UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS

CARRERA DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CONTAMINACIÓN CON *Staphylococcus aureus* EN PASTELES CON CREMA DE EXPENDIO EN PASTELERÍAS Y PUESTOS AMBULANTES (LA PAZ, ENERO – AGOSTO, 2006)

Elaborado por:

Univ. Ajllahuanca Callisaya, Vladimir

(TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS)

LA PAZ – BOLIVIA
2007

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS

CARRERA DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CONTAMINACIÓN CON *Staphylococcus aureus* EN PASTELES CON CREMA DE EXPENDIO EN PASTELERÍAS Y PUESTOS AMBULANTES (LA PAZ, ENERO – AGOSTO, 2006)

Elaborado por:

Univ. Ajllahuanca Callisaya, Vladimir

Asesora:

Dra. Espada Silva, Angélica María

(TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS)

LA PAZ – BOLIVIA
2007

Dedicado a:

Mis padres Juan y Delia por brindarme su constante apoyo, amor, paciencia, por ser los mejores padres del mundo. Y para una persona muy especial en mi vida, gracias por tu apoyo, consejos y por brindarme tu amor, algún día el destino hará que nos encontremos de nuevo, mi querida Judith.

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres por brindarme todo el apoyo que necesitaba y por confiar en mí, gracias a ellos acabo una meta más en mi vida, gracias de todo corazón.

- A mi asesora, por su paciencia, orientación y por brindarme los materiales, equipos y reactivos necesarios para llevar a cabo el presente trabajo.

- A la Dr. María Rosa Pantoja por brindarme datos recientes del RELOAA, por los consejos y observaciones después de la revisión del presente trabajo.

- A mi querida amiga, Dra. Ximena Pardo, por contar con su apoyo, tiempo y paciencia durante el desarrollo de la parte práctica de este trabajo.

- Al personal del Instituto SELADIS por abrirme sus puertas y fortalecer mis conocimientos en el aspecto práctico de mi profesión.

- A mis queridos amigos Denny, Katty, Alicia y Ramiro, gracias por sus consejos y apoyo en esos momentos tristes de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

Pags.

Resumen …… 1
Introducción …… 2

I. Planteamiento del problema …… 4
A. Justificación …… 4
B. Objetivos …… 5
1. Objetivo general …… 5
2. Objetivos específicos …… 5

II. Diseño teórico …… 6
A. Antecedentes generales …… 6
B. Marco teórico …… 8
1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) …… 8
a) Infecciones …… 8
b) Intoxicaciones …… 9
2. *Staphylococcus aureus* …… 10
a) Características generales …… 10
b) Factores de virulencia …… 11
c) Variaciones en los requerimientos de los nutrientes …. 13
d) Métodos convencionales para el recuento e identificación de *S. aureus* en alimentos …… 15
e) Enterotoxinas estafilocócicas y pruebas para su identificación …… 22
3. Intoxicación alimentaria por *S. aureus* …… 25
a) Alimentos implicados …… 25
b) Aspectos clínicos …… 26
c) Patogenia …… 28
d) Tratamiento …… 29

III. Diseño metodológico …… 30
A. Población …… 30
B. Descripción del ámbito de investigación …… 30
C. Descripción del ambiente de investigación …… 31
D. Metodología y técnicas …… 32
E. Tipo de estudio …… 32
F. Análisis estadístico …… 32

IV. Resultados …… 33
A. Contaminación de pasteles con crema con *S. aureus* en puestos ambulantes y pastelerías …… 33
B. Contaminación de pasteles con crema con *S. aureus,* de expendio en puestos ambulantes …… 34
C. Contaminación de pasteles con crema con *S. aureus,* de expendio en pastelerías con local fijo …… 35

D. Factores de riesgo de contaminación de las muestras fuera de Norma durante su conservación ……... 36
E. Factores de riesgo de contaminación de las muestras fuera de Norma durante su manipulación en el momento de expendio ….. 38

V. Discusión …… 39

VI. Conclusiones …….. 41

VII. Recomendaciones …… 43

VIII. Bibliografía …….. 44

IX. Anexos …… 48

Glosario …… 50

RESUMEN

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos más implicados en intoxicaciones alimentarias debido a la producción de una enterotoxina termoestable en alimentos donde se han eliminado los microorganismos competidores que no soportan altas temperaturas, altas presiones osmóticas y humedad relativamente baja, como es el caso de los derivados lácteos y cremas de pastelería. Mediante este trabajo se pretende determinar el grado de contaminación con *Staphylococcus* aureus en pasteles con crema de expendio en pastelerías y puestos ambulantes en la ciudad de La Paz.

El método utilizado para tal motivo fue el cultivo bacteriológico en placa para recuento de *S. aureus*, según la Norma Boliviana NB 33004.

Según los resultados hallados, el 8% de las muestras analizadas presentaban un recuento fuera de Norma (se usó como referencia una Norma Chilena, 10 - 10^2 UFC/g). De las muestras obtenidas de puestos ambulantes y pastelerías con local fijo se encontró que el 7% y 10%, respectivamente, presentaban recuentos fuera de Norma. Los principales factores de riesgo de contaminación de las muestras que se encontraban fuera de Norma fueron la falta de una adecuada refrigeración, la manipulación con pinzas y la falta de uso de ropa protectora por los vendedores.

El resultado hallado es mayor de lo que se esperaba, pero no se consideró si las cepas de *S. aureus* eran enterotoxigénicas, se deberían realizar estudios posteriores tomando en cuenta esta variable y otros posibles factores de riesgo no incluidos en este trabajo.

INTRODUCCIÓN

Los *Staphylococcus aureus* son células esféricas Gram (+) dispuestos en racimos irregulares. Es uno de los microorganismos más implicados con intoxicaciones alimentarias a nivel mundial por la producción de su enterotoxina termoestable en los alimentos que faciliten su desarrollo.

S. aureus produce una variedad de toxinas proteicas y factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad. Las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) han sido clasificadas en diferentes tipos, estas son terrmoestables y resistentes a la acción de enzimas digestivas.[1] Existen 6 tipos antigénicos llamados SE – A, B, C, D, E y G.[2]

Comúnmente estos microorganismos se desarrollan en alimentos donde se han eliminado los microorganismos competidores, que no soportan altas temperaturas, altas presiones osmóticas o humedad relativamente baja, como es el caso de los derivados lácteos, natillas, cremas de pastelería y jamón. Estos alimentos pueden contaminarse con estos microorganismos cuando han sido puestos en contacto con manipuladores con secreciones purulentas, abscesos, erupciones acneiformes o secreciones nasofaríngeas.[3]

La presencia de los síntomas en esta intoxicación es rápida (de 1 a 7 horas después de la ingestión) y en la mayoría de los casos aguda, dependiendo de factores como ser la susceptibilidad individual a la toxina, la cantidad de alimento contaminado ingerido y el estado de salud de la persona afectada. Los síntomas más comunes son náuseas, vómitos, dolor abdominal y postración. Algunos individuos pueden no mostrar todos los síntomas asociados con la enfermedad. En los casos más severos puede haber dolor de cabeza, calambres musculares y cambios transitorios en la presión sanguínea y en la frecuencia cardiaca. Por lo general el paciente se restablece en un par de días, sin embargo, en los casos severos esto puede llevar tres y a veces más días. La muerte por intoxicación estafilocócica es muy rara, aunque algunos casos han ocurrido en ancianos, niños y personas severamente debilitadas.[4]

El método más usado para el recuento e identificación de *S. aureus* es el método bacteriológico de recuento en placa utilizando agar Baird Parker suplementado con emulsión de yema de huevo y telurito de potasio y posterior confirmación con la prueba de la coagulasa en tubo.

Los productos de pastelería son aquellos elaborados de diversa forma, tamaño, y composición, integrados fundamentalmente por harinas, féculas, azúcares, grasas comestibles y otros productos alimenticios como sustancias complementarias, además están preparadas con relleno o guarnición de otros productos (crema, frutas, chocolate, etc.) [5]

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) constituyen el problema de salud pública más extendido en el mundo, por lo que es necesario mantener una vigilancia de estas para aplicar medidas oportunas que permitan su control y prevención.

En los últimos años varios estudios revelaron la participación de *Staphylococcus aureus* en intoxicaciones alimentarias debido a la contaminación de determinados alimentos (derivados lácteos, productos de pastelería y carnes).

Para tratar de salvaguardar la salud de la población en general y dado que los pasteles rellenos con crema son de consumo diario y principalmente por niños, mediante este trabajo se investiga la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de pasteles con rellenos de crema y se determinará si las muestras positivas se encuentran fuera de Norma. Debido a que en Bolivia no se cuenta con una Norma específica para tal efecto, se utilizará como referencia la Norma Chilena ($10 – 10^2$ UFC/g)

También es importante determinar los posibles factores de riesgo de contaminación de los pasteles durante su manipulación, conservación y expendio. De esta manera poder contar con datos para la toma de medidas preventivas.

B. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

   Determinar el grado de contaminación con *Staphylococcus aureus* en pasteles con crema de expendio en puestos ambulantes y pastelerías con local fijo en la ciudad de La Paz.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

   - Realizar cultivo bacteriológico para la búsqueda de *Staphylococcus aureus* en pasteles con crema según su lugar de expendio en la ciudad de La Paz.
   - Determinar los posibles factores de riesgo de contaminación de las muestras fuera de Norma en su conservación.
   - Determinar los posibles factores de riesgo de contaminación de las muestras fuera de Norma en el momento de su expendio.

II. DISEÑO TEÓRICO

A. ANTECEDENTES GENERALES

En México durante los años 1980 y 1989 en brotes de toxiinfección alimentaria como agente causal se confirmó a *S. aureus* en el 45% de los brotes, ocasionó 792 casos y 5 defunciones. Los alimentos que actuaron como vehículo fueron básicamente productos lácteos y pasteles. El tipo de toxina que se encontró más frecuentemente fue la "A" (38.5%).[6]

En Hong Kong, en el año 1998, se reportó un solo caso de alimento (Moon cake, es un pastel tradicional chino que esta a la venta en días festivos en agosto y septiembre durante la celebración del Mid-Autumn Festival) contaminado por *S. aureus* de un total de 45 muestras analizadas (2,22%), pero esta se consideró solo una contaminación cruzada por una mala manipulación, durante el procesamiento o durante la conservación, se encontraron niveles inferiores (10^4 UFC/g) al requerido para la producción de la toxina termoestable (10^5 UFC/g), lo cual indica que el paso final para la producción de los Moon Cakes es virtualmente efectivo para la eliminación de este microorganismo peligroso.[7]

En 1999, en España, se reportaron 15 (0,113%) casos de enfermedades producidos por la toxina termoestable de *S. aureus*, se reportaron en total 13243 casos de enfermedades.[8]

En Accra – Ghana (África), un año más tarde, se reportó la presencia de *S. aureus* en el 31,9% de los alimentos analizados, encontrándose valores inferiores dentro de lo aceptable.[9]

Sin ir tan lejos, en Venezuela se realizó un estudio de detección de brotes de ETAs durante los años 1996 – 2004 y se pudo evidenciar que en los años 1999 y 2004 se registraron 61 y 58 brotes de ETAs respectivamente, y en todos esos años el principal agente causal de los brotes fue *Staphylococcus aureus* que durante el 2004 produjo

aproximadamente 39 brotes de ETAs y principal alimento contaminado fue el queso.[10]

