

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN**  
**EN SALUD.**



**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL MÉTODO DE CULTIVO  
CONVENCIONAL Y DE PLACA SECA REHIDRATABLE, PARA EL RECuento  
DE *Staphylococcus aureus* EN QUESOS FRESCOS DE ELABORACIÓN  
ARTESANAL DE EXPENDIO EN MERCADOS POPULARES DE LA CIUDAD DE  
LA PAZ- BOLIVIA PRIMER SEMESTRE DE LA GESTIÓN 2016.**

**Elaborado por:**

*Lic. Juan Pablo Apaza Paco*

**Asesora:**

*MSc. Angélica María Espada Silva*

**(TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN DIAGNÓSTICO  
LABORATORIAL EN SALUD MENCIÓN MICROBIOLOGÍA)**

**La Paz –Bolivia**

**2016**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN**  
**EN SALUD**



**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL MÉTODO DE CULTIVO  
CONVENCIONAL Y DE PLACA SECA REHIDRATABLE, PARA EL RECuento  
DE *Staphylococcus aureus* EN QUESOS FRESCOS DE ELABORACIÓN  
ARTESANAL DE EXPENDIO EN MERCADOS POPULARES DE LA CIUDAD DE  
LA PAZ- BOLIVIA PRIMER SEMESTRE DE LA GESTIÓN 2016.**

**Elaborado por:**

*Lic. Juan Pablo Apaza Paco*

**Área:**

Microbiología de alimentos

**(TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN DIAGNÓSTICO  
LABORATORIAL EN SALUD MENCIÓN MICROBIOLOGÍA)**

**La Paz –Bolivia**

**2016**

“La imaginación  
es más importante  
que el conocimiento”

*Albert Einstein.*

“No es que sea inteligente,  
simplemente me estoy con  
los problemas más tiempo”

*Albert Einstein.*

Ayer ya es tarde, ya habrá tiempo  
para decirles a los andan diciendo  
que no se puede hacer,  
que yo, ya lo he hecho.

*Anónimo.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

A Dios por ser tan generoso conmigo y mi familia.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (*mi escolita*) por haberme permitido formarme como profesional, con el fin de servir a mi sociedad.

Al Instituto “SELADIS”, por la dotación de ambientes para la elaboración de este trabajo.

A mi asesora Doctora Angélica Espada, por los consejos y el ánimo impartido en todo momento

A mis tribunales, por los consejos y el ánimo impartido en todo momento.

Y a todas aquellas personas de una u otra manera, colaboraron en la realización de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
ABSTRACT	
RESUMEN	
1. Introducción.	1
2. Marco teórico.	3
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).	3
2.2 Queso fresco “medio enriquecido y selectivo para el desarrollo microbiano”.	5
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .	6
2.3.1 Fisiología.	8
2.3.2 El patógeno y los alimentos.	9
2.3.3 Portadores y manipuladores.	11
2.3.4 Descripción de la estructura y actividad biológica de la enterotoxina (SE).	12
2.4. Dosis - respuesta de la Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE)	17
2.5 Aspecto epidemiológico.	18
2.6 Análisis microbiológico convencional.	20
2.6.1 Agar Baird-Parker.	21
2.6.2 Agar DNasa.	21
2.6.3 Catalasa.	22
2.6.4 Coagulasa.	22
2.7 Placa seca rehidratable.	23
2.8 Muestreo por atributos.	24
2.8.1 Plan de dos clases.	25
2.8.2 Plan de tres clases.	26
2.9 Legislación y normativa.	26
2.9.1 Normativa.	28
2.9.1.1 ISO 17025:2005. Competencia de los laboratorios de ensayo.	28
2.9.1.2 ISO/TS 19036. Directrices para la estimación de la incertidumbre.	29
2.9.1.3 ISO 7218:2007. Requisitos generales para el análisis microbiológico.	29
2.9.1.4 Requerimiento NB: 33009-2003. Productos lácteos-Queso fresco.	29
2.9.1.5 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> ISO 6888 NB 32004.	30
2.9.1.6 Evaluación del desempeño de un método alternativo.	30

3. Antecedentes.	34
4. Planteamiento del problema.	37
5. Justificación.	39
6. Planteamiento de la hipótesis	41
7. Objetivos	42
7.1 Objetivo General.	42
7.2 Objetivos específicos.	42
8. Materiales y métodos.	43
8.1 Tipo o diseño del estudio.	43
8.1.1 Variable en estudio.	43
8.2 Universo y población o muestra.	43
8.3 Procedimiento.	44
8.3.1 Selección de la matriz.	45
8.4 Cultivo convencional de <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.	45
8.4.2. Preparación de medio Baird Parker norma NB: 32004; ISO 6888-1.	45
8.4.2.1 Reactivación de la cepa ATCC 25923 de <i>Staphylococcus aureus</i> .	45
8.4.2.2 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> de acuerdo a la norma ISO 6888-1.	45
8.4.2.3 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> de acuerdo a la NB 32004	46
8.5 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> por placa seca rehidratable.	47
8.6 Fortificación de la matriz con interferentes.	48
8.7 fortificación de la matriz con <i>Staphylococcus aureus</i> .	48
8.7.1 Exactitud relativa.	50
8.7.2 Precisión relativa.	50
8.7.3 Linealidad y curva de calibración.	51
8.7.4 Límite de cuantificación.	51
8.8 Muestreo de quesos frescos de manufactura artesanal.	52
8.8.1 Criterios de aceptación y rechazo	52
8.8.1.1 Criterios de inclusión.	52
8.8.1.2 Criterios de exclusión.	52
8.8.2 Material y equipo de muestreo.	53
8.8.3 Recolección de la muestra, Identificación y conservación de la muestra.	53

