

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PCR DEL GEN CODIFICADOR DE LA ENTEROTOXINA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN PRODUCTOS LÁCTEOS

GUTIERREZ A. Gimena; REVOLLO Z. Susana; ESPADA Angélica*; QUISPE M. Sergio*; Instituto SELADIS, Unidad de Biología Molecular. UMSA.

RESUMEN

La enterotoxina formada por *Staphylococcus aureus* presente en alimentos con riesgo de contaminación como la leche y sus derivados pueden producir signos gastrointestinales. Los métodos de diagnóstico microbiológico para *S. aureus* enterotoxigénicos son bastante sensibles pero poco específicos y de costo elevado constituyendo en desventaja. La técnica, Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**) es un método alternativo para identificar al gen productor de enterotoxina de *S. aureus*. En este presente trabajo se analizaron 40 muestras de productos lácteos por métodos microbiológicos y moleculares. En el cultivo bacteriológico se encontró en 5 (25 %) muestras de leche y en 4 (20 %) muestras de queso. Mediante la **PCR** se identificó en 1 (5%) muestra a *S. aureus* enterotoxigénico tipo A. La contaminación con *S. aureus*, puede ser influenciada por la contaminación del material, conservación deficiente, manipulación inadecuada y el tiempo prolongado entre la elaboración y el consumo de estos alimentos.

ABSTRACT

The enterotoxaemia formed by present *Staphylococcus aureus* in foods with contamination risk as milk and its derivatives can produce gastrointestinal signs. The enterotoxigenic methods of microbiological diagnosis for *S. aureus* are quite sensible but little specific and of high cost constituting in disadvantage. The technique, Chain reaction of Polymers (PCR) is an alternative method to identify to the producing gene of enterotoxaemia of *S. aureus*. In the present work 40 milky product samples were analyzed by microbiological and molecular methods. In the bacteriological culture one was in 5 (25 %) samples of milk and in 4 (20 %) samples of cheese. By means of the PCR enterotoxigenic type A was identified in 1 (5%) shows *S. aureus*. The contamination with *S. aureus*, can be influenced by contamination of the material, deficient conservation, inadequate manipulation and the time prolonged between the elaboration and the consumption of these foods.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre contaminación microbiana de alimentos

callejeros, fueron realizados por la OPS/OMS en 1996 donde indican que en La Paz se presentó un 17% de *S. Aureus* (1). El Ministerio de Salud, previsión Nacional de Salud Ambiental y promoción de la salud, indica un brote estudiado por ETA en Bolivia del año 2001 y hasta febrero del 2002, en la ciudad de Cochabamba donde se presentó 32 personas afectadas por *Staphylococcus aureus* en leche fortificada. *Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos más patógenos de las especies encontradas en el hombre, es capaz de causar infecciones sistémicas en el organismo y de contaminar los alimentos produciendo enterotoxinas(7). La enterotoxina formada por *Staphylococcus aureus*, presente en alimentos produce infecciones gastrointestinales, presentándose con más frecuencia en lugares donde existe alta contaminación, pudiendo afectar especialmente a pacientes inmunodeprimidos, los síntomas de la intoxicación aparecen de 1 a 6 horas, dependiendo de la concentración de enterotoxina en el alimento, incluso menor a 0,1ug por 100 g de alimento puede provocar una intoxicación y causa un desequilibrio hidroeléctrico. Las enterotoxinas más comunes son 7 toxinas que se designan A, B, C1, C2, C3, D, E, y TSST-1 (toxina productora del síndrome de shock tóxico originalmente descrito como enterotoxina F). La enterotoxina del serotipo A es la que con más frecuencia aparece en los brotes de intoxicación alimentaria y le siguen en orden decreciente los serotipos C1, B, D, y E. Estas enterotoxinas son termoestables, los alimentos en los cuales mayormente se presentan enterotoxinas son la leche y sus derivados. (2)

S. aureus enterotoxigénico tipo A presenta secuencias conservadas y repetitivas que pueden ser utilizadas para una detección específica de estos microorganismos. (8) Mediante el presente trabajo se ha evaluado la técnica de PCR como método alternativo para la identificación de microorganismos patógenos como *S. aureus* enterotoxigénico tipo A. (12)

MÉTODOS

Población

Se analizaron un conjunto de 40 muestras; 20 muestras de leche cruda de vaca y 20 muestras de queso



ARTESANAL, recolectadas del sector oeste de la Ciudad de La Paz, todas estas muestras son de expendio al aire libre, que provienen del área Rural de La Paz.

