

Caracterización bioquímica y enzimática de *Staphylococcus aureus* aislados en los alimentos callejeros.

Barrera Jiménez, I.¹, Perea Cantero, R.A.¹, y Perea Rodríguez, R.B.²

¹División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, Coyoacán, 04960.

²Facultad de medicina UNAM Circuito Interior, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán C.P. 04510 México. rperea@correo.xoc.uam.mx.

Palabras clave: contaminación, susceptibilidad a los antibióticos, enterotoxinas.

Introducción

En los países en desarrollo, la venta ambulante de alimentos es común porque son baratos y las ubicaciones son convenientes. Sin embargo, los alimentos consumidos en establecimientos públicos y la comida callejera han estado implicados en incidentes de intoxicación alimentaria. La falta de infraestructura básica, práctica de buena higiene e instalaciones de almacenamiento adecuadas contribuyen a una mala calidad microbiana de los alimentos que se venden en la vía pública. Aunque *Staphylococcus aureus* es un importante patógeno, muchas personas sanas lo portan como parte de la población de microorganismos asociados con la nariz, garganta, perineo o piel. *S. aureus* tiene la capacidad de producir varias exoenzimas que contribuyen a la virulencia como la coagulasa, hemolisina, proteasa y lipasa y enterotoxina. Estafilococo puede crecer y producir enterotoxinas termoestables en los alimentos en el intervalo de temperatura que oscila entre 7 y 48 °C [1]. La intoxicación alimentaria por estafilococos (SFP) está entre las más comunes enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo. *S. aureus* ha sido identificado como agente causal en numerosos brotes de intoxicación alimentaria, no se informa debido a su naturaleza autolimitante de la enfermedad [2]. Sin embargo, estafilococos y por consecuencia la intoxicación alimentaria representa una carga social considerable en términos de gastos hospitalarios, pérdida de jornadas laborales y productividad de los pacientes, y esto aunado al costo de deshacerse de los alimentos contaminados. Los alimentos que están frecuentemente implicados en SFP incluyen productos cárnicos (de cerdo, de res, de aves), ensaladas, productos de huevo, pasteles de crema, tacos, rellenos de sándwich, así como otros alimentos que requieran considerable manipulación durante la preparación [3]. La seguridad alimentaria es una de las principales preocupaciones, tanto para el consumidor como para la industria alimentaria, ya que hay un número creciente de infecciones asociadas a los alimentos. por tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar bioquímica y enzimáticamente de *Staphylococcus aureus* aislados de alimentos callejeros.

Metodología

Muestras de alimentos. Se compraron un total de 106 muestras de alimentos durante un período de 3 meses de 2 centros de alimentación (hospital y cafetería de estudiantes) de la CDMX. Todas las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio para su análisis.

Para el aislamiento e identificación de *S. aureus*, se suspendieron veinticinco gramos de cada una de las muestras de alimentos en 225 mL de agua de peptona tamponada (Difco Labs) y se homogenizo asépticamente en un stomacher. Se realizó el método de las diluciones decimales y 0.1 mL de cada dilución se transfirió a agar Baird-Parker (Difco), y se incubaron durante 48 h a 35 °C. Las colonias resultantes se cultivaron en agar soya tripticasa (TSA) e incubaron a 35 °C por 24 h. Para su almacenamiento se mantuvieron a -80 °C en infusión cerebro-corazón caldo con 20% de glicerol como crioprotector.

Caracterización bioquímica. Los aislados de *S. aureus* se caracterizan mediante tinción de Gram, reacción de catalasa, producción de ácido de agar sal manitol (MSA, Merck), fermentación anaeróbica de

manitol, producción de acetoina con rojo de metilo Voges-Medio Proskauer (Difco) y prueba de coagulasa en tubo con plasma de conejo con EDTA.

Caracterización preliminar de factores de virulencia. Se investigó la actividad de hemolisinas, lecitinasa y lipasa, siguiendo métodos modificados [4]. Los inóculos fueron preparados subcultivando los aislados en TSA e incubados durante la noche a 35 °C. Posteriormente, las colonias bien aisladas se suspendieron en una solución de NaCl al 0.85% y se ajustó a una concentración de aproximada de 10⁸ UFC / mL. Se utilizó un inoculador multipunto para administrar gotas de suspensión bacteriana en la superficie de cada placa como se describe a continuación. Las hemolisinas se detectaron mediante inoculación en agar TSA con un 5% de sangre de caballo y se incubaron a 35 °C por 24 h. Los aislamientos hemolíticos presentaron una zona de halo en el agar sangre adyacente al crecimiento bacteriano. Para identificar actividad de lecitinasa se agregó emulsión de yema de huevo al 10% (v / v) a agar nutritivo con glucosa al 1% (Merck). Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C durante 72 h y los aislados que mostraron un crecimiento opaco se consideraron lecitinasas positivas. Se utilizaron placas de agar nutritivo que contenían Tween 80 al 1% para estudiar la actividad de la lipasa, se incubaron a 35 °C durante 72 h y las colonias que mostraron un halo adyacente al crecimiento se registraron como lipasas positivas. Para la determinación de producción de proteasas, las cepas fueron sembradas en placas que contenían TSA adicionado con caseína al 2% y los aislados que produjeron las zonas opalescentes alrededor del crecimiento fueron registradas como proteasas positivas

Cepas de referencia. Tres cepas de referencia utilizadas en este estudio fueron las cepas de *S. aureus* ATCC 23235, y ATCC 2766 y ATCC 27664, las cuales son cepas productoras de enterotoxinas. (se cultivaron en TSA (Merck).

