



Frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus aureus* Oxacilina resistente en quesos artesanales comercializados en el mercado La Unión (Trujillo, Perú) mayo-julio 2015

Frequency of isolation of *Staphylococcus aureus* Oxacillin resistant in artisanal cheeses sold in "La Union" market (Trujillo, Peru) May-July 2015

Yuliana Aranda-Rojas, Giannina Chiroque-Yesquén, Angie Díaz-Vega, Yeltsin Rodríguez-Ascón, Liseth Velásquez-Vidaurre y Luis Llenque-Díaz.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú

RESUMEN

Es frecuente encontrar *Staphylococcus aureus* en los productos lácteos producidos artesanalmente y comercializados en la ciudad de Trujillo (Perú) en grados menores sin que causen daño; sin embargo, en dosis mayores conllevan a intoxicaciones alimentarias y, al ser tratadas en forma ambulatoria con antibióticos, estas bacterias crean resistencia: tal es el caso de la Oxacilina. Por ello, se propuso determinar la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* Oxacilina resistente a partir de quesos artesanales comercializados en el mercado La Unión de Trujillo, entre mayo y julio del 2015. Se recolectaron 36 muestras de quesos artesanales, por triplicado, de los doce establecimientos de venta durante 12 semanas, cada muestra estuvo constituida por 250 g. Las tres muestras recolectadas por semana fueron homogeneizadas con un mortero, se extrajo 10g y agregó 90 mL de agua-peptonada-citratada estéril obteniendo una dilución de 10^{-1} , se filtró y se realizaron diluciones hasta 10^{-3} . De las diluciones se sembró 0.1 mL en Agar Bair-Parker e incubó a 37°C por 24h. De las colonias características se procedió al aislamiento de tres cultivos de *S. aureus* por muestra en Agar-Nutritivo haciendo un total de 108 cultivos de *S. aureus*. Después de su incubación se conservaron en refrigeración a 4°C y, a cada cultivo se le realizó tinción Gram y luego pruebas de catalasa, coagulasa, y susceptibilidad a Oxacilina. Se encontró que el 100 % de cultivos de *S. aureus* coagulasa positivos fueron resistentes a Oxacilina.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, coagulasa positivo, quesos, resistencia, oxacilina

ABSTRACT

It is common to find *Staphylococcus aureus* in dairy products, produced by hand and marketed in the city of Trujillo - Peru, in minor degrees that don't cause damage, however at higher doses lead to food poisoning in certain people and to be treated on an outpatient basis with antibiotics, these bacteria create resistance as it is the case of Oxacillin. Therefore, it was proposed to determine the frequency of isolation of *S. aureus* Oxacillin resistant from artisanal cheeses sold in the market Trujillo's Union, during the period from May to July 2015. 36 samples of artisan cheeses, in triplicate, of the twelve shops for 12 weeks were collected, each sample consisted of 250 g of cheese. 3 samples collected in the week were homogenized in a mortar, it weighed 10 g and 90 ml of water added citrated sterile peptone dilution of 10^{-1} , obtaining leaked, and they searched dilutions up to 10^{-3} . The dilution was sown 0.1 ml in Bair-Parker Agar and incubated at 37°C for 24 h. Characteristic colonies was the isolation of 3 cultures of *S. aureus* per sample in nutrient Agar making a total of 108 cultures of *S. aureus*. After incubation were kept in refrigeration at 4°C and each crop was you performed Gram stain, catalase, coagulase, and susceptibility to Oxacillin test. Finally, it was determined that the 100% crop of *S. aureus* coagulase positive were resistant to Oxacillin.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, coagulase positive, cheeses, oxacillin

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una bacteria que tiene la forma de un coco, Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil, catalasa positivo, generalmente coagulasa positiva, no esporulados, mesófilo, que se agrupa en racimos, de colonia con pigmento dorado, amarillo y a veces blanco; crece en ambientes con temperaturas entre 30 – 37°C, pH entre 4.2 a 9.3, siendo el óptimo entre 7.0 a 7.5; tolera concentraciones de sal hasta del 10% y tiene una actividad acuosa mínima de 0.86¹.

Algunas especies de estafilococos son productoras de una familia de proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular, entre 22 000 y 31 000 Daltons, conocidas como enterotoxina estafilocócicas (SE) que se caracterizan por ser termo-resistentes, y que *S. aureus* produce alrededor de 11 serotipos distintos de SE, además de otras toxinas de gran virulencia para los mamíferos, todas relacionadas con las infecciones intrahospitalarias^{1,2}.