Cultivo microbiológico

Se utilizó un medio de cultivo selectivo, Agar Baird Parker que contiene cloruro de litio y telurito de potasio que favorece selectivamente el crecimiento de *S. aureus* (10). Se preparó una dilución 1:10 de la leche y queso en agua peptonada al 0.1%, homogenizando por 30 seg. en stomacher. Se realizó la siembra por superficie y se incubó a 35° C por 48 horas, al cabo del periodo de este se realizó el recuento y la identificación de colonias.

Se seleccionó de 3 a 7 colonias para la realización de la prueba de coagulasa (12), las colonias escogidas se inocularon en caldo Brain Heart Infusion (BHI). Se incubaron a 35°C por 6 horas para realizar la prueba de la coagulosa, después del periodo de incubación se procedió a observar la formación del coágulo.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Extracción de ADN

Se preparó varias diluciones 1:10, 1:100 de la leche en agua peptonada al 0.1%, homogenizando por 30 segundos

en Stomacher. Posteriormente se procedió con la dilución 1:100 en caldo Brain Herat Infusión e incubada a 35 °C por 24 horas, a partir del caldo con bacterias se tomó 1 ml con TEC/SDS y proteinasa k, incubada por 2 horas a 56 °C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

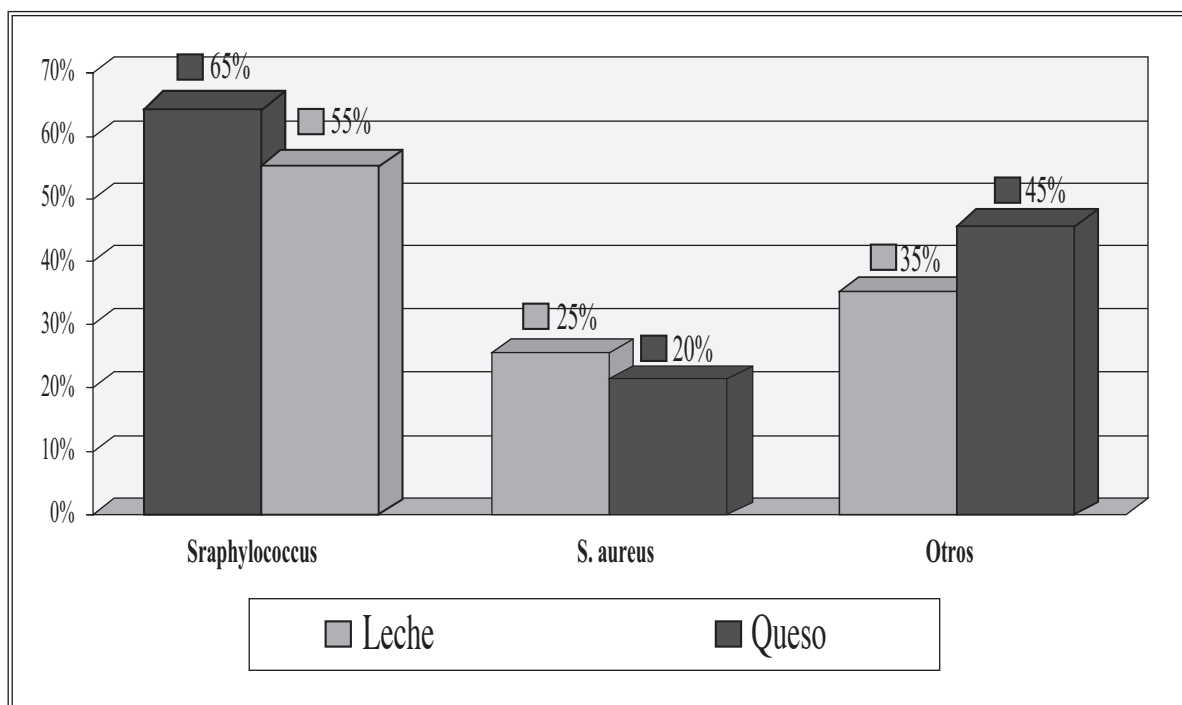
Se preparó la mezcla de amplificación para la PCR: Tris-HCl, MgCl₂, cebadores SEA-1 y SEA-2, dNTPs, Taq polimerasa y agua PCR. 15ul de la mezcla y 5ul de los controles y la muestra, teniendo un volumen total de 20ul. La amplificación se llevó a cabo en un equipo termociclador MJ-Research, siguiendo una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min., hibridización a 55° C por 2 min., extensión a 73°C por 1 min. constituyendo un ciclo, el que se repitió 30 veces. Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa al 1,5 %, revelados con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método microbiológico

