



Comparación de tres métodos de recuento de *Staphylococcus aureus* en queso fresco de expendio en los mercados populares de la ciudad de La Paz-Bolivia

Comparison of three methods of counting *Staphylococcus aureus* in fresh cheese for sale in the central markets of the city of La Paz-Bolivia

APAZA PACO, JUAN PABLO¹
 ESPADA SILVA, ANGÉLICA MARIA¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 25 DE JULIO DE 2018

FECHA DE ACEPTACIÓN: 9 DE OCTUBRE DE 2018

Resumen

Staphylococcus aureus puede contaminar una gran gama de alimentos, constituyéndose el queso fresco en un buen medio diferencial y selectivo para el desarrollo de este microorganismo. La intoxicación estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingesta de enterotoxina termoestable preformada en el alimento que fue generada por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* llegando a constituirse en un riesgo para la salud de los consumidores. El presente estudio tiene el objetivo de comparar tres métodos: i) ISO 6888-1:2003 ii) NB 32004:2004 y iii) Placas secas rehidratables (Placas Petrifilm) para el recuento de *Staphylococcus aureus* en queso fresco de expendio en los mercados populares de la ciudad de La Paz.

La comparación entre el método de cultivo convencional empleando medio Agar Baird Parker y el método alternativo por placa seca rehi-

Abstract

Staphylococcus aureus can contaminate a wide range of foods, constituting fresh cheese in a good differential and selective medium for the development of this microorganism. Staphylococcal foodborne poisoning results from the intake of thermostable enterotoxin preformed in the food that was generated by a toxigenic strain of *Staphylococcus aureus*, becoming a risk to the health of consumers. The present study has the objective of comparing three methods: i) ISO 6888-1: 2003 ii) NB 32004: 2004 and iii) Dry rehydratable plates (Petrifilm plates) for the recount of *Staphylococcus aureus* in fresh cheese for sale in popular markets from the city of La Paz.

The comparison between the conventional culture method using Baird Parker Agar medium and the alternative method by rehydratable dry plate was made by random sam-

1.- Instituto de Servicios de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.

* Correspondencia: bio_juancho@hotmail.com

dratable fue hecha por medio del muestreo al azar de 30 muestras de queso fresco, el análisis fue hecho por los tres métodos métodos, donde por el método de placa seca rehidratable 10 muestras se encontraban dentro de norma y 20 se encontraban fuera de norma; por medio del método de cultivo convencional 22 muestras se encontraban en norma y 8 fuera de norma. Concluyendo que el método de placa seca rehidratable es más sensible y fácil de aplicar en comparación con el método convencional según norma Bolivia y norma ISO.

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus aureus, queso fresco, placa seca rehidratable, cultivo convencional.

pling of 30 samples of fresh cheese, the analysis was done by the three methods methods, where by the method dry rehydratable plate 10 samples were within norm and 20 were out of norm; By means of the conventional cultivation method, 22 samples were in standard and 8 out of norm. Concluding that the rehydratable dry plate method is more sensitive and easier to apply compared to the conventional method according to the Bolivia standard and ISO standard.

KEY WORDS

Staphylococcus aureus, fresh cheese, rehydratable dry plate, conventional culture.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un microorganismo que está presente de forma natural en la leche y los productos lácteos y está a menudo asociado con las enfermedades transmitidas por los alimentos debido a la capacidad de algunas cepas para producir enterotoxinas termoestables (Nogueira *et al.*, 2010). La intoxicación estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas generadas por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* que contaminó y desarrolló en un alimento.

La incidencia es desconocida pero es probablemente una de las causas más frecuentes de intoxicación transmitida por alimentos; entre los alimentos implicados más frecuentemente se encuentran: queso fresco, huevo, carne de pollo, crema helada (Augustin *et al.*, 2006).

La afección se conoce como intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) (Bird *et al.*, 2014). *S. aureus* es la especie más característica del género que entre sus numerosos factores de virulencia se encuentran las enterotoxinas estafilocócicas (SE). Las enterotoxinas estafilocócicas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas solubles en agua, presentan un peso molecular bajo que oscila entre 26 kDa y 30 kDa, pueden mantenerse estables incluso al calentar los alimentos más de 100 °C durante 30 minutos esto por la presencia de enlaces disulfuro, mostrando también resistencia a la hidrólisis por enzimas gástricas y pancreáticas (Bird *et al.*, 2014).

La contaminación de alimentos por *S. aureus*, está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por un cuadro caracterizado por vómitos (76% de casos) y diarrea (77% de casos). El corto período de incubación de 1-6 horas orienta a la sospecha de intoxicación producida por ingestión de enterotoxinas preformadas en el alimento. Si bien son raramente

observados signos de toxicidad sistémica, tales como fiebre e hipotensión. En general, es un cuadro autolimitado que típicamente se resuelve en 24- 48 horas desde el inicio (Caballero *et al.*, 2015). El 99% de casos de intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocóccicas está asociado a *S. aureus* y ocasionalmente se reportan casos por *Staphylococcus epidermidis*.