8.8.4 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de queso fresco.	54
8.9 Análisis estadístico.	54
9. Resultados	55
9.1 Elección de la matriz.	55
9.2 Cultivo convencional de <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923, de acuerdo a la ISO 6888-1-2003 y NB 32004: 2004.	55
9.3 fortificación de la matriz.	56
9.3.1 Exactitud relativa.	58
9.3.2 Precisión relativa.	58
9.3.3 Linealidad y curva de calibración.	58
9.3.4 Límite de cuantificación.	59
9.4 Muestreo de quesos frescos de manufactura artesanal.	60
9.4.1 Frecuencia de la procedencia.	60
9.4.2. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de queso fresco.	62
9.4.2.1 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> por norma ISO 6888-1:2003.	62
9.4.2.2 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> por norma boliviana 32004:2004.	62
9.4.2.3 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> por placa seca rehidratable.	63
10. Discusiones	64
10.1 Selección de la matriz.	64
10.2 Cultivo convencional de <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923, de acuerdo a la ISO 6888-1-2003 y NB 32004: 2004	64
10.3 Fortificación de la matriz.	65
10.3.1 Exactitud relativa.	66
10.3.2 Precisión relativa.	66
10.3.3 Linealidad y curva de calibración.	67
10.3.4 Límite de cuantificación.	68
10.4 Muestreo de quesos frescos de elaboración artesanal.	69
11. Conclusiones	73
12. Recomendaciones	75
13 Perspectivas futuras	76
13. Bibliografía	77





## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Composición química del queso fresco (Fedio <i>et al.</i> , 2008).	6
Tabla 2.-	Parámetros de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> (Zendejas <i>et al.</i> , 2014).	8
Tabla 3.-	Parámetros de producción de toxina de <i>Staphylococcus aureus</i> (Zendejas <i>et al.</i> , 2014).	14
Tabla 4.-	Planes de muestreo para combinaciones de diferente grado de riesgo para la salud y diversas condiciones de manipulación.	26
Tabla 5.-	Requerimiento microbiológico para queso fresco de acuerdo a la NB: 33009-2003 (IBNORCA).	29
Tabla 6.-	Operacionalización de variables.	42
Tabla 7.-	Criterio de confirmación de colonias sospechosas por coagulasa (NB 32004: 2004).	47
Tabla 8.-	Niveles de fortificación con cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	49
Tabla 9.-	Evaluación de matriz a ser empleada para la contaminación artificial	55
Tabla 10.-	Morfología de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Baird Parker.	57
Tabla 11.-	Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en los diferentes niveles de fortificación aplicando los métodos de cultivo en placa seca rehidratable y cultivo convencional según NB 32004: 2004 e ISO 6888-1:2003.	58
Tabla 12.-	Exactitud relativa de los métodos de cultivo placa seca rehidratable y cultivo convencional a distintos niveles de fortificación.	58
Tabla 13.-	Precisión relativa de los métodos de cultivo en placa seca rehidratable y cultivo convencional a distintos niveles de fortificación	59
Tabla 14.-	Análisis de varianza (ANOVA) de doble vía: recuento por diferentes métodos versus nivel de concentración de <i>Staphylococcus aureus</i> .	61
Tabla 15.-	Límite de cuantificación de los métodos de cultivo en placa seca rehidratable y cultivo convencional.	61
Tabla 16.-	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía: límite de cuantificación versus método de recuento.	62

## INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1.- Partes de una placa seca rehidratable ( <a href="http://www.3M.com/microbiology">www.3M.com/microbiology</a> )	23
Figura 2.- Linealidad y curva de calibración método de cultivo alternativo y cultivo convencional	58
Figura 3.- Porcentaje de muestras según su procedencia.	61
Figura 4.- Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> aplicando norma ISO 6888-1:2003	61
Figura 5.- Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> aplicando norma boliviana 32004:2004.	62
Figura 6.- Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> aplicando placa seca rehidratable	62
Figura 7.- Intersección e porcentajes de recuperación por las metodologías comparadas.	63

## ABREVIATURAS

<b>AFNOR</b>	Asociación francesa de normalización
<b>AOAC</b>	Asociación Oficial de Agroquímica.
<b>ATCC</b>	Colección americana de cepas.
<b>Atm</b>	Atmosfera.
<b>Aw</b>	Actividad agua
<b>CDC</b>	<a href="#"><u>Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos.</u></a>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>ETA</b>	Enfermedad de transmisión por alimento.
<b>FAO</b>	Organización para la alimentación y la agricultura.
<b>FDA</b>	Fundación de medicamentos y alimentos.
<b>gl</b>	Grados de libertad.
<b>IAE</b>	Intoxicación alimentaria estafilococica.
<b>ISO</b>	Organización internacional de estandarización
<b>KDa</b>	Kilo Dalton.
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad.
<b>NB</b>	Norma boliviana
<b>NC</b>	Nivel crítico
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud.
<b>PCA</b>	Placas de agar para recuento.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>RSD</b>	Desviación estándar de reproducibilidad.
<b>SE</b>	Enterotoxina estafilocócica.

**SELADIS** Servicio laboratorial de diagnóstico en salud e investigación.

**TCR** Receptor de células T.

**UFC** Unidades formadoras de colonias.

## **SIMBOLOGÍA**

**c** Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o unidades de muestra provisionalmente aceptables en un plan de muestreo de 3 clases.

**$\chi^2$**  Chi cuadrado.

**g** gramo.

**Hi** Hipótesis alterna.

**Ho** Hipótesis nula.

**log** Logaritmo.

**m** Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable.

**M** Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

**min** minuto.

**mL** mililitro.

**mm** milímetro.

**n** Número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis.

**pH** Potencial de hidrogeniones

**r** Coeficiente de correlación.

**s** Segundo.

## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* puede contaminar una gran gama de alimentos, constituyéndose el queso fresco en un buen medio diferencial y selectivo para el desarrollo de este microorganismo. La intoxicación estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingesta de enterotoxina termoestable preformada en el alimento que fue generada por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* llegando a constituirse en un riesgo para la salud de los consumidores.

