

Staphylococcus aureus EN QUESO BLANCO FRESCO Y SU RELACIÓN CON DIFERENTES MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD SANITARIA

Cándida Díaz-Rivero y Bedirva González de García, Laboratorio de Microbiología de Alimentos – Departamento de Microbiología y Parasitología - Facultad de Farmacia – Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela
Email: candglor@yahoo.com

Introducción

Los patógenos microbianos en alimentos, han sido confirmados como la causa principal de las enfermedades transmitidas por estos productos en Latinoamérica y El Caribe, destacando entre estas, las infecciones por *Salmonella* y las intoxicaciones por cepas enterotoxinógenas de *Staphylococcus aureus* (1).

Entre 1993 y el año 2000, en esta región de la América ocurrieron 191 brotes por intoxicación estafilocócica con 6 433 afectados y 2 muertes. De estos brotes, 48 correspondieron a Venezuela, de los cuales, en 40 el queso fue el alimento involucrado (2), afectando a un gran número de personas.



Se afirma que un número importante de cepas de *S. aureus* producen alguna de las siete enterotoxinas más conocidas, predominando en la mayoría de los brotes las enterotoxinas A y D, probablemente por formarse en los alimentos bajo condiciones de pH, a_w , y Eh, más amplia que las otras (3).

Los síntomas característicos de la intoxicación estafilocócica son náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea; se desarrollan entre 1 y 6 horas después de haber consumido el alimento, conteniendo enterotoxinas (4). Pueden ocurrir otras manifestaciones, como dolor de cabeza y disnea, pero con menor frecuencia, generalmente los síntomas no persisten más allá de las 24 horas; en casos severos puede haber deshidratación, originando descompensación electrolítica; las muertes son raras y puede ocurrir en ancianos, niños o personas débiles por alguna enfermedad (5).

El *S. aureus*, es considerado omnipresente, encontrándose en las mucosas y piel de la mayoría de los animales de sangre caliente (6), en el humano el principal reservorio es la cavidad nasal, de donde pasan a la piel y lesiones de ésta, localizándose principalmente en los brazos, las manos y la cara; también se puede encontrar en la garganta y en el tracto intestinal, pasando de estas localizaciones al aire, polvo, ropa (7), utensilios y equipos, llegando a contaminar los alimentos.

Se estima que un alimento es de riesgo en la intoxicación alimentaria por *S. aureus*, cuando se confirma la presencia de alguna de sus enterotoxinas o tiene una carga del microorganismo igual o superior a 10^5 UFC/g (8).

Generalmente, la determinación cuantitativa de *S. aureus* en alimentos se realiza con la finalidad de establecer su potencialidad para originar intoxicación alimentaria y demostrar contaminación post proceso (9).

En Venezuela, el queso blanco fresco es uno de los alimentos de mayor consumo, encontrándose una cantidad importante del producto comercializado en el mercado, procedente de pequeños productores, quienes sin preparación técnica alguna, se aventuran a realizar esta actividad. Entre los errores que se cometen, destacan el empleo de materia prima inadecuada y sin ningún tratamiento de higienización, condiciones sanitarias inapropiadas durante el proceso, deficiente refrigeración en el producto terminado y ausencia de empaque acorde.

Basados en estas premisas y con la finalidad de conocer el perfil higiénico sanitario del queso que consume la población de la ciudad de Mérida, se diseñó el presente trabajo con el propósito de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Determinar cuantitativamente *S. aureus* .
2. Investigar en forma cuantitativa los grupos microbianos indicadores de calidad sanitaria :coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras.
3. Correlacionar la presencia de *S. aureus* con los indicadores investigados.
4. Deducir la peligrosidad de los quesos blancos en base a los resultados obtenidos.

Materiales y Métodos

Muestra

Se analizaron un total de 72 unidades muestras de queso blanco fresco clasificado como semiduro según la norma venezolana sobre quesos (10), tomadas en diferentes lugares de expendio de la ciudad de Mérida, Venezuela.