En el presente trabajo se compararon tres métodos: dos métodos convencionales y un método alternativo: i) ISO 6888-1:2003 ii) NB 32004:2004 y iii) Placas secas rehidratables (Placas Petrifilm) para el recuento de *Staphylococcus aureus* en queso fresco de expendio en los mercados centrales de la ciudad de La Paz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Matriz a ser analizada

Las muestras de queso fresco de elaboración artesanal fueron adquiridas de diferentes mercados populares de la ciudad de La Paz en un número de 30 unidades por muestreo al azar, donde se registraron: la temperatura, descripción del entorno, si existía la presencia de vegetales, frutas, legumbres, embutidos; tomando en cuenta si su expendio era en el suelo o en tarima. Como el expendio de quesos frescos de elaboración artesanal es expuesta al aire libre y a otros contaminantes, los recipientes para la recolección de muestras se abrieron únicamente en el momento de introducir las muestras y cerrarlos de inmediato. Se identificaron las muestras por códigos numéricos, asegurando que cada muestra este correctamente identificada. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su análisis en el laboratorio.

Recuento de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la norma ISO 6888-1: 2003.

En una bolsa stomacher estéril, se procedió a pesar 25g de muestra, se realizaron diluciones decimales en agua peptonada llegando hasta un factor de dilución de 10^{-2} . Hechas las diluciones se procedió a inocular la dilución 10^{-2} un volumen de 0,1mL por duplicado sobre la superficie de Agar Baird Parker, se distribuyó el inóculo con la ayuda de un asa de Drigalsky, posteriormente se incubaron las placas a 35°C durante 48hrs. Pasado este tiempo las colonias características de *Staphylococcus aureus* fueron a confirmadas con las pruebas de la coagulasa y DNasa.

Recuento de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la NB 32004:2004.

En una bolsa stomacher estéril, se procedió a pesar 25g de muestra, inmediatamente se añadieron 225mL de agua peptonada obteniéndose una dilución 10^{-1} , de ahí se realizaron diluciones seriadas llegando a 10^{-2} ; 10^{-3} . Hechas las diluciones se procedió a inocular un volumen de 0,3mL de la dilución 10^{-3}

en dos placas y un volumen de 0,4mL en una tercera placa sobre la superficie de Agar Baird Parker, se distribuyó el inóculo con la ayuda de un asa de Dri-galsky, posteriormente se incubaron las placas a 35°C durante 48hrs. Como procedimiento confirmatorio para determinar la identidad del analito de interés, se realizó la prueba de coagulasa y DNasa. Tomando en cuenta el criterio de recuento presuntivo descrito en la tabla 1.

Tabla 1. Criterio de confirmación del recuento presuntivo por la prueba de la coagulasa (NB 32004: 2004).

Nº de Colonias presuntivas en placa	Colonias a confirmar
< 50	3
51 a 100	5
101 a 200 ó más	7

Recuento de *Staphylococcus aureus* por placa seca rehidratable (Placas Petrifilm)

En una bolsa de stomacher estéril, se pesaron 25 gramos de la muestra, posteriormente se agregaron 225 ml de agua peptonada obteniendo un factor de dilución de 10^{-1} , posteriormente se ubicaron las placas en una superficie plana y lisa. Se elevó la lámina superior y se inóculo 1mL de la dilución en el centro de la placa Staph Express sin hacer burbujas, distribuir con el esparcidor plano en el centro de la placa para distribuir la muestra de manera uniforme, finalmente se incubaron las placas a 35°C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias rojo-violetas. No se contó las colonias azules o verdosas porque estas no responden a ser *Staphylococcus coagulasa* positivos.