S. aureus es encontrado en la piel y habita en las mucosas de los humanos², y estos pueden llegar a los alimentos de muchas maneras y fuentes; así tenemos que pueden contaminar los alimentos por conducto de quienes manejan o preparan los mismos que tengan infecciones piógenas agudas o por portadores sanos que los albergan en fosas nasales y garganta. Esta presencia en los alimentos se asocia a una inadecuada manipulación o al empleo de materias primas contaminadas causando intoxicaciones alimentarias^{3,4}. Se han encontrado enterotoxinas por la ingesta de productos contaminados, generalmente de origen cárnico y lácteo¹.

Existen diferentes cepas de *S. aureus*, aislados de diferentes muestras biológicas, que son resistentes a los antibióticos oxacilina y meticilina, denominados *S. aureus* meticilino resistentes (MRSA), que producen una o más exoproteínas estafilocócicas específicas, incluyendo superantígenos tipo enterotoxinas, toxina del síndrome del choque tóxico y toxinas exfoliativas⁵. Se ha reportado una prevalencia del 2.8 % de estas bacterias en 101 muestras de leche de vaca colectado en tanques⁶ que dificultan su tratamiento en costo y en tiempo⁷.

El queso es un vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos⁸ en varios países de América del Sur⁹ y a nivel mundial^{10,11}. Hay trabajos de investigación que reportan la presencia de *S. aureus* en diferentes alimentos; además, estudios realizados en Latinoamérica entre el año 1993 y 2002 indican que 719 brotes fueron debido a infección estafilocócica que afectaron a 27 693 personas de las cuales 3 fallecieron¹². Otras investigaciones estiman que un alimento constituye un riesgo de intoxicación alimentaria por *S. aureus*, cuando se confirma la presencia de alguna de sus enterotoxinas o una carga del microorganismo igual o superior a 10⁵ UFC/g^{13,14}.

La producción artesanal de quesos por los pobladores de las regiones de la sierra de Cajamarca y La Libertad en el Perú es una actividad comercial importante que contribuye con su economía. Este producto es un derivado lácteo ampliamente consumido por los comensales, por su valor nutritivo, sabor y bajo costo, por lo que se expende en una cantidad apreciable en los mercados. Por otro lado, el público consumidor generalmente no conoce la procedencia ni la forma de elaboración, la cual se realiza sin la debida calificación técnica. A esto se suma el riesgo de la existencia de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos y que por su particular virulencia, dificulta el tratamiento terapéutico de las intoxicaciones.

Es conocida que la resistencia antibacteriana en cultivos de *S. aureus* se ha convertido en un problema de salud pública cuando se planifica el tratamiento y manejo de las infecciones por esta bacteria. Por otro lado se han reportado informaciones sobre la presencia de bacterias MARS en diferentes muestras de alimentos. Entonces epidemiológicamente es importante detectar y hacer un seguimiento a este tipo de población bacteriana en la comunidad local, regional y nacional ya que su presencia está relacionada con diferentes tipos de toxinas que afectan la salud del hombre. Por tanto, considerando que algunos brotes de intoxicación estafilocócica han sido atribuidos al consumo de quesos artesanales, en esta investigación se pretende determinar la frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Oxacilina en quesos artesanales procedentes del mercado La Unión en la ciudad de Trujillo-Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo y procesamiento de quesos artesanales.

De 12 establecimientos de venta de quesos artesanales del mercado La Unión de la ciudad de Trujillo (Perú), se eligió al azar tres establecimientos por semana, durante 12 semanas, de los cuales se obtuvo una muestra (36 en total) que fue depositada en bolsas con cierre hermético estériles, las cuales fueron acidificadas y trasladadas al Laboratorio de Fisiología Microbiana de la Universidad Nacional de Trujillo.

Cada muestra fue triturada y homogenizada por 3 minutos en un mortero. Se pesó 10 g de muestra y se agregó 90 ml de agua peptonada estéril (APE) al 0.1% más citrato de sodio al 2.0 % a fin de obtener una dilución inicial (10^{-1}); a partir de esta, se filtró en un embudo con gasa estéril⁶. Del filtrado se tomó 1 ml y se realizaron diluciones seriadas con 9 ml APE al 0.1%, obteniendo una dilución 10^{-2} , tal procedimiento se repitió hasta la dilución 10^{-3} .