En Uruguay, según datos recogidos del Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las ETA, durante el período 1993-2001 han sido declarados 12 brotes de intoxicación estafilocócica, con un total de 164 afectados sin fallecimientos.[11]

Los estafilococos se presentan más comúnmente en la leche, pastas, pasteles y productos cárnicos. Según los resultados reportados por Lancelle et al, en un estudio que se realizó en leche para evaluar la calidad microbiológica de leche cruda usada para la elaboración de quesos en la Provincia de Corrientes – Argentina, encontró la presencia de *S. aureus* en un 9,38%, la carga de este microorganismo (10^1 ufc/ml) fue significativamente inferior a los niveles en que la potencial producción de toxina convierte al producto en riesgoso para la salud.[12] En Cuba los resultados reportados por Carrera et al muestran que *S. aureus* tiene mayor presencia en productos de repostería (8%) y semielaborados cárnicos (7%).[13] Estos resultados son apoyados por Grillo et al que reporta que uno de los agentes causales de los brotes de ETA en Cuba es el *S. aureus* como el más frecuente y está asociado a productos de repostería, así como alimentos de origen animal preparados en salsa.[14]

En la ciudad de La Paz – Bolivia, según el laboratorio Bromatológico Municipal se pudieron identificar 4 tipos de microorganismos contaminantes en los alimentos de venta callejera, estos son coliformes fecales, *Escherichia coli*, mesófilos y estafilococos, pero no se cuenta con datos específicos de la incidencia de estos microorganismos.[15] Actualmente en Bolivia se cuenta con muy pocos datos acerca del grado de contaminación de alimentos por *S. aureus*. Los pocos estudios realizados se lo hicieron principalmente en muestras de queso y leche. En un primer estudio realizado en la ciudad de La Paz, se evidenció la presencia de *S. aureus* en un 36%, las muestras analizadas fueron de queso.[16] Posteriormente en otro estudio realizado en la misma ciudad, en

muestras de queso y leche se evidenció la presencia de *S. aureus* en el 20% y 25% de muestras, respectivamente. [17]

En el año 2005, según el RELOAA (Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos), se reportó que la contaminación por *S. aureus* de alimentos en producción y almacén, distribución, consumo, fue del 14%. En esta vigilancia realizada a nivel nacional, los principales alimentos contaminados con *S. aureus* fueron queso fresco y embutidos, encontrándose valores de hasta 62% y 8% respectivamente.[18]

B. MARCO TEÓRICO

1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs)

La enfermedad transmitida por alimentos es un síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población. [11, 19]

Hay dos categorías principales de enfermedades transmitidas por los alimentos:[20]

a) Infecciones

Son el resultado de ingerir alimentos que contienen microorganismos patógenos que posteriormente se reproducen en el cuerpo. Existen dos tipos de infecciones:

- Aquellas en las que los microorganismos atacan al intestino u otros órganos directamente**,** provocando síntomas como náuseas, vómitos, diarrea y fiebre. Es común a todas ellas, un intervalo de varios días entre el momento de la ingestión de la comida infectada y la aparición de los primeros síntomas,

debido al tiempo que necesitan los microorganismos para multiplicarse. Algunos ejemplos son las infecciones causadas por las bacterias *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes*.

- Aquellas en las que los síntomas como diarrea, son resultantes de productos venenosos o toxinas producidas por los microorganismos cuando se desarrollan en el intestino. El tiempo que tardan en aparecer los síntomas puede variar desde varias horas a varios días, después de la ingestión. Un ejemplo es la enfermedad causada por una variedad tóxica de la bacteria *Escherichia coli.*

b) <u>Intoxicaciones</u>

Son las ETAs producidas por la ingestión de toxinas pre formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde la producción del alimento hasta su consumo.

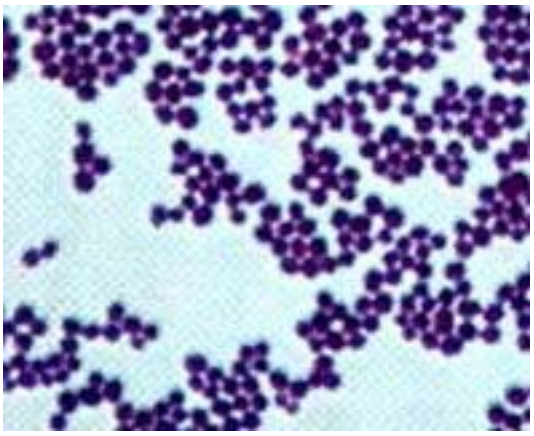
Los síntomas pueden hacerse patentes sólo unas horas después de haber ingerido la comida contaminada. Algunos ejemplos son el botulismo, causado por una toxina de la bacteria *Clostridium botulinum* y la causada por la enterotoxina producida por *Staphylococcus aureus*.

2. *Staphylococcus aureus*

a) Características generales

Los estafilococos son células esféricas Gram positivas (**VER FIGURA 1**) generalmente dispuestas en racimos irregulares parecidos a racimos de uvas, crecen con rapidez sobre muchos tipos de medios y son metabólicamente activos, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo intenso, algunos son miembros de la flora normal de piel y mucosas de los humanos; otros causan supuración formación de abscesos, varias infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Los estafilococos patógenos casi siempre causan hemólisis, coagulación del plasma y producen varias enzimas y toxinas extracelulares. El tipo más común de envenenamiento alimentario es causado por una enterotoxina termoestable de los estafilococos. Éstos desarrollan con rapidez resistencia a muchos antimicrobianos y presentan problemas terapéuticos difíciles.[21]

FIGURA 1: TINCIÓN GRAM DE ESTAFILOCOCOS



FUENTE: ©2005 Laboratorio de Tecnología Educativa. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

b) Factores de virulencia [22]

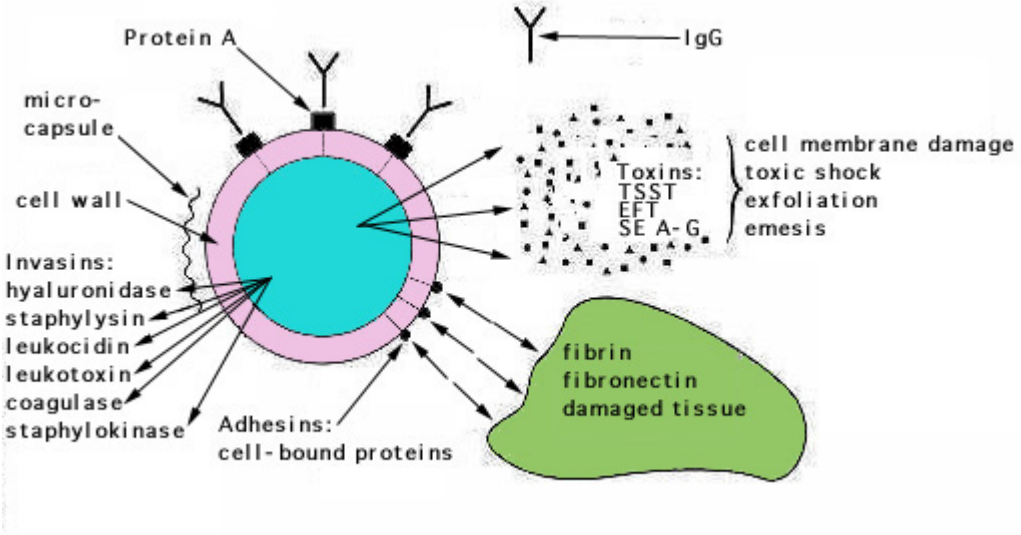
S. aureus, tiene una amplia gama de factores de virulencia (**VER FIGURA 2**), que abarca componentes de pared celular y una gran variedad de exoproteínas que contribuyen en su habilidad para colonizar y causar enfermedad en los mamíferos.

Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa. La principal función de estas proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano.

Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen:

- Toxina I del shock tóxico estafilocóccico (TSST-I)
- Toxina exfoliatina (ETA y ETB)
- Leucocidina
- Enterotoxinas estafilocóccicas (SE): SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG. Son proteínas inmunológicamente diferentes, con pesos moleculares que oscilan entre 28.000 y 35.000 Daltons.

FIGURA 2: FACTORES DE VIRULENCIA DE *S. aureus*



FUENTE: © 2005 Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology

Cada una de estas toxinas es conocida por sus potentes efectos en células del sistema inmune, pero muchas de ellas también tienen otros efectos biológicos, siendo reconocidas como superantígenos pirogénicos (PTSAgs).

Cada una de estas exotoxinas exhiben al menos tres propiedades biológicas:

- pirogenicidad
- superantigenicidad, que se refiere a la habilidad de estas exotoxinas de estimular la proliferación de linfocitos T sin tener en cuenta la especificidad antigénica de estas células.
- aumento de sensibilidad a la acción de endotoxina en modelos experimentales en conejo.

Algunas de ellas presentan propiedades adicionales. Por ejemplo las enterotoxinas son potentes agentes eméticos en tanto los otros integrantes no lo son y por esta razón están históricamente relacionadas con un cuadro bien definido que es la intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*.

Son producidas en la fase exponencial del desarrollo y los genes que las codifican se encuentran en plásmidos, bacteriófagos o elementos genéticos heterólogos, referidos como islotes de patogenicidad.

Su expresión es controlada por al menos tres sistemas reguladores globales denominados:

- gen regulador accesorio (agr)
- gen accesorio regulador estafilocóccico (sar)
- sistema represor por catabolitos.

c) Variaciones en los requerimientos de los nutrientes para el desarrollo de *S. aureus*

1) Características fisiológicas

- Es anaerobio facultativo
- No esporulado
- Coagulasa positivo
- Fermenta hidratos de carbono
- Glucosa positivo, manitol positivo, maltosa positivo
- Termonucleasa positivo
- Catalasa positivo
- Hemólisis positivo
- DNAsa positivo
- Novobiocina negativa
- Actividad de fosfatasa

2) Características de cultivo y desarrollo

S. aureus presenta requerimientos nutricionales complejos, pero se desarrollan bien en casi todos los medios de laboratorio de rutina, como ejemplo:

- Agar nutritivo
- Agar soja tripticasa
- Agar sangre de cordero (no debe utilizarse sangre humana en su preparación porque contiene inhibidores o anticuerpos no específicos)
- Agar manitol salado
- Caldo tioglicolato o caldo cerebro corazón (BHI)
- Agar Baird Parker, es usado principalmente para su aislamiento de muestras de alimentos

También se utilizan concentraciones elevadas de NaCl, pero diversas investigaciones han puesto de manifiesto que medios

que contiene este agente selectivo logran recuperar un número bajo de *S. aureus* especialmente si las células han sufrido algún tipo de estrés tales como: congelación, calentamiento o desecación.