La comparación entre el método de cultivo convencional empleando medio Agar Baird Parker y el método alternativo por placa seca rehidratable fue hecha por medio de la fortificación de una matriz que carecía de la presencia de *Staphylococcus aureus* y un recuento bajo de la microbiota acompañante del alimento, se establecieron diferentes niveles de fortificación, evaluándose los indicadores de desempeño de exactitud relativa, precisión relativa, linealidad, curva de calibración y límite de cuantificación y posterior verificación de métodos realizando el muestras de quesos frescos de elaboración artesanal de expendio en mercados populares de la ciudad de La Paz.

En la determinación de indicadores de desempeño se obtuvo: En la exactitud relativa para el nivel más bajo fue de 95,6% de recuperación, y se obtuvo 98,7% de recuperación para el nivel de contaminación más alto del método alternativo. Para la precisión relativa se calculó el  $RSD_{cal}$  el mismo fue menor que el  $RSD_{teórico}$  para todos los niveles de fortificación por el método alternativo. Para la linealidad se obtuvo un  $R^2 = 0,9996$  y el límite de cuantificación para un recuento de  $\approx 8\text{UFC/g}$  fue de  $CV\% 1,16$ . En el análisis estadístico comparando ambas metodologías se obtuvo un  $p < 0,05$  demostrando que existe diferencia estadísticamente significativa de un método a otro.

Se realizó el muestreo de 30 muestras de quesos frescos de elaboración artesanal de mercados populares de la ciudad de La Paz, el análisis fue hecho por ambos métodos, donde por el método de placa seca rehidratable 10 muestras se encontraban dentro de norma y 20 se encontraban fuera de norma; por medio del método de cultivo convencional 22 muestras se encontraban en norma y 8 fuera de norma.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, queso fresco, placa seca rehidratable, cultivo convencional, fortificación.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* can contaminate a wide range of foods, becoming fresh cheese in a good differential and selective medium for the development of this organism. Staphylococcal intoxication foodborne, resulting from ingestion of thermostable enterotoxin preformed in the feed generated by a toxigenic strain of *Staphylococcus aureus* becoming a risk to consumer health.

The comparison between the alternative method plate dry Rehydratable and conventional culture method using Agar Baird Parker was made by the fortification of a matrix lacked the presence of *Staphylococcus aureus* and a low number of accompanying microbiota food is they established different levels of fortification, evaluating performance indicators relative accuracy, relative accuracy, linearity, calibration curve and limit of quantification and subsequent verification of performing the samples of fresh cheese craftsmanship outlets in popular markets in the city of La Paz.

In determining performance indicators it was obtained: In the relative accuracy to the lowest level was 95.6% recovery, and 98.7% recovery for the highest level of contamination was obtained. For precision was calculated on the RSDcal the same was less than RSDteórico. For linearity  $R^2 = 0.9996$  was obtained and the limit of quantification for  $\approx 8\text{UFC} / \text{g}$  was 1.16 CV%. Through statistical analyzes  $p < 0.05$  was obtained showing that there is a statistically significant difference method to another.

sampling of 30 samples of fresh cheese craftsmanship of popular markets in the city of La Paz, the analysis was done by two methods, where by the method of dry plate Rehydratable 10 samples were within standard and 20 was conducted were outside standard; by means of conventional cultivation method were 22 samples in standard and non-standard 8.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, fresh cheese, Rehydratable dry plate, conventional farming, fortification.

## 1. Introducción.

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que está presente de forma natural en la leche y los productos lácteos y está a menudo asociado con las enfermedades transmitidas por los alimentos debido a la capacidad de algunas cepas para producir enterotoxinas termoestables (Nogueira *et al.*, 2010). La intoxicación estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas generadas por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* que contaminó y desarrolló en un alimento. La incidencia es desconocida pero es probablemente una de las causas más frecuentes de intoxicación transmitida por alimentos; entre los alimentos implicados más frecuentemente se encuentran: quesos frescos, huevos, carne de pollo, cremas heladas (Augustin *et al.*, 2006).

La afección se conoce como intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) (Bird *et al.*, 2014). *S. aureus* es la especie más característica del género que entre sus numerosos factores de virulencia se encuentran las enterotoxinas estafilocócicas (SE). Las enterotoxinas estafilocócicas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas solubles en agua, presentan un peso molecular bajo que oscila entre 26 kDa y 30 kDa, pueden mantenerse estables incluso al calentar los alimentos más de 100 °C durante 30 minutos esto por la presencia de enlaces disulfuro, mostrando también resistencia a la hidrólisis por enzimas gástricas y pancreáticas (Bird *et al.*, 2014).

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 intoxicación producida por ingestión de enterotoxinas preformadas en el alimento. Si bien son raramente observados 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 (Caballero *et al.*, 2015). El 99% de casos de intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocócicas está asociado a *S. aureus* y ocasionalmente se reportan casos por *Staphylococcus epidermidis*.

Para la incorporación de una metodología alternativa que disminuya costos técnicos y económicos requiere una previa comparación frente a un *Gold estándar* por parte del laboratorio que va a utilizar el método alternativo, que consiste básicamente en comprobar que el método es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo en el laboratorio.



## 2. Marco teórico

### 2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA`s).

Las ETA`s constituyen una causa importante de estrés negativo, muertes evitables y carga económica innecesaria (FAO), causando aproximadamente 76 millones de enfermedades, 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes en los Estados Unidos cada año (Garay *et al.*, 2011). Las enfermedades transmitidas por los alimentos son sinónimo de incomodidad y ausentismo laboral. Para algunos, especialmente niños en edad escolar, adultos mayores que residen en instituciones de atención médica y aquellos con sistemas inmunológicos dañados, las enfermedades transmitidas por los alimentos son más graves e incluso mortales.

