

Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos

MARÍA PAULA ALARCÓN-LAVÍN^{1,a}, CAROLINA OYARZO^{2,a},
CARLOS ESCUDERO^{2,b}, FABIOLA CERDA-LEAL^{3,c},
FRANCISCO J. VALENZUELA^{4,d}

Carriage of *Staphylococcus aureus* among food service workers

Background: *Staphylococcus aureus* produces 11 serotypes of endotoxins that may cause food poisoning. **Aim:** To determine the prevalence of type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* carriage among food service workers in Chillan, Chile. **Material and Methods:** Pharyngeal swabs were obtained from 100 food service workers and were cultured in Agar plates. After identifying the presence of *Staphylococcus aureus*, DNA was extracted to identify type A toxin by conventional PCR. **Results:** Thirty eight percent of samples were colonized with *Staphylococcus aureus*. Among these, 26% were toxin A producers. **Conclusions:** Half of the sampled workers carried *Staphylococcus aureus* and a quarter of these produced type A enterotoxin.

(Rev Med Chile 2017; 145: 1559-1564)

Key words: *Staphylococcus aureus*; Enterotoxins; Foodborne Diseases.

¹Departamento de Nutrición y Salud Pública, Facultad de Ciencias de la Salud y los Alimentos. Universidad del Bío-Bío. Chillán, Chile.

²Laboratorio de Fisiología Vasculard, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias. Universidad del Bío-Bío. Chillán, Chile.

³Laboratorio de Microbiología y Epidemiología Molecular, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias de la Salud y los Alimentos. Universidad del Bío-Bío. Chillán, Chile.

⁴Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Campus Fernando May Universidad del Bío-Bío. Chillán, Chile.

^aNutricionista. Magíster.

^bPhD.

^cBiólogo. Magíster.

^dBioquímico. PhD.

Financiamiento: DIUBB 1438202/I. Los autores no declaran conflictos de interés.

Recibido el 17 de marzo de 2017, aceptado el 7 de noviembre de 2017.

Correspondencia a:

Mg María Paula Alarcón Lavín
mpalarcon@ubiobio.cl

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos contaminados por patógenos, produciendo síntomas como vómitos, diarreas, dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, alteraciones neurológicas y otros. Además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas y, en casos extremos, la muerte¹. Se ha descrito un aumento significativo de ETA, a nivel mundial, estimándose que entre 15 y 70% de los casos de diarrea en menores de cinco años de edad se debe a alimentos contaminados².

A nivel mundial, las intoxicaciones alimentarias causadas por *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico (SAE) no son notificadas a los sistemas de vigilancia epidemiológica. Estimaciones indican que si los casos aislados diagnosticados fueran reportados, la cifra sería 10 veces mayor

al número de brotes reportados³. El subreporte de intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) se debe, principalmente, a que la recuperación normalmente ocurre sin suministro de medicamentos y, frecuentemente, los organismos de salud no la incluyen dentro de las enfermedades de declaración obligatoria, tal como sucede en Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.)⁴. Se estima que solo de 1-5% de todos los casos de IAE que ocurren en EE.UU. son reportados al Departamento de Salud Pública; y se estima que la IAE corresponde alrededor de 14% del total de las ETA, representando la tercera causa más común de infección bacteriana⁴. En Francia, SAE es la segunda causa de ETA después de *Salmonella* spp.⁵ y en Corea ocupó el segundo lugar entre los agentes bacterianos causales de estas enfermedades⁶. Antecedentes que sugieren a la IAE como la principal causa de enfermedad alimentaria a nivel mundial³.

En Chile, hasta septiembre de 2016, se registraron 885 brotes de ETA con 4.705 casos asociados, cifras que son 13,1% y 17,3% mayores a lo notificado en igual período de 2015, respectivamente. De estos, 30% han sido clasificados con un diagnóstico clínico específico, observándose 16 brotes asociados *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)⁷.