Análisis microbiológico

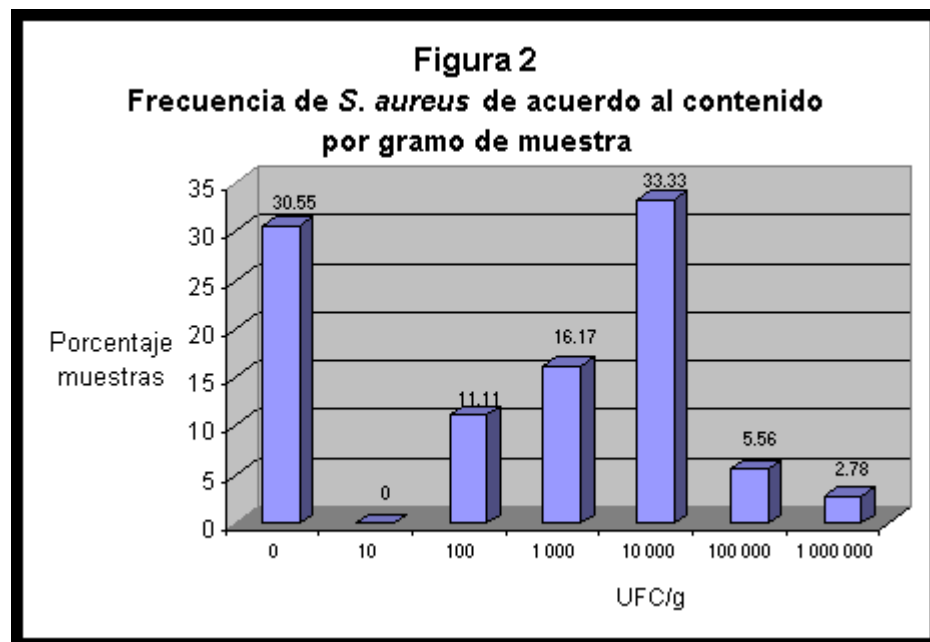
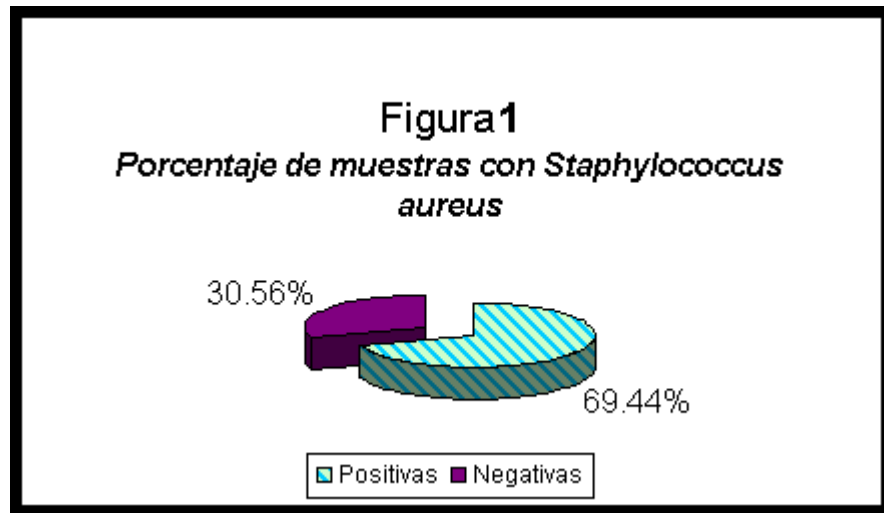
De cada unidad muestra, se pesaron porciones representativas de 10 g y se homogeneizaron por un minuto en solución de citrato de sodio al 2%, utilizando un homogeneizador tipo licuadora, para preparar la dilución 10^{-1} . A partir de esta, se efectuaron diluciones decimales en agua peptonada al 0,1% hasta 10^{-3} . A partir de las diluciones, se sembraron diferentes medios de cultivo para la determinación cuantitativa de los microorganismos a investigar y se incubaron a las temperaturas apropiadas, según procedimientos de la APHA (11), de la siguiente forma: *S. aureus* en Agar de Baird Parker con incubación a 35° C y posterior confirmación con la prueba de coagulasa; coliformes y coliformes fecales en Caldo Lauril Sulfato para la prueba presuntiva y para la confirmación en Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante a 35° C y Caldo EC a 44° C, respectivamente; los mohos y las levaduras en Agar Papa Dextrosa a pH 3,5 con Ácido Tartárico al 10% incubando a 25° C .