RESULTADOS

Figura 1

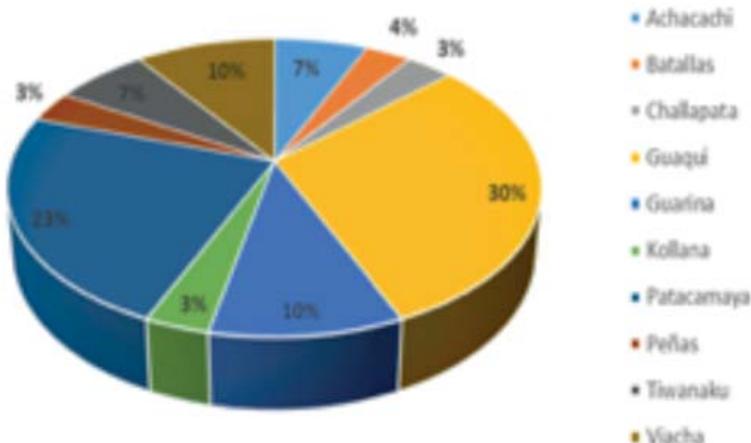
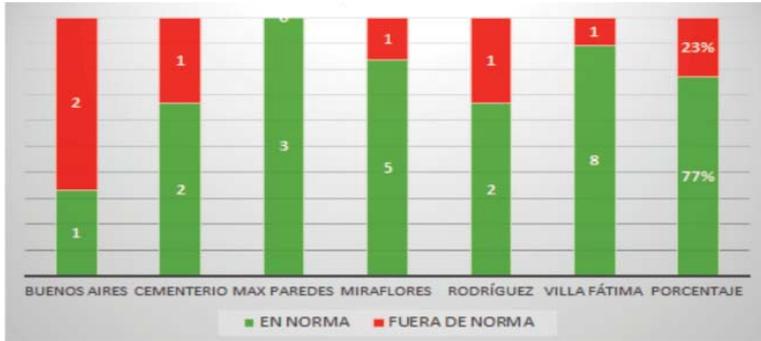


Figura 1, muestra que los quesos objetos de este estudio proceden de Guaqui con un porcentaje del 30%, seguido de Patacamaya con un 23,3%. Siendo las comunidades que proveen de queso fresco a los mercados centrales de la ciudad de La Paz.

Recuento de *Staphylococcus aureus* aplicando norma ISO 6888-1:2003

Figura 2



χ^2	gl	P
9,1925	8	0,3263

Figura 2, podemos observar que por el método de cultivo convencional ISO 6888-1:2003 que de las 30 muestras analizadas un 77% de las muestras analizadas se encuentran en norma y el 23% de las muestras presenta un recuento >10 UFC/g de *Staphylococcus aureus* (NB: 33009: 2003). De acuerdo al estadístico Chi-cuadrado (χ^2) con 8 grados de libertad no existe significancia estadística χ^2 13,9286 $<$ 15,51 que la presencia de *Staphylococcus aureus* no se encuentra relacionado al mercado de expendio.

Recuento de *Staphylococcus aureus* aplicando norma boliviana 32004:2004.

Figura 3



χ^2	gl	P
10,9659	8	0,2036

Figura 3, podemos observar que por el método de cultivo convencional NB 32004:2004, que de 30 muestras analizadas un 73% de las muestras analizadas se encuentran en norma y el 27% de las muestras presenta un recuento >10 UFC/g de *Staphylococcus aureus* (NB: 33009: 2003). De acuerdo al estadístico Chi-cuadrado (χ^2) con 8 grados de libertad no existe significancia estadística χ^2 13,9286 < 15,51 (χ^2 tabulado Software minitab16), que la presencia de *Staphylococcus aureus* no se encuentra relacionado al mercado de expendio.

Recuento de *Staphylococcus aureus* aplicando placa seca rehidratable.

Figura 4



χ^2	gl	P
10,25	8	0,2479

Figura 4, se puede observar que por el método de cultivo en placa seca rehidratable que de las 30 muestras analizadas solo el 33% de las muestras se encuentran en norma y el 67% de las muestras presenta un recuento >10 UFC/g de *Staphylococcus aureus* (NB: 33009: 2003). De acuerdo al estadístico Chi-cuadrado (χ^2) con 8 grados de libertad no existe significancia estadística χ^2 13,9286 < 15,51 (χ^2 tabulado Software minitab16), que la presencia de *Staphylococcus aureus* no se encuentra relacionado al mercado de expendio.

Figura 5



Figura 5.- Se muestra la interacción del porcentaje de las muestras que se encuentran en norma y fuera de ella por las metodologías, donde por medio del cultivo en placa seca rehidratable se obtuvo un 33% de muestras que están en norma y el 67% fuera de norma, por otro lado se observa que por el método de cultivo convencional se obtiene que el 77% de las muestras están en norma y solo el 23% fuera de norma.

DISCUSIÓN

Se buscó evaluar el rendimiento en muestras naturalmente contaminadas, de modo que se optó por muestrear quesos frescos de elaboración artesanal porque los mismos carecen de controles de calidad estrictos, según Caballero (2015) y Beuchat (2016) que se encuentra trabajando con el método de placa seca rehidratable en alimentos comparando con el cultivo convencional, consiguieron resultados representativos en los ensayos realizados. Donde por análisis estadístico se obtuvo un $p < 0,05$ comparando ambas metodologías, de modo que Caballero (2015) propone considerar el método de placa seca rehidratable como método alternativo para el análisis microbiológico de alimentos.