S. aureus es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, se agrupa en racimos pigmentados dorados o blancos, inmóvil, que posee actividad de catalasa y coagulasa, convirtiéndolo en un agente agresivo para el huésped³. Algunas especies de estafilococos son productoras de una familia de proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular (masa molecular 22-31.000 kDa), conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SE) que poseen termoresistencia, incluso a 100°C⁸. *S. aureus* produce alrededor de 11 serotipos distintos de SE, enterotoxinas que son causantes de intoxicaciones alimentarias³. Se han descrito 8 cepas de *S. aureus* productoras de las enterotoxinas A-H, que son responsables de las intoxicaciones alimentarias más comunes. En el año 1998, se ha reportado la existencia de al menos dos nuevas variedades⁹. Sin embargo, tal como fue reportado por Figueroa et al., 2002, y por el Ministerio de Salud de Chile, la enterotoxina tipo A es la más frecuente y duplica la cantidad presente de enterotoxina B (frecuencias de 67,3 y 28,3%, respectivamente)^{7,8}. El *S. aureus* coloniza preferentemente mucosa y piel de seres humanos⁹ y puede existir de manera permanente o transitoria como parte de la microflora normal sin causar síntomas en el huésped¹⁰, identificándose su presencia principalmente en la zona nasal anterior con 30-40%¹¹.

La ingestión de toxinas de *S. aureus* es conocida como estafiloenterotoxemia o estafiloenterotoxemia¹², y destaca por su período de incubación menor a tres horas. Las manifestaciones clínicas son náuseas, vómitos intensos, espasmo abdominal y diarrea. Generalmente de evolución favorable entre 24 y 48 h, aun cuando pueden producirse formas graves con hipotensión, hipotermia y shock¹³.

En América Latina, entre los años 1993 y 2000 se detectaron 191 brotes por IAE con 6.433 afectados y 2 muertos¹⁴. En Chile, Prado et al., 2002¹⁵, reportaron que el año 2000 aumentaron en la Región Metropolitana 37% los casos de brotes de ETA, respecto al año anterior. El 63,5% se originó en los hogares, y 33,1% se produjo por ingesta

de alimentos en establecimientos expendedores, destacando *S. aureus* como uno de los agentes bacterianos más importantes del brote. Se asocia esta contaminación a una inadecuada manipulación y transferencia de la bacteria desde las superficies de trabajo o desde los mismos portadores¹⁶.

La portación nasofaríngea de *S. aureus* es un hallazgo común en la población, según la revisión de Kanafani et al., 2006¹⁷ se ha documentado la existencia de 20% de portadores persistentes, 60% de portadores intermitentes, constituyendo un serio problema para los manipuladores de alimentos, pues actúan como puente entre los productos alimentarios y los microorganismos¹⁸, en cualquier etapa del proceso de elaboración. En otro estudio realizado por Figueroa et al., 2002⁸, en manipuladores de alimentos de Santiago, evidenció que 34% de los individuos analizados estaban colonizados por *S. aureus* y más de la mitad de ellos eran productores de enterotoxina.

En función de lo anterior y dado la ausencia de reportes en los últimos 10 años que indiquen si esta portación ha cambiado, nosotros proyectamos estimar la prevalencia de portación de *S. aureus* enterotoxigénico tipo A en manipuladores de alimentos de Chillán. Se sospecha que al menos 10% del grupo de estudio es portador de SAE, antecedentes que podrían aportar a la actualización de la reglamentación sanitaria vigente para los servicios de alimentación en Chile.

Material y Método

Sujetos

Se reclutaron 102 individuos en la ciudad de Chillán, pertenecientes a 16 servicios de alimentación de tres empresas concesionarias. Los criterios de exclusión fueron aquellos individuos que no estaban interesados en participar o quienes al momento de practicar el examen nasofaríngeo estaban bajo tratamiento antibiótico o lo habían terminado dos semanas antes (n = 2). Según estos criterios, se realizó el análisis de prevalencia en 100 manipuladores cuya edades oscilan entre 27-55 años, y al menos 60% de los sujetos se desempeña en la misma labor por al menos 10 años. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética y Bioética de la Universidad del Bío Bío, los cuales fueron explicados a los participantes, quienes entregaron su consentimiento informado

de acuerdo a las pautas éticas de investigación en humanos (Council for International Organizations of Medical Sciences, WHO).