Determinaciones estadísticas

Se utilizó el programa Excel 2000 de Microsoft.

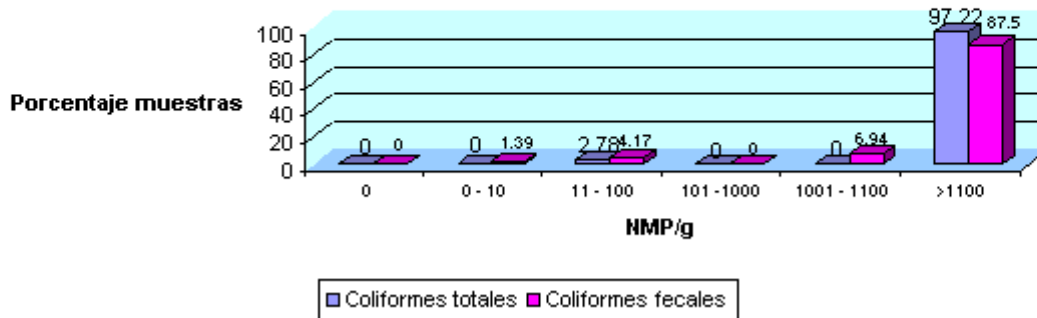
Resultados

Se detectó el *S. aureus* en 50 (69,44%) de las 72 muestras estudiadas (Figura 1), con un promedio de $1,5 \times 10^5$ UFC/g y un rango de < 100 a $5,0 \times 10^6$ UFC/g (Tabla 1).El 41,67 % estuvo por encima de 10^3 y el 8,34% sobre 10^5 (Figura 2).



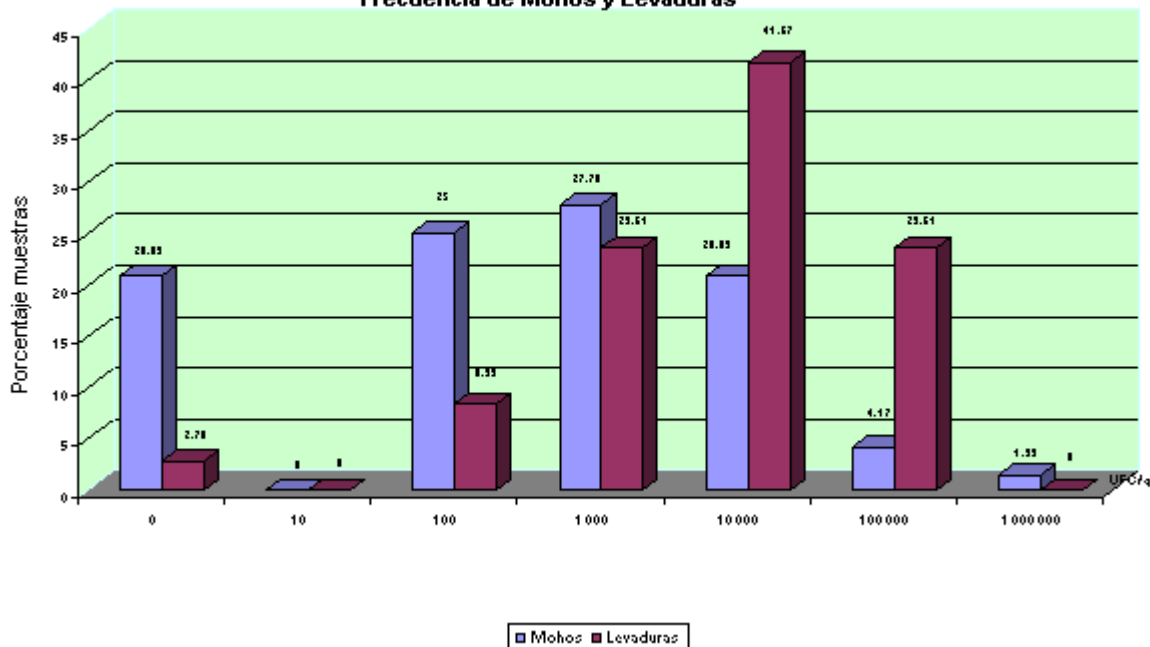
Los coliformes totales se presentaron por encima de 10^3 NMP/g en el 97,22% de los quesos estudiados, coincidiendo estos, con cargas > 1100 (Figura 3), con un promedio de > 1070 y un rango de 23 a >1100 (Tabla 1). Los coliformes fecales se detectaron con cargas superior a 10 NMP/g en el 98,61% de las muestras y > 1100 en el 87,50% (Figura 3), con un rango entre 9 y >1100 y un promedio de >1040 (Tabla 1).