De las 20 muestras de leche, 13 (65 %) desarrollaron en el medio de cultivo específico para *Staphylococcus*. De estos 13 cultivos positivos, solamente 5 (25%) fueron identificadas como *Staphylococcus aureus* después de

FIGURA 1. Determinación de la presencia de *Staphylococcus* en muestras de leche y queso.



la determinación de la prueba de la coagulasa. El resto, 7 (35%) muestras no desarrollaron en el medio selectivo agar Baird Parker con telurito de potasio.

De 20 (100 %) muestras de queso, 11 (55 %) muestras presentaron desarrollo en el medio de cultivo agar Baird Parker. De estos, solamente 4 (20 %) fueron tipificadas como *Staphylococcus aureus*, después de realizar la prueba de coagulasa. Los restantes 9 (45 %) no desarrollaron colonias en el medio selectivo.

Análisis mediante PCR

FIGURA 2. PCR muestras de leche carril 1, 2, 3, 4(muestras negativas);carril 5, 6 (controles positivos); carriles M (escaleras de 100pb).

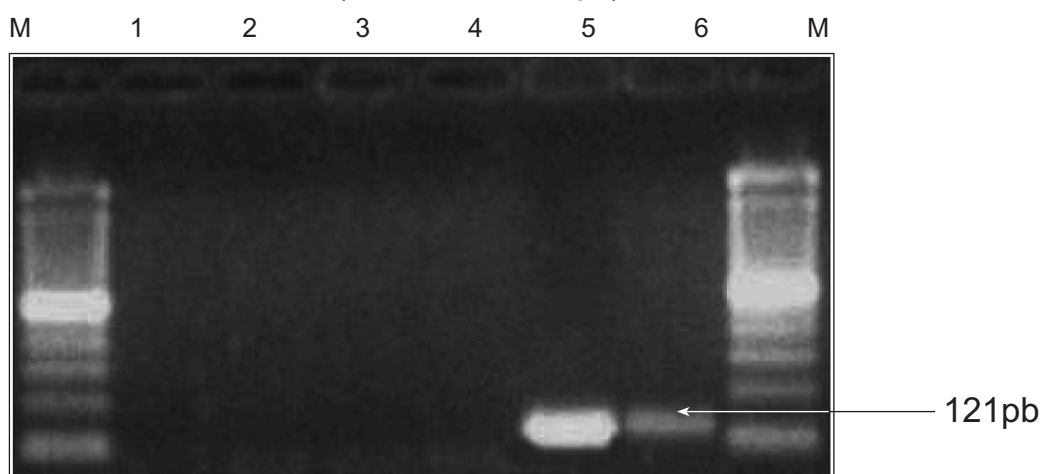


Figura. 2 PCR muestras de leche carril 1, 2, 3, 4(muestras negativas);carril 5, 6 (controles positivos); carriles M (escaleras de 100pb)

En las 20 muestras de queso, no se observó amplificación de ADN, para *S. aureus* enterotoxigénico tipo A. El cultivo es un método que requiere de mucho más tiempo para su realización, necesita mayor cantidad de bacterias presentes en la muestra para poder detectarla.

CONCLUSIONES

El método PCR nos brinda una nueva alternativa en cuanto a eficacia, rapidez para brindar el resultado de la identificación de *S. aureus* enterotoxigénico tipo A. Se identificó la contaminación de un 5% para *S. aureus* enterotoxigénico tipo A en leche, en muestras de queso el 95 % resultaron negativos. Se reconoce que el microorganismo citado no es el único indicador para una evaluación higiénica de los alimentos, ni tampoco es el único que puede ocasionar ETA (enfermedades transmitidas por alimentos). El *S. aureus* enterotoxigénico tipo A es un microorganismo emergente de gran impacto sanitario, porque produce un cuadro severo de emesis y diarrea grave al cabo de 1 a 6 horas pudiendo llevar a la muerte en personas convalecientes y niños. El factor

Identificación de las muestras de leche

De las 20 (100%) muestras de leche, 1 (5%) muestra fue positivo para cultivo y PCR de *S. aureus* enterotoxigénico tipo A. El 95 % resultó negativo para *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A.