Las muestras fueron obtenidas de la zona nasofaríngea mediante tórula con medio estéril en un tubo de 1,5 mL (Eppendorf) y trasladadas en refrigeración a 4°C, para ser inoculadas en placas Agar Baird Parker enriquecido con infusión cerebro corazón (BHI) e incubadas 37 °C por 48 h. Se seleccionaron las colonias positivas para *S. aureus* realizando para su confirmación las pruebas bioquímicas de catalasa y coagulasa. La actividad enzimática de esta última se determinó en plasma de conejo según protocolo.

Ensayo coagulasa y catalasa

Para realizar las pruebas bioquímicas se seleccionaron al menos dos colonias de *S. aureus* (redondas, bordes lisos, convexas, negras, brillantes, borde blanco fino, halo claro), y se llevaron a cultivo en medio BHI (Brain Heart Infusion Agar, Becton Dickinson, Alemania) según instrucciones de uso del fabricante. Se utilizaron 0,05 ml para realizar la prueba de coagulasa (BBL™ Coagulase Plasmas, Becton Dickinson, USA) según las especificaciones del proveedor. Se confirma la presencia de *S. aureus* cuando se aprecia cualquier grado de coagulación.

La prueba bioquímica de catalasa se realiza previa selección de colonias de *S. aureus* que se situaron en una placa de vidrio y a la cual se le agregó 500 µL de agua oxigenada, se confirma la presencia de la bacteria por la generación de burbujas de oxígeno en la solución.

Extracción de ADN y PCR

Para extraer el ADN de las muestras, fueron tratadas previamente con 2,5 mg de lisozyima (US Biological life Science, USA) y resuspendida en 2 mL de fosfato de potasio al 0,1 M, incubada a 37°C por 60 min y luego centrifugadas. El *pellet* se incubó con 600 µL de *NucleiLysis solution* a 80°C por 5 min. Luego se continúa con los pasos de purificación y lavado según el instructivo del proveedor del *kit* Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA). Se resuspende el ADN en agua libre de nucleasas y se cuantifica la concentración por absorbancia 260 nm almacenando a -20°C.

Los partidores utilizados para amplificar *S. aureus* tipo A fueron publicados por Brizzio et al, 2013, y corresponden a las siguientes secuencias;

SA-U: 5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC-3' y SA-A: 5'-ATTAACCGAACGTTCTGT-3' sintetizados en Integrated DNA Technologies (IDT DNA, USA) y cuyo amplicón corresponde a un fragmento de 270 pb. En la reacción de amplificación, se utilizó el 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 5 µL de 5 x *Green buffer* (Promega, USA), 0,125 µL GoTaq 5U/mL (Promega, USA), 10,0 µL de agua libre de nucleasas (Winkler, Chile), 2 µL MgCl₂ (25 mM, Promega, USA) y 2,5 µL de *Primer Forward o Reverse* (100µM). Los ciclos de temperatura fueron una denaturación inicial de 94°C por 5 min y 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54-56-60°C por 1 min, 72°C por 1 min. Finalmente, se realiza una extensión de 72 °C por 10 min para dejar un enfriamiento final a 4°C, utilizando rangos de sustrato que van de 10, 100 y 1.000 ng. Posteriormente, se corren geles de agarosa a 1,2% en *buffer* TAE a 100 volt por 40 min, se determinó que la temperatura óptima del PCR fue 54°C a una concentración de 5 y 2 ng.

Análisis estadístico

Los datos de frecuencia fueron analizados por Chi cuadrado (χ^2) y test de Fischer, por entregar un P exacto. Los valores significativos son considerados cuando $p < 0,05$. El tamaño muestral se calculó usando el programa Graph Pad Stat Mateversion 2.00 for Windows (Graph Pad Software, San Diego California, USA), www.graphpad.com". Stat Mate.