3) Factores que favorecen o inhiben su crecimiento

Las condiciones que permiten el crecimiento de *S. aureus* y por consiguiente, la producción de la enterotoxina, dependen del alimento implicado

- pH: *S. aureus* se desarrolla a un pH de 4,2 – 9,33; siendo el pH más adecuado para la producción de la toxina de 7 a 7,5.
- Temperatura: *S. aureus* crece con facilidad sobre casi todos los medios bacteriológicos en condiciones aerobias o microaerofílicas, crecen con mayor rapidez a 37 ºC. La formación de la enterotoxina ocurre a temperatura entre los 10 y 46 ºC con una temperatura óptima entre los 40 a 45 ºC. La multiplicación y producción de enterotoxinas depende de la calidad del sustrato, la actividad acuosa y el pH del alimento.
- Compuestos químicos: *S. aureus* es relativamente resistente a la desecación, al calor y al cloruro de sodio al 9%, pero se inhiben con facilidad mediante ciertas sustancias químicas, por ejemplo, hexaclorofeno al 3% pero algunas son más tolerante, toleran concentraciones de cloruro de sodio del 10 al 25%. Además resisten a los azúcares disueltos, son fermentativos y proteolíticos, aunque con la mayoría de los alimentos no suelen producir olores repugnantes ni los convierten en alimentos de aspecto desagradable.

d) Métodos convencionales para el recuento e identificación de *S. aureus* en alimentos

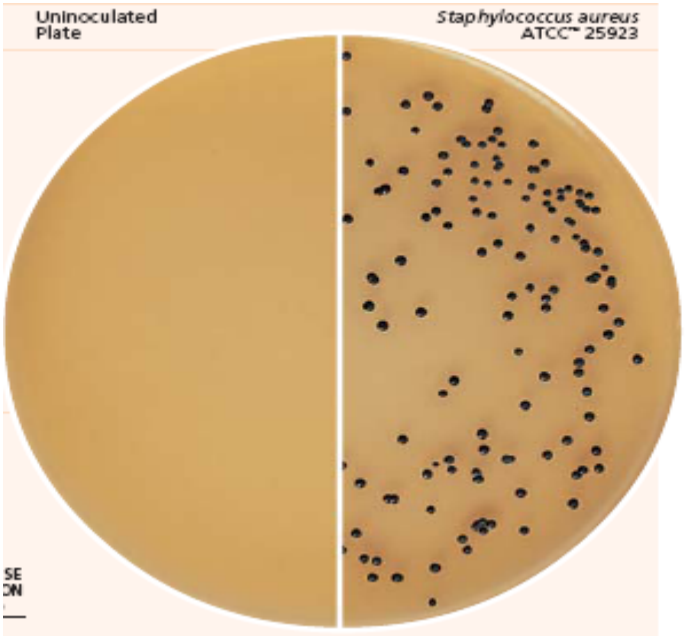
Actualmente existen una gran variedad de medios y técnicas para el recuento de *S. aureus* en alimentos, los más importantes son:

1) Agar Baird Parker suplementado con emulsión de yema de huevo y telurito de potasio. [23]

Es el método de recuento más comúnmente usado en los laboratorios de Microbiología de alimentos. Es un medio selectivo para el aislamiento y enumeración de estafilococos coagulasa (+) provenientes de alimentos, piel, tierra y otros materiales. También puede ser usado para la identificación de estafilococos sobre la base de su habilidad para degradar la emulsión de yema de huevo.

El agar Baird Parker contiene peptona, extracto de carne y levadura como fuentes de nitrógeno, carbono, azufre, vitaminas y trazas minerales. El piruvato de sodio es incorporado para estimular el crecimiento de *S. aureus*, el telurito añadido posteriormente es toxico para otras bacterias que también aclaren la emulsión de yema de huevo, además *S. aureus* reduce el telurito para formar colonias brillantes que van desde un plomo a negro [24]. La adición de emulsión de yema de huevo se la realiza para enriquecer el medio y además ayuda a la identificación de *S. aureus* por la acción de la lecitinasa que se caracteriza por la presencia de zonas claras alrededor de las colonias. La glicina y el cloruro de litio tienen acción inhibitoria para otro tipo de bacterias.

FIGURA 3: COLONIAS CARACTERÍSTICAS DE *S. aureus* EN AGAR BAIRD PARKER SUPLEMENTADO



FUENTE: Difco™ Baird-Parker Agar Base with EY Tellurite Enrichment

Las colonias típicas de *S. aureus* son negras, brillantes, convexas y rodeadas de zonas claras de aproximadamente 2 – 5 mm (**VER FIGURA 3**). Estafilococos coagulasa negativos generalmente no crecen bien, si ocurre algo de crecimiento, las típicas zonas claras están ausentes. La mayoría de otros organismos son inhibidos pero algunas podrían crecer esparcidamente, produciendo colonias blancas o cafés sin zonas de aclaración alrededor de sus colonias.

El agar Baird Parker es selectivo para estafilococos coagulasa positivos pero otras bacterias también pueden crecer. Se recomienda utilizar los exámenes microscópicos y pruebas bioquímicas para diferenciar estafilococos coagulasa positivos de otros organismos.

Existen otros métodos alternos, pero que no están disponibles en nuestro país, o son usados para investigaciones, como ser:

2) Agar Baird Parker libre de emulsión de huevo[25]

En un estudio en 1984, se describió un medio simplificado para el recuento de *S. aureus*, esto incluye el reemplazo de la emulsión de yema de huevo por un suplemento de Tween 80 y cloruro de magnesio ($MgCl_2$), estos compuestos además del piruvato permiten la recuperación de células estresadas de *S. aureus* en un medio que contenga telurito de potasio, cloruro de litio y glicina como agentes selectivos. Las colonias negras son identificadas como *S. aureus* por una simple prueba de termonucleasa.

El medio libre de emulsión de yema de huevo suplementado con Tween 80 y Mg^{++} provee muchas ventajas: i) el medio y su eficiencia es reproducible, especialmente en situaciones en las cuales la calidad de la emulsión de yema de huevo (EY del inglés *egg yolk*) es variable. ii) la ausencia de un suplemento rico como la EY reduce el costo y la cantidad de mano de obra en la preparación del medio.

Los efectos estimulatorios de Tween 80 y Mg^{++} a las células estresadas de *S. aureus* se dan a nivel de la membrana citoplasmática y ribosomal ya que son los primeros sitios dañados. El efecto estimulatorio de Tween 80 probablemente se debe a la presencia de oleato en una forma no tóxica para la reparación de la membrana celular dañada, donde los lípidos y fosfolípidos están localizados. Los altos niveles de Mg^{++} pueden ser requeridos para la reparación de los ribosomas dañados como una consecuencia de una pérdida de Mg^{++} después del estrés.

3) Placa 3M™ Petrifilm™ Staph Express para recuento de *S. aureus* [26]

La enumeración de S. aureus se utiliza a menudo como indicador de la calidad y seguridad de los alimentos. La placa y

el disco 3M™ Petrifilm™ Staph Express para cuenta de *S. aureus* se han desarrollado para proporcionar un resultado cuantitativo de esta bacteria en un plazo de 22 a 29 horas. El desempeño del método fue demostrado al comparar las cuentas en los alimentos usando la placa 3M Petrifilm y el método de referencia en agar Baird Parker seguido por la prueba coagulasa en colonias seleccionadas.

El Método Petrifilm consta de tres sencillos pasos:

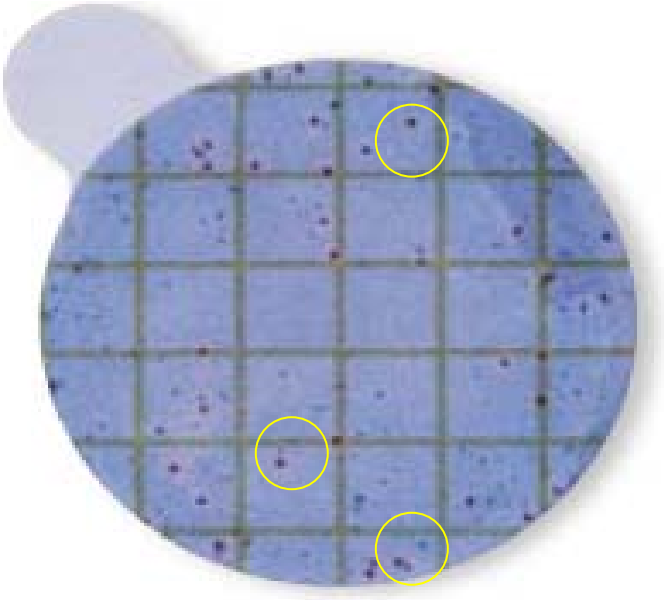
- Inoculación
- Incubación
- Interpretación

Después de inocular 1 ml de la muestra, la placa se incuba a 35 °C ± 2 °C de 22 a 24 horas. Después, la placa está lista para la interpretación. Si *S. aureus* está presente en la muestra se verán colonias rojo-violetas distintivas (**VER FIGURA 4**) en tan sólo 22 ± 2 horas. Esto elimina la necesidad de seleccionar colonias y realizar la prueba de coagulasa para la confirmación.

El medio de cultivo de la Placa 3M Petrifilm Staph Express es específico para estafilococo, por lo que previene el crecimiento de otros microorganismos que, en un medio Baird Parker tradicional, podrían desarrollarse.

Sin embargo, cuando el alimento tiene altas concentraciones de carga microbiana es probable que otros microorganismos se presenten en la placa además de las colonias rojo – violeta; estas colonias generalmente aparecen como colonias negras o azul – verdosas. Cuando esto sucede, se debe emplear el Disco 3M Petrifilm Staph Express para distinguir S. aureus (colonias rojo – violetas) de las otras colonias sospechosas.

FIGURA 4: COLONIAS CARACTERÍSTICAS DE *S. aureus* EN LA PLACA 3M™ PETRIFILM™ STAPH EXPRESS



FUENTE: www.3m.com/microbiologia

El DNA presente en el disco reacciona con la enzima DNAsa que producen las colonias de *S. aureus*. Al mismo tiempo, la enzima DNAsa se combina con la O-toluidina del disco y se forman las zonas rosadas que confirman la presencia del estafilococo. Cuando sea necesario realizar el paso confirmatorio con el disco, se incuba la placa con el disco insertado de 1 a 3 horas (no más) a la misma temperatura (35 °C ± 2 °C).

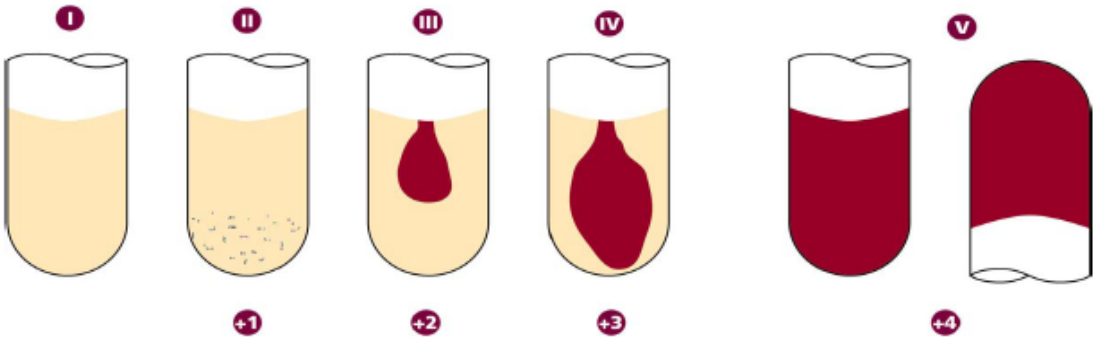
4) Método de la coagulasa para identificación de *S. aureus*

Los *S. aureus* producen coagulasa, una proteína similar a una enzima que coagula el plasma oxalatado o citratado en presencia de un factor del suero. El factor sérico reacciona con la coagulasa para generar esterasas y actividad de coagulación de manera similar a la activación de la protrombina a trombina. La acción de la coagulasa evita la cascada de la coagulación normal del plasma. La coagulasa puede depositar fibrina sobre la superficie de los estafilococos, alterando talvez su ingestión

por células fagocíticas o su destrucción dentro de dichas células. Se considera que la producción de coagulasa es sinónimo de patógeno potencialmente invasor.