Figura 3
Coliformes totales y Coliformes fecales
según el NMP/g de muestra



Los mohos estuvieron en el 26,39% de las muestras analizadas con valores superiores a 10^3 UFC/g, habiéndose encontrado el 5,56% con cargas por encima de 10^5 (Figura 4). Su promedio fue de $5,6 \times 10^4$ UFC/g y el rango de <10 a $1,6 \times 10^6$ (Tabla 1). Las levaduras se encontraron en el 65,28% de las muestras por encima de 10^3 y 23,61% sobre 10^5 (Figura 4). El rango fue de $3,1 \times 10^2$ a $8,3 \times 10^5$ UFC/g y el promedio de $1,0 \times 10^5$ (Tabla 1).

Figura 4
Frecuencia de Mohos y Levaduras



El grado de asociación entre el *S. aureus* y los grupos de microorganismos indicadores de calidad sanitaria investigados, fue insignificante como se deduce de los coeficientes de correlación respectivos (Tabla 2).

Tabla 1
Valores promedios y rango de *S. aureus* e indicadores

Microorganismos	Promedio	Valor menor	Valor mayor
<i>S. aureus</i> (UFC/g)	$1,5 \times 10^5$	<100	$5,0 \times 10^6$
Coliformes totales (NMP/g)	> 1070	23	>1100
Coliformes fecales (NMP/g)	>1040	9	>1100
Mohos (UFC/g)	$5,6 \times 10^4$	<10	$1,6 \times 10^6$
Levaduras (UFC/g)	$1,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^2$	$8,3 \times 10^5$

Tabla 2
Coefficiente de correlación entre *S. aureus* e indicadores

Microorganismos	<i>S. aureus</i> (r)
Coliformes totales	0,037
Coliformes fecales	0,053
Mohos	-0,048
Levaduras	-0,102

r = coeficiente de correlación

Discusión

La presencia de *S. aureus* en queso y en los alimentos en general, debe interpretarse desde diferentes puntos de vista. Por un lado, se ha señalado la existencia de una relación directa entre el número de unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro de producto y la probabilidad inminente de la presencia de alguna

de sus enterotoxinas; en este sentido, se ha considerado como valor crítico 10^4 UFC/g, a partir del cual es posible detectarlas, incrementándose esta posibilidad cuando las cargas se encuentran en el orden de 10^6 o mayores (12, 13) . Por otro lado, se ha indicado que un número elevado de microorganismos, aunque es indicativo de una manipulación deficiente, no es suficiente para vincular el producto con el riesgo de una intoxicación alimentaria y debe demostrarse su capacidad para producir enterotoxinas (14). Por razones obvias, los límites microbiológicos máximos permitidos, deben estar por debajo de los valores antes indicados a los fines de asegurar un producto inocuo, evitando así la posibilidad de su multiplicación, durante la distribución y comercialización del queso.