Siembra, aislamiento e identificación de *S. aureus*¹⁵.

De cada dilución se colocó 0.1 ml y se sembró por superficie con la ayuda del asa de Drigalsky en placas con agar Baird Parker (ABP) por duplicado. Éstas se incubaron a 37°C por un período de 24 a 48 h.

De las colonias características se procedió al aislamiento de 3 cultivos de *S. aureus* por muestra, sembrando por estría en Agar Nutritivo e incubó en las mismas condiciones como en la siembra, y finalmente se conservó en refrigeración a 4°C.

A cada cultivo aislado se realizó las siguientes pruebas:

- **Tinción de Gram:** (i) se colocó una gota de solución salina fisiológica estéril (SSFE) sobre una lámina portaobjeto, con la ayuda de un asa bacteriológica se tomó una porción de cultivo, se realizó una extensión, y se fijó secando a temperatura ambiental, (ii) sobre una porta láminas para tinción, se colocó la lámina y se agregó los colorantes de tinción. Primero una gota de Cristal Violeta, se dejó por dos minutos, y luego se lavó con agua destilada. Después, se agregó el lugol, por un minuto, y se lavó con agua destilada. Se añadió alcohol-acetona hasta decoloración, se lavó con agua destilada. Luego se agregó una gota de safranina por treinta segundos. Por último se lavó con agua destilada y se dejó secar. Luego se observó al microscopio con el objetivo de inmersión y (iii) **Lectura:** La observación al microscopio de células esféricas, formando racimos, de color violeta o azules, indicó la presencia de cocos Gram positivas¹⁶.
- **Prueba de la catalasa:** (i) se colocó una gota de solución de peróxido de hidrógeno comercial sobre una lámina porta objeto. Con el asa se sacó una porción de la colonia de la bacteria, se hizo una suspensión turbia y se observó bajo el microscopio y (ii) **Lectura:** La producción de burbujas de gas (oxígeno) indicó un resultado positivo^{14,15}.
- **Prueba de la coagulasa:** (i) se tomó de cuatro a cinco colonias y fueron colocados en un tubo que contenía 0.5 ml de plasma citratado de conejo, se mezcló completamente y se incubó a 35 °C de 18-24 h. Se examinó periódicamente cada 30 minutos para verificar la formación de un coágulo y (ii) **Lectura:** La aparición de un coagulo que permaneció firme y completo cuando el tubo se invirtió, confirmó un resultado positivo^{17 18, 19}.

Pruebas de susceptibilidad a la Oxacilina

A los cultivos de *S. aureus* coagulasa positivos se realizó la prueba de susceptibilidad antibacteriana frente a la Oxacilina por el método de difusión del disco en agar²⁰. El medio de agar Mueller-Hinton se virtió sobre una placa estéril y se dejó enfriar. Se extrajo una cantidad suficiente de colonias del cultivo joven de *S. aureus* y se mezcló con SSFE hasta hacer una suspensión homogénea y fue comparado con el tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland, cuya concentración corresponde a $1,5 \times 10^8$ células/ml. Luego se distribuyó con un hisopo estéril hasta cubrir totalmente la superficie del agar, se dejó secar en estufa por 5 minutos y seguidamente se colocó el disco de Oxacilina. Se incubó en estufa, placa invertida, a 37°C durante 12 a 18 h.

Lectura: Se midió los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano y determinó el grado de susceptibilidad de la bacteria frente a la Oxacilina utilizando la tabla propuesta por NCCLS, 2001²¹.

RESULTADOS

Se aisló 50 cultivos de *S. aureus*, todos ellos resistentes a la la oxacilina (Fig. 1)