Para la confirmación de *S. aureus* se debe transferir 0,2 mL de cultivo en caldo BHI dentro de tubos estériles que contengan 0,5 mL de plasma, luego incubar a 35 ºC y examinar después de 1 hora y luego de 4 horas. No agitar los tubos durante la incubación. Los tubos negativos deben ser incubados toda una noche a temperatura ambiente y luego ser observados. Distintos grados de coagulación, como se muestran en la **FIGURA 5**, son consideradas reacción positiva a la coagulasa. Un coágulo firme que no presente movimiento cuando el tubo es inclinado (reacción coagulasa 4+) es considerado una prueba positiva para *S. aureus* y no se requiere de otras pruebas confirmatorias. Y si no hay reacción coagulasa la bacteria aislada no es *S. aureus* y tampoco se necesitan otros pasos confirmatorios.[27]

FIGURA 5: PRUEBA DE LA COAGULASA



FUENTE: HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH OTTAWA. MFO-22 July 2002

5) Pruebas confirmatorias adicionales para *S. aureus*

Por lo menos una de las siguientes pruebas adicionales se deben realizar:

- Utilización anaerobia de glucosa, se inocula el cultivo a ser analizado en un tubo con medio que contenga glucosa al 0,5%, luego incubar a 35 ºC por 18 – 24 horas. El cambio de color indica una reacción ácida que es prueba positiva para *S. aureus*.
- Utilización anaeróbica de manitol, en este caso la fuente de carbohidratos es el manitol y *S. aureus* da reacción positiva.
- Sensibilidad a lisostafina, se debe inocular el cultivo a testear en 0,2 mL de tampón salino fosfato (PBS). Luego transferir la mitad de la suspensión a otro tubo y mezclar con 0,1 mL de PBS, esto servirá como un control negativo. Añadir 0,1 mL de solución de lisostafina al tubo original y llevar a una concentración de 25 mg de lisostafina por mL de suspensión celular. Incubar ambos tubos a 35 ºC por más de dos horas. Si la turbidez se aclara en el tubo que contiene células más lisostafina y no hay aclaración en el tubo control, la prueba es positiva para *S. aureus*. Si el aclaramiento no ha ocurrido en dos horas, la prueba es negativa.
- Prueba de la termonucleasa [28], La detección de la desoxirribonucleasa termoestable estafilocócica (termonucleasa) en los alimentos, se utiliza como una prueba indirecta de la presencia de grandes cantidades de *Staphylococcus aureus* en los alimentos, así como de la posible formación de enterotoxina estafilocócica. La producción de esta enzima se inhibe en anaerobiosis y se estimula por la presencia de oxígeno, requiere iones calcio para su actividad enzimática, posee un pH óptimo de 8,6 y se precipita de cultivos fluidos con sulfato de amonio. Su termoestabilidad (resiste temperatura de 130 ºC por 16,6 min) es la única asociación con el crecimiento de *S. aureus*. Esta relación ha motivado el desarrollo de diferentes métodos para detectar

esta enzima en el alimento y utilizarla como pesquisa en los alimentos susceptibles a la contaminación de *S. aureus.*

e) Enterotoxinas estafilocócicas y pruebas para su identificación

1) Enterotoxinas

Son proteínas de cadena simple no ramificada compuestas por cantidades relativamente grandes de lisina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico. Los pesos moleculares oscilan entre 28 000 y 35 000 daltons, son solubles en agua y presentan una alta termoestabilidad. La producción de enterotoxinas por cepas de *Staphylococcus aureus* se afecta por la calidad de los nutrientes y el pH del sustrato, la temperatura, la atmósfera, el cloruro de sodio, otros compuestos químicos y los microorganismos competidores. Los alimentos de mayor riesgo asociados con los brotes de intoxicación alimentaria son las ensaladas frías, productos avícolas (principalmente ensalada de pollo), pasteles con crema, productos lácteos (principalmente quesos) y el jamón sobre todo el cocido o alimentos elaborados con éste.

Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por cepas muy específicas; sin embargo, una de ellas es capaz de sintetizar más de un serotipo de enterotoxinas. Actualmente se diferencian por su actividad serológica no menos de 7 enterotoxinas que se designan A, B, C_1, C_2, C_3, D y E. La enterotoxina del serotipo A es la que con más frecuencia aparece en los brotes de intoxicación alimentaria y le siguen en orden decreciente las de los serotipos C_1, B, D y E.[29]

Actualmente se han descrito otras enterotoxinas como ser los tipos G, H, I, J, K, L, M, N y O.[30]

Se conoce poco acerca del mecanismo de acción de las enterotoxinas estafilocócicas y el cómo causan los síntomas de la intoxicación alimentaria, se cree que tendrían un efecto directo sobre el epitelio intestinal y sobre el nervio vago, causando de esta manera una estimulación del centro emético y del tránsito intestinal. La dosis de infección requerida para inducir la intoxicación alimentaria por *S. aureus* en humanos es estimado alrededor de 0,1 ug y puede variar de acuerdo a la sensibilidad del paciente.

2) Métodos para su identificación

Los alimentos contaminados suelen tener altos niveles de estafilococos enterotoxigénicos (10^6 UFC/g). Los alimentos involucrados deben ser analizados para ver si el estafilococo está presente. La presencia de un número importante de estafilococos en el alimento permite sospechar que la toxina está presente.

La prueba más concluyente es la detección de la toxina en las muestras de los alimentos sospechosos. Se han desarrollado y utilizado con éxito en el diagnóstico de la enfermedad varios métodos serológicos para determinar la entero – toxigenicidad de *S. aureus* aislado de los alimentos, así como métodos para separar y detectar la toxina. Para detectar residuos de la enterotoxina estafilocócica en los alimentos supuestamente implicados en un brote de la enfermedad, la toxina debe ser separada y concentrada antes de procederse a la identificación con el antisuero (anti – enterotoxina). Se han desarrollado métodos rápidos basados en anticuerpos monoclonales (ELISA, Reverse Passive Latex Agglutination), que permiten detectar aproximadamente 1,0 nanogramo de toxina por gramo de alimento.

- Método de aglutinación pasiva y reversa en látex (RPLA del inglés *Reverse Passive Latex Agglutination*): este método es aplicable para la determinación de la producción de enterotoxina por *S. aureus* en alimentos, ingredientes alimentarios y cultivos en caldo. Los alimentos implicados en intoxicaciones estafilocócicas suelen contener menos de 10 ng de toxina por gramo de alimento, para detectar estos niveles bajos de enterotoxina sin utilizar métodos de concentración, se puede utilizar este método directamente ya que presenta un anticuerpo específico que recubre partículas de poliestireno, este método es capaz de detectar las enterotoxinas del tipo A, B, C y D. [31]

- Ensayo inmunoadsorbente ligado a enzimas (ELISA del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*): vienen en Kits para la detección de enterotoxinas totales (SETs) de *Staphylococcus aureus* en alimentos y sobrenadantes de cultivos. El método más usado es el ELISA tipo sandwich en microplaca. Es un test cualitativo y el limite de detección de enterotoxinas totales (A, B, C1, C2, C3, D y E) es de 0,25 a 1,0 ng/g en función del tipo de alimento.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *Polimerase Chain Reaction*): las enterotoxinas estafilocócicas son termoestables y resistentes a la acción de enzimas digestivas. Los tipos más comunes de estas enterotoxinas son SEA – SEE. Cepas aisladas que son portadoras de los genes *sea – see* para la síntesis de las toxinas son responsables del 95% de los brotes de intoxicación alimentaria. Mediante este método se puede determinar la presencia de los genes A (*sea*), B (*seb*) C (*sec*), D (*sed*) and E (*see*) en aislados de *S. aureus* recuperados de alimentos.

- Otros métodos: actualmente existen en el mercado una variedad de métodos, principalmente inmunológicos, para el diagnóstico de las enterotoxinas, como ser la inmunocromatografía, radioinmunoensayo y hemaglutinación.

3. INTOXICACIÓN ALIMENTARIA POR *S. aureus*

a) Alimentos implicados

En todos los casos de intoxicación alimentaria por estafilococos el alimento o alguno de sus ingredientes estaban contaminados con cepas de *S. aureus* enterotoxigénico y estaban expuestos a temperaturas que permiten el desarrollo de *S. aureus*. Muchas veces los alimentos llegan a esa temperatura por un fallo en el proceso de refrigeración o porque una temperatura que permite su desarrollo es requerida durante su procesamiento (por ejemplo la fabricación del queso). Muchos alimentos pueden ser un medio adecuado para el crecimiento de *S. aureus* y han sido implicados en la intoxicación alimentaria estafilocócica incluyendo leche y crema, pasteles rellenos con crema, mantequilla, jamón, queso, salchichas, carne enlatada, ensaladas, carnes cocidas y sándwiches rellenos. Varios ejemplos de intoxicaciones alimentarias por estafilococos han sido descritos en la literatura. En un caso, el queso estaba implicado en un brote porque fue hecho de leche contaminada después de su pasteurización, la pasteurización mata a los estafilococos pero no tiene efecto sobre las enterotoxinas. Es importante eliminar las posibles fuentes de contaminación durante el procesamiento y refrigeración del alimento o alguno de sus ingredientes. Los productos pueden ser refrigerados antes o después de los tratamientos con calor

(pasteurización). En el caso de los alimentos enlatados que han sido correctamente procesados, la bacteria y la enterotoxina son usualmente destruidos.

En algunos casos las principal fuente de contaminación son los humanos (los manipuladores contaminan el alimento vía contacto manual o por vía respiratoria ya sea tociendo o estornudando) y la contaminación ocurre después del tratamiento por calor del alimento. Sin embargo en alimentos como la carne cruda, salchichas, leche cruda y queso elaborado con leche cruda, la contaminación es de origen animal y frecuentemente debido a que el animal es portador de la bacteria o esta infectado (por ejemplo la mastitis en vacas).

El crecimiento del *S. aureus* en los alimentos se ve facilitado si se eliminan los microorganismos competidores, que no soportan las altas temperaturas, altas presiones osmóticas o humedad relativamente baja. Debido a ello, hay ciertos alimentos asociados con elevadas incidencias de intoxicación estafilocócica, como son las natillas y las cremas de pastelería (es una emulsión de aceites vegetales, leche o leche en polvo, huevo y azúcar[32]), de presión osmótica relativamente alta y con zonas de escasa humedad, o el jamón, que contiene muchas sales y saborizantes, que inhiben a los microorganismos competidores pero no a los estafilococos.

b) Aspectos clínicos [22] (**VER FIGURA 6**)

La contaminación de alimentos por *S. aureus*, está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por un cuadro caracterizado por vómitos (76% de casos) y diarrea (77% de casos). El corto período de incubación de 1 – 6 horas orienta a la sospecha de enfermedad producida por ingestión de una o más enterotoxinas preformadas en el alimento que ha sido contaminado con cepas de *S. aureus* productor de la misma.

Raramente se observan signos de toxicidad sistémica, tales como fiebre e hipotensión

En general, es un cuadro autolimitado que típicamente se resuelve en 24 – 48 horas desde el inicio.