Los resultados, en relación a *S. aureus*, revelan la existencia una situación latente de brotes por intoxicación estafilocócica, por el consumo del queso investigado, al haberse encontrado el 41,67% de las muestras con cargas iguales o superiores a 10^4 UFC/g, sobrepasando el valor máximo permitido en este tipo de producto ($M=10^3$); se consiguió que el 8,34% presentó contenidos de 10^5 o mayores, incrementándose en estas muestras la posibilidad la posibilidad de ser vehículos de intoxicación.

Por las características de humedad del producto y las condiciones de manipulación y conservación observadas, existe un alto riesgo de aumento de la población microbiana durante su comercialización . En los expendios ubicados en los sectores de menores recursos económicos de la población, destacan entre otras, la exhibición del producto a temperatura ambiente y la refrigeración por encima de las temperaturas recomendadas con el fin de ahorrar electricidad; así mismo en los mercados populares se expone el queso en ambientes abiertos a temperaturas promedios de 22 – 23° C, manteniéndolo en estas condiciones durante varias horas.

Las muestras con cargas de *S. aureus*, entre 100 000 y por encima de 1 000 000 UFC/g (8,34%), representan un peligro inminente para los consumidores, por tener mayor posibilidad de contener enterotoxinas, pues se ha corroborado que los alimentos implicados en intoxicaciones, contienen poblaciones elevadas del microorganismo (15; 16).

El porcentaje de muestras y la carga de *S. aureus* encontrado, es semejante al obtenido por las autoras en estudio realizado hace unos años atrás (17), menor a la contaminación hallada por Arispe(18), con más de 50% de las muestras por encima de 10^5 y mayor a la obtenida por Osechas (19), con una media de $6,5 \times 10^3$ en otras regiones del país.

La alta frecuencia y contenido de coliformes totales y coliformes fecales, reflejan la deficiente calidad sanitaria del producto que llega al consumidor, constituyendo un alerta sobre la posibilidad de la presencia de enteropatógenos. El 98,61% de las muestras, clasificaron como rechazables por presentar coliformes fecales por encima de 10 NMP/g ,

Los mohos se consiguieron con una frecuencia relativamente baja (26,36%), si se compara con las levaduras (65,28%), por encima de los valores recomendados ($M = 10^3$) . La alta frecuencia y contenido de levaduras, es indicativo de las fallas higiénicas a la par de incidir junto con la alta carga bacteriana, en el rápido deterioro del producto .

Al aplicar el coeficiente de correlación para determinar el grado de asociación entre *S. aureus* y el resto de los microorganismos investigados, no se pudo apreciar relación alguna entre los mismos, pues indiferentemente de los contajes obtenidos en los organismos indicadores, los estafilococos se manifestaban en baja o alta carga.

Conclusiones y recomendaciones

El gran porcentaje de muestras con contajes relativamente elevados de *S. aureus*, unido a las características de humedad del producto y a la deficiente manipulación durante su comercialización, convierten al queso analizado, en un vehículo de alto riesgo para la salud de los consumidores, por el peligro latente de intoxicación estafilocócica.

Se detectó en el producto fallas en su calidad sanitaria, por la considerable contaminación con los diferentes grupos de microorganismos indicadores. La elevada población en coliformes fecales, permite inferir la posible presencia de microorganismos enteropatógenos y el riesgo de infecciones entéricas.

El alto contenido de levaduras en la mayoría de las muestras, unido a la fuerte contaminación bacteriana, contribuirá a la disminución de la vida de comercialización por deterioro de sus características organolépticas.