Se observó que por medio del método de placa seca rehidratable se obtuvieron los resultados en menos tiempo y con menos mano de obra en comparación con el método de cultivo convencional, además que con la metodología de la placa seca rehidratable se pueden realizar recuentos de niveles bajos, que según Silva (2005) se debe a una mejor sensibilidad esto debido al volumen del inóculo de la muestra que es de 1mL y la presencia del agente cromógeno,

Por otro lado Beuchat (2016) quien hace mención que el recuento por placa seca rehidratable se facilita por la presencia del azul de o-toluidina que facilita la visualización de la reacción de desoxirribonucleasa (DNasa) organismos DNasa positivos son *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*. Estos tres microorganismos representan la mayoría del grupo de organismos comúnmente conocidas como estafilococos coagulasa positiva. De modo que el recuento en placa seca rehidratable consiste en contar solamente las colonias rojo violeta. Por lo citado anteriormente solo se debería citar el análisis de un alimento como recuento de *Staphylococcus spp.*, porque *Staphylococcus aureus* no es el único microorganismo coagulasa positivo que podría estar presente en queso u otra matriz.

La variación en los recuentos por las tres metodologías posiblemente se deba a varios factores como el inóculo de la muestra, en la NB de 1mL esta fraccionada en tres (0,3mL; 0,3mL y 0,4mL) y en el caso de norma ISO, el volumen de inóculo es de 0,1mL. (Sí por ejemplo tenemos una matriz con 100 UFC/g, al hacer la dilución 10^{-1} solo se tendrá 10 UFC/g en la dilución y de acuerdo a la norma ISO se sembró 0,1mL por duplicado, en este caso se tendría que esperar el desarrollo de una colonia de *Staphylococcus aureus*), se debe de tomar en cuenta que las matrices alimenticias cuentan con una microbiota variada propia, lo que ocasionaría que se emita un recuento erróneo. En el caso del recuento por el método de placa seca rehidratable es de 1mL evitándose este fraccionamiento que conlleva a ser un punto crítico cuando no se cuenta con personal calificado y que además el recuento es más sencillo por la presencia del agente cromogénico que poseen las placas.

CONCLUSIÓN

A la conclusión a la que se llega en el presente trabajo por los resultados obtenidos es de indicar que la metodología alternativa (placas secas rehidratables) comparada con la metodología convencional llega a identificar productos alimenticios que no cumplen con los requisitos de inocuidad alimentaria, presentando mejores cualidades con respecto a su aplicación y su grado de sensibilidad.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa 3M por proporcionarnos los insumos y al instituto SELADIS por brindarnos los ambientes para realizar el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Española de Normalización y certificación. 2004. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos UNE-EN ISO 4833: AENOR
- Bamberger DM, Boyd SE. 2005. Management of *Staphylococcus aureus* Infections. Am Fam Physician. 72(12): 2474-2481.
- International Organization for Standardization. 2003. International Standard ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs Protocol for the validation of alternative methods.
- International Standardization Organization. 2006. Microbiology of food and animal feedign stuff- Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. ISO/TS 19036.
- Lahou, E., Uyttendaele, M., 2014. Evaluation of three swabbing devices for detection of *Listeria monocytogenes* on different types of food contact surfaces. Int. J. Environ. Res. Public Health 11, 804-814.
- MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3era edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2003.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., Herman, L., 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 11, 133-147.
- Perdomo IL, Meléndez P. 2004. Determinación y aislamiento de *Sthapylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* enterotoxigénicos a partir de alimentos. Rev Col Cienc Quím Farm. 33(1): 59-69.
- Rasmussen RV, Fowler VG Jr, Skov R, Bruun NE. 2011. Feature challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis in the MRSA. Future microbiol. 6(1): 43-56.
- Ruiz-Quezada SL, Orozco Anguiano AE, Martínez Acosta DG, López Sandoval MG, Rodríguez M. OA, Flores Calzada SC, Salazar García PR. 2010. Estudio piloto sobre la frecuencia en chorizo de *Staphylococcus aureus* en la zona metropolitana de Guadalajara. RESPYN. 9(13):1-3.
- Silva García MC, García Bermejo MJ, Castillo Torres L, Ania Palacio JM, Gómez Martíne D. 2006. Técnico Especialista en Laboratorio del Servicio Vasco de Salud Osakidetza 2da Edición. Editorial MAD. S.L. Sevilla, España.
- Soares, J.C., Marques, M.R., Tavaría, F.K., Pereira, J.O., Pintado, M.M., 2011. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. Int. J. Food Microbiol. 146:123-129.
- Suarez MJ, Arias ML, Gamboa MM. 2008. Detección de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su correlación con las pruebas de coagulasa y termonucleasa. Arch Latinoam Nutr. 58(1): 59-63.
- Vasconcelos NG, de Souza da Cunha MLR. 2010. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and methods. J Public Health Epidemiol. 2(3): 29-42