Susceptibilidad a los antibióticos. Los aislamientos se analizaron para determinar la susceptibilidad a los antibióticos utilizando el método de difusión en disco de agar en Mueller–Hinton [5]. Los antibióticos (Difco) probados fueron: eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 UI), trimetoprima con sulfametoxazol (25 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg). Los experimentos se realizaron por duplicado y las cepas se clasificaron como susceptibles o resistentes según la tabla suministrada con los discos. Para la actividad antibacteriana del extracto crudo sobre *S. aureus*, se utilizó misma metodología de difusión en disco.

Resultados y discusión

Aislados en los alimentos. En la **Tabla 1** se muestran los tipos de alimentos listos para consumir que se analizaron. El 71.7% de los alimentos estaban contaminados con *S. aureus*., 17 de las muestras de pastel (73.9%) y 28 (93.3%) de 30 muestras de tacos de carne, , Diez (45,4%) de 22 de las salchichas de pollo estaban contaminadas, mientras que *S. aureus* no se aisló de postres lácteos. La tasa de contaminación de alimentos listos para comer que se dejan a temperaturas ligeramente elevadas después de la preparación fue mayor que la de las salchichas y las muestras de leche. Las salchichas se fríen en aceite caliente en el momento de la compra, mientras que la leche había sido pasteurizada y envasada en un recipiente sellado. Se obtuvo un recuento promedio de las muestras en general de al menos 4 log¹⁰ (UFC / g)

Tabla 1. Tipo de alimentos, número de muestras analizadas y número de muestras positivas para *S. aureus*

Tipo de alimentos	Número de muestras analizadas	Número de muestras con <i>S. aureus</i> (%)
-------------------	-------------------------------	---

Pastel	23	17 (73.9%)
Tacos de carne	30	28 (93.3%)
Guisado de cerdo	9	9 (100%)
ensalada de frutas	7	7 (100%)
Suchi de pescado	10	5 (50.0%)
Salchichas de pollo	22	10 (45.4%)
Postres lácteos	5	0 (0)
Total	106	76 (71.69%)

S. aureus está presente en la piel y mucosas de humanos, animales, y en el medio ambiente[4]. Como consecuencia, los alimentos originalmente pueden estar contaminado durante o después del procesamiento, por lo tanto se fomenta el crecimiento de *S. aureus* en alimentos que se mantienen a niveles ligeramente elevados de temperatura. Todas las muestras de alimentos analizadas en este trabajo excepto las salchichas y las muestras de leche se mantuvieron a temperatura ambiente (30 °C), lo que probablemente propicio el crecimiento de *S. aureus*, que probablemente sobrevivió a la cocción o gracias a la recontaminación humana después procesamiento [3] Se puede concluir que el saneamiento o control de temperatura o ambos eran inadecuados y bajo esta condición adecuada *S. aureus* presente en los alimentos puede multiplicarse y producir enterotoxina que cuando se consume daría lugar a SFP. Por tanto, la falta de higiene entre los manipuladores de alimentos, además de las superficies contaminadas con dicho patógeno pueden contribuir a la generación de enfermedades transmitidas por los alimentos [6].

Para caracterizar fenotípicamente los microorganismos aislados en alimentos se utilizaron técnicas tradicionales. En este estudio se realizó el aislamiento y caracterización de las cepas de *S. aureus*. Adicionalmente, . Los *S. aureus* que no produjeron halo en Baird-Parker fueron subcultivados en agar sal de manitol y se realizó nuevamente la fermentación de manitol y la prueba de coagulasa en tubo. Las características de las cepas de *S. aureus* aisladas de las muestras de alimentos en este estudio se muestran en la **Tabla 2**. El 94% de los aislamientos fueron fermentadores de manitol y positivo para la producción de acetoina, mientras que el 86% fueron positivos para la prueba de coagulasa en tubo. Aproximadamente el 25% de los aislamientos totales, secretaron conforme se observa en la tabla las 3 enzimas proteasa(35.8%), lipasa(81.1%) y hemolisina (55.6%). Por lo menos cada uno de los aislamientos secretó 1 o 2 enzimas. La mayoría de los aislamientos fueron capaces de producir enzima lipasa (81.1%), por el contrario, solo unos pocos aislamientos poseían enzima lecitinasa (10.3%).