El grado de asociación entre *S. aureus* y los indicadores, fue insignificante.

Se sugiere la implementación urgente de un programa para mejorar la higiene del queso blanco fresco fabricado y de venta en Mérida, tal como el sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control.

Resumen

Datos epidemiológicos revelan que entre los años 1993 y 2000, *Staphylococcus aureus* fue uno de los principales microorganismos causantes de brotes en Venezuela por consumo de queso blanco. Se realizó un estudio con la finalidad de determinar cuantitativamente la presencia de *S. aureus* en queso blanco fresco de venta en la ciudad de Mérida-Venezuela y relacionar este microorganismo con algunos de los indicadores de calidad sanitaria tradicionales: coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras. Fueron analizadas un total de 72 muestras aplicando la metodología de referencia. *S. aureus* se detectó en el 69,44% de los quesos; cargas por encima de 10^3 UFC/g en el 41,67% de las muestras y superior a 10^5 en el 8,34%; los coliformes totales y coliformes fecales se presentaron >1100 NMP/g en el 97,22% y 87,50% respectivamente de los quesos examinados; mohos por encima de 10^3 UFC/g en el 26,39% y levaduras superior a 10^3 UFC/g en el 65,28%. Los rangos fueron: *S. aureus* entre $< 1,0 \times 10^2$ y $5,0 \times 10^6$, coliformes totales entre 23 y >1100 , coliformes fecales entre 9 y >1100 , mohos entre $<1,0 \times 10$ y $1,6 \times 10^6$, levaduras entre $3,1 \times 10^2$ y $8,3 \times 10^5$. El coeficiente de correlación, evidencia un grado de asociación insignificante entre *S. aureus* y los grupos de microorganismos indicadores investigados. Al comparar los resultados con los requisitos microbiológicos exigidos para este tipo de producto, se concluye que manifiesta una gran deficiencia higiénica y representa un peligro latente como vehículo de intoxicación estafilocócica para el consumidor, a la par de otros riesgos relacionados con enfermedades originadas por agentes entéricos, pues el 98,61 % de las muestras clasificaron como rechazables por presentar coliformes fecales por encima de 10 NMP/g. Se sugiere la implementación de un programa para mejorar la higiene del queso blanco fresco de venta en Mérida.

Palabras clave : *Staphylococcus aureus*, queso, indicadores de calidad sanitaria, coliformes, coliformes fecales, mohos, levaduras.

Abstract

Epidemiological data revealed that *Staphylococcus aureus* was leading microorganism in food outbreaks caused by white cheese in Venezuela. A study to quantify the presence of *S. aureus* was carried out in white fresh cheese marketed in the city of Mérida-Venezuela. *S. aureus* was related some traditional indicators of sanitary quality, such as : total coliforms, fecal coliforms, molds and yeasts. Official methods were use to analyzed 72 samples of cheeses. *S. aureus* was detected in 69,44% of the cheeses; it was higher than 10^3 CFU/g in 41,67% of the samples and higher than 10^5 in 8,34% of the cheeses . The examined cheeses were >1100 MPN/g of total coliforms and fecal coliforms in 97,22% and 87,50% respectively ; counts of molds higher than 10^3 CFU/g were present in 26,39% of the samples, and yeasts were higher than 10^3 CFU/g in 65,28% of the samples. The ranges were: *S. aureus* between $< 1,0 \times 10^2$ and $5,0 \times 10^6$, total coliforms between 23 and >1100 , fecal coliforms between 9 and > 1100 , molds between $<1,0 \times 10$ and $1,6 \times 10^6$, yeasts between $3,1 \times 10^2$ and $8,3 \times 10^5$. The correlation coefficient evidences the counts of *S. aureus* were not significantly association between *S. aureus* and the investigated indicator groups . To compare our results with the microbiological requirements demanded for this product type, we conclude that white fresh cheeses analyzed were poorly hygiene and they represent a latent risk as vehicle of staphylococcal food poisoning for the consumer, at time other risks related with infections for enteric microorganisms because 98,61% of the samples were rejectable according to the limit of 10 MPN/g for fecal coliforms . It is strongly suggested a program to improve the hygiene of white fresh cheese processed and marketed in city of Mérida.