Resultados

Nuestro objetivo fue observar los cambios de prevalencia de *S. aureus* enterotoxigénico tipo A en los sujetos manipuladores de alimentos. En este contexto, del total de muestras nasofaríngeas analizadas, 38 estaban colonizadas por *S. aureus*, a partir de los ensayos bioquímicos de coagulasa y catalasa (Tabla 1), correspondiendo a 38% de la población estudiada. En estos sujetos positivos para la bacteria, se realizó PCR convencional para amplificar la enterotoxina tipo A (Figura 1A), con un fragmento de 270 pb. En este ensayo de PCR, se identificó que 26,3% (10 manipuladores) de los individuos *S. aureus* positivos eran productores de enterotoxina tipo A, lo que corresponde a 10% del grupo total de estudio, genotipo positivo que no necesariamente refleja una producción de la toxina.

En los sujetos negativos y positivos para *S. aureus*, no había diferencias significativas en las edades promedio, $39 \pm 11,6$ y $42 \pm 13,2$, respectivamente (Figura 1B). Además, se pudo observar una tendencia a una mayor prevalencia de *S. aureus* en individuos mayores de 38 años, tal

como se observa en la Figura 1C, donde se puede apreciar las frecuencias de los ensayos bioquímicos positivos para coagulasa y catalasa.

Dos tercios de las empresas de alimentación colaboradoras de este estudio (84% de la muestra total de sujetos) no tenía como requisito de

Tabla 1. Frecuencia fenotípica para ensayos de catalasa, coagulasa y enterotoxina tipo A

Fenotipo	Catalasa	Coagulasa	Enterotoxina Tipo A	p-value*	OR	[95% Conf. interval]
(+)	38	38	10	p < 0,0001	5.516	2.559-11.89
(-)	62	62	90			

*El análisis de frecuencia fue realizado por *Chi-square test*.