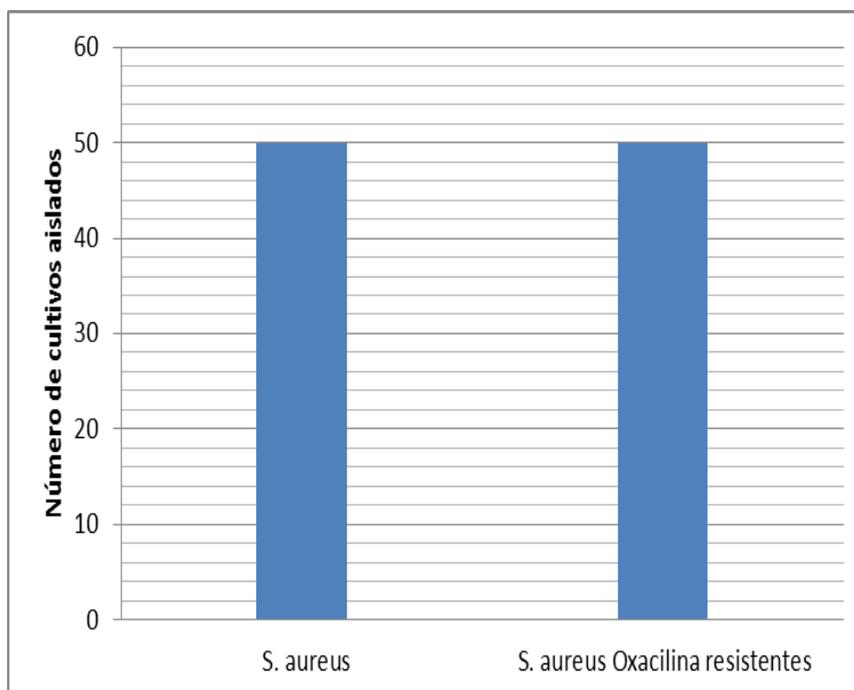


Fig. 1. Numero de cultivos de *S. aureus* y *S. aureus* resistentes a Oxacilina aislados de quesos artesanales comercializados en el mercado “La Unión” Trujillo, La Libertad, de mayo-julio 2015.

DISCUSIÓN

S. aureus es halófila y mesofila, y algunos factores fisicoquímicos, como la temperatura, pH y atmosfera aeróbica de los ambientes de procesamiento y almacenaje del queso crean una hábitat idóneo para desarrollo y proliferación óptima de estas bacterias ²², por lo que se justifica su presencia y aislamiento en los quesos blancos elaborados artesanalmente y que son comercializados en el mercado La Unión de Trujillo. Esta presencia indica que existió la contaminación bacteriana de los quesos de producción artesanal, facilitada por la exposición de las manos de las personas que procesan el alimento, hacia el suelo, agua, a objetos contaminados que estuvieron en contacto con los animales reservorios de bacterias patógenas, así como también por la diseminación microbiana desde las mucosas que tapizan fosas nasales y garganta de los manipuladores como ha sido demostrado por investigaciones sobre la evaluación microbiológica del personal que procesa alimentos y su relación con el grado de contaminación del producto alimenticio ^{23, 24}.

La frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la Oxacilina a partir de muestras de queso fue del 100 %. Este resultado es mayor al encontrado en pacientes hospitalizados, donde se encontró que solo el 32% presentaban esta bacteria ²³. Otro estudio en el hospital Arzobispo Loayza, arrojó un 53,6%²⁵. En cambio, en el instituto de enfermedades neoplásicas se reportó que un 100% de estas bacterias fueron resistentes a la Oxacilina²⁶. Esta resistencia bacteriana se debería a tres mecanismos: producción exagerada de β -lactamasa, modificación de las PBPs, y por la presencia de una nueva proteína en la pared celular denominada PBP2a, codificada por el gen *mecA*; este último mecanismo es el más importante en las cepas que rutinariamente se aíslan en el laboratorio ²⁷.

Esta investigación se justifica porque la detección de cepas de origen comunitario provenientes de alimentos, tiene una implicancia epidemiológica, ya que podrían tener la capacidad de resistir los efectos de la Oxacilina y por lo tanto a todos los betaláctamicos y a las combinaciones de betaláctamicos con inhibidores de bectalactamasa ²⁸. Entonces de los 50 cultivos de *S. aureus* coagulasa positivos aislados de quesos artesanales, el 100% resultaron resistentes a la Oxacilina, este hallazgo evidencia que los quesos de producción artesanal a nivel regional estarían actuando como