Se calcula que el costo anual por atención medica en casos de las enfermedades transmitidas por los alimentos está entre los \$10 mil y los \$83 mil millones (OMS/FAO). La naturaleza de los alimentos y de las enfermedades transmitidas por los mismos han cambiado drásticamente en el último siglo, a pesar de que muchos adelantos tecnológicos como la pasteurización y sistemas óptimos de envasado que prácticamente han eliminado algunas enfermedades por otro lado por la incorporación de un sistema de gestión de calidad; se han identificado nuevas causas de enfermedades transmitidas por los alimentos.

La vigilancia de los alimentos es compleja debido a diversos factores. (i) falta de notificaciones de casos. A pesar de que los casos pueden ser severos e incluso mortales, los casos más leves a menudo no son detectados mediante los sistemas de vigilancia de rutina. (ii) muchos de los patógenos que son transmitidos a través de los alimentos también pueden ser transmitidos a través del agua o de persona a persona, lo cual hace que el rol de la transmisión vía los alimentos sea confuso y (iii) Finalmente, los patógenos o agentes que aún no han sido

identificados, y que por ende no pueden ser diagnosticados, también suelen provocar un porcentaje elevado de casos (Lahou *et al.*, 2014).

En repetidas ocasiones los datos de brotes epidemiológicos han identificado cinco factores de riesgo importantes asociados con el comportamiento de empleados y con prácticas de preparación utilizadas en establecimientos de venta al por menor y de servicio de alimentos que contribuyen a las enfermedades transmitidas por los alimentos. El *Codex Alimentarius* aborda el uso de controles para detectar factores de riesgo y establece 5 medidas clave de salud pública para proteger la salud de los consumidores.

1. Temperaturas de mantenimiento incorrectas;
2. Cocción inadecuada.
3. Equipos y utensilios contaminados.
4. Alimentos provenientes de fuentes inseguras.
5. Higiene personal deficiente.

Específicamente, estas medidas son: demostración de conocimiento, controles de salud para los empleados, control de las manos como medio de contaminación, parámetros de tiempo y de temperatura para el control de patógenos y el servicio de información al consumidor. Enmarcando como objetivo de seguridad alimentaria: mejorar la conducta de los empleados que manipulan alimentos y las prácticas de preparación de estos, que están directamente relacionados con las enfermedades transmitidas por los alimentos en establecimientos de venta al por menor que expenden alimentos.

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) se ha propuesto ayudar por todos los medios a las 75 agencias estatales y territoriales y a más de 3,000 departamentos locales que han asumido la responsabilidad de prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos y expedir permisos e inspeccionar establecimientos de la industria de alimentos.

## 2.2 Queso fresco “medio enriquecido y selectivo para el desarrollo microbiano”.

El queso es el resultado de la concentración selectiva de la leche, que de acuerdo a la FAO/OMS: “*es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos*”. El agua se elimina en una proporción distinta en cada variedad, arrastrando con ella una parte de los elementos solubles y de las proteínas no coaguladas que contiene la leche. El agua libre presente en el queso desempeña un papel muy importante: es esencial para el desarrollo de los microorganismos y determina la velocidad de las fermentaciones y de la maduración, el tiempo de conservación, la textura del queso y el rendimiento del proceso de elaboración.

La materia grasa influye en la textura, el sabor, el rendimiento y en el color. La lactosa es sustrato para la formación de ácido y por lo tanto, interviene en la coagulación de la leche, el desuerado y la textura de la cuajada, y también en el crecimiento de los microorganismos. La caseína origina diversos compuestos aromáticos. Las proteínas del suero que quedan incluidas en la cuajada contribuyen al valor nutritivo del queso y tiene mucha importancia en el proceso de maduración. Los minerales participan en la coagulación de la leche e influyen sobre el desuerado y la textura del queso (Fedio *et al.*, 2009).

Tabla 1.- Composición química del queso fresco (Fedio *et al.*, 2008)

Componente	Porcentaje
AGUA	60,0%
GRASA	19,0%
PROTEÍNA	17,0%
CARBOHIDRATOS	2,0%
SALES MINERALES	2,0%

### **2.3 *Staphylococcus aureus*.**

Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva (Zendejas *et al.*, 2014). Presentan una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio. Es por ello que, gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos humano-animales y viceversa.

De aquí surge la importancia de conocer más acerca de este patógeno, ya que, además de los animales, los mecanismos de invasión abarcan también fómites y el contacto de persona a persona. En los últimos años, la incidencia de bacteriemia por estafilococos ha aumentado significativamente, ya que una especie de esta familia bacteriana ha aumentado su frecuencia de aparición; se trata de la especie *Staphylococcus aureus*, que se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio e *intoxicaciones ocasionadas por alimentos*. Estos brotes están surgiendo de manera alarmante en la mayoría de los países industrializados (Rasmussen *et al.*, 2014). De esta manera, al ser una especie bacteriana relativamente común, es natural que surjan investigaciones para mantenerse al tanto de la evolución de este patógeno. Una de las interrogantes, que consternaba mucho a los científicos, era cómo podía ser tan fácil la diseminación de esta bacteria siendo la respuesta el grado de su virulencia.

La patogenicidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se relaciona con diversos componentes de la superficie bacteriana (Lina *et al.*, 1999); de manera general, los componentes del microorganismo son peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de la proteína A. Así pues, la patogenia provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped; estas condiciones propician que *Staphylococcus aureus* posea características de

virulencia y daño bastante particulares; la situación se ve agravada debido a que el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (Jacó *et al.*, 2015).

*Staphylococcus aureus* es importante no solo porque ocasiona infecciones en diversas partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias implicadas en *enfermedades transmitidas por alimentos* (ETA's). Tales enfermedades son causadas por diversas acciones, incluyendo la capacidad del patógeno de producir toxinas, siendo esto relativamente común en determinados sectores de la población y en algunas regiones geográficas desfavorecidas por la falta de sistemas de salud y de control de infecciones adecuados. Así, las infecciones ocurren por la ingesta de alimentos contaminados con las toxinas. Lo preocupante del caso es que esta bacteria puede encontrarse en el aire, la leche, el agua potable, aguas residuales y, desde luego, la comida o en el equipo donde los alimentos han sido elaborados.