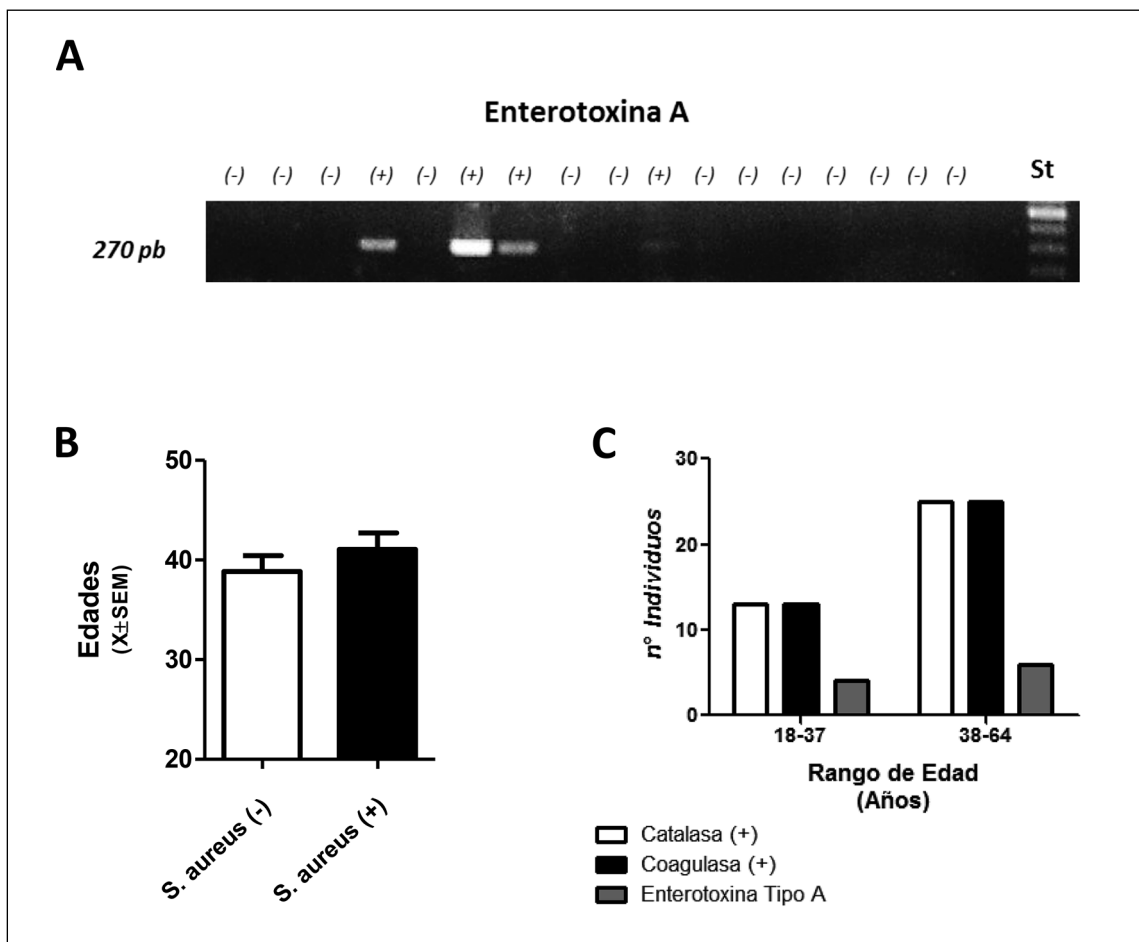


Figura 1. Caracterización de los sujetos estudiados. **(A)** Foto representativa de la amplificación de los ADN de las muestras nasofaríngeas mediante PCR convencional con primers específicos para la enterotoxina A. Los pacientes positivos (+) corresponden a una banda de 270 pb, y a la derecha se puede observar el estándar de peso molecular (St). **(B)** Edades promedio de los manipuladores negativos y positivos por ensayos bioquímicos para *S. aureus*. **(C)** Frecuencia de ensayos bioquímicos y de PCR para individuos de 18-37 años y 38-64 años.

ingreso la realización de examen nasofaríngeo para detección de *S. aureus*, y su política interna establecía que este solo realizará si la empresa que contrata su servicio lo establece como exigencia. Tan solo una empresa (correspondiente a 16% de la muestra), exigía un examen nasofaríngeo para la detección de *S. aureus* como un requisito de ingreso y establecía como política interna la repetición de este examen cada 6 meses.

Discusión

Los resultados de prevalencia obtenidos de esta investigación se relacionan con los detectados en un estudio realizado por Figueroa et al., 2002⁸, donde se evidenció que 34% de los individuos analizados estaban colonizados por *S. aureus* y 58% de las cepas aisladas de *S. aureus* producía enterotoxina A. En nuestro estudio, observamos un aumento de 4% en la portación de la bacteria en la población estudiada, y de estos, 26,3% son productores de la enterotoxina A, caracterización genotípica que va de la mano con la producción de la proteína enterotoxigénica en 100% de los casos, según estudio de Kérouanton et al., 2007¹⁹. Este aumento se puede deber a la contaminación cruzada entre manipuladores de alimentos, por inadecuado uso de la mascarilla o eventualmente a un aumento en la portación de esta bacteria en la población.

La contaminación de los alimentos por *S. aureus* está asociada a una incorrecta manipulación de alimento por parte de aquellos portadores que no emplean las medidas higiénicas adecuadas para realizar este tipo de actividad. Por lo señalado, es preocupante que las empresas de alimentación no tengan establecido como política interna, la realización de examen que asegure que el manipulador de alimentos no es portador de *S. aureus* productor de enterotoxina. Ello es más relevante aun considerando que la portación nasofaríngea de este patógeno es un hallazgo común en la población, al menos 80%, entre portadores persistentes e intermitentes, según el estudio de Kanafani et al., 2006¹⁷. Puesto que al ser estos individuos los que intervienen en la elaboración de productos alimentarios generan un potencial riesgo de IAE para la población. No obstante lo anterior, durante el período de esta investigación no se observaron brotes de ETA en los servicios de alimentación involucrados.