Key words: *Staphylococcus aureus*, cheese, sanitary quality indicators, coliforms, fecal coliforms, molds, yeasts.

Referencias

1. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis – Organización Panamericana de la Salud (INPPAZ-OPS/OMS). 1997. Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en Latinoamérica y el Caribe.1995-1997.

2. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis – Organización Panamericana de la Salud (INPPAZ-OPS/OMS). 2000. Sistema de Información Regional para la Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos: Brotes de Intoxicación estafilocócica.1993-2000.

www.inppaz.org.ar/Salida2.asp?frm.AnDesde=1993&frm.AnHasta=2000&frm.Pais=Todos&frm.Enfermedad=Intox+estafilococcica&frm.Alimento=Todos&frm.Local=T

3. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).1998. Microorganismos de los Alimentos: Características de los Patógenos Microbianos. Ed. Acribia España. 349-385 pp.

4. Bergdoll, M.S. 1990. Staphylococcal Food Poisoning. En: Cliver, D.O. Foodborne Diseases. Academic Press.USA. 85-106 pp.

5. Varnam, A.H.and M.G. Evans.1991. Foodborne pathogens. Wolfe Publishing. London. 235-265 pp.

6. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), *Op.cit.*

7. Jay,J.M. 1994. Microbiología Moderna de Los Alimentos. Ed. Acribia. España. 537-563 pp.

8. Center for Disease Control (CDC). 2000. Guidelines for confirmation of Foodborne-Disease Outbreaks. Morb. Mort. W. Report. 49:54-62.

www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml.

9. Bennett, R.W. and G. A. Lancette . 1998. Bacteriological Analytical Manual. 8 th ed. (Revision A). FDA . AOAC International. USA. 12.01 p.

10. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1993. Quesos. Norma 1813. Caracas. Venezuela.

11. Vanderzant, C. and D. F. Splittstoesser. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. USA.

12. Jay,J.M., *Op.cit*

13. Becquer-Lombard, A., V. Legua-Castillo; C. Lara-Ortiz y L. Mota –Dela Garza. 1997. Staphylococcus aureus, actividad termonucleasa y enterotoxinas en alimentos. Rev. Cubana Aliment. Nutr. 11(2):89-93.

www.infomed.sld.cu/revistas/ali/vol11-2-97/ali03297.htm.

14. Bennett, R.W. and G. A. Lancette, *Op.cit.*

15. Becquer-Lombard, A., V, *et.al.*, *Op.cit.*

16. Lacette, G.A. and S.R. Tatini. 1992. Staphylococcus aureus. En: Vanderzant, C. ; D.F. Splittstoesser. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. USA.533 pp.

17. Diaz-Rivero,C. y B. González-García. 1997. Evaluación de la Calidad Microbiológica del Queso Blanco Fresco de Venta en Mérida. Memorias XXIV Jornadas Venezolanas de Microbiología: 39.

18. Arispe,I. 1980. Staphylococcus aureus y organismos indicadores, su recuperación e incidencia en quesos blancos pasteurizados blandos y duros. XXX Convención Anual de Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC). En: Osechas, O. D. 1983. Calidad Sanitaria del Queso Blanco elaborado en el Estado Trujillo. Trabajo de Ascenso presentado a la Universidad de Los Andes-Núcleo Universitario Rafael Rangel. Venezuela.100 pp.

19. Osechas, O.D. 1983. Calidad Sanitaria del Queso Blanco elaborado en el Estado Trujillo. Trabajo de ascenso presentado a la Universidad de Los Andes-Núcleo Universitario Rafael Rangel. Venezuela. 100 pp.