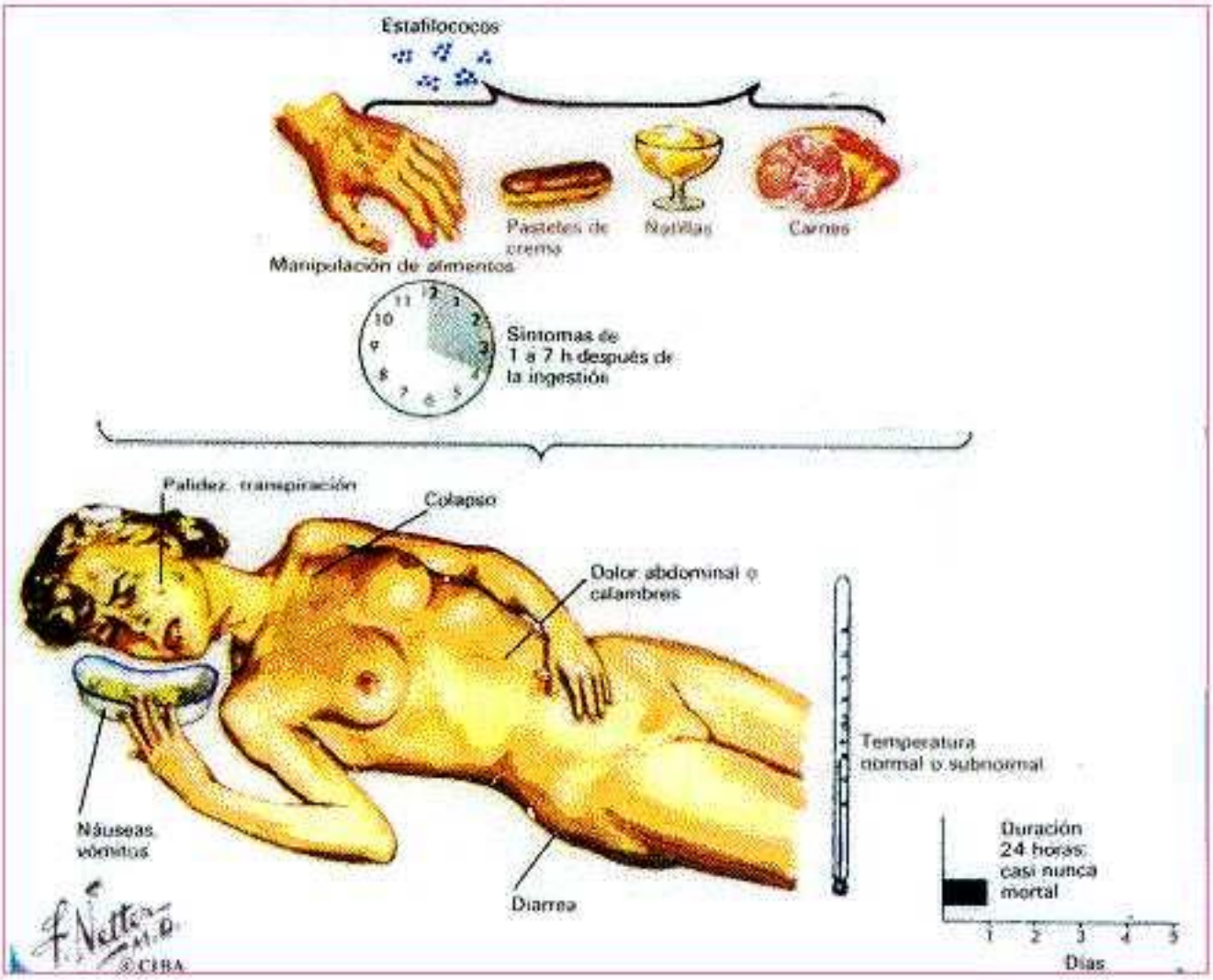
No está claro si en humanos se desarrolla inmunidad a largo plazo, pero anticuerpos frente a una SE (enterotoxina estafilocócica, del inglés *Staphylococal Enterotoxin*) no necesariamente confieren inmunidad frente a la intoxicación por *S. aureus,* ya que existe múltiples SE capaces de producir enfermedad. En algunos casos, anticuerpos producidos frente a una SE confieren protección cruzada contra otra SE, ya que algunas comparten epítopes.

Todas las SE son capaces experimentalmente en primates de producir emesis, y no se registra enterotoxemia, excepto en dosis muy altas, probablemente debido a su dificultad para atravesar mucosas.

El 99% de casos de intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocóccicas está asociado a *S. aureus* y ocasionalmente se reportan casos por *Staphylococcus epidermidis.*

Las cepas estafilocóccicas enterotoxigénicas aisladas de alimentos implicados en brotes de infección son mas a menudo lisadas por fagos del grupo III, y menos frecuentemente simultáneamente por los grupos I y III.

FIGURA 6: ALIMENTOS COMÚNMENTE CONTAMINADOS CON *S. aureus* Y ASPECTOS CLÍNICOS



FUENTE: ©2005 Laboratorio de Tecnología Educativa. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

c) <u>Patogenia</u> [22]

El sitio blanco de acción de las enterotoxinas que origina el reflejo emético está localizado en la víscera abdominal, donde existen receptores celulares para SE. Debido a que estos receptores no han sido identificados resta mucha incertidumbre con respecto a los eventos tempranos en la patogenia de la intoxicación por S. aureus.

La hipótesis más sustentada argumenta que los vómitos ocurren en respuesta a la inflamación inducida por las enterotoxinas. Los síntomas están altamente correlacionados con la producción de un gran número de mediadores de la inflamación, incluyendo prostaglandina E2, leucotrieno B4, y ácido 5-hidroxicicosatetraenoico.

No está claro si estos mediadores son generados directa o indirectamente en respuesta a las SE.

En última instancia, la respuesta emética a las SE es dependiente de la activación del centro del vómito en el tronco encefálico, el cual es estimulado por impulsos trasmitidos desde el vago y nervios simpáticos.

d) Tratamiento [22]

Como para la mayoría de enfermedades trasmitidas por alimentos autolimitadas, las medidas de sostén son la base del tratamiento. No está indicado tratamiento con antimicrobianos.

Una cuidadosa preparación de los alimentos puede prevenir la contaminación alimentaria por estafilococos. Cualquiera que tenga una infección estafilocócica en la piel, como forúnculos o impétigo, infecciones en el tracto respiratorio, no debe manipular alimentos para otros hasta que se encuentre libre de la infección.

El tratamiento generalmente consiste en beber líquidos adecuados. Cuando los síntomas son graves, el médico puede administrar inyecciones o prescribir supositorios para ayudar a controlar las náuseas. A veces, la pérdida de líquidos es tal que se tienen que reponer por vía intravenosa. La administración rápida de líquidos y electrólitos por vía intravenosa a menudo proporciona una gran mejoría.

III. DISEÑO METODOLÓGICO

A. POBLACIÓN

La población de estudio estuvo constituida por 60 muestras de pasteles con relleno de crema de expendio en la ciudad de La Paz durante los meses de enero y agosto del año 2006. 30 muestras fueron recolectadas de puestos ambulantes y las otras 30 fueron recolectadas de pastelerías con local fijo.

Las muestras fueron recolectadas de las zonas Pampahasi, San Isidro, Obrajes, Vino Tinto, Puente Topater, La Portada, Max Paredes, Cementerio, Pérez Velasco, Calatayud, Kollasuyo, Alonso de Mendoza, Cota Cota, San Miguel y Calacoto.

B. DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN [33]

La ciudad de La Paz se levanta en un valle de 18724 hectáreas urbanizadas, con pendientes variables bajas y medias y accidentes geográficos típicos de una cuenca.

La ciudad tiene una excepcional configuración topográfica, ubicada en una altitud que oscila entre los 3200 y 4000 metros sobre el nivel del mar. Esta ubicación la convierte en una de las pocas ciudades asentadas sobre tal desnivel y de allí se derivan sus particularidades climatológicas y topográficas.

La ciudad se encuentra situada en una zona intertropical de 16º 30’ de latitud sud y 68º 08’ de longitud oeste. Por su latitud, se encuentra ubicada en la zona tórrida ecuatorial, con un grado de radiación pronunciado, que se incrementa con radiación ultravioleta por la baja densidad atmosférica presente.

La temperatura media anual es de 16º C y varía desde los 7,8º C en el mes de julio (invierno) y 16,7º C en el mes de diciembre (verano). Las

temperaturas máximas evolucionan poco a lo largo del año de 20º C (octubre) a 15º C (junio-julio), con un máximo absoluto en noviembre, una ligera disminución en verano debido a la cobertura nubosa, un ligero máximo en abril debido a la mejora del asolamiento y un mínimo absoluto en el mes de julio.

La estación húmeda se extiende generalmente durante cuatro meses, de diciembre a marzo, con el 70% de las precipitaciones anuales. La sequedad es casi absoluta de mayo a agosto. La estación seca es interrumpida entre septiembre y noviembre por algunos periodos lluviosos de corta duración (1 a 3 días). En la zona urbanizada de La Paz, las diferencias registradas son débiles y poco significativas (10% a 15%) a la escala anual. La humedad relativa al igual que las otras variables climáticas, varía estacionalmente, mostrando los valores más altos durante los meses de enero y febrero, relacionados totalmente con los eventos de lluvia.

La presión barométrica, referida al barómetro de mercurio, tiene un comportamiento relativamente más homogéneo respecto a las ciudades costeras. La presión media anual es de 493,5 mm Hg, muy por debajo de la presión a nivel del mar de 760 mm Hg.

C. DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE INVESTIGACIÓN

Este estudio se realizó en el laboratorio de la Unidad de Microbiología de Alimentos dependiente del Instituto de Servicios en Laboratorio e Investigación en Salud (SELADIS) que se encuentra ubicado en la avenida Saavedra # 2224, su teléfono de referencia es el 2222436 (interno 108). El mencionado Instituto es dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés, con sede principal en la ciudad de La Paz – Bolivia.

D. METODOLOGÍA Y TÉCNICAS

El método utilizado fue el cultivo bacteriológico en placa para recuento de *S. aureus*, técnica que tiene una sensibilidad de por lo menos 20 UFC/g y se encuentra normalizado dentro la Norma Boliviana NB 33004

Este método se basa en la siembra en superficie de un volumen determinado de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de la muestra (pastel con crema) en agar Baird Parker, y el desarrollo de colonias negras por la reducción de telurito a teluro rodeadas de zonas claras por proteólisis de la yema de huevo, colonias características de *S. aureus*.

Posteriormente se hizo la confirmación de las colonias sospechosas mediante la prueba de la coagulasa en tubo.

En el **ANEXO 1** se ilustra un flujograma del método mencionado.

Los materiales, reactivos y equipos usados en el presente trabajo se enlistan en el **ANEXO 2**.

E. TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo es un estudio observacional, prospectivo, transversal y descriptiivo.

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El grado de contaminación de pasteles con crema por *S. aureus* fue calculado tomando como base la confirmación de las colonias sospechosas usando la prueba de la coagulasa en tubo. Los resultados se expresaron como muestras fuera de Norma y dentro de norma y sus respectivos porcentajes.

