frecuentemente asociadas a brotes de intoxicación alimentaria, se detectaron mediante técnicas de biología molecular. Se utilizó una PCR múltiple A-B-C para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec1*, *sec2* y *sec3* de *S. aureus* enterotoxigénico, y otra PCR múltiple D-E para la detección de los genes *sed* y *see*, según el protocolo descrito por Manfredi *et al.* (11).

Se obtuvieron 33 aislamientos de *S. aureus* de los 88 individuos analizados, lo que implica un 37,5 % de portación de este microorganismo en manipuladores de alimentos. La distribución con respecto al sexo fue la siguiente: 25 hombres y 8 mujeres. De los 33 aislamientos, 13 fueron potencialmente enterotoxigénicos: 10 presentaron el gen que codifica la enterotoxina A y 3 el que codifica la enterotoxina C. No se demostró la presencia de los genes codificantes de las enterotoxinas B, D ni E. La Tabla 1 muestra la distribución de los aislamientos de *S. aureus* y de los genes codificantes de enterotoxinas que surgió del relevamiento efectuado.

El análisis de sensibilidad a los antibióticos mostró que todos los aislamientos de *S. aureus* presentaron halos de inhibición frente a teicoplanina, a gentamicina y a rifampicina, y 2 fueron resistentes a la clindamicina y a la eritromicina. Se encontró resistencia a meticilina en 4 aislamientos.

En los establecimientos estudiados, la prevalencia de portadores nasales de *S. aureus* resultó, en promedio, del 37,5 %, con un rango que varió entre el 18,8 % y el 43,5 %. Estos valores son compatibles con lo que informan algunas comunicaciones nacionales e internacionales, donde la prevalencia osciló entre el 25 % y el 45 % (1, 3, 5, 12).

En este trabajo se detectó un 39,4 % de aislamientos que portaban los genes codificantes de enterotoxinas (14,7 % de los manipuladores estudiados); esta frecuencia resultó inferior a las comunicadas en otras investigaciones de Latinoamérica, donde se observaron valores superiores al 50 % (5, 10). El gen predominante en este estudio fue *sea*, lo que coincide con lo referido en comunicaciones internacionales (3, 5, 8, 10). No se ha observado la producción simultánea de dos o más grupos toxigénicos, como informan Figueroa *et al.* (5).

El estudio de sensibilidad a los antibióticos mostró que la mayoría de los aislamientos obtenidos de los manipuladores de alimentos fueron sensibles a los antibióticos ensayados y de uso frecuente en la terapia, en coincidencia con los datos obtenidos por Acco *et al.* (1). El porcentaje de resistencia a meticilina (12 %) superó el 5,9 % informado por Cifuentes *et al.* (2). Otros autores, en cambio, no hallaron resistencia a dicho antibiótico (5).

S. aureus es uno de los patógenos responsables de las intoxicaciones alimentarias, de modo que es importante estar alerta con respecto a las cepas aisladas en la comunidad y su comportamiento frente a los antibióticos.

Este trabajo contribuye al conocimiento de portación de *S. aureus* en manipuladores de alimentos en la provincia de Misiones, información no disponible hasta el presente para esa provincia y escasamente en el resto del país (6). Sería interesante promover la realización de trabajos similares en otras jurisdicciones de la Argentina, para conocer la frecuencia de aislamientos de *S. aureus* potencialmente enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos en el país en su conjunto.

Nuestra expectativa es que este trabajo contribuya de forma significativa al conocimiento del problema y que se implementen medidas tendientes a reducir el número de las intoxicaciones alimentarias por *S. aureus*.

AGRADECIMIENTOS: a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), por el uso de las instalaciones y los servicios prestados durante la realización de este trabajo. A los establecimientos gastronómicos, por la financiación de los medios de cultivo utilizados, y, especialmente, a su personal, por permitir la toma de muestras clínicas y colaborar en esta tarea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acco M, Ferreira F, Henriques J, Tondo E. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiol* 2003; 20: 489-93.
2. Cifuentes M, Prado V, Ojeda A. Prevalencia de portación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de medicina y población general. *Rev Chil Infectol* 1998; 15: 161-9.
3. Dantas MC. Tipificação fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* aislados de manipuladores, leite e queijo, Minas Frescal, 2006. Tese submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, área de concentração: Microbiologia. Goiana-Go Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical.

4. Fernández-Crehuet Navajas J, Carnero Varo M, Pinedo Sanchez A. Intoxicaciones y tox infecciones alimentarias. En: Piédrola Gil. Medicina preventiva y salud pública. 11.ª edición. Barcelona, Elsevier Masson, 2008, p. 577-9.
5. Figueroa G, Navarrete P, Caro M, Troncoso M, Faúndez G. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. Rev Med Chile 2002; 130:859-64.
6. Grumelli Y, Aliverti F, Brocardo MS, Aliverti V, Brusa V, Copes J, Leotta G. Portación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en manipuladores de alimentos. XII Congreso Argentino de Microbiología, resumen 27323. Rev Argent Microbiol 2010, 42 Supl 1: 107.
7. Hatakka M, Asplund K, Korkeelala HJ. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from hands and nasal cavities of flight-catering employees. J Food Prot 2000; 63: 1487-91.
8. Jaime Borges L. Caracterização de microorganismos isolados em manipuladores e dietas enterais de dois hospitais públicos de Goiania, 2010. Tese submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, área de concentração: Microbiologia. Goiana-Go Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical.
9. Løvseth A, Loncarevic S, Berdal K. Modified Multiplex PCR Method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. J Clin Microbiol 2004; 42: 3869-72.
10. Mamprim Filho A. Enterotoxinas de *Staphylococcus coagulase positiva* e negativa isoladas das fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos, 2006. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
11. Manfredi E, Leotta G, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. Rev Argent Microbiol 2010; 42: 212-5.
12. Raddi MSG, Leite CQF, Mendonça, CP. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. Rev Saúde Públ S. Paulo 1988; 22: 36-40.
13. Riquelme Gyimesy LF. Incidencia de *Staphylococcus aureus* en platos fríos listos para el consumo en locales de comida italiana y medidas para su control. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos, 2007. Universidad Nacional de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química.
14. Soriano JM, Blesa J, Rico H, Molto JC, Mañes J. Incidence of *Staphylococcus aureus* in meals from cafeterias. J Food Saf 2002; 22: 135-40.
15. Suárez MJ, Arias ML, Gamboa MM. 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 term nucleasa. Arch Latinoam Nutr 2008; 58: 59-63.

Recibido:18/11/2011-Aceptado:13/2/2012