vehículos de transmisión de *S. aureus* foráneos resistentes a antibióticos hacia quienes los manipulan y/o consumen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alejo J, Cortes M, Correa D, Klotz C, Herrera C, Martínez J, Rey J, Vanegas M. Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Instituto Nacional de Salud Subdirección de Investigación. Bogotá: Nacional de Colombia. 2011.
2. Figueroa G, Navarrete P, Caro M, Troncoso M, Faúndez G. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. Rev. Med. Chile. 2002; 130(8):859-64.
3. Bauman H. HACCP: Concept, development and application. Food Technol. 1990; 44(5):174-8.
4. ICMSF. Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration. Toronto, Canadá: University of Toronto Press. 1998.
5. Moncayo-Ortiz J, Corredor-Arias L, Luligo-Espinal J, Álvarez-Aldana A, Santacruz-Ibarra J. Correlación entre la detección de superantígenos y resistencia a oxacilina en aislamientos hospitalarios de *Staphylococcus aureus*. Asociación Colombiana de Infectología. 2015;19(3):109-114
6. Haran K, Godden S, Boxrud D, Jawahir S, Bender J, Sreevatsana S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota Dairy Farms. J Clin Microbiol. 2012; 50 (3):688-695.
7. Cosgrove S. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. Clin. Infect. Dis. 2006; 42:S82-S89.
8. Jáuregui, E. 1988. Detección de estafilococos enterotoxigénicos en queso fresco elaborado a nivel artesanal. Microbiología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
9. Díaz-Rivero C, Gonzáles B. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Rev. de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. Universidad de Los Andes. 2001; 2(3): 32-38.
10. Ríos M. Enfermedades Transmitidas por Alimentos: Impacto y vigilancia epidemiológica. II Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Maracay, Venezuela. 2003: 44.
11. Prado V, Solari V, Alvarez M, Arellano C, Vidal R, Carreño M, Mamani N, Fuentes D, O’Ryan M, Muñoz V. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. Rev. Med. Chile. 2002;130(5): 495-501.
12. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis – Organización Panamericana de la Salud (INPPAZ-OPS/OMS). Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. 1993-2002.
13. Dinges M, Orwin P, Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(1):16-34.
14. Instituto Nacional de Defensa de la competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI). Norma Técnica Nacional 202.087-ITINTEC. Lima. 1982.
15. Pinto A, Guimaraes J. Microbiología de queso tipo minas frescal producido artesanalmente. Ciencia Rural. 2001; 31(6):1063-1067.
16. Tortora G, Funke R, Case C. Microbiology: an introduction .9th ed. EE.UU: Médica Panamericana. 2007.
17. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual Chapter 12 *Staphylococcus aureus*. College Park, Maryland: FDA; 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>.
18. Zendejas-Manzo G. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed. 2014; 25:129-143.
19. Koneman E, Allen S. Microbiological diagnosis: Text and Color Atlas. 6th ed. USA: Médica Panamericana, 2008.
20. Cona E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev Chil Infect. 2002; 19 (2): S 77-81.
21. Juliet C. Evaluation of *Staphylococcus* spp. *in vitro* susceptibility. Revista Chilena de Infectología. 2002; 19 (2):116-118.
22. Satorres S, Alcaráz L. Prevalence of ica A and ica D genes in *Staphylococcus aureus* and *S. epidermis* strains isolated from patients and hospital staff. Cent. Eur. J. Public Health 2007; 15:87-90.
23. Mamani E, Luján D, Pajuelo G. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. Anales de la Facultad de Medicina. Lima. 2006; 67(2):120-124.
24. Hatakka M, Bjorkroth K, Asplund K, Maki – Petays N, Korkeala H. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. J Food Prot. 2000; 63:1487-91.
25. Sánchez H, Carrillo L, Quispe M, Godoy A. Resistencia antibiótica de estafilococos en el Hospital Arzobispo Loayza de Lima, Perú. Bol Soc Peruana Enferm Infec y Trop. 1998; 7: 9-10.

26. Luján D. Evaluación de *Staphylococcus aureus* multirresistente en pacientes hospitalizados en el Instituto de Enfermedades Neoplásicas. Rev Per Enferm Infec Trop. 2003; 2:10-13.
27. Fasola E, Peterson L. Laboratory detection and evaluation of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. In: Advances in Pathology Weinstein, Ed. MosbyYear Book, Inc., Chicago, IL. 1992; p.285-306.
28. Fueyo J, Mendoza M, Martin M. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. Microbes Infect. 2005; 7:187-94

Recibido: noviembre, 2016

Aceptado: enero 2017

Autor de c la correspondencia: albertoyenque65@gmail.com