IV. RESULTADOS

A. CONTAMINACIÓN CON *S. aureus* EN PASTELES CON CREMA EN PUESTOS AMBULANTES Y PASTELERÍAS

De 60 muestras recolectadas y posteriormente analizadas, el 8% (5 muestras) presentaron un recuento fuera de Norma (10 – 10^2 UFC/g según Norma Chilena), de los cuales el 3% (2 muestras) eran provenientes de puestos ambulantes y el 5% (3 muestras) eran provenientes de pastelerías con local fijo. (**CUADRO 1 Y FIGURA 7**)

Los valores encontrados fuera de Norma durante el recuento de *S. aureus* en los pasteles con crema fueron los siguientes:

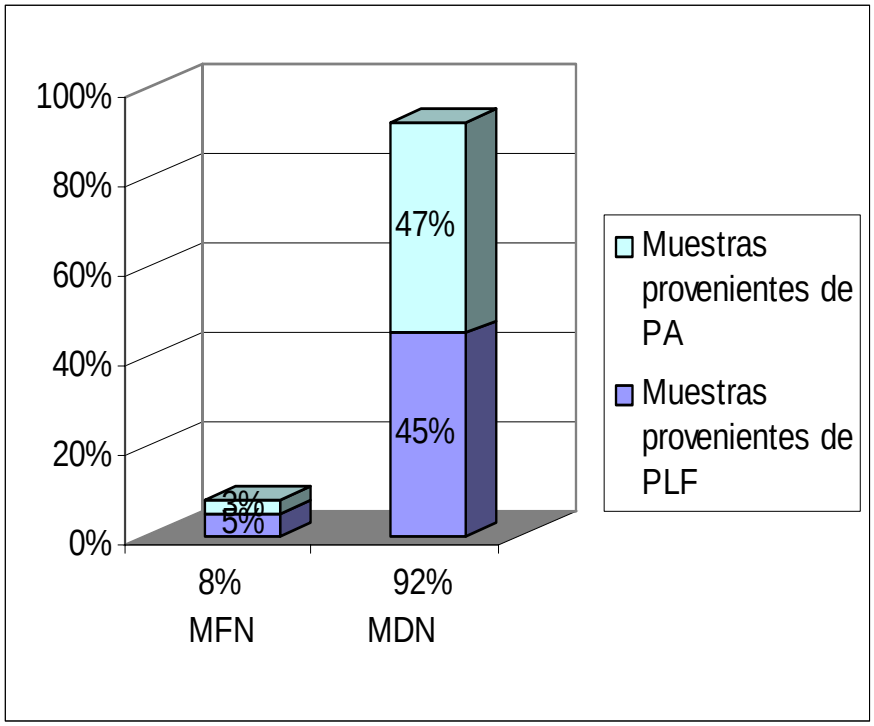
- $6{,}04 \times 10^3$ UFC/g (proveniente de pastelería con local fijo)
- $6{,}53 \times 10^3$ UFC/g (proveniente de pastelería con local fijo)
- $2{,}33 \times 10^4$ UFC/g (proveniente de pastelería con local fijo)
- $1{,}17 \times 10^4$ UFC/g (proveniente de puesto ambulante)
- $3{,}50 \times 10^2$ UFC/g (proveniente de puesto ambulante)

Cuadro 1: Muestras fuera de Norma al recuento de *S. aureus*, según lugar de expendio. SELADIS. LP – Bol. Agosto 2006

	# DE MUESTRAS			PORCENTAJES		
	PLF	PA	Total	PLF	PA	Total
Fuera de Norma	3	2	5	5%	3%	8%
Dentro de Norma	27	28	55	45%	47%	92%
TOTALES	30	30	60	50%	50%	100%

(PLF = Pastelerías con local fijo; PA = Puestos ambulantes)

Figura 7: Porcentaje de muestras fuera de Norma al recuento de *S. aureus*, según lugar de expendio. SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006



(PLF = Pastelerías con local fijo; PA = Puestos ambulantes MFN = Muestras fuera de Norma; MDN = Muestras dentro de Norma)

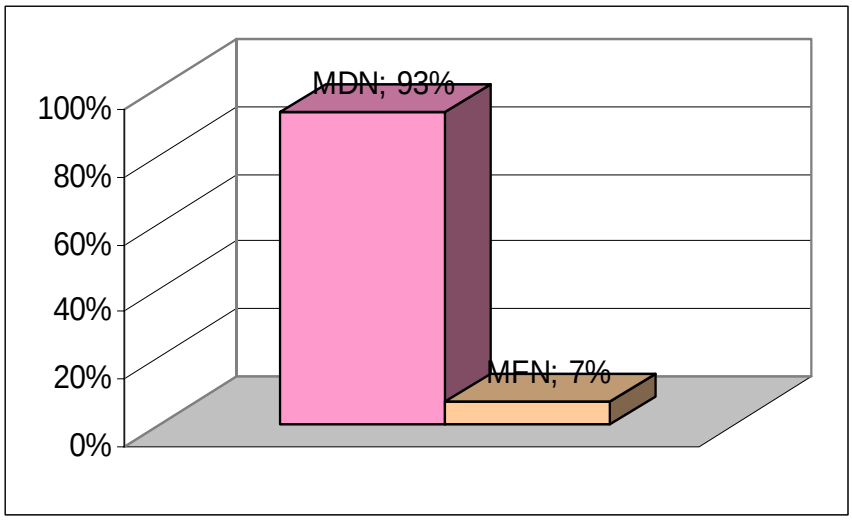
B. CONTAMINACIÓN DE PASTELES CON CREMA CON *S. aureus*, DE EXPENDIO EN PUESTOS AMBULANTES

De 30 muestras recolectadas de puestos ambulantes de las diferentes zonas de la ciudad de La Paz, después del recuento se evidenció que el 7% (2 muestras) presentaron un recuento fuera de Norma (**VER CUADRO 2 Y FIGURA 8**).

Cuadro 2: Muestras fuera de Norma al recuento de *S. aureus* en puestos ambulantes. SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006

	# DE MUESTRAS	PORCENTAJE
Fuera de Norma	2	7%
Dentro de Norma	28	93%
Total	30	100

Figura 8: Porcentaje de muestras fuera de Norma para *S. aureus* en puestos ambulantes. SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006



**(MDN = Muestras dentro de Norma
MFN = Muestras fuera de Norma)**

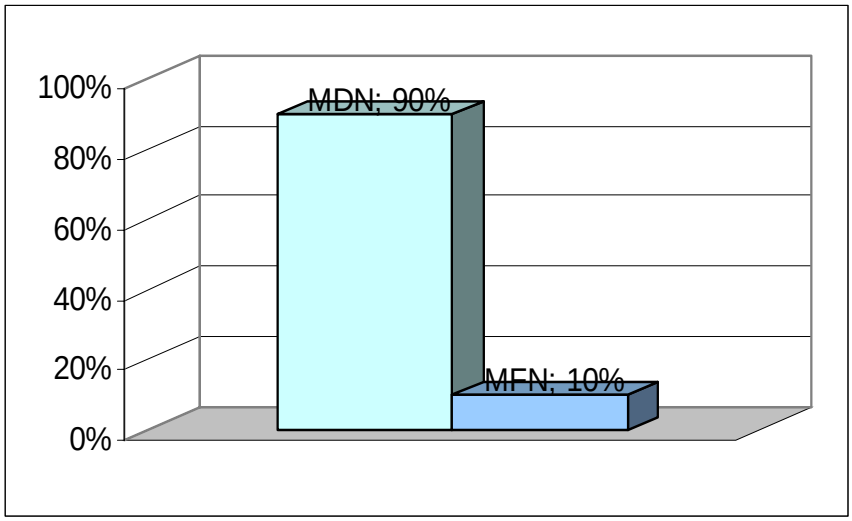
C. CONTAMINACIÓN DE PASTELES CON CREMA CON *S. aureus*, DE EXPENDIO EN PASTELERÍAS CON LOCAL FIJO

De 30 muestras recolectadas de pastelerías con local fijo ubicadas en las diferentes zonas de la ciudad de La Paz se evidenció que el 10% (3 muestras) presentaban un recuento fuera de Norma. (**VER CUADRO 3 Y FIGURA 9**)

Cuadro 3: Muestras fuera de Norma al recuento de *S. aureus* en pastelerías con local fijo. SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006

MUESTRAS	# DE MUESTRAS	%
Fuera de Norma	3	10
Dentro de Norma	27	90
Total	30	100

Figura 9: Porcentaje de muestras positivas para *S. aureus* en pastelerías con local fijo SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006



**(MDN = Muestras dentro de Norma
MFN = Muestras fuera de Norma)**

D. FACTORES DE RIESGO DE CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS FUERA DE NORMA DURANTE SU CONSERVACIÓN.

Durante el muestreo de los pasteles, se evidenció los posibles factores de riesgo durante la conservación de los pasteles, tomándose en cuenta: 1) protección contra el medio ambiente, ya sea por el uso

de mamparas de vidrio o simplemente el uso de nylon. 2) Temperatura de conservación.

Para el primer caso se evidenció que el 40% (2 muestras) estaban protegidos del medio ambiente por el uso de nylon, el otro 60% (3 muestras) estaba protegido por el uso de mamparas de vidrio. (**VER FIGURA 10**)

Para el segundo caso, el 100% (5 muestras) no se encontraban a una temperatura adecuada de conservación (refrigeradas), sino que se encontraban conservadas a temperatura ambiente. (**VER FIGURA 11**)

FIGURA 10: Porcentaje de muestras fuera de Norma según su protección contra el medio ambiente. SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006

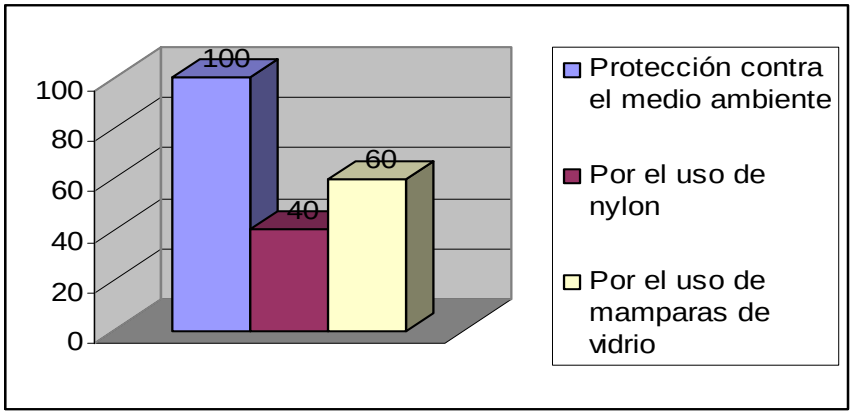
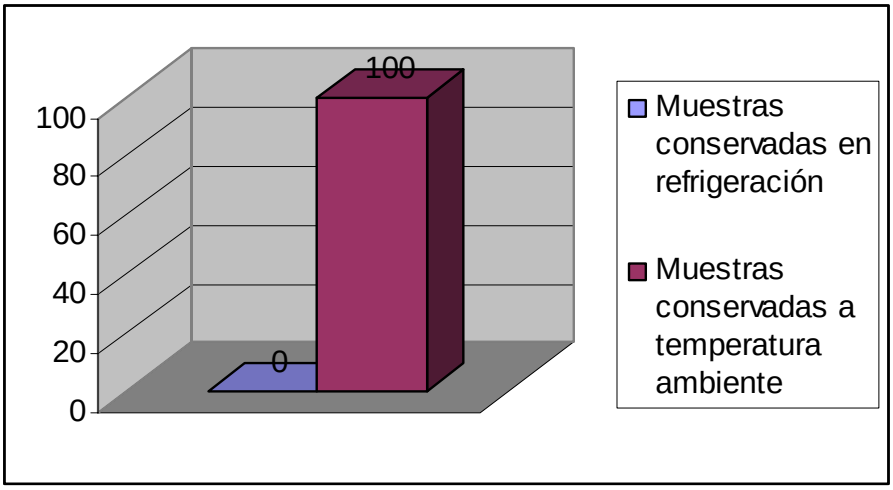