En la Figura. 2 se observa el PCR realizada a las muestras de leche, el pozo 6 es la muestra positiva, se observa la amplificación de un fragmento de 121pb del ADN de *S. aureus* enterotoxigénico tipo A.

de riesgo de contaminación de los alimentos en estudio de acuerdo al resultado obtenido, puede deberse a la mala conservación, manipulación y el expendio al medio ambiente sin ningún control de higiene.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida Claudio. Contaminación Microbiana de los Alimentos Vendidos en Vía Pública. 1996. 87 p.
2. Madrid V. Antonio. Curso de Industrias Lácteas. 1 ed. Madrid (España): Ed. AMV. 1996.
3. Becquer L. Armando y col. Importancia de la detección de enterotoxinas estafilococicas. Cuba 1996 137 p.
4. JICA. (Agencia de Cooperación Internacional del Japón) Manual Ganadero: Lechería tropical. Trinidad (Bolivia) 1995. 38 p.
5. Eley Adrián R. Intoxicaciones Alimentarias de Etiología microbiana. Zaragoza (España): Ed. Acribia. 1994. 199 p.



6. IBTA. Impactos de la Introducción de Leche en el ingreso Familiar. La Paz (BOLIVIA) 1995.
7. OMS /OPS. Instituto panamericano de protección de alimentos y zoonosis. Programa de salud pública veterinaria. Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias. 1996. 36, 11, 23 p.
8. Davis Bernard. Tratado de Microbiología 3. Ed. Saivat Editores S. A. 1996 .
9. Camargo, N.J. et al. Ejemplo de surto de doença transmitida por alimentos. Curitiba, secretaria de Estado de Saúde e do bem estar Social do Paraná 1984.
10. FAO/OMS. Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos, Ginebra, Organización Mundial de la Salud, Serie de informes técnicos No. 705, 1984. 86 p.
11. FAO/OMS: Importancia de la inocuidad de los alimentos para la salud y el desarrollo. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, Serie de informes técnicos No. 705, 1984. 86 p.
12. FAO/OMS Manual de Inspección de los alimentos. Roma, estudios FAO: Alimentación y Nutrición, 14. 5, 1984.
13. Grillo, M. Enfermedades adquiridas a través de los alimentos. La Habana, Cuba. Editorial ciencias médicas 1988.
14. OMS Health surveillance and management procedures for food handling personnel. Ginebra, serie informes técnicos 785, 1989.
15. OPS/OMS Aspectos microbiológicos de la higiene de los alimentos. Ginebra, OMS, Serie de informes técnicos No. 399, 1968.
16. Quevedo, F. Contaminación de alimentos proteínicos con toxinas de origen microbiano. Buenos aires, Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, 1979. 1997 p.
17. Quevedo, F. Enfermedades transmitidas por alimentos y guía técnica para la vigilancia de las intoxicaciones alimentarias. En: Seminario regional sobre sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmisibles y zoonosis. Río de Janeiro, OPS/OMS; 1973.
18. Pascual A. Maria del Rosario. Microbiología alimentaria. 2ª Ed. Madrid (España) 1992
19. IBNORCA Norma Boliviana NB 274, productos lácteos, leche pasteurizada homogenizada, productos lácteos. Oct. 1998.
20. Ameida R. Claudio. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía publica en ciudades de América latina y características socio-económicas de sus vendedoras y consumidores. Instituto Panamericano de Protección de alimentos de salud pública. 2 Ed., 1996.
21. Varnan Jane P. Leche y productos lácteos. 1 Ed. Tecnología química y microbiológico.
22. Robertis D. P. Eduardo. Biología Celular y Molecular Buenos Aires-Argentina, 460 p. 12 Ed. 1996.

FINANCIAMIENTO Y AGRADECIMIENTOS

Unidad de Diagnóstico y Tipificación Molecular, Instituto SELADIS. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés.