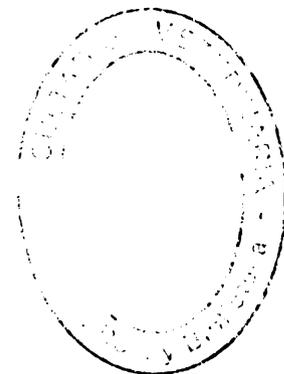


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**INCIDENCIA E IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVO EN EMBUTIDOS FRESCOS**

por

BARROS MASSIA, Eliana
PEREZ ESCUDERO, Amalia



TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección, Control y Tecnología de los Alimentos de origen
animal

MODALIDAD: Estudio de caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2010

PÁGINA DE APROBACIÓN

TUTOR:

Dra. Cristina López

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Dr. Ruben Inderkum



Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Cristina López



Tercer Miembro:

Dr. José Pedro Dragonetti

Fecha:

29 de octubre del 2010

Autores:

Eliana Barros



Amalia Pérez

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con16 (diez) ed.....

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer por todo el apoyo brindado a nuestra tutora la Dra Cristina López, quien nos guió en todo momento, dándonos el soporte académico y moral para llevar a cabo este trabajo final.

A la MSc Marta Odizzio por facilitarnos las cepas de referencia, ayuda en la elaboración de la tesis y ante todo, por el afecto que nos brinda

A la Dra Francesca Carrega Bertolini, "Pancha", por su ayuda con el inglés técnico y su amistad.

Al Dr. José Piaggio por su apoyo estadístico.

A las Dras Monica Bertachi y Teresa Bellizi, por la ayuda brindada durante el proyecto.

Nuestros más sinceros agradecimientos a nuestros esposos, Pablo y Nico, por alentarnos en los momentos más difíciles de nuestra carrera. A nuestros hijos, Santi, Delfi, Agu y Joaqui, quienes a su corta edad entendieron y respetaron nuestros momentos de estudio. A nuestros padres y hermanos, por acompañarnos en este camino, el cual ha sido largo y difícil de sobrellevar.

Muchas Gracias

Eliana y Amalia

TABLA DE CONTENIDO

	Página
<u>PÁGINA DE APROBACIÓN</u>	II
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	III
<u>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</u>	IV
1 <u>RESUMEN</u>	1
2 <u>SUMMARY</u>	2
3 <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
4 <u>REVISION BIBLIOGRÁFICA</u>	6
4.1 ANTECEDENTES	6
4.2 ENFERMEDADES TRASMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA's).....	6
4.2.1 <u>Objetivos de la implementación del sistema</u>	8
4.2.2 <u>Situación Nacional e Internacional</u>	9
4.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	12
4.4 SINTOMATOLOGÍA Y DOSIS INFECTANTE	13
4.5 CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO.....	14
4.5.1 <u>Parámetros de crecimiento</u>	16
4.5.2 <u>Ecología del crecimiento</u>	17
4.5.3 <u>Enterotoxinas estafilocócicas</u>	18
4.6 PRODUCCIÓN DE COAGULASA.....	19
4.6.1 <u>Correlaciones</u>	21
5 <u>DESARROLLO DEL PROYECTO</u>	23
5.1 CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	23
5.1.1 <u>Clasificación de chacinados</u>	23
5.1.1.1 Chorizo fresco	24
6 <u>OBJETIVOS DEL PROYECTO</u>	26
6.1 OBJETIVO GENERAL	26
6.1.1 Objetivo específico	26
7 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	26
7.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO	26
7.2 MUESTREO.....	26
7.3 CEPAS DE REFERENCIA	26
7.4 MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS	27
7.4.1 <u>Preparación y composición del medio sólido selectivo Baird Parker</u> ..	27
7.4.1.1 Prep. y composición de la emulsión de yema de huevo-telurito	27
7.4.2 <u>Preparación y composición del caldo cerebro corazón</u>	28
7.5 MATERIALES.....	28
7.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	29
7.6.1 <u>Preparación de la muestra</u>	29
7.6.2 <u>Métodos de Confirmación</u>	29
7.6.2.1 Coloración de Gram.....	30
7.6.2.2 Prueba de la Coagulasa en tubo	30
8 <u>RESULTADOS</u>	33
9 <u>DISCUSIÓN</u>	35
10 <u>CONCLUSIONES</u>	36
11 <u>RECOMENDACIONES</u>	37
12 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	38

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

	Página
Cuadro I. Determinantes de patogenicidad o factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Cuadro II. Correlaciones entre los test de coagulasa y termonucleasa	22
Cuadro III. Valores recomendados por Instituto Nacional de Alimentos y Recopilación de Normas Microbiológicas.....	25
Cuadro IV. Interpretación de reacciones (Prueba de la Coagulasa).....	32
Cuadro V. Resultados microbiológicos del total de muestras analizadas.....	43

FIGURAS

Figura I. Clasificación de las enfermedades alimentarias.....	7
Figura II. Flujograma del funcionamiento del sistema V.E.T.A.	9
Figura III. Brotes de etiología bacteriana- Uruguay (1995-2001)	11
Figura IV. Brotes de etiología bacteriana. (por lugar de elaboración del alimento)	11
Figura V. Brotes de ETA's en América. (según agente etiológico).....	12
Figura VI. Reportes de brotes de ETA's (según etiología bacteriana). 2002-EEUU.)	12
Figura VII. Recuento total de ufc/gr en medio Agar Baird Parker.	33
Figura VIII. Prevalencia de <i>Staphylococcus spp.</i> en el total de muestras analizadas n=65	33
Figura IX. Porcentaje de <i>Staphylococcus coagulasa positivo</i>	34

1. RESUMEN

Los alimentos de origen animal, son naturalmente susceptibles a la contaminación por *Staphylococcus spp.* y se asocian a menudo con brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, debido a la capacidad de algunas cepas para producir enterotoxinas termoestables. Esta capacidad se asocia generalmente a la producción de coagulasa y termonucleasa, características que son consideradas en los análisis microbiológicos para la identificación de los microorganismos productores de enterotoxinas. Los productos alimenticios tales como carne picada y embutidos frescos son una parte importante de la dieta de los habitantes de este país. Estos productos son altamente perecederos con un valor de pH aproximadamente de 5,5 y una actividad de agua (aW), igual o superior a 0,97. Dado que ningún proceso de fermentación se realiza durante el almacenamiento a 4° C, la calidad higiénica de las materias primas es el principal factor que afecta el valor final del producto. Este estudio se llevó a cabo con el objetivo determinar la incidencia e importancia de la detección y cuantificación de *Staphylococcus coagulasa positivo* en embutidos frescos. Para ello fueron analizadas 65 muestras de chorizos recolectadas al azar, pertenecientes a los mercados de Montevideo y Canelones, durante el período comprendido entre los meses de febrero a abril del presente año. La metodología empleada para la determinación del microorganismo fue la norma UNE-EN ISO 6888-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, Método horizontal para el recuento de *Staphylococcus coagulasa positivos* (*Staphylococcus aureus* y otras especies) (AENOR, 2000). Los resultado mostraron que el 49,23% de las muestras analizadas estaban contaminadas con *Staphylococcus spp.* Dichas colonias sospechosas fueron analizadas con el fin de determinar si eficazmente eran productoras de la enzima coagulasa. Esta técnica se realizó sobre un total de 32 muestras que corresponden al 49,23%, de las cuales, 17 de ellas, o sea el 53,13% dieron positivo a la prueba de coagulasa. Estos hallazgos sugieren la necesidad de una readecuación de las técnicas de manipulación del alimento por parte de las empresas elaboradoras, así como también de los lugares de expendio y planes de contralor oficial más estrictos para evitar que estos productos lleguen al consumidor final.

2. SUMMARY

Animal origin foods are naturally susceptible to contamination by *Staphylococcus spp* and are often associated with outbreaks of food borne illnesses due to the capacity of some strains to produce thermostable enterotoxins. This ability is usually associated with the production of coagulase and thermonuclease, characteristics considered in the microbiological analysis for the identification of enterotoxin-producing microorganisms. Food products such as minced meat and fresh sausages are an important part of the diet of the habitants of this country. These products are highly perishable with a pH value of approximately 5.5 and water activity (Wa), same or higher than 0.97. Since no process of fermentation takes place during storage at 4 ° C, the hygienic quality of materials is the main factor affecting the final value of the product. The aim of this study was to determine the incidence and importance of detection and quantification of coagulase positive *Staphylococcus* in fresh sausages. For this, 65 samples of sausages were analyzed, collected randomly from the markets of Montevideo and Canelones, during the period between February and April this year. The methodology for determining the microorganism was the norm. UNE-EN ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). (AENOR, 2000). The results showed that 49.23% of the samples were contaminated by *Staphylococcus spp.* suspicious colonies were analyzed to determine whether they were effectively producers of the enzyme coagulase. This technique was performed on a total of 32 samples corresponding to 49.23% of which 17 (53.13%) of them tested positive for coagulase test. These findings suggest the need of a readjustment in the manipulation techniques of food by the processing companies, as well as points of sale and official control plans to prevent these products reach the final consumer.

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados han surgido como una causa importante de morbilidad a nivel mundial. Siendo descritos alrededor de 250 agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones y toxinas. Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, pero cuando encuentran en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse pueden alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad. (Casale, 2007).

Las bacterias pueden ocasionar enormes pérdidas económicas no solo porque deterioran los productos alimenticios, sino que, además, algunas patógenas resultan extremadamente difíciles de eliminar de los alimentos lo que origina diversas enfermedades en los consumidores.

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena, de amplia distribución en la naturaleza, asociada con infección general y brotes alimentarios.

Se considera la tercera causa más importante de la enfermedad en el mundo dentro de las enfermedades transmitidas por los alimentos. (Normanno, 2005; Suárez, 2008).

En Uruguay durante el período 1993-2001 han sido declarados 12 brotes de intoxicación estafilocócica. (O.P.S, 2002).

Hace algunas décadas, dicho microorganismos fue responsable del 25% de todas las enfermedades transmitidas por los alimentos, sin embargo desde 1988 hasta 1992 en Estados Unidos, *S. aureus* sólo era responsable del 1,8%, 2,8%, 2,4%, 1,7% y 1,5% de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, respectivamente. Durante el mismo período de 5 años, *S. aureus* causó el 5,1% de los brotes de intoxicación alimentaria en Europa, particularmente en Italia causó 4 de los 233 brotes notificados. (Normanno, 2005).

En Colombia los principales agentes causales de ETA's son *Salmonella sp.* y *S. aureus*, los cuales ocupan los primeros lugares de los reportes anuales de la red de vigilancia de salud pública. (Vanegas, 2008).

Diferentes especies del género, tales como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* y *S. warneri*, pueden producir enterotoxina. (Vanegas, 2006). La mayoría de las cepas son capaces de producir una o más enterotoxinas que son la causa de los síntomas gastrointestinales observados durante las intoxicaciones.

Las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) son una familia de nueve toxinas termoestables, resistentes a la pepsina-exoproteínas formando una sola cadena con un peso molecular que van 26.000 a 29.600 Da. Ellos son identificables serológicamente y conocidas como SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH y la SEJ. La toxina SEC, presenta varias subvariantes antigénicas (*Sec*₁, *Sec*₂, *SEC*₃, *SEC*_{ovine}, *SEC*_{bovino}). Las enterotoxinas comúnmente involucradas en los brotes de intoxicación son SEA y SED. (Jay, 2002; Padhila da Silva, 2004; Normanno, 2005).

A pesar de que la intoxicación por los alimentos con *Staphylococcus aureus* es una

enfermedad leve, generalmente autolimitada, con síntomas que incluyen vómitos, con o sin diarrea y sin mayores complicaciones, en aproximadamente 10 % de los casos se requiere hospitalización. Por lo tanto se debe tener en cuenta que representa una carga social considerable en términos de gastos de hospital, pérdida de días de trabajo y productividad, junto con los problemas y el costo de la eliminación del alimento contaminado.

Aproximadamente 1,5 millones de dólares se gastan anualmente en los EE.UU. a causa de intoxicaciones por *Staphylococcus*. (Normanno, 2005).

Tenemos que tener en cuenta que los alimentos que requieren considerable manipulación durante la preparación y que se mantiene a temperatura ligeramente elevada después de esta, son considerados potencialmente peligrosos. (Vanegas, 2008). Esto es debido a que desde las narinas y a través de las manos se puede contaminar el alimento durante su preparación, ya que los manipuladores de alimentos son portadores sanos entre un 10 - 40%, según un estudio publicado en el año 1997, por la revista La Alimentación Latinoamericana.

Como consecuencia originalmente los productos alimenticios pueden contaminarse durante o después de su transformación. Según Tranter, citado por Casale en el año 2007, 1 mg de la toxina es suficiente para inducir síntomas cuando la población bacteriana alcanza 10^5 ufc/g.

Staphylococcus coagulasa positivo se ha aislado de varios alimentos: carne, productos lácteos, pollo, alimentos fermentados, verduras, productos de la pesca, productos de salazón, alimentos como el jamón, embutidos frescos y madurados. Los productos mencionados anteriormente han sido señalados en el 24% de los casos de intoxicación estafilocócica. (Normanno, 2005).

La metodología habitualmente empleada en la enumeración de las especies de *Staphylococcus* utilizada en alimentos es Agar Baird Parker (BP) y requiere una evaluación de colonias típicas y atípicas con ciertas características bioquímicas con el fin de estimar el potencial enterotoxigénico. Las colonias seleccionadas en este medio se caracterizan morfológicamente por ser de color negro- gris brillante, dado por la reducción del telurito, rodeadas por un halo opaco (actividad lecitinasas) y a continuación en general muestran una capa iridiscente (actividad de la lipasa). Luego se evalúa la producción de la enzima coagulasa. Coagulasa o termonucleasa se asocian con la capacidad de producir enterotoxina. (Capita y col, 2001; Nogueira y col, 2010).

Varios medios selectivos han sido desarrollados, pero agar Baird Parker con emulsión de yema de huevo con telurito, sigue siendo uno de los más utilizados para la detección y enumeración de *Staphylococcus* en los alimentos.

Organizaciones internacionales tales como, la Organización Internacional de Normalización (ISO), la Asociación Oficial Internacional de Químicos Analíticos (AOAC), el Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM), La asociación Americana de Salud Pública (APHA), recomiendan el uso de Agar Baird Parker, para el recuento y aislamiento de *Staphylococcus aureus* de alimentos.

Aunque debemos tener en cuenta que dicho medio no es suficientemente selectivo

para el análisis de productos alimenticios, ya que presentan un alto nivel de la flora contaminante. Algunos microorganismos (*Bacillus* spp., *Proteus* spp., enterococos o micrococcos) muestran colonias con una similar morfología a las de *Staphylococcus coagulasa positivo*. Por otra parte, hay *Staphylococcus aureus* que no producen zonas claras alrededor de las colonias. Estos hechos pueden afectar a los recuentos de *Staphylococcus aureus* llevado a cabo en Agar Baird Parker. (Capita y col, 2001).

Debido a esto la norma ISO y los organismos anteriormente nombrados, determinaron que la identificación de *Staphylococcus coagulasa positivo*, se realice mediante la prueba de coagulasa en tubo. La producción de la enzima coagulasa se asocia con la capacidad de producir enterotoxina.

La producción de coagulasa ha sido el método más aceptado para la identificación de *Staphylococcus aureus*. Aunque los resultados de la prueba solo se pueden leer después de 4 h de incubación e incluso muchos aislamientos necesitan 24 h de incubación, lo que implica un tiempo de espera significativo en la obtención del resultado. (Capita y col, 2001).

La introducción de la prueba de coagulasa en portaobjetos (factor de aglutinación) resuelve parcialmente este problema, el inconveniente que presenta esta prueba es que da resultados falsos negativos. (Lairscey y col, 1986).

Este trabajo de tesis reporta los resultados obtenidos en la búsqueda de *Staphylococcus coagulasa positivo* en embutidos frescos (chorizos) en los mercados de Montevideo y Canelones.

La metodología de trabajo que se empleó fue la establecida por la norma AENOR (2000). UNE-EN ISO 6888-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, Método horizontal para el recuento de *Staphylococcus coagulasa positivos* (*Staphylococcus aureus* y otras especies).

Esta metodología se basa en el recuento de *Staphylococcus coagulasa positivo* mediante el cultivo en Agar Baird Parker confirmándose por medio de la tinción de Gram y la prueba de coagulasa en tubo.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ANTECEDENTES

La primera observación registrada que asoció los *Staphylococcus* con la intoxicación alimentaria, probablemente fue hecha por Vaughan y Sternberg, quienes en 1884, describieron una investigación de un importante brote de enfermedad en Michigan, que se creía que había sido causada por la ingesta de queso.

Mediante examen microscópico, los citados autores descubrieron que el queso estaba contaminado con un organismo esférico al cual denominaron micrococo.

Fueron consumidos extractos de este queso, que provocaron la enfermedad.

Treinta años más tarde Barber (1914) demostró claramente la intoxicación alimentaria estafilocócica por beber leche que se había guardado sin refrigerar, procedente de una vaca que padecía una mastitis estafilocócica.

De momento no se reconoció la importancia de esta investigación. El papel de los *Staphylococcus* en la intoxicación alimentaria fue redescubierto en 1930 por Dack y sus colegas. (Jay, 2002).

4.2- ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA'S)

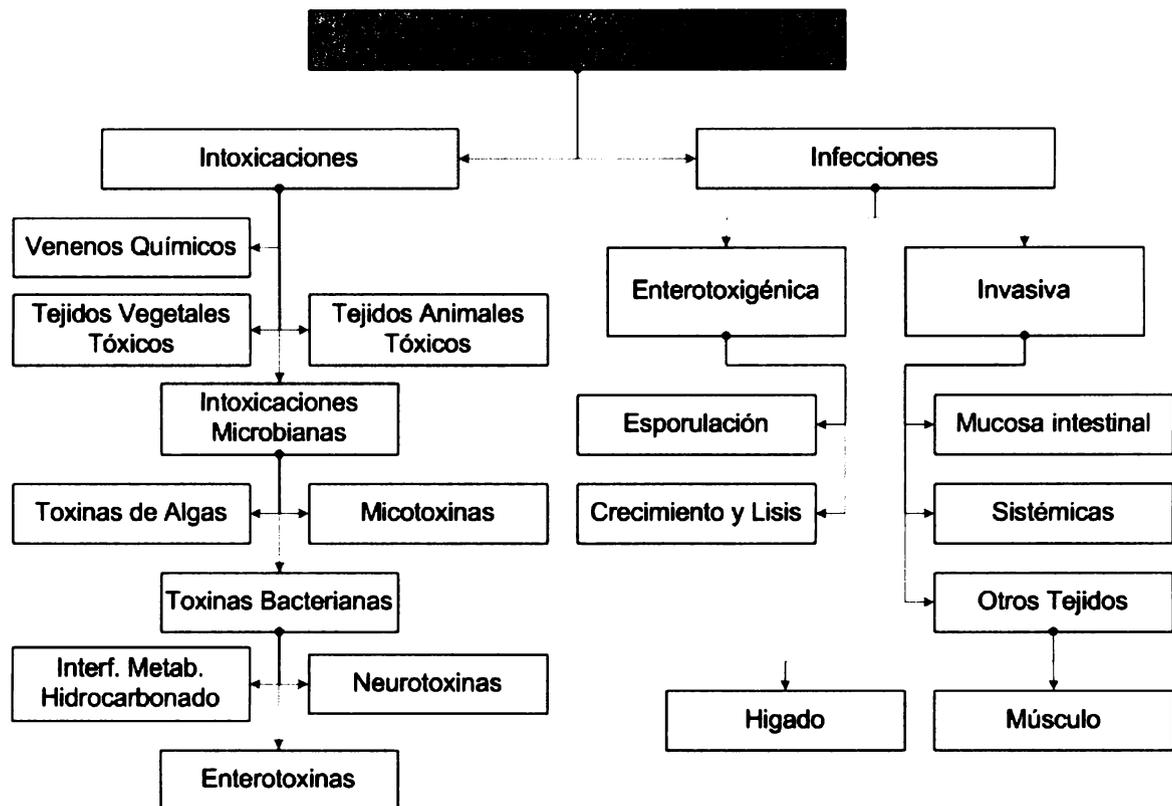
Síndrome generalmente gastrointestinal originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor. (O.P.S, 1999).

Estos cuadros clínicos agudos, que resultan de la ingestión de alimentos contaminados pueden clasificarse como:

Intoxicaciones: son las producidas por la ingestión de alimentos que contienen toxinas formadas por los microorganismos en tejidos de plantas o animales, productos metabólicos de esos microorganismos o sustancias químicas que se incorporan a ellos en cualquier momento desde su producción hasta su consumo.

Infecciones: son las producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminadas con agentes infecciosos específicos tales como, bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas. (Frazier, 1993). (Ver Fig. I.).

Fig. I. Clasificación de las enfermedades Alimentarias¹



La ocurrencia de las ETA's está en incremento tanto en la región como en el mundo, debido a varios factores: aumento de la población, aparición de grupos poblacionales vulnerables y acelerada urbanización.

En el año 1991, el consejo directivo de la Organización Panamericana de la Salud (O.P.S), en su plan de acción del Programa Regional de Cooperación Técnica en Protección de Alimentos decidió aconsejar y apoyar el establecimiento de Sistemas Nacionales de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (Sistemas V.E.T.A.). Se designa al Instituto Panamericano para la Protección de Alimentos y Zoonosis (I.N.P.P.A.Z), en Argentina, como centro de referencia y capacitación de datos regionales.

Dentro de este marco en Uruguay se decide la implementación de un sistema V.E.T.A, que integre a todos los actores involucrados en el tema, los cuales son: Ministerio de Salud Pública (M.S.P), Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (M.A.G.P), Intendencias Municipales, Facultades de Medicina, de Agronomía y de Ciencias, O.S.E, entre otros. Respetando sus campos de acción específicos. A su vez se decide que a través de la notificación de los casos y brotes registrados en el país, Uruguay se integre al Sistema de Información Regional (S.I.R.V.E.T.A –E.T.A)

Es así que en el año 1995 se inicia en el país, con el apoyo de la O.P.S y del I.N.P.P.A.Z, el desarrollo del sistema V.E.T.A nacional. Todas las actividades necesarias para la implementación del sistema son organizadas y coordinadas por el

¹ Fuente: Adaptada a partir Frazier, 1993.

Departamento de Vigilancia Epidemiológica del M.S.P en el ámbito central. El sistema V.E.T.A es entonces un sistema de información simple, oportuno, continuo, de las enfermedades que se adquieren por el consumo de alimentos y/o agua, que incluye la investigación de los factores determinantes y los agentes causales de la entidad, así como el establecimiento del diagnóstico de la situación, permitiendo la formulación de estrategias de acción para la prevención y control. (O.P.S, 1999).

4.2.1 Objetivos de la implementación del sistema V.E.T.A:

Realizar un diagnóstico de situación del País con respecto a las ETA's que permita implementar las medidas de prevención y control.

Diseñar un flujograma de información para el manejo adecuado de las ETA's.

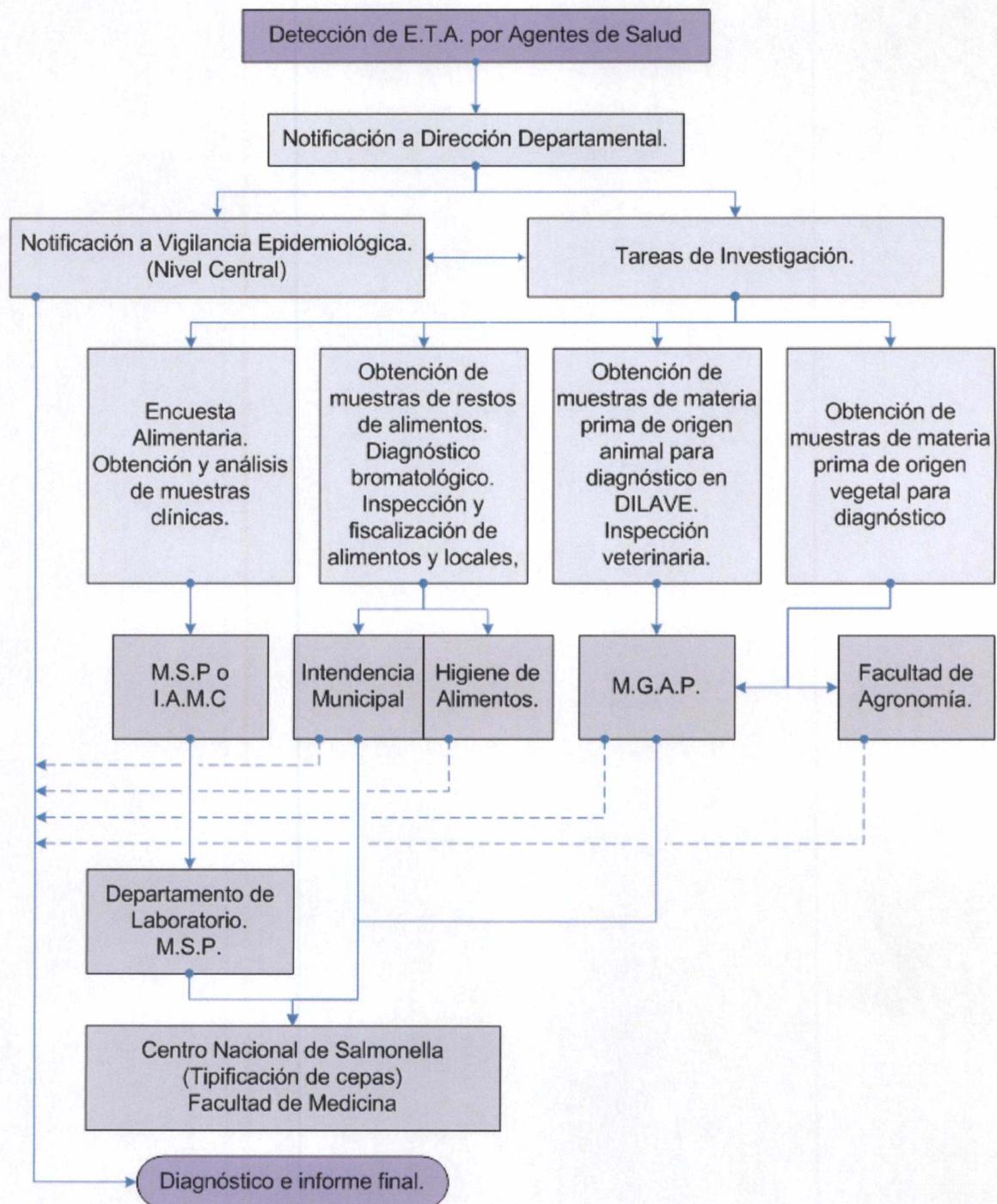
Identificar una forma modelo para la investigación epidemiológica, frente a la notificación de ETA's.

Favorecer la articulación entre las distintas instituciones intervinientes.

Facilitar permanentemente la información actualizada de la situación de las ETA's en el país y en la región.

Fig. II. Flujoograma del Funcionamiento del Sistema V.E.T.A.²

FLUJOGRAMA DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA V.E.T.A.



4.2.2. Situación nacional e internacional

La gastroenteritis estafilocócica es causada por la ingestión de un alimento que contiene una o más enterotoxinas, que son producidas solamente por algunas especies y cepas de *Staphylococcus spp.* (Jay, 2002).

2 Fuente: Adaptado a partir de O.P.S, 1999.

Generalmente el microorganismo responsable es aislado de personas involucradas en la preparación del alimento. Frecuentemente la enfermedad ocurre en brotes, entendiéndose por éste al episodio en el cual dos o más personas presentan una enfermedad similar después de ingerir alimentos y/o agua, vinculados por su origen, lugar de consumo, o expendio. (MSP, 2010).

En Uruguay según datos recogidos del Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (S.I.R.V.E.T.A.), durante el período 1993-2001 han sido declarados 12 brotes de intoxicación estafilocócica, con un total de 164 afectados, sin fallecimientos. En nueve brotes se identificaron lácteos como alimento responsable, siendo carnes rojas y aves en los tres brotes restantes. (Ver Fig. III.)

En cuanto a los locales de origen, siete brotes ocurrieron en comedores, dos en viviendas y los tres restantes en restaurantes, escuelas y otros. (O.P.S, 2002). (Ver Fig. IV.)

Reportes tomados de otros países como es el caso de Colombia publican que los principales agentes causales de enfermedades transmitidas por los alimentos en dicho país son los patógenos *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*, los cuales ocupan los primeros lugares de los reportes anuales de la red de vigilancia en salud pública de Colombia. Publicaciones internacionales coinciden en que la enterotoxina A es la más prevalente en las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen humano y por tanto también en productos que requieren manipulación y están listos para el consumo. (Vanegas, 2008).

Staphylococcus coagulasa positivo se encuentra entre los diez patógenos causales de ETA's, siendo el más implicado en la salud pública a nivel mundial. (Ver Fig. V) Tal es así que en Europa fue el responsable del 5,1% de las enfermedades transmitidas por alimentos durante el período 1993-1998, mientras que en Estados Unidos el número anual de casos por intoxicación de dicho microorganismo es de 185.000 con 1750 hospitalizaciones. (Vanegas, 2008)(Ver Fig. VI). En Colombia en el año 1999, según registros del Sistema Alerta de Acción del área de vigilancia en Salud Pública de la Secretaría Distrital de Bogotá, se presentaron 35 brotes que afectaron a grupos de 2 a 120 personas. Mientras que en el año 2000 se reportaron un total de 34 brotes. Según datos de dicha secretaría los grupos de alimentos asociados a intoxicaciones por este microorganismo son: lácteos en un 46% y preparados con carne en un 37%.

Es importante destacar que en general, el número de brotes que se reportan a las autoridades de salud representan una pequeña proporción de los brotes que realmente ocurren. Debido a que las personas que enferman no acuden a los servicios médicos por tratarse de casos autolimitantes, o la falta de capacidad para reconocer la aparición de un brote de ETA's, o bien, a la falta de notificación ante las autoridades de salud. (Bianchi, 2010)

Fig. III Brotes de Etiología Bacteriana- Uruguay 1995-2001³

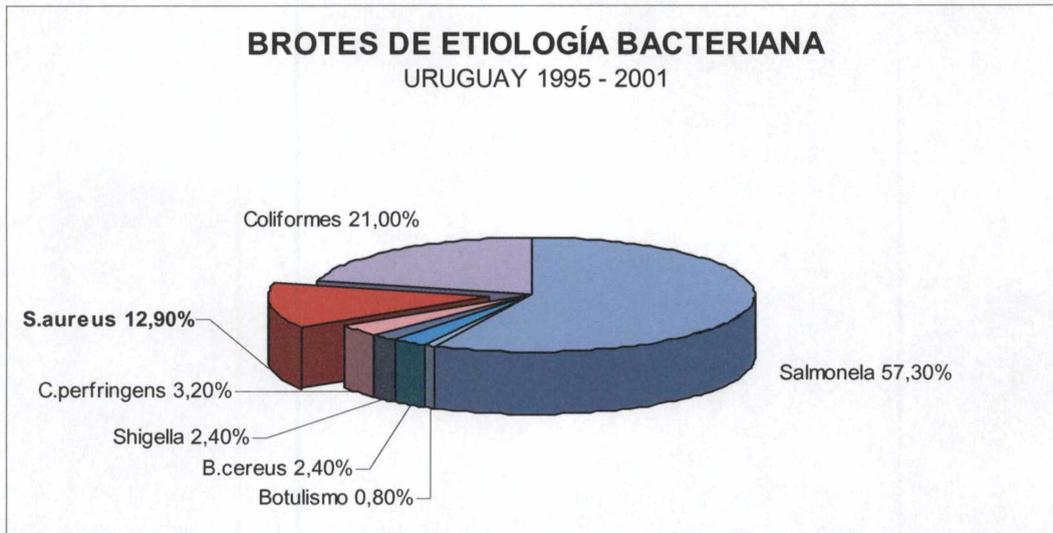
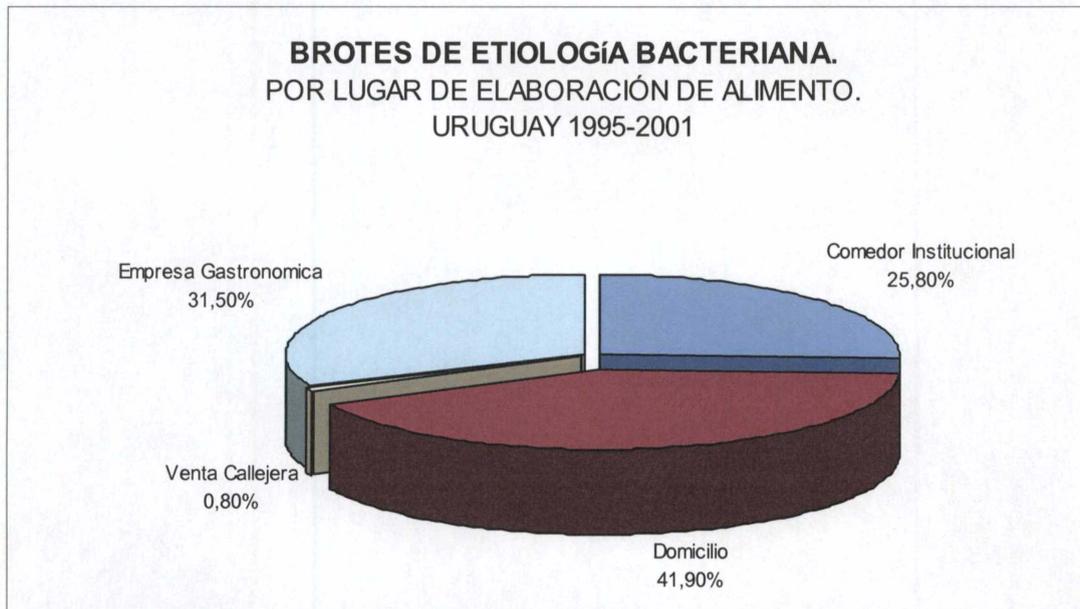


Fig. IV Brotes de Etiología Bacteriana, (por lugar de elaboración del alimento)³



³ Fuente: O.P.S, 2002

Fig. V. Brotes de ETA's en América. Según agente etiológico, 1995-1999.⁴

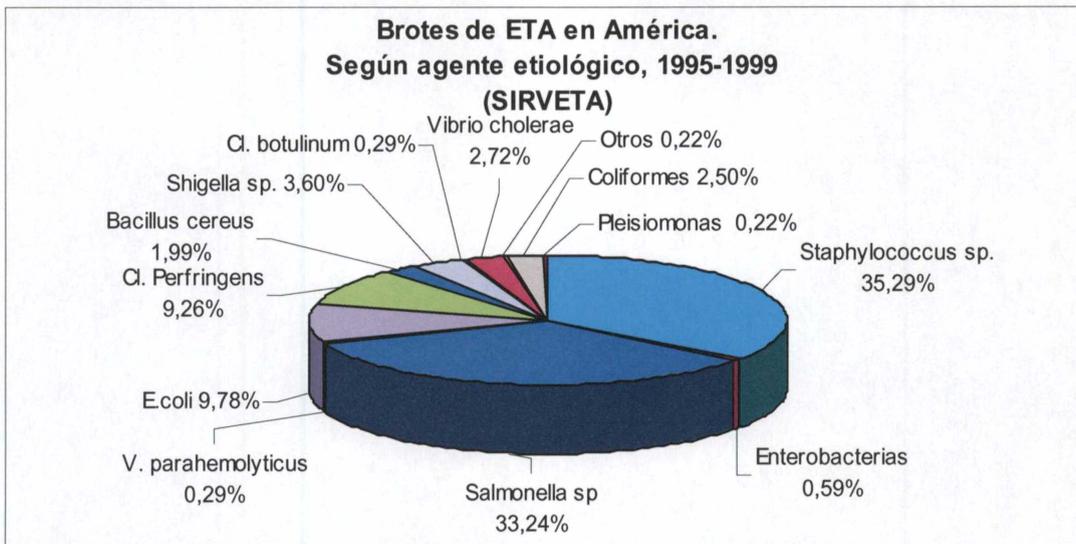
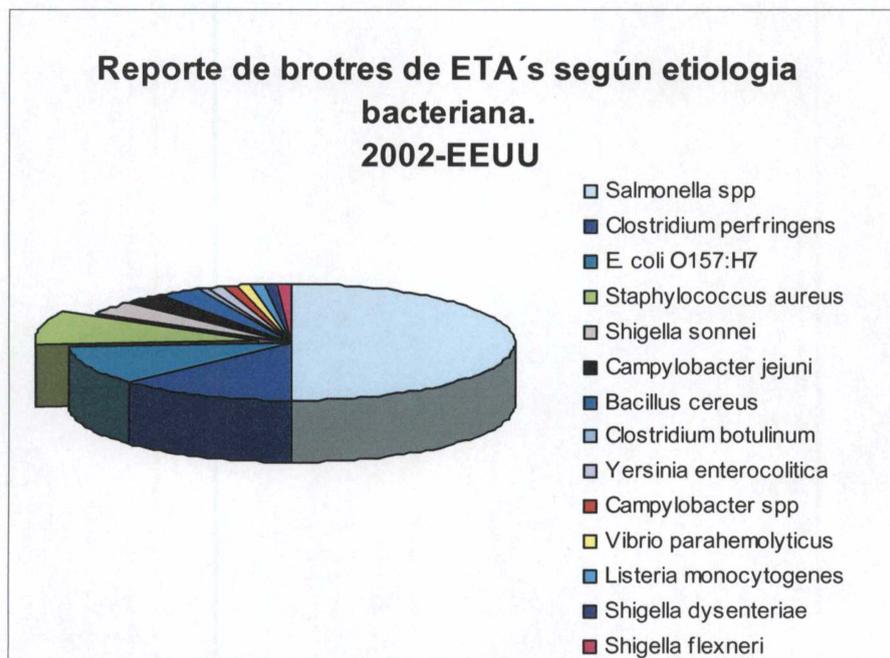


Fig. VI. Reporte de brotes de ETA's según etiología bacteriana. 2002- EEUU⁴



4.3- EPIDEMIOLOGÍA

Staphylococcus aureus es omnipresente, encontrándose en las mucosas y en la piel de la mayoría de los animales de sangre caliente. Es un patógeno oportunista y si bien generalmente es comensal, con frecuencia causa infección a través de una herida abierta o como consecuencia de cambios en la fisiología del hospedador, como por ejemplo un desequilibrio hormonal. (ICMSF, 1996; FDA, 2001; Fueyo, 2005).

⁴ Fuente: Torres, 2006.

En las personas, el principal reservorio de *Staphylococcus* es la cavidad nasal. Desde esta localización, los microorganismos pasan a la piel y a las heridas directa o indirectamente. Si bien el porcentaje de portadores nasales varía, generalmente es de aproximadamente un 50% en las personas adultas y algo más elevado en los niños. En la piel, las localizaciones más corrientes son, los brazos, las manos y la cara, localizaciones en las que el porcentaje de portadores oscila entre el 5% al 30%. Además de encontrarse en la piel y las cavidades nasales dicho microorganismo se puede encontrar en los ojos, en la garganta y en el tracto intestinal. Desde estas localizaciones, el microorganismo pasa al aire, al polvo, a la ropa y a otros lugares en los que puede contaminar los alimentos. (ICMSF, 1996) *Staphylococcus aureus* compete mal con otras bacterias y por ello rara vez causa intoxicación alimentaria en un producto crudo, una excepción es la leche cruda proveniente de una vaca con mastitis estafilocócica, en la que los niveles de *Staphylococcus* son muy elevados.

Las dos procedencias más importantes para los alimentos son los portadores nasales y los individuos cuyas manos y brazos presentan forúnculos y se les ha permitido manipular alimentos.

En los distintos brotes han sido incriminados un gran número de alimentos, dentro de los que se destacan aquellos que sufren gran manipulación y que son insuficientemente refrigerados una vez preparados. Los más comúnmente implicados han sido: carnes rojas (especialmente carnes procesadas), así como también carnes blancas tales como pollo. Se deberán considerar riesgosos los productos lácteos y sus derivados. (Alcaráz y col, 1997; Fueyo, 2005; Vanegas y col, 2008)

4.4. SINTOMATOLOGÍA Y DOSIS INFECTANTE

La aparición de los síntomas de la intoxicación alimentaria tiene lugar entre una y siete horas (generalmente 2-4 h) después de la ingestión del alimento que contiene enterotoxinas estafilocócicas, manifestándose clínicamente por un cuadro caracterizado por vómitos (76% de los casos) y diarrea (77% de los casos) al que lo acompañan otros síntomas como dolores abdominales. Son raramente observados signos de toxicidad sistémica tales como fiebre o hipotensión. (Jay, 2002). En pacientes fuertemente afectados se puede requerir de una terapia de fluidos para la recuperación de la volemia.

Existen diversas opiniones acerca de la dosis infectante, algunos autores como Franco & Landgraf citados por Padhila da Silva en el año 2004, relatan que no existe una concordancia entre la dosis infectante y la capacidad de producir sintomatología en seres humanos, pero de manera general estiman que estaría entre 0,015 y 0,375 mg de enterotoxina por kilo de peso vivo.

En otras publicaciones se considera que la cantidad de toxina causante de la enfermedad depende del peso y de la sensibilidad individual, pero generalmente aceptan parámetros entre 0,1-1 µg/kg que serían capaces de afectar la salud. (ICMSF, 1996). Podríamos concluir entonces que no deberíamos hablar de dosis infectante sino de población susceptible teniendo en cuenta, edad y estado fisiológico del paciente.

Post en su publicación del año 1999, menciona que exposiciones previas a la toxina

podrían generar inmunidad frente a contactos posteriores, causando así un menor cortejo sintomático debido a sus características antigénicas.

El modo de acción de la toxina no ha sido esclarecido del todo. Publicaciones del ICMSF del año 1983, plantean la hipótesis que tanto los vómitos como la respuesta diarreica son el resultado de la estimulación de neuroreceptores locales existentes en el tracto gastrointestinal y de la transmisión de los estímulos al centro del vómito del cerebro, a través del vago y de otras partes del sistema nervioso simpático.

En general, es un cuadro autolimitado que típicamente se resuelve en veinticuatro a cuarenta y ocho horas desde el inicio de los síntomas. El índice de mortalidad de dicha afección es bajo o nulo.

La intoxicación podrá ser evitada con cuidadosos métodos higiénicos, almacenando los alimentos a bajas temperaturas para evitar el crecimiento microbiano, y eliminando todos los alimentos que hayan permanecido durante algunas horas a una temperatura superior a 4° C. (O.P.S, 2002). En resumen, la presencia de un número elevado de *Staphylococcus* en un alimento refleja higiene defectuosa por mala manipulación. Si además, las cepas aisladas son enterotoxigénicas, suponen un riesgo potencial para la salud.

Es importante destacar que se puede dar el hecho de no detectar *Staphylococcus aureus* en un alimento o que la detección sea de una cantidad mínima y que sin embargo, exista una cantidad suficientemente detectable de enterotoxina estafilocócica. En este caso lo que sucede es que los microorganismos que originaron la toxina han ido descendiendo en número, incluso desapareciendo mientras que la toxina, por su mayor resistencia, permanece en el alimento.

4.5. CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO

El género *Staphylococcus* está ubicado junto a los géneros *Micrococos*, *Planococos* y *Estomatococos*, dentro de la familia *Micrococcaceae*. Ediciones más recientes de ICMSF del año 1996, consideran que desde el punto de vista morfológico, *Staphylococcus* es parecido al género *micrococo*, pero en contraposición al metabolismo estrictamente aerobio de los *micrococos*, *Staphylococcus* crece en anaerobiosis y muestra un metabolismo estrictamente anaerobio facultativo.

El comité internacional responsable de las recomendaciones sobre taxonomía ha indicado que estos microorganismos se deben encuadrar en una familia independiente de los *micrococos*, siendo la recomendada la Familia *Staphylococcaceae*. (ICMSF, 1996).

Publicaciones recientes revelan que el género *Staphylococcus* está compuesto por 32 especies y 15 subespecies. La diferenciación de especies esta amparada por la homología del DNA y por los estudios inmunoquímicos. Además en base a pruebas bioquímicas y a patrones de resistencia. *Staphylococcus aureus* se puede dividir en varios biotipos y ecotipos pudiendo ser clasificado también en base a fagotipado y serotipado mediante el análisis de los plásmidos. (ICMSF, 1996; Padhila da Silva, 2008).

Staphylococcus coagulasa positivos existen varias especies: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S.*

intermedius, *S. schleiferi* subespecie *coagulans* y *S. delphini*. Siendo *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus* los que han sido aislados en alimentos. (Padilha da Silva, 2004; Post, 1999)

Las bacterias del género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, agrupados en racimos, con un tamaño de 0,5 a 1,3 μ , anaerobios facultativos, catalasa positivos, inmóviles, no formadores de spora, no capsulados o con limitada formación de capsula, los cuales se diferencian de otras bacterias Gram positivas porque para su nutrición necesitan determinados compuestos orgánicos, como ser aminoácidos como fuentes de nitrógeno y entre las vitaminas de grupo B, necesitan tiamina y ácido nicotínico.

La primera descripción del Género *Staphylococcus* fue realizada por Ogoston, en 1880. Las primeras especies fueron diferenciadas por la producción de pigmentos: *Staphylococcus aureus* de color amarillo/dorado y *Staphylococcus albus* en colonias blancas.

La taxonomía de dichos microorganismos ha experimentado un cambio importante en los últimos 20 años, es así que en la edición del Bergey's Manual citado por ICMSF en el año 1996, se admiten 19 especies de *Staphylococcus* en contraposición a los tres grupos de especies que figuraban en el año 1974. Baird Parker en el correr de ese mismo año reconocía tres especies de importancia clínica utilizando como prueba diferencial la prueba de la coagulasa. Considerando como *coagulasa positivo* a *Staphylococcus aureus*, siendo *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* *coagulasa negativos*.

Existen dos pruebas utilizadas con mayor frecuencia para diferenciar *Staphylococcus* patógeno de otros *Staphylococcus*, ellas son, la prueba de la coagulasa (coagulación del plasma sanguíneo) y la prueba de la termonucleasa estable (destrucción del DNA por la nucleasa, que ha resistido la ebullición). Sin embargo es importante tener en cuenta que ninguna de estas dos pruebas es absolutamente específica de *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus produce una amplia gama de sustancias (agresinas y exotoxinas) asociadas con la infecciosidad y con la enfermedad. Varían desde componentes de la pared celular, por ejemplo ácidos teicoicos, hasta exoenzimas que incluyen las estafiloquinasas, hialuronidasas, fosfatasas, coagulasa, enzima importante para nuestro trabajo. Por lo tanto merece un capítulo más detallado acerca de su producción y características la que se desarrollará más adelante. También es capaz de producir otras enzimas tales como catalasas, proteasas, nucleasas, lipasas, leucocidinas, hemolisinas y por último, pero de ningún modo menos importante las enterotoxinas responsables la intoxicación alimentaria. (ICMSF, 1996). (Ver Cuadro I).

Esta variedad de enzimas y toxinas que es capaz de producir el género *Staphylococcus*, son las responsables de una variedad de patologías tanto en humanos como en animales, es así que lo podemos a su vez dividir de forma didáctica como lo realizó Novak citado por Padilha da Silva en el año 2004, en infecciones y en enfermedades causadas por toxinas. Pudiendo las infecciones ser localizadas, como pústulas, forúnculos e impétigos.

A su vez existen procesos más extensos y graves, como ser infecciones posquirúrgicas, osteomielitis, neumonía, endocarditis, meningitis o diseminarse como bacteriemia o septicemia. En cuanto a las enfermedades causadas por toxinas también presentan un amplio espectro de manifestaciones como celulitis, síndrome de piel escaldada, síndrome de choque tóxico e intoxicación alimentaria la cual es la que reviste mayor importancia para nuestro trabajo.

Cuadro I Determinantes de patogenicidad o factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*⁵

Determinante	Función
Componente de la pared celular	
Peptidoglicano	Activación del complemento
Ácidos Teicoicos	Antifagocitaria
Proteína A	Antifagocitaria
Adhesinas	Adherencia a células-hospedador
Capsula mucoide y micro cápsulas	Adherencia y Antifagocitario
Enzimas	
Coagulasa	Formación de abscesos
Estafiloquinasas	Destrucción de coágulos
Hialuronidasa	Invasión hística
Catalasa	Supervivencia en fagocitos
Lipasa	Invasión-Colonización
Termonucleasa	Hidrólisis del ADN
Toxinas	
Hemolisinas	Rotura de membranas celulares
Leucosidinas	Alteración de la permeabilidad celular
Toxinas Exfoliativas	Epidermolisis
Toxina TSST-1	Shock Tóxico
Enterotoxinas	Intoxicación Alimentaria
Bacteriocinas	Matar a otras bacterias

4.5.1. Parámetros de crecimiento

En cuanto a los parámetros de crecimiento todos los autores consideran prácticamente los mismos, con mínimas variaciones.

Si bien los *Staphylococcus coagulasa positivo* son mesófilos, algunas de sus cepas son capaces de crecer a una temperatura tan baja como es la de 6,7° C, pero en general esta especie crece dentro de la escala de temperaturas comprendidas entre 7° C y 47,8° C, mientras que las enterotoxinas son producidas entre 10° C y 46° C, estando su temperatura óptima para dicha producción, comprendida entre 40° C y 45° C. (Jay, 2002). Es importante tener en cuenta que las enterotoxinas estafilocócicas son producidas bajo una serie de condiciones, que comparadas con las condiciones de crecimiento bacteriano son más limitadas, pero resultan afectadas de modo parecido por los factores que influyen en su crecimiento, es así que las

⁵ Fuente: Fueyo, 2005.

enterotoxinas SEA y SED, generalmente son producidas bajo una serie de condiciones de crecimiento más amplias que en el caso de la enterotoxina SEB, caso que explica que dichas enterotoxinas sean más frecuentemente implicadas en casos de intoxicación alimentaria. Este autor también señala que “Estas temperaturas máximas y mínima de crecimiento y la correspondiente a la producción de toxina suponen condiciones óptimas con respecto a los demás parámetros”.

Jay en el año 2002, describe que dichos microorganismos crecen bien en medios de cultivo sin NaCl, pero son capaces de crecer en concentraciones de NaCl comprendidas entre el 7% y el 10%, incluso algunas cepas son capaces de crecer en concentraciones de hasta un 20%. Presentan tolerancia a los nitritos, pudiendo crecer, en consecuencia, en carnes curadas, o en soluciones de curado, si son favorables las demás condiciones del medio. A su vez presentan elevado grado de tolerancia a compuestos tales como el telurito, el cloruro de mercurio, la neomicina, la polimixina, y la azida sódica. Todos los cuales han sido usados como agentes selectivos en los medios de cultivo; pudiendo ser diferenciado de otras especies de *Staphylococcus* por su mayor resistencia a la acriflavina, mientras que dichos microorganismos son sensibles al borato, ayudándonos a diferenciarlos del *Staphylococcus epidermidis* siendo este último resistente a dicha sustancia. (Jay, 2002)

Bajo condiciones óptimas dichas bacterias son capaces de crecer dentro de una escala de pH comprendida entre los valores de 4,0 a 9,8 (Jay, 2002; Padilha da Silva, 2004) aunque su pH óptimo de crecimiento se ubica en parámetros que comprenden valores de 6 y 7, es importante destacar, que al igual que sucede con otros parámetros de crecimiento, el pH mínimo de crecimiento exacto depende en cierto modo de que los demás parámetros se encuentren a niveles óptimos. (Jay, 2002)

En el año 2002, Jay hace mención de la capacidad de los *Staphylococcus coagulasa positivos* de poder crecer a valores menores de actividad de agua (aW) que otras bacterias halófilas, trabajos publicados posteriormente como el de Padilha Da Silva en el año 2004 reafirman dicha característica, estableciendo parámetros de crecimiento que se encuentran entre valores de 0.83 a 0.86 de aW. Esto es particularmente importante a tener en cuenta ya que el organismo será capaz de resistir la desecación, por lo que puede crecer y producir enterotoxina en productos que se ubiquen dentro de esos parámetros. Así como también colonizar los materiales que se usan para la elaboración del alimento a causa de una mala limpieza y desinfección de los mismos.

Son fermentativos y proteolíticos, pero no suelen producir olores desagradables en la mayoría de los alimentos, ni empeoran su aspecto (Frazier, 1993)

4.5.2. Ecología del crecimiento

En general, los *Staphylococcus* no compiten bien con la flora normal de la mayoría de los alimentos, y esto es especialmente cierto en aquellos alimentos que contienen grandes cantidades de bacterias ácido-lácticas, donde las condiciones permiten el crecimiento de estos microorganismos.

Se ha demostrado la incapacidad de *Staphylococcus aureus* para competir, tanto en

los alimentos frescos como congelados. A temperaturas que favorecen el crecimiento de los *Staphylococcus*, la flora saprofítica normal de los alimentos depara protección frente al crecimiento de *Staphylococcus* gracias al antagonismo, a la competición por determinados nutrientes, y a la modificación del medio hacia condiciones menos favorables para el mencionado microorganismo. Las bacterias antagónicas del crecimiento de este microorganismo incluyen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus* y *Pseudomonas* entre otros. (Jay, 2002).

4.5.3. Enterotoxinas estafilocócicas

Como se mencionó anteriormente las enterotoxinas estafilocócicas responsables de la intoxicación alimentaria tienen un peso molecular bajo, encontrándose aproximadamente en valores que oscilan entre 25.000 a 30.000 Da, son proteínas de cadena sencilla, que incluyen una cadena polipeptídica conteniendo cantidades relativamente grandes de lisina, tirosina, ácido aspártico y glutámico. Teniendo la característica de ser termoestables, resistiendo los tratamientos de pasteurización y ultra pasteurización. Tal es así que existen trabajos que han probado la resistencia de las mismas, como por ejemplo la actividad biológica de la enterotoxina B (SEB). La cual se mantuvo activa tras un calentamiento por 16 horas a una temperatura de 60° C y pH 7,3, así como también el calentamiento de un preparado de enterotoxina C (SEC) durante 30 minutos a 60° C, no dio como resultado cambio alguno en las reacciones serológicas. (Jay, 2002).

Las enzimas proteolíticas, tales como la tripsina, quimiotripsina, renina y la papaína, no logran inactivarlas. Característica que revela la capacidad de permanecer activas luego de la ingestión de los alimentos que la contienen. (Halpin-Dohnalk, 1989; Padhila da Silva, 2004; Jay, 2002). Así como también poder resistir la acción de enzimas producidas por otros microorganismos y enzimas del propio alimento. Lo que demuestra la gran estabilidad que presentan.

En la actualidad diversos autores (Jay, 2002; O.P.S, 2002; Padilha Da Silva, 2004), tomando como base las características antigénicas clasifican a las enterotoxinas en distintos grupos (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ). Las cuales pueden ser diferenciadas por medio de serología. Novak en el año 1999, publica la subdivisión de la enterotoxina C justificando dicha subdivisión por diferencias encontradas a nivel inmunológico y físico-químico. La composición de aminoácidos de las enterotoxinas SEA, SED, SEE por una parte, y la de las enterotoxinas SEB, SEC₁, SEC₂, Y SEC₃, por otra parte es parecida. Lo que se ha indicado que son producidas por el microorganismo por lo menos en dos formas diferentes.(Padhila da Silva, 2004).

La producción de los tipos SEB y SEC se halla bajo control plasmídico/cromosómico y son producidas principalmente al final de la fase estacionaria del crecimiento como metabolitos secundarios; mientras que los tipos SEA y SEE se hallan bajo control cromosómico son producidos durante la fase logarítmica de crecimiento. (ICSMF, 1996).

Es importante destacar que a pesar de la gran cantidad de enterotoxinas existentes las más frecuentemente involucradas en casos de intoxicación alimentaria en un orden decreciente serían SEA, SEC, SEB, SED, SEE. Mientras que la enterotoxina B ha sido relacionada a infecciones hospitalarias. (Halpin-Dohnalek, 1989)

El procedimiento clásico para detectar la toxina estafilocócica en un alimento es una combinación de extracción, concentración y detección final de la toxina utilizando la técnica de Ouchterlony, en portaobjetos descubierta por Crowle. (ICMSF, 1996). Dicho método es capaz de detectar 0,1 µg. de toxina en 100 gr. de alimento, pero presenta la desventaja que es lenta y laboriosa por lo que ha sido sustituida por la técnica de ELISA, siendo esta más rápida, o por la técnica de aglutinación en látex, que es capaz de detectar 0,1 a 10 ng. de enterotoxina en 1ml de extracto de alimento. La prueba de ELISA es más sensible que la prueba de aglutinación en látex, pero presentan el inconveniente de ser de ejecución más difícil. Ambos métodos son apropiados para el uso rutinario en el laboratorio, pero las pruebas de ELISA modernas son más fiables, sin embargo aún con estas técnicas más avanzadas se deberán esperar algún falso tanto positivo como negativo, por lo cual la bibliografía existente recomienda que el resultado de una prueba única se confirme con otra prueba diferente. (ICMSF, 1996)

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ha demostrado ser una técnica específica y sensible para la determinación de *Staphylococcus* enterotoxigénico, a través de la identificación de genes que codifican para sus enterotoxinas. (Suárez, 2008)

Además de las enterotoxinas, algunas otras enzimas son producidas como factores de virulencia, por determinadas especies de *Staphylococcus* y son a su vez utilizadas en el diagnóstico de laboratorio para la identificación de este género microbiano. De las enzimas mencionadas se destacan la catalasa, termonucleasa y la que reviste mayor importancia en nuestro trabajo la coagulasa.

Cada una de ellas presenta mecanismos de acción diferentes, es así que la catalasa actúa inactivando el peróxido de hidrógeno y radicales libres tóxicos formados por el sistema mieloperoxidasa en el interior de las células fagocitarias y es utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. (Padhila da Silva, 2004) Mientras que la termonucleasa o endonucleasa termoestable es una fosfodiesterasa, producida por la mayoría de las cepas de *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, y *S. hyicus*. Estructuralmente, es una proteína globular compacta, consiste en una única cadena polipeptídica, pudiendo ser aislada de la superficie de la pared celular. Su presencia en alimentos es usada como una medida indirecta de detección de *Staphylococcus aureus*, pudiendo, también indicar la presencia potencial de enterotoxina. Por otro lado tenemos a la enzima coagulasa la cual se describirá en detalle en la sección 4.6.

4.6. PRODUCCIÓN DE COAGULASA

La capacidad del *Staphylococcus aureus* para producir coagulasa fue presentada por primera vez por Loeb en 1903. *Staphylococcus aureus* fue considerada por muchos años la única especie del género capaz de producir enterotoxina, así como de producir coagulasa, una enzima extracelular que coagula el plasma sanguíneo, siendo una técnica muy utilizada en el laboratorio la detección de dicha enzima. Posteriormente de las 32 especies del género *Staphylococcus* se constata la existencia de cinco cepas capaces de producir coagulasa libre: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* sub especie *coagulans* y *S. Delphini*. De estas cinco especies, tres de ellas (*S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*) han sido descritos como productores de enterotoxina y asociados a casos de intoxicación alimentaria

en humanos. Estas especies microbianas presentan características morfológicas en medios de cultivo diferenciales, así como reacciones bioquímicas extremadamente semejantes, lo que torna difícil su diferenciación. (Padilha da Silva, 2004).

Haciendo mención a las otras dos especies productoras de coagulasa (*S. schleiferi* subespecie *Coagulans*, *S. delphini*) no se han encontrado publicaciones que logren relacionarlos a casos de intoxicación alimentaria.

En función de dichos avances en el descubrimiento de nuevas cepas capaces de producir estas dos sustancias (coagulasa, y enterotoxina), varios países, tal es el caso de Brasil, que debido a la semejanza fenotípica de estas tres especies realizó un cambio en su legislación. Es así que las actividades de fiscalización cambian el nombre de su programa pasándolo a llamar "Investigación y enumeración de *Staphylococcus coagulasa positivo*". De esta manera se tomaría en cuenta a estas últimas especies extremadamente semejantes las cuales no son diferenciadas en la rutina de laboratorio. (Padhila da Silva, 2004)

Staphylococcus aureus produce dos tipos de coagulasa, una libre y otra unida. La coagulasa libre es una enzima extracelular producida cuando el microorganismo es cultivado en caldo. A su vez a nivel de la superficie externa dicho microorganismo contiene una proteína denominada factor de agregación o coagulasa de unión, presente en los *Staphylococcus coagulasa positivo*. Esta proteína se une al fibrinógeno por una reacción no enzimática y lo convierte en fibrina insoluble, haciendo que los *Staphylococcus* se agreguen o formen grupos. Dicha característica es conocida como factor de aglutinación, permaneciendo fija a la pared celular del microorganismo. La prueba en tubo puede detectar tanto la presencia de coagulasa fija como libre. (Becton, 2003)

En la prueba directa en tubo, la coagulasa libre, liberada de la célula actúa sobre la protrombina en el plasma de la coagulasa, para producir un producto semejante a la trombina. Este producto luego actúa sobre el fibrinógeno para formar un coagulo de fibrina. (Becton, 2003)

En la rutina de laboratorio, tanto en análisis de alimentos, como en análisis clínicos, el test de coagulasa en tubo es el método patrón empleado para identificar y clasificar *Staphylococcus*, como *coagulasa positivo*. Este procedimiento no permite diferenciar *Staphylococcus aureus*, de *S. hyicus* ni de *S. intermedius*. (ICMSF, 1983; APHA, 1992; Jay, 2002; Padhila da Silva, 2007).

La coagulasa como se mencionó anteriormente es una sustancia capaz de coagular el plasma humano y el de otras especies como la de conejo. Los plasmas pertenecientes a estas dos especies son los más usados, además de ser los que se encuentran comercialmente disponibles. El uso de plasma de cerdo también ha dado buenos resultados pero no siempre se encuentra disponible.

Cabe citar el trabajo publicado en el año 2005 por Betancourt y col., donde se evalúan varios plasmas de diferentes especies trabajando con 106 cepas de *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos demuestran que el plasma humano es poco efectivo en la identificación de cepas coagulasa positivas, dado que sólo se identificaron un 57,5% del total de muestras analizadas, por lo cual podemos concluir que la utilización del plasma humano en dicho trabajo arrojó un 43,5 % de

falsos negativos. Los ensayos realizados con plasma de conejo y de equino dieron un porcentaje de detección de 95,3% y 94,3% respectivamente. Los resultados obtenidos en dicho trabajo sugirieron entonces la sustitución del plasma humano por el plasma equino.

Además de que debemos de tener en cuenta los temas éticos, referidos al utilización del plasma humano, se presentan otros inconvenientes entre los cuales se encuentran la pérdida de actividad biológica de la *Staphylococcus* coagulasa por la presencia de anticuerpos humanos presentes en él, o presencia de antibióticos por su conocida acción inhibitoria. Lo que seguro constituyen limitaciones para su utilización.

La literatura consultada indica que el plasma de conejo brinda los mejores índices en la detección del patógeno cuando se compara con otros plasmas animales, pero presenta el gran inconveniente de no estar disponible en grandes volúmenes. (Betancourt, 2005).

4.6.1 Correlaciones

Existen trabajos como el de Suárez y col. en el año 2008 que han intentado correlacionar la presencia del gen que codifica para la enterotoxina A con la producción de coagulasa y termonucleasa. En dicho trabajo se les realiza a las cepas de *Staphylococcus*, la prueba de coagulasa, termonucleasa y detección de enterotoxina A. Esta última se detecta a través de la técnica de PCR, posteriormente se realizó un análisis estadístico con el fin de determinar algún tipo de asociación. Los resultados han demostrado que no existe correlación entre las tres variables, no obstante, todas las cepas coagulasa positivas fueron productoras de termonucleasa, pero no así a la inversa y todas las cepas enterotoxina positivas son también coagulasa y termonucleasa positivas, no así a la inversa. Lo anterior pondría de manifiesto que el utilizar pruebas presuntivas o indirectas para evidenciar enterotoxigenicidad en cepas de *S. aureus* no es confiable y por lo tanto es recomendable realizar el análisis directo de estas utilizando técnicas altamente sensibles y específicas como lo es PCR.

Teniendo en cuenta lo publicado por Suarez y col. en su trabajo, se desprende que todas las cepas capaces de producir enterotoxina serían reaccionantes positivos a la prueba de la coagulasa, sin lugar a dudas siempre la detección directa de la enterotoxina nos evitará falsos resultados. Aunque es necesario tener presente que la detección de la enterotoxina estafilocócica en alimentos es una actividad extremadamente laboriosa, además pocos laboratorios disponen de tecnología suficiente para la verificación de la capacidad enterotoxigénica de este microorganismo. Por tanto, test bioquímicos más simples son frecuentemente utilizados en las metodologías de enumeración de este microorganismo, para sugerir la producción de enterotoxina, destacándose la producción de coagulasa y termonucleasa. Existiendo entre estas dos últimas pruebas una correspondencia bastante alta, entendiéndose por esto que ambos test pueden ser realizados en forma independiente cuando no sea posible la realización simultánea de las dos pruebas, sin que se vean comprometidos los resultados. (Nogueira y col. 2008). En el Cuadro II es posible observar la correspondencia entre los test de coagulasa y termonucleasa.

Cuadro II Correlaciones entre los test de coagulasa y termonucleasa.⁶

Test		Termonucleasa		
		Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Coagulasa	Negativo	367 (52,9)	26 (3,8)	393 (56,7)
	Positivo	26 (3,8)	274 (39,5)	300 (43,3)
	Total	393 (56,7)	300 (43,3)	693 (100,0)

6 Fuente: Nogueira y col., 2008

5. DESARROLLO DEL PROYECTO

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

5.1.1. Clasificación de chacinados

La utilización de la carne de rumiantes en forma exclusiva para la elaboración de productos chacinados no es muy común, dado que en general y por diferentes motivos se utiliza la mezcla con carnes de otras especies (cerdo, pollo, caballo, pescado) predominando la de cerdo. (Bianchi, 2010)

El tratamiento industrial de las carnes data de finales del siglo XIX, cuando predominaban los saladeros. Su finalidad era y es, la conservación de estas ya que se descomponen con facilidad y rapidez si no se aplican las medidas necesarias.

Nuestro Reglamento Bromatológico Nacional (Decreto 315/994) realiza definiciones que a nuestro criterio es considerable citarlas, ya que nos ubican en el tema, en cuanto a clasificaciones se refiere. Una definición de productos cárnicos a la que hace referencia es: "Aquellos productos aptos para consumo humano que contengan carne, subproductos o derivados en su composición, con adición de otros ingredientes aprobados, independientemente de que hayan sido sometidos a un proceso destinado a asegurar su conservación". Mientras que la definición de chacinados, la pública como, el alimento elaborado a base de carne o sangre o mezcla de ambas con o sin el agregado de vísceras u otros productos animales, vegetales, autorizados por la presente reglamentación. Debiendo estar exentos de aponeurosis, tendones, ligamentos y cartílagos, a excepción de los chacinados cocidos, en los que se admite tejidos colágenos, a los efectos de su transformación en gelatina, sometidos o no a un proceso de curación y/o ahumado.

Existe una clasificación de los chacinados publicada en el Decreto 315/994 la cual se mantiene aún vigente, donde clasifica a los chacinados según la tecnología aplicada en su elaboración.

Es así que encontramos:

- Chacinados frescos embutidos y no embutidos
- Chacinados secos
- Chacinados cocidos embutidos y no embutidos
- Chacinados salados

De la citada clasificación es relevante destacar a los chacinados frescos los cuales se definen como: "Aquellos preparados a base de carne y grasa cruda y picada de las especies bovina, suina, u otras autorizadas, aptas para el consumo humano, con adición de condimentos, aditivos, e ingredientes aprobados en esta reglamentación". Dichos chacinados podrán ser embutidos o no embutidos, según hayan sido introducidos o no, en tripas naturales o artificiales.

5.1.1.1. Chorizo fresco

Su nombre se origina del latín *salcium* siendo un chacinado típico del mundo hispano parlante. En Uruguay y Argentina se elabora el chorizo parrillero para cocinar en parillas en general acompañando carne asada o consumido solo. Su consumo se extendió luego a Paraguay, Bolivia, Chile y Perú. En Colombia se lo denomina longaniza al igual que en Chile mientras que en Brasil se lo nombra linguiza. (Bianchi, 2010).

En Uruguay al chorizo fresco se lo considera como tal, al producto elaborado con carne de cerdo, vacuno, o mezcla de ellas, tocino y el agregado o no de aditivos de uso permitido en este reglamento. La pasta agregada de sal, especias y condimentos es introducida en finas tripas. (Decreto 315/994)

Los chacinados frescos embutidos reciben el siguiente proceso tecnológico: picado, amasado, condimentado, embutido, moldeado, atado. Se puede visualizar con esta breve descripción del proceso tecnológico, la gran cantidad de etapas que requiere el mismo. Llevándose a cabo una gran manipulación por parte del personal, acción que favorece el agregado de contaminantes al producto, si no se respetan las buenas prácticas de manufactura.

A nivel mundial se han hallado diferentes contaminantes en la composición de los mismos: *E. coli O157:H7*, coliformes fecales, *Escherichia coli* genérica, *Staphylococcus coagulasa positivo* y *Salmonella* spp, así como *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, y *Listeria welshimeri*. (Bianchi, 2010). Los hallazgos reportados, sugerirían la necesidad de una readecuación de las prácticas de limpieza y sanitización de las plantas de procesamiento en todos los lugares donde se elaboren chacinados.

Las condiciones en embutidos frescos (chorizos) son favorables para el desarrollo de bacterias del género *Staphylococcus coagulasa positivo*, ya que el componente mayoritario de este alimento es la carne picada, la cual ofrece una mayor extensión superficial, hecho que por sí solo explica el aumento de la flora microbiana.

Actualmente por la única disposición que se rigen los organismos de contralor estatales, es por la publicación del Decreto 315/994, en el cual presenta un capítulo de disposiciones generales, allí establece que desde el punto de vista microbiológico los ingredientes alimentarios y los alimentos no podrán contener:

- Microorganismos patógenos
- Toxinas u otros metabolitos microbianos actual o potencialmente riesgosos

Agentes microbianos capaces de causar alteración y que la tecnología exigible para su elaboración debió eliminar: cualquier tipo de microorganismo que por su cantidad o por sus cualidades indique una manipulación defectuosa, malas condiciones higiénicas o haga presumir la presencia de microorganismos patógenos.

Como se puede visualizar nuestro Reglamento Bromatológico Nacional no establece ningún criterio microbiológico, por lo que no permite aplicar pautas de aceptación o rechazo del producto elaborado. A diferencia de organizaciones internacionales como lo es el International Commission on Microbiological Specification for Food

(ICMSF) y la Recopilación de Normas Microbiológicas de Unión Europea. (Moragas y De Pablo, 2008) entre otros en los que si se han publicado valores para que sean tomados como referencia. (Ver Cuadro III)

Cuadro III. Valores recomendados por Instituto Nacional de Alimentos y Recopilación de Normas Microbiológicas.⁷

<p style="text-align: center;">Instituto Nacional de Alimentos</p> <p>Productos preparados a base de carne picada, tales como chacinados o no embutidos</p>	<p style="text-align: center;">$n= 5$ $c= 2$ $m= 100$ $M= 500$</p>
<p style="text-align: center;">Recopilación de Normas Microbiológicas (UE).</p> <p>Productos de Charcutería crudos(chorizo, salchichón y lomo embuchado)</p>	<p style="text-align: center;">$n= 5$ $c= 1$ $m= 5 \times 10^2$ $M= 5 \times 10^3$ 10^2 ufc/g</p>

El Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) realiza un Plan de Control de Productos Elaborados a Base de Carne, que consiste en la extracción sistemática de muestras y su análisis. En el mismo no se incluye el análisis de *Staphylococcus coagulasa positivo* en embutidos frescos, a diferencia de otros países donde se determinó la obligatoriedad de una investigación y enumeración, como parte de las acciones de fiscalización sanitaria por parte de los órganos gubernamentales. Acción que nos parece relevante se tome en Uruguay. (Instituto Nacional de Alimentos; MGAP, 2004; MGAP, 2006).

De aquí surge nuestra inquietud de realizar un relevamiento de la calidad microbiológica de los embutidos frescos que se distribuyen en el mercado.

⁷ Fuente: Instituto Nacional de Alimentos, 2003; Moragas, 2008.

6. OBJETIVOS DEL PROYECTO

6.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener información microbiológica acerca de los embutidos frescos, que se comercializan en nuestro mercado nacional, por medio de técnicas validadas.

6.1.1. Objetivo específico

Reportar el hallazgo de *Staphylococcus coagulasa positivo* en embutidos frescos, en los departamentos de Montevideo y Canelones, mediante la prueba de coagulasa en tubo. (Estudio y aplicación de dicha técnica)

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

Esta investigación se llevó a cabo en el Instituto de Ciencia y tecnología de los Alimentos -Departamento de Calidad Agro Alimentaria – Área de Microbiología de Alimentos. Facultad de Veterinaria - Universidad de la República.

7.2. MUESTREO

Se obtuvieron 65 muestras de embutidos frescos (chorizos), de 300 g cada una, adquiridas en grandes cadenas de supermercados, así como también en pequeños almacenes de los departamentos de Montevideo y Canelones.

Luego de haber sido adquiridas fueron trasladadas al laboratorio inmediatamente, en cajas isotérmicas donde posteriormente se mantuvieron refrigeradas en heladera hasta el momento del análisis.

El muestreo se realizó en los meses de febrero a abril del presente año. Dicho muestreo se realizó teniendo en cuenta lugares de venta donde la reposición de la mercadería se realiza con mayor frecuencia debido al volumen de venta y en locales donde el volumen de venta es menor, por lo tanto la reposición del producto también lo es.

7.3. CEPAS DE REFERENCIA

Las cepas de referencia utilizadas en este estudio fueron *Staphylococcus aureus*, subespecie *aureus*, Colección: ATCC, N°: 6538, Lote 2971969. (Donada por la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. (DINARA).

La cual se utilizó con cada siembran para darle mayor confiabilidad a los resultados obtenidos.

Las cepas fueron conservadas a 5° C y para cada análisis se cultivaron en caldo Brain Heart Agar -BHA, Oxoid Ltda., Basingstoke, Hampshire, England.

7.4- MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Baird-Parker desarrolló este medio a partir de la formulación de agar-glicina telurito de Zebovitz y ha mejorado su fiabilidad en el aislamiento de *Staphylococcus coagulasa positivos*. Además agregó yema de huevo como una emulsión de agente diagnóstico. A su vez incorpora a la fórmula piruvato de sodio para proteger a las células dañadas y ayudar a su recuperación. Actualmente este medio es ampliamente recomendado por los organismos nacionales e internacionales para el aislamiento de *Staphylococcus coagulasa-positivos* y se incluye en microbiología de los alimentos y piensos para animales. (Oxoid, 1981)

En otro estudio realizado por Baird-Parker y Davenport, publicado por Oxoid en el año 1981, demostró que la recuperación de *Staphylococcus* dañados fue mayor en Baird-Parker Agar que en cualquier otro medio de cultivo.

Por otro lado Oxoid en el mismo año publica un trabajo realizado por Broeke y col. donde demostraron que el medio de cultivo Baird-Parker Agar utilizado en los estudios ecológicos de alimentos sospechosos de estafiloenterotoxigenosis fue de mucha ayuda, ya que de las 522 cepas de *Staphylococcus aureus* a prueba, aisladas de humanos y de alimentos, desarrollaron en 97,5 % colonias características en dicho medio.

7.4.1. Preparación y composición del medio sólido selectivo Baird Parker

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Extracto de Levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Piruvato Sódico	10,0 g
L-Glicina	12,0 g
Cloruro de Litio	5,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1000 ml

Disolver por calentamiento y agitación

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Enfriar a 50 °C y añadir 50 ml de emulsión estéril yema de huevo-telurito. (Ver apartado 7.4.1.1) Mezclar uniformemente y preparar placas de Petri. (Asociación Española de Normalización y Certificación, 2000).

7.4.1.1. Preparación y composición de la Emulsión de yema de huevo-telurito

Emulsión de yema de huevo	50 g
Telurito potásico	3,5 %
Sulfametazina.....	0,2 %

La siembra se realizó en este medio de cultivo sólido selectivo por el método de siembra en superficie.

Este medio posee agentes selectivos como el telurito, glicina y cloruro de litio, los cuales inhiben el crecimiento de la flora competitiva. A su vez contiene yema de

huevo, la cual permite coadyuvar en la reparación de las células dañadas.

Los agentes selectivos; glicina, el litio y telurito ya mencionados han sido cuidadosamente equilibrados para suprimir el crecimiento de la mayoría de las bacterias presentes en los alimentos, sin inhibir *Staphylococcus coagulasa positivos*. (Oxoid, 1981).

La emulsión de yema de huevo hace que el medio sea crema/amarillo y opaco. Los *Staphylococcus coagulasa positivos* reducen el telurito y el medio se presenta con colonias negro/gris brillante, que después de 48 horas, producen zonas (halos) claras alrededor de la colonia, este halo es causado por la proteólisis de la yema de huevo. Esta zona clara junto a las colonias negras/gris son de diagnóstico para los *Staphylococcus coagulasa positivos*. (Oxoid, 1981, Usal, 2000).

En la incubación, la mayoría de las cepas de *Staphylococcus coagulasa positivos* forma dos halos opacos alrededor de las colonias, lo que se piensa que es debido a la acción de una lipasa. No todas las cepas de *Staphylococcus coagulasa positivos* producen ambas reacciones. Algunas cepas *Staphylococcus coagulasa-negativos* por ejemplo: *Staphylococcus saprophyticus* producen las dos zonas claras, pero los técnicos experimentados pueden distinguir éstos de otros organismos por el tiempo de incubación más largo requerido. (Oxoid, 1981; Difco [19--]).

7.4.2- Preparación y composición del caldo cerebro corazón

Digerido enzimática de tejidos animales	10,00 g
Infusión de cerebro de ternera, deshidratada.....	12,50 g
Infusión de corazón de buey, deshidratada.....	5,00 g
Glucosa	2,00 g
Cloruro sódico	5,00 g
Fosfato de hidrógeno disódico, anhidro.....	2,50 g
Agua	1000 ml

Disolver por calentamiento y agitación 37gramos en 1 litro de agua destilada.

Distribuir en tubos de ensayo a razón de 10 ml.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Este medio de cultivo es especialmente útil como medio de crecimiento y suspensión para los *Staphylococcus* en los que se vaya a determinar la producción de coagulasa. (Oxoid, 1981).

7.5. MATERIALES

- Aparato para esterilización en seco (horno) y para la esterilización húmeda (autoclave)
- Incubadora (con intervalos de temperatura de 35° C ± 1 o de 37° C ± 1)
- Balanza de precisión.
- Stomacher.
- Probeta de 100 ml.
- Tubos de ensayo, matraces o frascos de tapón de rosca.

- Pacas de Petri, estériles de plástico.
- Asa de vidrio estéril (Asa de Drigalsky)
- Pipetas graduadas descartables de capacidad nominal de 1ml y 10ml.
- Matriz para ensayo (embutidos frescos: chorizos)
- Diluyente estéril
- Bolsas de Stomacher
- Láminas portaobjetos

7.6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Se aisló *Staphylococcus coagulasa positivo* según la norma AENOR (2000). UNE-EN ISO 6888-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, Método horizontal para el recuento de *Staphylococcus coagulasa positivos*. (*Staphylococcus aureus* y otras especies).

7.6.1. Preparación de la muestra

De cada muestra se tomaron 10g de chorizo en forma aséptica en bolsas de Stomacher con 90 ml de diluyente estéril (suero fisiológico). Se mezclaron en Stomacher a velocidad máxima durante sesenta segundos.

Se toma con pipeta estéril 1 ml.

Se plaquea (dilución de 10⁻¹) en medio Baird Parker, de forma aséptica se transfiere 1 ml de manera equitativa a 3 placas.

Se extiende el inóculo sobre la superficie de la placa de agar rápidamente sin tocar las paredes, utilizando el asa de Drigalski estéril.

Se deja las placas con la tapa puesta en posición horizontal hasta que el inóculo se absorba en el agar (alrededor de 15 min. a temperatura ambiente).

Luego se invierten e incuban 45-48 h a 37° C.

Se seleccionan las placas con 20-200 colonias.

Las colonias típicas de *Staphylococcus* son negras o grises, brillantes y convexas, (de entre 1,5 mm y 2,5 mm de diámetro) y rodeadas de una zona clara, también puede aparecer en esta zona clara un anillo opalescente en contacto con las colonias.

Las bacterias que pertenecen a géneros distintos de *Staphylococcus* pueden presentar colonias similares a la de los *Staphylococcus*. Para diferenciarlas se realiza el examen microscópico de la tinción de Gram, antes de realizar la confirmación la cual permite diferenciar los Gram. positivos de los negativos.

Cuando se extiende 1,0 ml sobre 3 placas, las tres placas se tratarán como si fueran una sola en todos los pasos siguientes de recuento y confirmación.

7.6.2. Métodos de Confirmación

La identificación de los *Staphylococcus coagulasa positivo* se basa en el examen al

microscopio (frotis de cultivo fresco con tinción de Gram), la morfología de las colonias y las características bioquímicas y de cultivo.

Los *Staphylococcus* asociados con infecciones agudas (*Staphylococcus aureus* en seres humanos y *S. intermedius* y *S. hyicus* en animales) pueden producir coagulación en el plasma. El criterio más ampliamente utilizado y de aceptación general para la identificación de estos organismos patógenos se basa en la presencia de la enzima coagulasa. La capacidad del *Staphylococcus* para producir coagulasa fue reseñada por primera vez por Loeb en 1903.

La coagulasa se une al fibrinógeno plasmático, lo que causa la aglutinación de los organismos o la coagulación del plasma.

La enzima coagulasa se produce de dos formas diferentes: libre y fija. Como ya fue mencionado en el punto 4.6.

El inóculo utilizado para el test de coagulasa en tubo debe ser puro, porque un contaminante puede producir resultados falsos después de una incubación prolongada. (Becton, 2003).

7.6.2.1. Coloración de Gram.

- La técnica de Gram se realizó según el Manual Difco, [19--]
- Preparación del frotis de un cultivo fresco (18-24 h).
- Secado (en forma espontánea o sobre el mechero en zona de aire caliente).
- Fijación del preparado (pasar en forma rápida la lámina portaobjeto con el frotis hacia arriba, tres veces por la parte más caliente de la llama del mechero).
- Coloración propiamente dicha: en esta técnica se utilizan, varios colorantes en pasos sucesivos a los que se les debe respetar su orden y tiempo de aplicación para lograr resultados fiables. Cada una de estas sustancias se coloca sobre la lámina ubicada en un soporte en la bandeja y se deja actuar el tiempo indicado para cada una de ellas, luego de lo cual se vuelca la sustancia y se arrastra el remanente con agua para continuar con la sustancia siguiente.
- Colorante: Cristal violeta (1 minuto).
- Mordiente: Lugol (1 minuto).
- Decolorante: Alcohol-Acetona (30 segundos).
- Colorante de contraste: Safranina o fucsina (30 segundos).

La técnica de Gram nos aporta múltiples datos, tamaño, forma y según el comportamiento frente a estos colorantes las bacterias se clasifican en:

- Gram positivas, si se colorean de color violeta.
- Gram negativas, si se colorean de color rosado o rojo. (Difco, [19--])

7.6.2.2. Prueba de la Coagulasa en tubo.

- Composición del reactivo

Coagulase Plasma, Rabbit with EDTA, plasma de conejo liofilizado con EDTA

al 0,15% (ácido etilendiaminotetraacético) y cloruro sódico al 0,85%, aproximadamente.(Becton, 2003).

- Preparación del reactivo

Rehidratar el plasma de conejo con EDTA agregando 3ml de agua purificada estéril al frasco. Mezclar mediante rotación suave e inversión del frasco.

- Posteriormente se fracciona en tubos de 0,3 ml.
- Se recoge un inóculo de la superficie de cada colonia seleccionada, utilizando un hilo estéril y se introduce el inóculo en tubo conteniendo caldo infusión de cerebro y corazón.
- Se incuba a 37° C durante 24 h ± 2 h.
- Se añade en condiciones asépticas 0,1 ml de cada cultivo a 0,3 ml de plasma de conejo en tubos y se incuba a 37° C.
- Se examina la coagulación del plasma inclinando el tubo tras una incubación de entre 4-6 h y, si el ensayo es negativo, se reexaminará a las 24 h de incubación. (Ver cuadro de Interpretación de reacciones)
- El ensayo de la coagulasa se considerará positivo si el volumen del coagulo ocupa más de la mitad del volumen original de líquido.
- Como control negativo para cada lote del plasma, se le adiciono 0,1 ml de infusión de cerebro y corazón sobre la cantidad recomendada de plasma de conejo y se incubo sin hacer la inoculación.
- Al mismo tiempo se le realizó un control positivo con cepa ATCC *Staphylococcus aureus*, subespecie *aureus*, Colección: N° 6538 para comprobar el rendimiento del plasma, la técnica y la metodología empleada.
- Para que el ensayo sea valido, el plasma control negativo no deberá mostrar ningún signo de coagulación. (Remel, 2009)

- Interpretación de Resultados

Cuadro IV. Interpretación de Reacción (Prueba de la Coagulasa)⁸

Negativo	Positivo			
	1+	2+	3+	4+

Negativo Sin evidencia de formación de fibrina

1+ Positivo Coágulos pequeños sin organización

2+ Positivo Coágulos pequeños organizados

3+ Positivo Coágulos grandes organizados

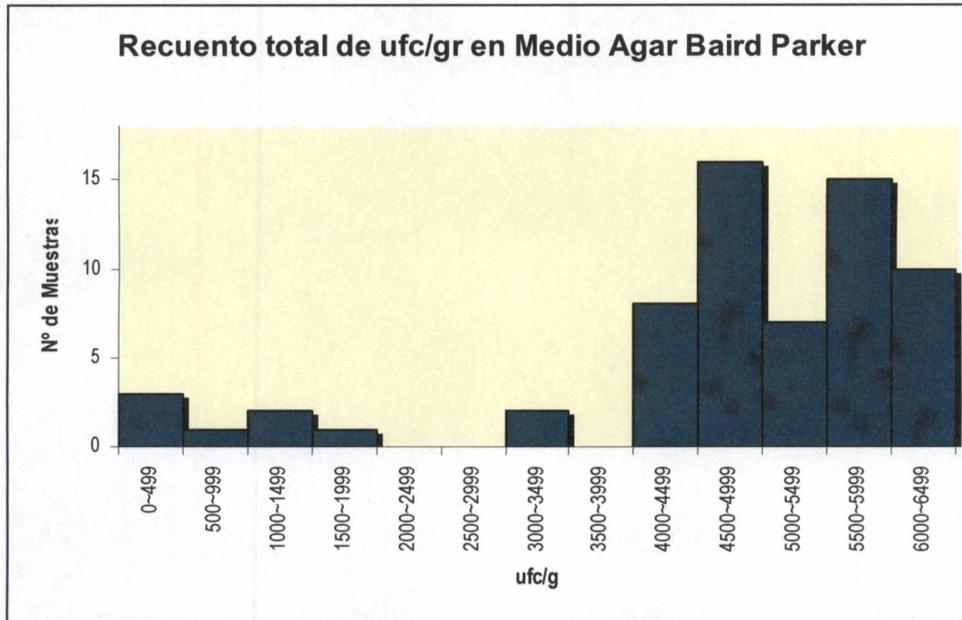
4+ Positivo Todo el contenido del tubo se coagula y no se desplaza cuando se invierte el tubo.

⁸ Fuente: Becton, 2003

8. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se detallan en el **Cuadro V**. (Ver Anexo). En el cual se puede visualizar el recuento, aislamiento y confirmación de los *Staphylococcus aureus coagulasa positivo* en el total de muestras analizadas (n=65).

Figura VII. Recuento Total de ufc/gr en Medio Agar Baird Parker, en la cual se observa la cuantificación presuntiva de *Staphylococcus aureus*.



En la siguiente gráfica se puede apreciar la proporción de muestras de *Staphylococcus spp.* en el total de muestras analizadas.

Figura VIII. Prevalencia de *Staphylococcus spp.* en el Total de Muestras Analizadas. (n= 65)

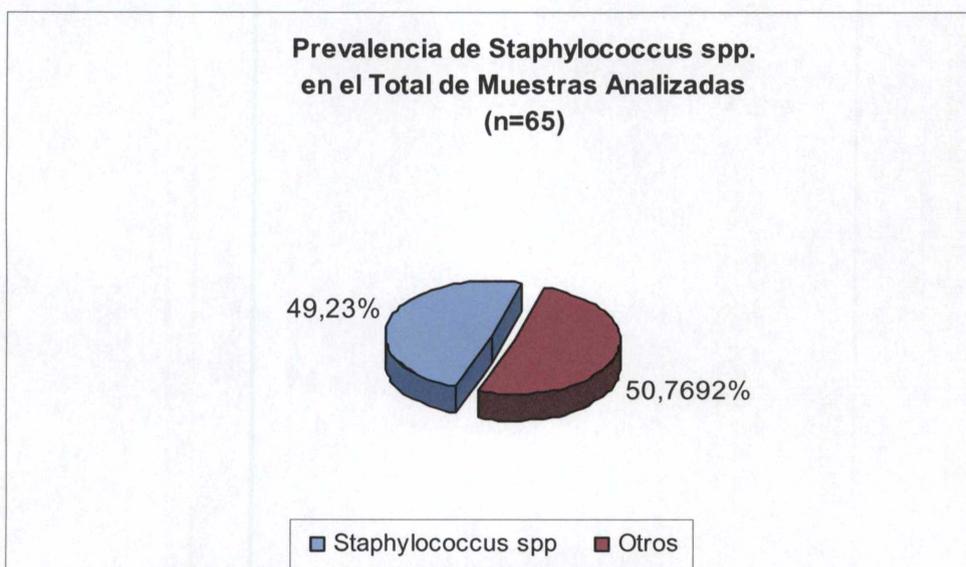
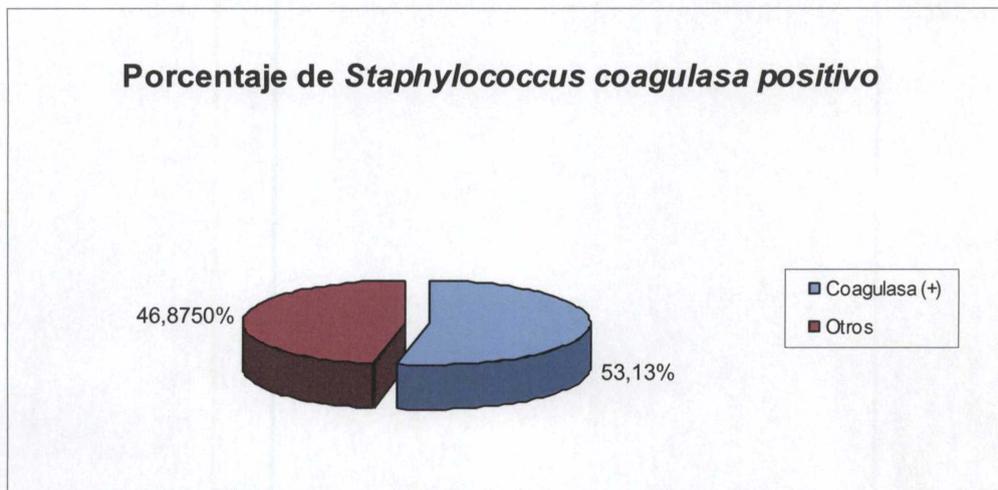


Figura IX. Porcentaje de *Staphylococcus coagulasa positivos*, en el total de muestras presuntivas de *Staphylococcus spp.* Las cuales fueron confirmadas por el test de coagulasa en tubo.



9- DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos podemos observar que existe un 49,3 % de *Staphylococcus spp.*, confirmados a través de frotis y tinción de Gram. Esta confirmación dio paso a que posteriormente se completara la investigación realizando el test confirmatorio de *Staphylococcus coagulasa positivo*. El cual según la normativa internacional consultada nos indica que estamos fuera de los límites recomendados para este microorganismo. (Instituto Nacional de Alimentos, 2003; Moragas y De Pablo, 2008). A nivel nacional no tenemos criterios para dicho microorganismo. Según la reglamentación vigente no se contempla la búsqueda de *Staphylococcus coagulasa positivo* en este alimento. (MGAP, 2004; MGAP, 2006)

La media de ufc/g se aproximó a valores de 4715 .Esto nos indican que podría existir incumplimiento de las buenas prácticas de manufactura a nivel de empresa elaboradora o bien debilidades en el sector comercial, que se podrían atribuir a fallas en la cadena de frío, manipulación incorrecta por parte del personal o condiciones higiénicas inadecuadas.

Se recuperaron 53,13 % de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas del total de muestras analizadas, este porcentaje corresponde a 17 muestras de un n=65. Este resultado confirma nuestras sospechas que las condiciones de manipulación del producto no son las adecuadas. Según la bibliografía consultada existe un alto índice de manipuladores portadores los cuales pueden contaminar el alimento y si a esto le agregamos condiciones temperatura inadecuadas, es predecible que se de una multiplicación y posterior producción de enterotoxina por parte de los microorganismos. La producción de dicha toxina se interpreta indirectamente mediante la prueba de la coagulasa. Se ha demostrado a lo largo de este trabajo que es una alternativa confiable para la detección de *Staphylococcus coagulasa positivo*.

10. CONCLUSIONES

En base a los datos recabados a través de este trabajo, se puede concluir que el recuento e identificación de *Staphylococcus coagulasa positivo* en las muestras analizadas se encuentran fuera de los límites recomendados por American Public Health Association, (APHA) y la International Commission on Microbiological Specifications for Food, (ICMSF), los cuales fueron mencionados anteriormente (Ver Cuadro II). Este recuento elevado puede ser debido a la falta de higiene durante el proceso de elaboración del producto, ya que como fue mencionado, es un producto que requiere gran manipulación durante el proceso de elaboración. Además se debe tener en cuenta que el mismo requiere que aseguremos el mantenimiento de la cadena de frío durante su distribución y almacenamiento en vitrinas.

El control puede ser logrado utilizando materias primas que contengan bajo recuento de *Staphylococcus* patógeno, utilizando tratamientos para el reducir o eliminar la carga microbiana, así como también evitando las condiciones que permitan el crecimiento (y por consiguiente la producción de enterotoxina), además de proteger los productos de la contaminación posterior.

Respecto a la técnica utilizada para la detección de *Staphylococcus coagulasa positivo* se puede concluir que es sencilla, eficaz, económica en comparación con otras técnicas, de fácil interpretación y con disponibilidad a la hora de acceder a los reactivos necesarios para la realización de la misma.

Si bien la tecnología de análisis de alimentos sufrió un gran avance, en los últimos años en la utilización de técnicas sensibles y específicas, como los son por ejemplo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una metodología usada en la detección de la enterotoxina estafilocócica. La cual implica a su vez mayor sensibilidad en la obtención de los resultados, pero presenta la gran desventaja de que no todos los laboratorios dedicados al análisis de alimentos cuentan con la infraestructura y la tecnología necesaria que requiere la técnica,

La detección de la enzima coagulasa es validada por organizaciones internacionales como A.P.H.A e I.C.S.M.F. Además que existe una Norma ISO (UNE- EN ISO 6888-1) la cual recomienda para la identificación de *Staphylococcus* patógeno la utilización de la prueba de la coagulasa.

Lo anteriormente mencionado pone de manifiesto que el utilizar pruebas presuntivas o indirectas para evidenciar enterotoxigenicidad en cepas de *Staphylococcus* patógeno sigue siendo un método eficaz, confiable y por lo tanto recomendable.

11. RECOMENDACIONES

Incrementar el control por parte de los organismos de fiscalización a través de planes de muestreo obligatorios, a nivel de planta y de lugares de comercialización de los embutidos frescos (chorizos).

Determinar límites microbiológicos a nivel nacional, estableciendo así criterios de aceptación o rechazo para los chorizos.

Las empresas elaboradoras deben establecer políticas de inocuidad de los alimentos, haciendo hincapié en las buenas prácticas de manufactura (BPM), y los procedimientos operativos estandarizados de limpieza y desinfección (POES), entre los cuales se incluyen almacenamiento y recepción de materia prima, capacitación del personal, condiciones edilicias, higiene de equipos, almacenamiento y transporte de los productos. No debiendo olvidar que las empresas elaboradoras de alimentos tienen la obligación de asegurar la calidad e inocuidad de sus productos contribuyendo así a preservar la salud humana.

Los locales de expendio de alimentos, tales como almacenes, supermercado, carnicerías, etc., deberán cumplir con la reglamentación establecida. Asegurando la cadena de frío del producto, respetando las condiciones establecidas para la conservación de este por parte del fabricante.

Se deberá tener en cuenta que la contaminación de los alimentos no sólo puede darse en plantas elaboradoras de alimentos, o en lugares de comercialización de los mismos, sino que puede presentarse a nivel doméstico, por hábitos inadecuados de conservación y manipulación.

El consumidor deberá ser más exigente al momento de la compra de los alimentos, observando las condiciones en que se encuentran los mismos.

Es importante tener en cuenta que el Estado debe controlar, las plantas deben cumplir, y el consumidor exigir.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaráz, L y col. (1997). Detección de *Staphylococcus aureus* spp. En manipuladores de alimentos. La Alimentación Latinoamericana 219:44-47.
2. Alves, L. y col. (2001). Pesquisa de *Staphylococcus sp* e *Staphylococcus coagulase positivo* em carne bovina "molda" comercializada em Acougues da Cidade de Sao Luis-Ma. Revista de Medicina Veterinaria e Zootecnia 17:120-123.
3. American Public Health Association. (1992). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3^a. ed. Washington. Committee. 1219 p.
4. Asociación Española de Normalización y Certificación. (2000). UNE-EN ISO 6888-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, Método horizontal para el recuento de estafilococos *coagulasa positivos* (*Staphylococcus aureus* y otras especies). 6 p.
5. Baker, J; Bormann, M; Boudreau, D. (1985). Evaluation of Various Rapid Agglutination Methods for the Identification of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology 21:726-729.
6. Becton, Dickinson. (2003). BBL Coagulase Plasmas. Maryland, BD. 15 p. (prospecto).
7. Betancourt, O y col. (2005). Plasma equino como sustituto del plasma humano en la identificación del *Staphylococcus aureus* en los laboratorios de microbiología. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol24_2_05/ibi04205.pdf
Fecha de consulta: 10/04/2010.
8. Bianchi, G; Feed, O. (2010). Introducción a la Ciencia y Tecnología de la Carne. Montevideo, Hemisferio Sur, 551 p.
9. Capita, R y col. (2001). Assessment of Baird-Parker Agar as Screening Test for Determination of *Staphylococcus aureus* in poultry meat. Journal of Food Protection 39:321-325.
10. Casale, L y col. (2007). Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. Food Control 18:630-634.
11. Cortez, A y col. (2004). Coliformes fecais, Estafilococos coagulase positiva (ecp), Salmonella spp. e Campylobacter spp. Em linguica fresca. Alimentos Nutritivos 15:215-229.
12. De Souza, A; Perdomo, D. (2005). Comparasion of petrifilm RSA system with the traditional methodology for the enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus* in food. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 25:531-535.
13. DIFCO. [19--]. Manual de Bacteriología. Madrid, Mirasa, 395 p.

14. Filliol, I y col. (2008). Microbial Quality Control of Raw Ground Beef and Fresh Sausage in Casablanca (Morocco). Disponible en:
<http://www.britannica.com/bps/additionalcontent/18/35040056/Microbial-Quality-Control-of-Raw-Ground-Beef-and-Fresh-Sausage-in-Casablanca-Morocco>.
Fecha de consulta: 02/05/2010.
15. Food and Drug Administration. (2001). *Staphylococcus aureus*. Disponible en:
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm>
Fecha de consulta 15/11/09.
16. Frazier, W; Westhoff, D. (1993). Microbiología de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 681 p.
17. Fueyo, J. (2005). Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relacionados con tipos genéticos. Disponible en:
http://www.tdr.cesca.es/TDX/TDR_UOV/TESIS/AVAILABLE/TDR-0426107-084149//UOV0004s.pdf.
Fecha de consulta: 05/09/2009.
18. Halpin-Dohnalek, M; Marth, E. (1989). *Staphylococcus aureus*: Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods. Journal of Food Protection 52: 267-282.
19. Hoet, A y col. (1999). Aislamiento de *Estafilococos coagulasa positivos* distintos a *Staphylococcus aureus*, de cuartos con mastitis subclínica en la villa del Rosario, Estado Zulia, Venezuela. Revista Científica 9:149-153.
20. Ibáñez, L. (2006). Productos Fermentados Secos: Desafío a la Inocuidad. Carnes y Alimentos 20:26-27.
21. Instituto Nacional de Alimentos. (2003). Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf
Fecha de consulta: 23/12/2009.
22. Intendencia Municipal de Montevideo. Departamento de desarrollo social. División Salud. (2006). Manual para manipuladores de alimentos. Montevideo, IMM, 24 p.
23. International Commission on Microbiological Specifications for food. (1983). Técnicas de análisis microbiológico. 2ª. ed. Zaragoza, Acribia, 431 p.
24. International Commission on Microbiological Specifications for food. (1984). Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. 2ª. ed. Zaragoza, Acribia, 215 p.
25. International Commission on Microbiological Specifications for Food (1996).

- Microbiología de los alimentos. 2ª. ed. Zaragoza, Acribia, 606 p.
26. Jay, J. (2002). Microbiología Moderna de los Alimentos. 4ª. ed. Nevada, Acribia, 615 p.
27. Lairscey, R; Buck, G. (1986). Performance of Four Slide Agglutination Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* When testing Methicillin-Resistant Staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 25: 181-182.
28. Marques, S y col. (2006). Avaliacao higiênico-sanitaria de linguicas tipo frescal comercializadas nos municipios de Tres Coracoes e Lavras-mg. Ciencias Agrotécnicas 30:1120-1123.
29. Ministerio de Salud Pública. (2010). Disponible en:
<http://www.msp.gub.uy>
Fecha de consulta: 03/02/2010.
30. Morgas, E; De Pablo, M. (2008). Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. Disponible en:
<http://cvu.rediris.es/pub/bscw.cgi/d683722/normic.pdf>
Fecha de consulta:13/03/10.
31. Nickerson, J; Sinskey, A. (1978). Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración. Zaragoza, Acribia, 279 p.
32. Nogueira, G y col. (2008). Equivalencia Entre Os Testes De Coagulase E Termonuclease Na Identificacao De Estafilococos Isolados De Leite Cru E Queijo Frescal. Congresso Brasileiro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. (6 al 9 de octubre). Belo Horizonte, Brasil, 6-10.
33. Nogueira, G y col. (2010). Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus spp.* in raw milk and fresh soft cheese. Disponible en:
www.elsevier.com/locate/fm.
Fecha de consulta 26/04/2010.
34. Normanno, G y col. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in Food Products Marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology 98:73-79.
35. Organización Panamericana de la Salud. (1999). Disponible en:
<http://www.bvsops.org.uy/pdf/veta00.pdf>.
Fecha de consulta: 14/04/2010.
36. Organización Panamericana de la Salud. (2002). Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Uruguay. Montevideo. OPS, 203 p.
37. OXOID (1981). Manual OXOID. 4ª. Ed. Hampshire, Turnergraphic. 360p.
38. Padhila da Silva, W; Zocche, F. (2007). Enterotoxinas e Intoxicación Alimentaria Estafilococica. Carnes y Alimentos 24:30-35.

39. Padilha da Silva, W. (2006). Principales Microorganismos Patógenos en Alimentos. Carnes y Alimentos 18:10-15.
40. Padilha da Silva, W. (2007). Staphylococcus coagulasa positiva. Jornadas de Ciencia y Tecnología de Carnes y Alimentos. (11 al 15 de junio). Montevideo, Uruguay, p. 1-6.
41. Padilha da Silva, W. (2008). Curso de Microorganismos patógenos en alimentos. Carnes y Alimentos 27:42-45.
42. Padilha da Silva, W; Avila, E. (2004). Estafilococos coagulase positiva: Patógenos de importancia em alimentos. Higiene Alimentar 18:32-40.
43. Post, D. E. (1999). Food-Borne Pathogens. *Staphylococcus aureus*. Hampshire, Oxoid, 46 p.
44. Uruguay. [2005]. Reglamento Bromatológico Nacional: Decreto N° 314/994 de fecha 05/07/1994: anotado y concordado con apéndice normativa. 2ª. ed. Montevideo: IMPO. CD ROM.
45. Remel. (2009). Coagulase Plasma. Kansas. 5p. (prospecto). Rojas, R; González, T. (2006). Detección e Identificación de Bacterias Causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-bioquimia/e-bq2006/e-bq06-2/em-bq062e.htm>.
Fecha de consulta 10/12/2009.
46. Silva, M. (2006). Agentes de enfermedad más prevalentes en Chile. Disponible en: <http://staphylococcus-aureus.blogspot.com/>
Fecha de consulta: 14/05/10.
47. Suarez, M; Arias, M; Gamboa, M. (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. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 58:59-63.
48. Torres, V. (2006). Un método rápido para detección de patógenos. Énfasis 5:58-62.
49. Uruguay. Universidad de la República Facultad de Química. (1996). Repartido del curso práctico de microbiología general. Montevideo, FQ. 109p.
50. Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Ganaderos. División Industria Animal. (2006). [Plan de control de productos elaborados a base de carne]. Montevideo, MGAP. [5] h.
51. Uruguay. Ministerio de ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Ganaderos. División de Industria Animal. (2004). [Plan de control de productos elaborados a base de carne]. Montevideo, MGAP. [4] h.

52. Usal. (2000). Investigación y Recuento de *Staphylococcus aureus*.
Disponible en:
http://virus.usal.es/web/demo_microali/Saureus/SaureusPlaca.html
Fecha de consulta: 18/11/09.
53. Vanegas, M y col. (2008). Aislamiento y Caracterización de Cepas de *Staphylococcus* Enterotoxigénicos en Bogotá. Disponible en:
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/693/69311191003.pdf>
Fecha de consulta: 02/01/2010.
54. Vanegas, M; Martínez, A; Medrano, M. (2006). Caracterización molecular de cepas toxigénicas de *Staphylococci* aisladas de operarios de plantas de alimentos. Disponible en :
<http://www.revistainfectio.org>
Fecha de consulta: 12/03/10.

Cuadro V. Resultados Microbiológicos del Total de Muestras Analizadas

Nº de muestras	Fecha de Siembra	Ufc/gr.	Frotis	Gram	Coagulasa
1	01/02/2010	200	-	-	-
2	03/02/2010	4290	-	-	-
3	08/02/2010	6220	-	-	-
4	08/02/2010	4950	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
5	10/02/2010	4650	-	-	-
6	10/02/2010	5780	-	-	-
7	10/02/2010	5550	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
8	17/02/2010	5040	-	-	-
9	17/02/2010	4720	-	-	-
10	22/02/2010	3440	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
11	22/02/2010	5580	-	-	-
12	22/02/2010	4370	-	-	-
13	24/02/2010	5320	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
14	24/02/2010	5910	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
15	24/02/2010	5450	-	-	-
16	03/03/2010	700	-	-	-
17	03/03/2010	1100	-	-	-
18	03/03/2010	200	-	-	-
19	03/03/2010	5520	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
20	03/03/2010	5820	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
21	03/03/2010	4500	-	-	-
22	08/03/2010	4560	-	-	-
23	08/03/2010	5670	-	-	-
24	08/03/2010	6290	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
25	10/03/2010	5130	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
26	10/03/2010	5760	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
27	15/03/2010	6090	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
28	15/03/2010	4440	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
29	15/03/2010	4620	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
30	15/03/2010	5350	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
31	15/03/2010	5640	-	-	-
32	15/03/2010	6000	-	-	-
33	15/03/2010	4740	-	-	-
34	15/03/2010	4670	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
35	17/03/2010	4470	-	-	-
36	17/03/2010	1030	-	-	-
37	17/03/2010	4890	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
38	17/03/2010	3100	-	-	-
39	17/03/2010	6060	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
40	17/03/2010	6300	-	-	-
41	22/03/2010	6240	-	-	-
42	22/03/2010	4510	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
43	22/03/2010	4530	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
44	22/03/2010	4710	-	-	-
45	22/03/2010	4410	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
46	22/03/2010	1800	-	-	-
47	24/03/2010	5990	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
48	24/03/2010	4320	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
49	24/03/2010	5660	-	-	-
50	24/03/2010	4230	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
51	24/03/2010	5070	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
52	24/03/2010	4980	-	-	-
53	05/04/2010	5590	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
54	05/04/2010	200	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
55	05/04/2010	5970	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
56	07/04/2010	4770	-	-	-
57	07/04/2010	4860	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
58	07/04/2010	6200	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
59	12/04/2010	6180	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
60	12/04/2010	6270	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(+)
61	12/04/2010	5700	-	-	-
62	14/04/2010	4350	Estafilococo	G(+)	Coagulasa(-)
63	14/04/2010	5690	-	-	-
64	14/04/2010	4830	-	-	-
65	14/04/2010	5340	-	-	-