FIGURA 11: Porcentaje de muestras fuera de Norma según su temperatura de conservación. SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006

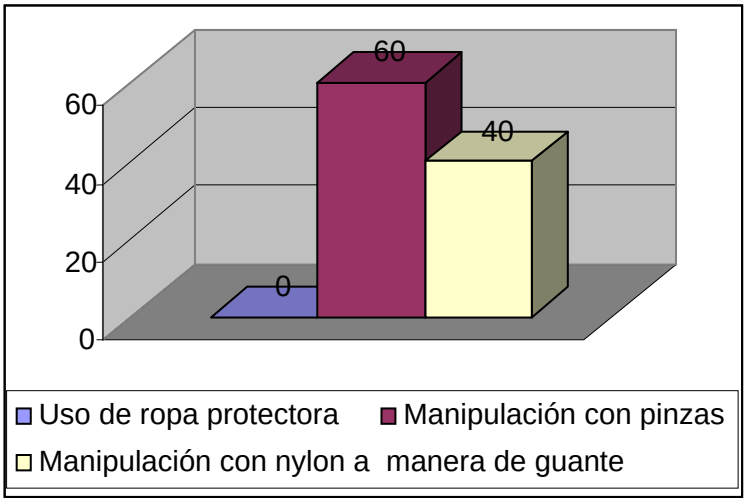


E. FACTORES DE RIESGO DE CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS FUERA DE NORMA DURANTE SU MANIPULACIÓN EN EL MOMENTO DE EXPENDIO

Para este caso, durante el muestreo se evidenció el uso de ropa protectora por parte de los vendedores (mandiles, gorras, guantes). Así como también, la manipulación de los pasteles durante su expendió (manipulación con pinzas o solamente con las manos)

El 0% de los vendedores usaban ropa protectora durante la manipulación y expendio de los pasteles. Durante la venta, la manipulación se la hacía con pinzas en el 60% (3 muestras) de los casos y en el restante 40% (2 muestras) se lo realizaba con las manos, pero estas protegidas con nylon (a manera de guante). (**VER FIGURA 12**)

FIGURA 12: Porcentaje de muestras fuera de Norma según su manipulación durante el expendio. SELADIS. LP – Bol. Agosto. 2006



V. DISCUSIÓN

El presente trabajo demostró que el grado de contaminación de pasteles con crema por *S. aureus* fue de un 8%, para su análisis se usó el método bacteriológico de recuento en placa y posterior confirmación de las colonias sospechosas con la prueba de la coagulasa, según la Norma NB 33004. Se debe destacar que este método es de fácil realización, los reactivos utilizados son de fácil preparación, accesibles y disponibles para el trabajo en cualquier laboratorio de microbiología de alimentos, pero su principal desventaja es el requerimiento de un tiempo prolongado para su lectura (aproximadamente 96 horas).

El resultado hallado en este trabajo es casi similar a los resultados de los trabajos realizados en Argentina por Lancelle y Vasek y en Cuba por Carrera et al (9,38% y 8% respectivamente, en el primer caso se procesaron muestras de leche cruda y en el segundo caso, muestras provenientes de pastelerías.

Sin embargo el resultado hallado es inferior al hallado en un trabajo realizado en Ghana por Mensah (31,9%). Cabe mencionar que en este estudio se procesaron todo tipo de alimentos y no solo se hizo énfasis en productos de pastelería. En trabajos realizados en la ciudad de La Paz, donde se trabajó con muestras de queso y leche, también se obtuvieron resultados mayores (22,5% y 36%) . Se debe tomar en cuenta que la probabilidad de desarrollo de *S. aureus* en leche y sus derivados es mayor que en los productos de pastelería debido a la presencia de mejores condiciones para su desarrollo y a la facilidad de una contaminación del alimento debido a su mayor manipulación y exposición al medio ambiente.

El resultado hallado es superior al encontrado en Hong Kong (2,22%) , en este caso también se procesaron pasteles, según mencionan en el estudio la elaboración de los pasteles era higiénica y seguía Normas para tal efecto.

Hubo mayor contaminación de los pasteles con crema por *S. aureus* en muestras provenientes de pastelerías con local fijo (10%) que en las muestras provenientes de puestos ambulantes (7%). En ambos casos las

muestras estaban mantenidas a temperatura ambiente, protegidos de la contaminación ambiental y durante su expendio no había contacto directo entre el manipulador y los pasteles. En algunos casos usaban pinzas pero estas eran de uso común y no se las almacenaba en lugares adecuados y mucho menos se realizaba una limpieza adecuada (mayor probabilidad de contaminación), en otros casos los vendedores usaban nylon en las manos (a manera de guante) para la manipulación (una pequeña disminución del riesgo de contaminación).

En el caso de las muestras que se encontraban fuera de Norma, todas presentaban recuentos inferiores para la producción de la enterotoxina ($>10^5$ UFC/g). En este trabajo no se consideró la búsqueda de enterotoxinas pero se recomienda realizar estudios posteriores de seguimiento donde se debería tomar en cuenta la búsqueda de cepas de *S. aureus* enterotoxigénico y específicamente de sus toxinas mediante métodos inmunológicos como las pruebas de aglutinación o el conocido ELISA.

VI. CONCLUSIONES

- El grado de contaminación de pasteles con crema por *S. aureus*, de expendio en puestos ambulantes y pastelerías con local fijo fue del 8%, todos los recuentos de las muestras se encontraban en un número mayor a la Norma de referencia utilizada.

- Se realizó cultivo bacteriológico para la búsqueda de *S. aureus* en pasteles con crema según su lugar de expendio. Se encontró que el grado de contaminación de los pasteles con crema recolectados de pastelerías con local fijo fue del 10% y las recolectadas de puestos ambulantes, solo fue del 7%. El porcentaje de contaminación es mayor en pastelerías con local fijo porque existe una inadecuada conservación y manipulación del pastel.

- En el caso de las muestras fuera de Norma se evidenció que el principal factor de riesgo durante su conservación es principalmente la falta de refrigeración, en el 100% de los casos.

- Se debe destacar que en el 100% de los casos si había una protección adecuada contra la posible contaminación ambiental, en el 40% la protección se lo realizaba por el uso de nylon y en el 60% mediante el uso de mamparas de vidrio, de esta manera se puede descartar este factor como posible factor de riesgo.

- En el caso de las muestras fuera de Norma se evidenció que los principales factores de riesgo para su contaminación durante la manipulación en la venta fueron la falta de uso de

ropa protectora por los vendedores en el 100% de los casos. En cuanto a la manipulación de los pasteles, en todos los casos no había contacto directo entre el manipulador y el pastel, en el 40% de los casos la manipulación era con la mano protegida con nylon (a manera de guante) y en el 60% la manipulación era mediante el uso de pinzas, este factor puede ser el principal factor de riesgo ya que la pinza era de uso común y no tenía una limpieza adecuada.

VII. RECOMENDACIONES

- Se debería realizar un seguimiento de los locales donde se hallaron muestras con recuentos fuera de Norma, para evitar posibles brotes de intoxicación alimentaria por *S. aureus*. También dar charlas o seminarios por parte del Ministerio de Salud a los elaboradores y vendedores de los productos de pastelerías, considerándose los posibles factores de riesgo de contaminación durante su elaboración, manipulación y conservación para así tratar de eliminar el problema de raíz.

- Se recomienda realizar trabajos posteriores donde se pueda considerar la determinación de otros posibles factores de riesgo no incluidos en este trabajo, como ser la presencia de heridas en las manos de los vendedores, presencia de infecciones respiratorias, el procedimiento de la elaboración, etc. También se podría determinar la presencia de enterotoxinas producidas por algunas cepas de *S. aureus*, para tal motivo se podrían utilizar pruebas inmunológicas.

- Ya se debería contar con un Código Alimentario completo en nuestro país que fije los rangos establecidos de los microorganismos en alimentos y aguas. Ya que actualmente se trabaja con Normas extranjeras que en algunos casos son ajenos a nuestra realidad y pone en riesgo la salud de la población en general.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

[1] ADWAN, Ghaleb et al. Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in Raw Milk in the North of Palestine. *Scientific Journals* [en línea]. 2005, vol. 29. [Fecha de consulta: 9 febrero 2006]. Disponible en http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-05-29-4/biy-29-4-6-0506-13.pdf.

[2] KENNETH TODAR UNIVERSITY OF WISCONSIN – MADISON. *Staphylococcus* [en línea], 2005. Madison, EEUU. [Fecha de consulta: 2 febrero 2006]. Disponible en: http://textbookofbacteriology.net/staph.html

[3] AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. *Estafilococos, intoxicación alimentaria* [en línea]. Red Book online. [Fecha de consulta: 22 octubre 2005]. Disponible en: http://aapredbook.aappublications.org/cgi/spanish_pdf/2003/1/3.118.pdf?ck=nck

[4] LABORATORIO DE TECNOLOGÍA EDUCATIVA, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. *Intoxicación estafilocócica* [en línea]. 2005, España. [Fecha de consulta: 25 octubre 2005]. Disponible en: http://virus.usal.es/Web/MicroAli/Enterotoxina/SET.html#muestras

[5] MINISTERIO DE SANIDAD Y SEGURIDAD SOCIAL. *Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio de productos de confitería, pastelería, bollería y repostería* [en línea]. 19 de mayo de 1978. Madrid, España. [Fecha de consulta: 26 octubre 2006]. Disponible en: www.hvsa.es/documentos/RTS_confiteria_y_pasteleria.pdf

[6] PARRILLA Cerrillo,María C. et al. B*rotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario*. Septiembre-octubre de 1993, VOL.35, No.5

[7] *Moon cakes in Hong Kong* [en línea]. Agosto 2000, Hong Kong. Food and Environmental Hygiene Department. [Fecha de consulta: 10 octubre 2005]. Disponible en: http://www.fehd.gov.hk/safefood/report/mooncake/mooncake.pdf

[8] ALMUDENA, Antón y Rosa Amejeiras. *Toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano*.

[9] MENSAH, Patience et al. Street foods in Accra, Ghana: how safe are they?. *Bulletin of the World Health Organization* [en línea]. 2002, vol. 80, No. 7. [Fecha de consulta: 10 octubre 2005]. Disponible en: www.who.int/entity/bulletin/archives/80(7)546.pdf

[10] *Enfermedad Transmitida por Alimentos* [en línea]. Venezuela. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. [Fecha de consulta: octubre 2005].