### **2.3.1 Fisiología.**

*Staphylococcus aureus* es una bacteria mesófila aerobia facultativa capaz de crecer en amplios rangos de pH y actividad agua (Aw) (Di Griogoli *et al.*, 2015). Es uno de los patógenos humanos no formador de esporas más resistente a condiciones ambientales adversas, logrando persistir a temperaturas de congelación y descongelación (Calasso *et al.*, 2016). Las concentraciones máximas de sal que permiten el crecimiento dependen de factores como: temperatura, pH, potencial redox, entre otros (ver tabla 2). Un millón de células de *Staphylococcus aureus* por mililitro o gramo de alimentos se inactivan a una temperatura de 66°C durante 12 minutos o 60°C durante 78 - 83 minutos.

Tabla 2.- Parámetros de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Zendejas *et al.*, 2014).

Parámetros	Crecimiento de <i>S. aureus</i>	
	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	37	7 - 48
pH	6 - 7	4 - 10
$a_w$	0,98	0,83 - > 0,99 <sup>1</sup>
		0,90 - > 0,99 <sup>2</sup>
NaCl (%)	0	0 - 20
Potencial redox ( $E_h$ ) (mV)	> + 200	< - 200 - > + 200
Atmósfera	Aerobia	Anaerobia

<sup>1</sup>Aeróbico; <sup>2</sup>Anaeróbico

### 2.3.2 El patógeno y los alimentos.

Las ETA's son originadas por consumir alimentos contaminados con toxinas microbianas o con una o varias bacterias patógenas. Dicha contaminación generalmente se presenta por el contacto del alimento con los manipuladores que se encargan de producirlos, empaquetarlos, almacenarlos y transportarlos es decir, con las personas que están en contacto directo con los alimentos. Sin embargo, las enfermedades entéricas no solo se contagian de esta manera, sino que la gravedad del problema se pone en evidencia al considerar que los agentes potencialmente patógenos se encuentran en diversos ambientes, incluyendo la presión osmótica elevada y la humedad reducida, agua de riego o por la contaminación cruzada de un alimento a otro lo que explica por qué pueden sobrevivir y desarrollarse (Vasconcelos *et al.*, 2010). Además, la contaminación del alimento puede ser endógena es decir desde la materia prima que lo compone o, de lo contrario, el alimento se contaminó en algún punto de su elaboración.

Respecto de la intoxicación provocada por *S. aureus*, se conoce que la mayoría de los brotes son originados por *Staphylococcus* coagulasa positiva, ya que muy pocas cepas coagulasa

negativa son capaces de producir enterotoxinas ocasionando una intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE). Por ello, cabe mencionar que las enterotoxinas estafilocócicas son de las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteica, que presentan termorresistencia (Ruaro *et al.*, 2013). Esto explica por qué las IAE son relativamente comunes, ya que las toxinas no se destruyen con facilidad. Asimismo, por estudios moleculares se sabe que existe una amplia variedad de alimentos capaces de albergar al estafilococo, pero cabe destacar que los más susceptibles son aquellos que tienen contacto con la piel del animal, tal es el caso de la leche, el huevo, los productos cárnicos como el jamón e, incluso, la carne de pollo; este último es muy susceptible a la contaminación bacteriana, porque tiene características fisicoquímicas que permiten que su superficie se contamine fácilmente, especialmente en la etapa de evisceración (Calasso *et al.*, 2016). Aun así, no solo la carne de pollo es ideal para la proliferación de *Staphylococcus aureus* sino también el chorizo, ya que las materias primas con que se elabora, de las que destacan la carne y la tripa, tienen excesiva manipulación por parte del productor (Soares *et al.*, 2011). También es importante considerar la influencia de la temperatura inadecuada a la que se expenden los productos o se almacenan las materias de elaboración.

Así, los alimentos se ven expuestos a contaminación post-proceso, ya que tienen un exceso de manipulación directa con las manos del ser humano, donde puede haber distintos tipos de cepas enterotoxigénicas, *Staphylococcus aureus* representa un doble riesgo debido a la ausencia de flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento de este.

De manera general, *se tiene la creencia que los alimentos que son vendidos en la calle un mayor índice de enfermedades transmitidas por alimentos*; pero los establecimientos cerrados que distribuyen alimentos, también presentan esta problemática, dado que los estándares para cocinar y manejar los alimentos son prácticamente los mismos. Sin embargo, la venta de alimentos en la calle y la imagen frecuente de malas condiciones higiénicas en el

procesamiento del alimento señalan la importancia de mantener el control sanitario a dicha actividad (Lahou *et al.*, 2014). Así pues, analizando las diferencias entre ambos productores de comida, se aprecia que los alimentos vendidos en la calle sí cuentan con mayor índice de contaminación bacteriana por el simple hecho de ser cocinados al aire libre y expuestos a diferentes tipos de contaminación. Para saber si somos víctimas de una intoxicación alimentaria enterotoxigénica, es necesario saber cuáles son los síntomas que cada microorganismo produce en el organismo humano.

De esta manera, se facilita el diagnóstico y se sabe en qué alimentos proliferan los microorganismos. Así, se encuentra una relación de estos con los que el paciente ha consumido. Los síntomas que presenta una persona con un cuadro de Intoxicación Alimentaria Estafilocócica son muy particulares; así, los daños provocados por la toxina de *Staphylococcus aureus* tienen específicas que las diferencian de otras IAE ocasionadas por agentes patógenos tales como *Bacillus cereus* o *Escherichia coli* enterotoxigénica. Tales manifestaciones clínicas abarcan: náuseas, dolor abdominal, emesis, diarrea y postración. En los casos más graves se pueden presentar cefalea y shock. Cabe destacar que la intensidad de los síntomas depende de la cantidad de alimento contaminado ingerido, de la concentración de la toxina y de la susceptibilidad individual, la cual está mediada por la edad y por el estado inmunológico de la persona (De Pascuale *et al.*, 2014).

### **2.3.3 Portadores y manipuladores.**

Los alimentos contaminados con patógenos juegan un papel importante en la transmisión de las ETA's. Que según el Real Decreto Español 202/2000 del 11 de febrero año 2000, define a los manipuladores de alimentos como: “todas aquellas personas que, por su actividad laboral, tienen contacto directo con los alimentos durante su preparación, fabricación, transformación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, venta, suministro y servicio”.



Las manipulaciones de mayor riesgo son aquellos cuyas prácticas de trabajo o acciones en ciertos procesos de producción pueden ser determinantes en relación con la seguridad y la salubridad de los alimentos (Marchand *et al.*, 2012). No obstante, como se describe en la tabla 2, existen determinadas características fisicoquímicas, como el pH, el grado de humedad o la tensión atmosférica, que son fundamentales para el desarrollo y la colonización en el ser humano. Las fosas nasales son el principal hábitat de la bacteria, aunque también se encuentra presente en heridas infectadas, quemaduras, tracto urogenital, gastrointestinal y casi cualquier secreción corporal. En este punto, aproximadamente la totalidad de la población humana podría ser portadora del microorganismo en algún momento de su vida (Parlapani *et al.*, 2015). En adición a lo anterior, también existen otros sitios de concurrencia que albergan al microorganismo; por ejemplo, la piel y la faringe. Así, el porcentaje de personas portadoras de *Staphylococcus aureus* puede abarcar aproximadamente 20-50% de la población en general, siendo las manos de los manipuladores las principales vías de contaminación (Akineden *et al.*, 2008).

En este aspecto, se destaca el papel fundamental de la capacitación inicial y continua al personal que manipulara los alimentos (Buenas Prácticas de Manufactura) de modo que, si los individuos que tienen bajo su responsabilidad la elaboración de los alimentos no entienden su responsabilidad como productores de alimento, entonces ponen en riesgo el establecimiento para el que trabajan y, sobre todo, la salud de las personas.

#### **2.3.4 Descripción de la estructura y actividad biológica de la enterotoxina estafilocócica.**

El principal factor de virulencia de *Staphylococcus aureus* involucrado en la intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) es la producción de enterotoxinas termorresistentes. Las SE son polipéptidos antigénicos compactos no ramificados con un único puente disulfuro y se ha postulado que el sitio activo de la molécula se halla en la región de este puente. Tienen

un peso molecular bajo (26-34 KDa) y una estructura química muy similar entre ellas. *S. aureus* produce cinco toxinas típicas: SEA, SEB, SEC, SED y SEE las cuales producen emesis en primates.

Adicionalmente, *S. aureus* puede producir otros tipos de SE, igualmente super-antigénicas, pero que no producen emesis en primates y son: SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ y SEU. Una misma cepa puede producir más de un tipo de enterotoxina. Los genes que codifican las SE están localizados tanto en DNA cromosomal como en islas de patogenicidad, fagos, transposones y plásmidos (Wertheim *et al.*, 2005). Las SEB, SEC y SED son producidas en la fase estacionaria del crecimiento como metabolitos secundarios; por otro lado, las SEA y SEE son producidas durante toda la fase logarítmica de crecimiento (Muñoz *et al.*, 2008). La SEA y SED están implicadas en la mayoría de los brotes de intoxicación alimentaria (Ruiz *et al.*, 2010).

Según su tipo, las SE son altamente termorresistentes, sus valores *D* varían generalmente desde 5 - 10 minutos a 121°C hasta varias horas a 180°C (27). La SEB a un *A<sub>w</sub>* de 0,99 tiene un *D*<sub>149</sub> de 100 minutos (Perdomo *et al.*, 2004). Las SE no son producidas a temperaturas menores de 10°C, su rango de producción se encuentra entre 10 a 48°C con un óptimo de producción entre 40 y 45°C (Bustos *et al.*, 2006).

En la tabla 3 se presentan los parámetros que favorecen la producción de SE. Como se puede apreciar, el rango de pH para la producción de SE está entre 4,0 – 9,6. Sin embargo, Mossel *et al.* (2003) encontraron que la SE no es producida en valores de pH inferiores a 5,0. Adicionalmente, se ha reportado como pH óptimo para la producción de la SE entre 7,0 a 8,0 (Bhatia 2007). El efecto del pH sobre la producción de SE depende de su tipo, por ejemplo, la SEA y SED son producidas en cantidades similares con un pH inicial de 5,3 a 6,8, mientras que las SEB y SEC se forman mejor a pH 6,8 (Naber *et al.*, 2009).

La producción de la SE puede darse con un  $A_w$  de 0,85 a  $> 0,99$ . Una  $A_w$  reducida tiene menos efectos sobre la producción de SEA y SED que sobre la producción de SEB y SEC (Naber et al., 2009). En general, no hay producción de SE a una concentración mayor de 12% de sal (cloruro de sodio, NaCl) (Borbolla *et al.*, 2004).

Tabla 3.- Parámetros de producción de toxina de *Staphylococcus aureus* (Zendejas *et al.*, 2014).

Parámetros	Producción de toxina	
	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	40 – 45	10 - 48
pH	7 – 8	4,0 – 9,6
$a_w$	0,98	0,85 - $> 0,99$ <sup>1</sup> 0,90 - $> 0,99$ <sup>2</sup>
NaCl (%)	0	0 - 10
Potencial redox ( $E_h$ ) (mV)	$> + 200$	$< - 100 - > + 200$
Atmósfera	Aerobia (5 – 20% oxígeno disuelto)	Aerobia - anaerobia

<sup>1</sup>Aeróbico; <sup>2</sup>Anaeróbico

Todas las toxinas identificadas hasta el momento comparten un número importante de propiedades incluyendo: (i) la capacidad de causar emesis y gastroenteritis en un modelo de primates, (ii) superantigenicidad, (iii) resistencia al calor y la digestión por pepsina y la semejanza estructural terciaria (incluyendo una unión disulfuro intramolecular).

Por medio de estudios realizados se han identificado ocho sub variedades de la enterotoxina por medio de su estructura y función. Se conoce la secuencia peptídica principal de todas estas toxinas y se observó que existe una importante similitud. En general, cerca del 15% de los residuos son totalmente conservados en todas las SE conocidas (Chen *et al.*, 2004). La mayoría de estos se encuentran ya sean centralizados o en el C<sup>12</sup>terminal. Con anterioridad al descubrimiento de SEG y SEI, las SE podrían dividirse en dos grupos, uno con SEB y de las SECs y el otro con SEA, SEE, SED, y SEH. El segundo grupo es de cierto interés por que SEA y SEE son 84% idénticas en tanto SED y SEH son más lejanamente similares. La toxinas

SEG parecen pertenecer al primer grupo (37 a 40% idéntica a SEB y SEC) y la toxina SEI al segundo grupo (26 a 28% idéntico al SEA, SED, y la SEE; 20,6% de similitud a la SEH) (Cremonesi *et al.*, 2007). A partir del análisis por cristalografía proporcionan una gran cantidad de datos interesantes sobre las estructuras de las SE. A partir de estos estudios se propuso que todas las SE se ajusten a un patrón común de proteína. La forma general de la molécula es elipsoide, y contienen dos dominios diferentes (A y B). El *dominio B* es el más pequeño y es común a otras exotoxinas (Messelhäusser *et al.*, 2006). Existe un puente disulfuro (*bucle*) que se encuentra al final del dominio. La estructura resultante del bucle es flexible, aunque esto parece variar entre las SE pequeñas y medianas. El *dominio A* es el más grande, aunque ciertamente hay algunas diferencias en las estructuras de las SE, las semejanzas son bastante notables. Las características estructurales particulares de las SE pueden originar su capacidad para inducir la intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) y su resistencia al cribado en el tracto gastrointestinal (García *et al.*, 2010).

Es importante comprender la característica estructural para entender la actividad superantigénica, que resulta de la unión de la PTSAgs al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) Clase II y el Receptor de Células T (TCR). Sobre la base de varios estudios mutagénicos ha sido dilucidado un modo general TCR vinculante, considerando la conocida especificidad de estas moléculas. La unión al TCR de las SEA, SEB, SEC se producen a través de la cavidad superficial en la parte superior de la molécula (CDR1, CDR2, y HV4) (Cairns *et al.*, 2009). La actividad superantigenica resulta entonces, de la interacción directa de las SE con receptores, antigénicos (TCR) de células T y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígeno (CPA) activando una respuesta (Wahib Mahana, 1999).

Parece ser que la interacción entre la SE y de MHC es primera y necesaria para unirse luego a la cadena  $\beta$  del TCR. De este vínculo cruzado resulta la activación inespecífica y proliferación de las células T, con una gran secreción de las interleuquinas que podrían estar implicadas en el mecanismo de toxicidad de la SE. La actividad de la enterotoxina se caracteriza por la capacidad de causar respuesta emética, mientras que otros superantígenos no son eméticos (Dinges y cols. 2000). Poco se sabe acerca de cómo las SE causan síntomas de intoxicación alimentaria, a no ser que podrían tener un efecto directo sobre el epitelio intestinal y en el nervio vago, que causa la estimulación del centro emético y el tránsito intestinal. La dosis infecciosa requerida para inducir la intoxicación alimentaria estafilocócica en los seres humanos se estima en alrededor de 0,1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso, y puede variar en función de la sensibilidad del paciente (Evenson y cols., 1988).

#### **2.4 Dosis – respuesta de la Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE)**

La IAE resulta del consumo de alimentos en los que *S. aureus* se ha multiplicado hasta alcanzar niveles que producen SE y puede ser el resultado de combinaciones de múltiples toxinas. Los síntomas de la IAE pueden ser algunos de los siguientes: náuseas, dolor abdominal, emesis, diarrea y postración (Bamberger *et al.*, 2005). En los casos más graves se puede presentar cefalalgia y shock (Munoz *et al.*, 2008). La intensidad de los síntomas depende de la cantidad de alimento contaminado ingerido, de la concentración de la toxina y de la susceptibilidad individual, la cual está mediada por la edad y el estado inmunológico de la persona (Ruiz *et al.*, 2010). El tratamiento es básicamente hidratación. La IAE, al ser una enfermedad auto-limitada se recupera en un plazo de dos días y el periodo de incubación varía entre 0,5 a 8 horas (Bamberger *et al.*, 2010).

La literatura no reporta un modelo oficial de dosis respuesta para SE (Garay *et al.*, 2011). La cantidad de SE que debe ser ingerida para causar IAE no se conoce exactamente, pero se reportan rangos entre 0,1-1,0 µg/kg (Villaseñor *et al.*, 2011), esta concentración de SE es alcanzada con cargas microbianas superiores a  $10^5$  UFC/g (Chapman 1945; Garay *et al.*, 2011).

El número de células de *S. aureus* necesarias para la producción del nivel mínimo de SE considerado para producir intoxicación es diferente para cada sustrato y para cada SE. La SEA se ha detectado en concentraciones de  $10^4$  UFC/g. En leche, se ha detectado SEA y SED con recuentos de  $10^7$  UFC/g pero no por debajo de este nivel. Empleando una cepa productora de SEA, SEB y SED, la SEB y SED se detectaron cuando el recuento alcanzó  $6 \times 10^6$  UFC/mL (1ng/mL de SE), mientras que la SEA (4ng/mL) fue detectada con un recuento de  $3 \times 10^7$  UFC/mL (Suarez *et al.*, 2008). No obstante K rouanton *et al.* (2007) investigaron 31 brotes de IAE, en los cuales se reportaron recuentos de *S. aureus* coagulasa positiva entre  $7,6 \times 10^2$  y  $7,5 \times 10^9$  UFC/g y se detectó SE en 25 de los 31 alimentos implicados (80%).