La normativa chilena vigente (D.S. N° 977) señala que cualquier persona que trabaje en manipulación de alimentos deberá mantener un estado de salud que garantice que no representa riesgo de contaminación de los alimentos que manipule²⁰, pero no establece exámenes a realizar ni su periodicidad. Sumado a lo anterior, la Norma Técnica para los Servicios de Alimentación y Nutrición año 2005 expresa que: “el personal operativo deberá a su ingreso y posteriormente una vez al año, realizarse un examen de salud completo, el que deberá certificar que el funcionario no es portador de enfermedades que puedan contagiarse a través de los alimentos, tales como fiebre tifoidea, hepatitis, *S. aureus*, ni enfermedades de la piel; en forma activa”²¹.

El aumento en la prevalencia de *S. aureus* detectado en nuestra investigación sugiere la necesidad de incrementar los estudios de la prevalencia en la portación de SAE en manipuladores de alimentos, generando políticas que permitan reducir progresivamente los indicadores entregados por el Instituto de Salud Pública de Chile, donde se señala que del total de cepas confirmadas de *S. aureus* con enterotoxinas (Boletín Instituto de Salud Pública de Chile, 2011-2012), las toxinas más frecuentes fueron la A y B.

Referencias

1. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico, estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. Roma: FAO; 2009 (6): 13-41.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico, estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. Roma: FAO; 2009 (6): 159-90.
3. Ministerio de salud y protección social, Instituto nacional de salud. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Bogotá 2011. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>.
4. Doyle M, Beuchat L, Montville T. *Microbiología de los*

- Alimentos, Fundamentos y Fronteras*. Zaragoza, España: Editorial Acribia; 2001. p. 371-93.
- Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol* 2007; 115 (3): 369-75.
 - Kim HJ, Griffiths MW, Fazil AM, Lammerding AM. Probabilistic Risk Model for Staphylococcal Intoxication from Pork-Based Food Dishes Prepared in Food Service Establishments in Korea. *J Food Prot* 2009; 72 (9): 1897-908.
 - Boletín Epidemiológico Trimestral, Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), Volumen 112, N° 3, año 2016 Disponible en: <http://epi.minsal.cl/boletin-epidemiologico-trimestral-edicion3-2016/>.
 - 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.
 - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganism in Food 5, microbiological specifications of food pathogens. London, UK:1sted; 1996. Blackie Academic and Professional. p. 299-333.
 - Acco M, Ferreira F, Henriques J, Tondo E. Identificación de multiple strain of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology* 2003; 20(5): 489-93.
 - Falagas ME, Bliziotis IA, Fragoulis KN. Oral rifampin for eradication of *Staphylococcus aureus* carriage from healthy and sick populations: a systematic review of the evidence from comparative trials. *Am J Infect Control* 2006; 35 (2): 106-14.
 - Bécquer A, Leiva V, Lara C, Mota L. *Staphylococcus aureus*, actividad termonucleasa y enterotoxinas en alimentos. *Rev Cubana AlimentNutr* 1997; 11 (2): 89-93.
 - Fernández-Crehuet J, Carnero M, Pinedo A. Intoxicaciones y toxoinfecciones alimentarias. En: Piédrola Gil, editores. *Medicina preventiva y Salud pública*. 11ª ed. Barcelona: ElsevierMasson; 2008. p. 577-9.
 - Valdiviezo N, Villalobos L, Martínez R. Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumana-Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 2006; 26 (2): 95-100.
 - Prado V, Solari V, Alvarez I, Arellano C, Vidal R, Carreño M, et al. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. *Rev Med Chile* 2002; 130 (5): 22-31.
 - Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36 (4): 815-36.
 - Kanafani ZA, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24 (3): 182-93.
 - Legomín M, Caballero A, Monterrey P, Arcia J. Riesgos en la venta de alimentos en las calles. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1997; 11 (2): 79-83.
 - Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France 2007; 115 (3): 369-75.
 - Reglamento Sanitario de los Alimentos. N° 977/96. Ministerio de Salud. Instituto de Salud Pública. 2013. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/02/RSA%20DECRETO_977_96_actualizado%202013.pdf.
 - Norma Técnica para Servicios de Alimentación y Nutrición, Ley N° 19.937 de Autoridad Sanitaria y Gestión Ministerio de salud Chile. Ministerio de Salud. 2005 <http://destudiantil.ubiobio.cl/documentos/norma-alimentacionnutricion2005final.pdf>.