[11] OPS – Uruguay. *Enfermedad Transmitida por Alimentos. Vigilancia de las ETA en Uruguay. Sistema VETA* [en línea]. Uruguay. [Fecha de consulta: 21 octubre 2005]. Disponible en: http://www.bvsops.org.uy/pdf/veta.pdf

[12] LANCELLE, María V. - Vasek, O. M. *Calidad microbiológica de leche cruda usada en queserías de la Provincia de Corrientes* [en línea]. Corrientes, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, UNNE. [fecha de consulta: 25 octubre 2005]. Disponible en: http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/08-Exactas/E-008.pdf

[13] CARRERA, Jose Antonio et al. Vigilancia de Staphylococcus y Salmonella en alimentos. *Revista Cubana sobre Alimentación y Nutrición* [en línea]. 1998, vol. 12. No. 1. [Fecha de consulta: 10 octubre 2005]. Disponible en: bvs.sld.cu/revistas/ali/vol12_1_98/ali03198.pdf

[14] GRILLO Rodríguez, Manuel et al. Análisis de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Cuba. *Revista Cubana sobre Alimentación y Nutrición* [en línea]. 1996, vol. 10. No. 2. [Fecha de consulta: 21 octubre 2005]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/

[15] LA PRENSA - EDITORES ASOCIADOS S.A. *Los alimentos callejeros están contaminados con 4 bacterias* (en línea). La Paz - Bolivia Edición de Enero 07, 2003. [Fecha de consulta: 25 octubre 2005]. Disponible en: http://www.laprensa.com.bo/noticias/

[16] YAÑIQUEZ, Irene. *Determinación del grado de contaminación por microorganismos patógenos en el queso criollo*. Tesina (Licenciado en Ciencias Bioquímicas). La Paz, Bolivia, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. 1999.

[17] ABERANGA, Gimena. *Determinación de S. aureus enterotoxigénico tipo A en leche y queso mediante la técnica PCR*. Tesis (Licenciado en Ciencias Bioquímicas). La Paz, Bolivia, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. 2003

[18] Montíveros Zapata, Daisy. *Vigilancia de contaminantes microbiológicos en alimentos, año 2005* [disquete]. Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA). [Fecha de consulta: 26 marzo 2007]. Cortesía Dra. Maria Rosa Pantoja

[19] OPS/OMS – Uruguay. *Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)* [en línea]. Uruguay. [Fecha de consulta: 10 octubre 2005]. Disponible en: www.bvsops.org.uy/pdf/etas.pdf

[20] *Técnicas de detección de infección microbiana en alimentos* [en línea]. Parlamento Europeo. Marzo 2001. [Fecha de consulta: 10 octubre 2005].

[21] BROOKS, Geo; BUTEL, Janet y MORSE, Stephen. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 17ª. ed. México. Editorial El Manual Moderno. 2002. 844 p.

[22] Acuña A et al. *Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay. Food communicable diseases in Uruguay* [en línea]. 2002. Montevideo – Uruguay. [Fecha de consulta: 10 octubre 2005]. Disponible en: http://www.bvsops.org.uy/pdf/aureus.pdf

[23] DIFCO. *Difco™ EY Tellurite Enrichment* [en línea]. [Fecha de consulta: 9 febrero 2006]. Disponible en: http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Baird_Parker_Agar_Base_and_EY_Tellurite_Enrichment1.pdf

[24] HEALTH PROTECTION AGENCY. *Baird Parker Agar* [en línea]. 2004. Inglaterra. Publication Type Standard Operating Procedures. Fecha de publicación 01/05/2005. Fecha de última revisión 05/11/2005. [Fecha de consulta: 9 febrero 2006]. Disponible en: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/msop/pdf/msop21.pdf

[25] LACHICA, Víctor. Egg Yolk-Free Baird-Parker Medium for the Accelerated Enumeration of Foodborne *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology* [en línea]. 1984, Vol. 48, No. 4. [Fecha de consulta: 9 febrero 2006]. Disponible en: http://aem.asm.org/cgi/reprint/48/4/870

[26] 3M MICROBIOLOGÍA. *Placa 3M™ Petrifilm™ Staph Express para Recuento S. aureus* [en línea]. 2004, México. [Fecha de consulta: 25 octubre 2005]. Disponible en: http://cms.3m.com/cms/MX/es/0-253/kReRrFQ/view.jhtml

[27] *Enumeration of Staphylococcus aureus in cheese*. [en línea]. Ottawa, Canada. Microbiology Research Division Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate Health Canada. Julio 2002. [Fecha de consulta: 9 febrero 2006]. Disponible en: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1/mfo22_e.html

[28] BÉCQUER, Armando. Detección de la desoxirribonucleasa termoestable (termonucleasa) directamente en el alimento. *Revista Cubana sobre Alimentación y Nutrición* [en línea]. 1996, vol. 10. No. 2. [Fecha de consulta: 31 enero 2007]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali05296.htm

[29] BÉCQUER, Armando. Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. *Revista Cubana sobre Alimentación y Nutrición* [en línea]. 1996, vol. 10. No. 2. [Fecha de consulta: 9 febrero 2006]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali12296.htm

[30] LE, Yves et al. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* [en línea]. 2003, Vol. 2, No. 1. [Fecha de consulta: 9 febrero 2006]. Disponible en: http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/pdf/sim0009.pdf

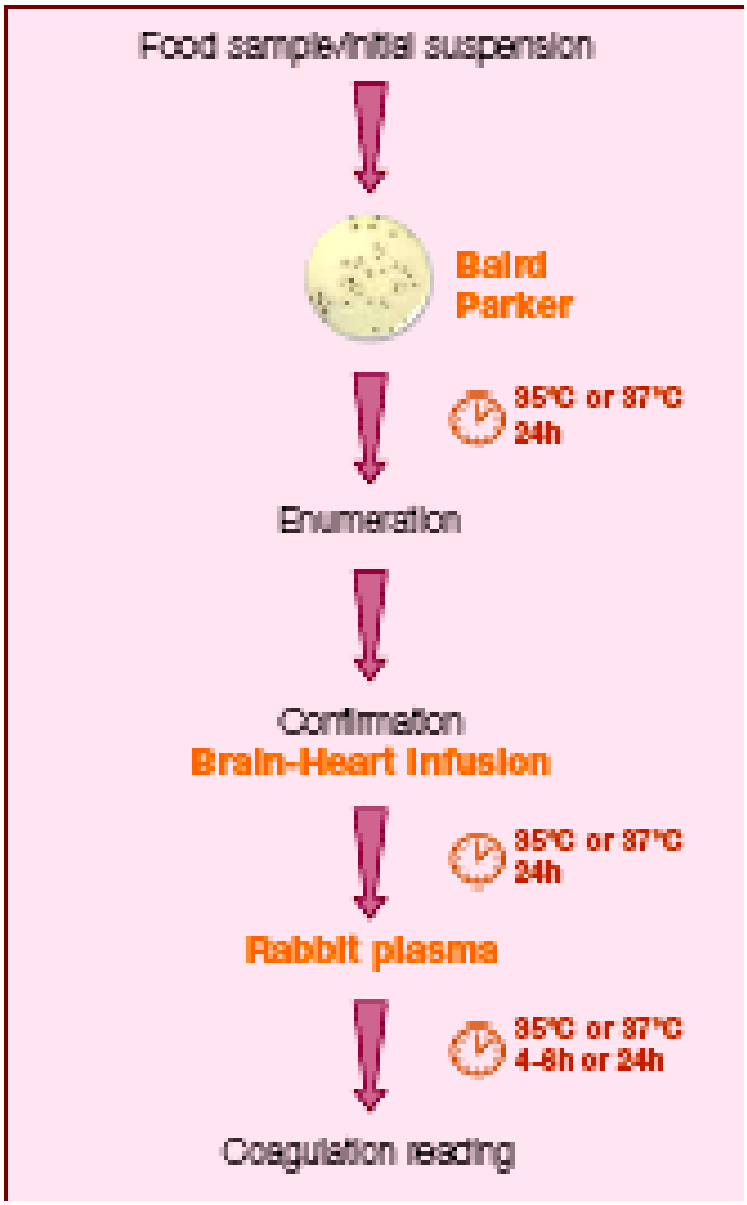
[31] *Determination of enterotoxin production by Staphylococcus aureus in foods and broth media [the reversed passive latex agglutination (RPLA) method*] [en línea]. Ottawa, Canada. Microbiology Research Division Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate Health Canada. Agosto 2005. [Fecha de consulta: 10 octubre 2005]. Disponible en: www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mflp67_e.pdf

[32] MICROSOFT CORPORATION. *Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ® 2005* [CD – ROM]. c2004. Reservados todos los derechos. Programa computacional.

[33] Gobierno Municipal de La Paz. www.ci-lapaz.gov.bo

ANEXOS

ANEXO 1
FLUJOGRAMA SOBRE LA METODOLOGÍA USADA PARA EL RECUENTO DE *Staphylococcus aureus* MEDIANTE CULTIVO BACTERIOLÓGICO EN PLACA



FUENTE: **ISO 6888-1 (07/2003)**
Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive *staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and other species)

ANEXO 2
MATERIALES, EQUIPOS, MEDIOS Y REACTIVOS USADOS EN EL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

A. MATERIALES

- Cajas Petri de 15 x 100 mm
- Tubos de cultivo de 150 x 15 mm
- Tubos de cultivo de 100 x 15 mm
- Gradilla para tubos
- Pipetas de vidrio de 10 mL
- Pipetas de vidrio de 2 mL
- Pipetas de vidrio de 1 mL
- Asas de Drigalsky
- Propipetas
- Utensilios (cucharas y cuchillos)
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL
- Bolsas para Stomacher
- Frascos de boca ancha con capacidad para 500 mL

Todo este material debe ser estéril.

B. EQUIPOS

- Estufa de incubación a 35 ± 2 ºC
- Autoclave
- Stomacher
- Balanza digital
- Refrigerador
- Mechero Bunsen
- Vortex

C. MEDIOS Y REACTIVOS

- Agua peptonada al 0,1%
- Agar Baird Parker (bioBRAS DIAGNOSTICAS – Brasil, Britania SA – Buenos Aires, Argentina)
- Caldo Infusión cerebro corazón (BHI)
- Plasma obtenido con EDTA preferentemente de conejo
- Emulsión de yema de huevo al 50%
- Solución de telurito de potasio (OXOID – Culture Media Suplements)

GLOSARIO

Absceso, acumulación de pus, líquido espeso de color amarillento, que se produce como consecuencia de la invasión de los tejidos corporales por bacterias, hongos o protozoos.

Acneiforme, inflamación crónica de las glándulas sebáceas.

DNasa, enzima responsable de la digestión del DNA.

Elemento genético heterólogo, material genético derivado o procedente de una especie distinta de la especie de referencia.

Emético, sustancia que estimula el vómito.

Endotoxina, toxina que se libera por la ruptura de las paredes de las propias bacterias al morir.

Exotoxina, toxina que se secreta por bacterias vivas.

Epítope, conjunto específico de características químicas que es reconocido por un anticuerpo o un receptor de célula T determinado. Sitio específico al cual se une una inmunoglobulina o un receptor de célula T particular.

Lecitinasa, enzima que actúa sobre las lecitinas (fosfatidilcolinas que se presentan en membranas celulares).

Lisostafina, es una endopeptidasa que hidroliza los enlaces pentaglicina en el péptidoglicano de la pared de Staphylococcus aureus produciendo la lisis celular. Naturalmente la lisostafina es producida por especies Coagulasa Negativa del género *Staphylococcus* como es el *S. simulans*. Se caracteriza por ser específica para *S. aureus*

Septicemia, enfermedad de la sangre producida por la multiplicación de bacterias en el torrente sanguíneo. Las bacterias entran en el torrente sanguíneo desde un área de infección local, una herida o una intervención quirúrgica. La septicemia se caracteriza por escalofríos, fiebre, postración y los síntomas propios de la infección local originaria.

Tween 80, es un aceite hidrogenado poliglicolisado, es decir, es una aceite dispersable en agua, se encuentran relacionados químicamente con los PEG El Tween 80 es una base grasa que se emplea en la formulación de supositorios.