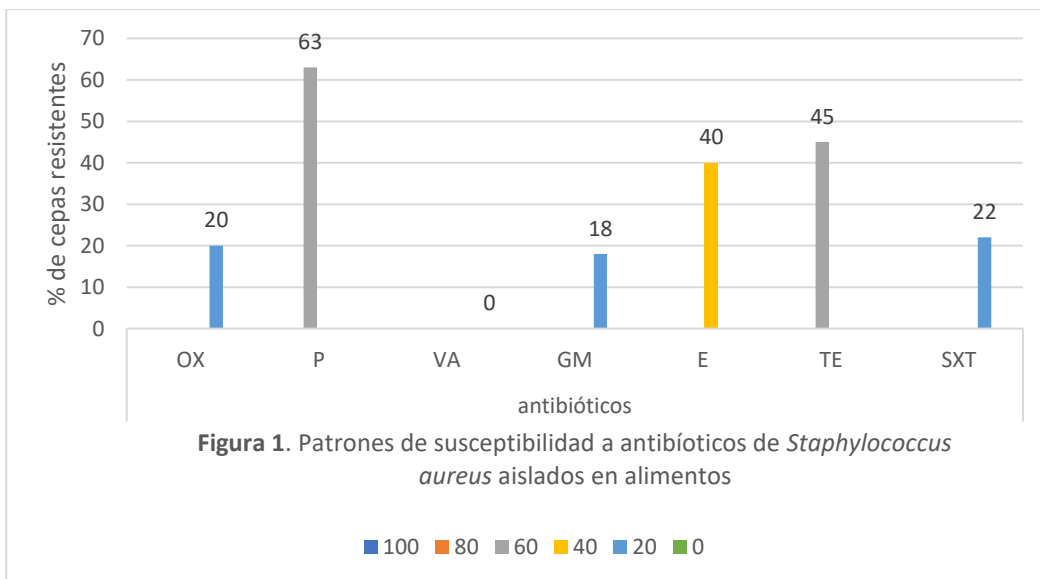
Tabla 2. Caracterización de *Staphylococcus aureus* aislados en los alimentos

Pruebas bioquímicas y producción de enzimas	Porcentaje de aislados positivos
Producción de acetoina a partir del medio Voges-Proskauer	94.0
Fermentación del manitol	94.0

Prueba de cuagulasa en tubo	86.0
Enzima proteasa	35.8
Hemolisina	55.6
Lipasa	81.1
Lecitinasa	10.3

El resultado mostró que la enzima lipasa se produjo más que cualquier otra enzima. Esto coincide con lo reportado por Hammer [7] donde 32 de 44 las cepas analizadas fueron positivas para la enzima lipasa. Se ha sugerido que los factores importantes de virulencia de *S. aureus* es la colonización y proliferación.

La figura 1 muestra los patrones de susceptibilidad a los antibióticos de los analizados. El 80.2% de los aislamientos presentan resistencia al menos a uno de los antimicrobianos probados.



OX = oxacillin, P = penicillin, VA = vancomycin, GM = gentamicin, E =erythromycin, TE = tetracycline, SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole.

Ninguna de las cepas fue resistente a la vancomicina. Sesenta y siete (63.2%) cepas mostraron resistencia a la penicilina, mientras que 22 (20.75%) fueron resistentes a oxacilina (Figura 1). Un número relativamente alto de aislamientos probados en este estudio fueron resistentes a 1 o 2 de los antibióticos comúnmente utilizados en los protocolos terapéuticos de infecciones humanas. [8] también informaron que alrededor del 68.8% de cepas aisladas de carne y productos lácteos mostraron resistencia a los antimicrobianos. Este estudio reveló que se podían aislar cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina a partir de alimentos.

Conclusiones

Conforme a lo arrojado en los resultados se determina que existe una alta prevalencia de *S.aureus* en personal de puestos de alimentos callejeros, lo cual representa un foco de infección y un riesgo latente para el consumidor de dichos alimentos

Referencias

1. [ICMSF] (1996).Microorganisms in foods. Characteristics of microbial pathogens *Intl. Commission on Microbiological Specifications for Food. Vol. 5*. London, U.K.: Blackie Academic and Professional.
2. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**:16–34.
3. Bremer PJ, Fletcher GC, Osborne C. (2004). *Staphylococcus aureus*. Christ Church, New Zealand: New Zealand *Inst. for Crop and Research Limited*. p 1–8.
4. Udo EE, Jacob LE. (2000). Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Kuwait hospitals with high-level fusidic acid resistance. *J Med Microbiol* (49):419–26.
5. [CLSI] Clinical and Laboratory Standard Inst. (2006^a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test;. *Clinical and Laboratory Inst.*, 940,
6. Cogan TA, Slader J, Bloomfield SF, Humphrey TJ. (2002). Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. *J Appl Microbiol* **92**:885–92.
7. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. (2006). Effects of tea tree oil on *Staphylococcus aureus* virulence factors: rural industries *Research and development corporation*. 1-34.
8. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J FoodMicrobiol* **115**:290–6.