## **2.5 Aspecto epidemiológico.**

*Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, bacteria oportunista que forma parte de la microbiota humana: la colonización más frecuente por *Staphylococcus aureus* es la mucosa nasal, el principal reservorio lo constituye el hombre enfermo o el portador. Durante varias décadas se han reportado un gran número brotes epidémicos de *S. aureus* a nivel mundial, describiendo a grandes rasgos los hechos más saliente donde se ha identificado a este microorganismo.

En los Estados Unidos, cada año, ocurren entre 3,3 y 12,3 millones de casos de ETA's, estimándose pérdidas económicas anuales que oscilan entre 6,5 y 34,9 miles de millones de dólares, encontrando a *Staphylococcus aureus* como uno de los agentes etiológicos más importantes (OMS 1997b; Timothy *et al.*, 2000; CDC. 2006).

En España los brotes registrados por la Red de Vigilancia indican que *Staphylococcus aureus* es el segundo agente más frecuentemente reportado y confirmado en brotes de ETA (Hernandez *et al.*, 1995).

En América Latina, un estudio evaluó la contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública de las principales ciudades, determinándose que *Staphylococcus aureus* es el mayor riesgo en ocasionar un brote de ETA (Almeida 1996).

Los estudios de Vigilancia Alimentaria realizados en Cuba determinan que *Staphylococcus aureus* es una causa importante de ETA (mayor al 30% de los reportes realizado) (Rodríguez *et al.*, 2001).

En Chile el Programa de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos, indica que en la Región Metropolitana *Staphylococcus aureus* tiene una alta incidencia de los brotes de origen alimentario (Prado *et al.*, 2002).

En Brasil se indica según reportes de datos obtenidos en el Municipio de Porto Alegre en el periodo de 1995 a 2002 que *S. aureus* es el segundo agente etiológico de ETA en importancia. (Gotaardi *et al.*, 2006)

En Europa la situación es similar, en Francia los reportes indican que cepas de estafilococos toxigénica son la segunda causa de las enfermedades transmitidas por alimentos después de la Salmonella, sin embargo, se sabe muy poco acerca de las características de las cepas involucradas. (Kerouanton *et al.*, 2007)

En el Reino Unido fueron examinados las cepas de *Staphylococcus aureus* responsables de brotes entre 1969 y 1990 en el Laboratorio de Higiene de alimentos (PHLS). Donde el 79 % de estas resultaron ser productoras de una o más enterotoxina. En Polonia las infecciones e intoxicaciones por alimentos se registraron mostraron una incidencia media en el periodo 1998-2001. Entre los agentes etiológicos más frecuentes en los brotes esta *Staphylococcus aureus* (10% de los casos). El principal vehículo son los alimentos y el agua, donde las materias primas de origen animal (29% de los casos), las comidas de huevos (27%) (Sadkowska *et al.*, 2003).

En Argentina los datos existentes son escasos, entre los reportes consultados se destaca que *Staphylococcus aureus* es la segunda causa de ETA entre 1993 y 2001 en la provincia de Rio Negro (Di Pietro *et al.*, 2004).

En Italia la investigación puso de relieve que estos organismos son muy comunes y constituyen un riesgo potencial para la salud de los consumidores. (Normanno *et al.*, 2005).

En Japón fueron reportados entre 1999 y 2009, 2.525 aislamientos de brotes alimentarios que involucraron 59.964 personas con 3 muertes. Los alimentos involucrados fueron preparaciones típicas japonesas. (Shimizu *et al.*, 2010).

La información disponible sobre los eventos vinculados a *Staphylococcus aureus* en nuestro medio, es escasa y fragmentada. Los estudios actuales demuestran que cada año se incrementa la morbilidad tanto de las EDA como de las ETA. Esto revela la ineficacia de las acciones sanitarias en esta decisiva área de la salud pública. (Scott E. 2003).

## **2.6 Análisis microbiológico convencional.**

Para el recuento de *Staphylococcus aureus* es necesario utilizar algunas pruebas bioquímicas y medios de cultivo especiales que permitan su fácil determinación. Esta identificación se basa en las enzimas y las toxinas que produce el microorganismo. Aprovechando estas



características se han diseñado medios para aislar esta bacteria, que son agar Baird Parker, agar estafilococos N° 110, agar DNAsa entre otros.

### **2.6.1 Agar Baird-Parker.**

Es un excelente medio para el recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos (Anexo 1), permite trabajar incluso, con células con daño subletal (Garnica *et al.*, 2013). Además, es el medio moderadamente selectivo más usado en el análisis microbiológico de alimentos. Dentro de su composición se encuentra el piruvato sódico que permite una mejor asimilación de la glucosa por las células con injuria; su poder selectivo se debe a la presencia de cloruro de litio y como agente diferencial se tiene al Telurito de Potasio, que por la reducción a Teluro de Potasio se llegan a observar colonias grises a negruzcas tipo ceniza (Forsythe *et al.*, 2000), la presencia de lecitina permite que se pueda observar un halo transparente que revela la actividad lecitinasa; sin embargo, las colonias que desarrollan en este medio deben ser sometidas a confirmación por otras pruebas.

### **2.6.2 Agar DNasa.**

Es utilizado para identificar estafilococos potencialmente patógenos (Anexo 3); manifiesta la actividad de la desoxirribonucleasa, la cual es indicadora de su patogenicidad (Forsythe *et al.*, 2000). Asimismo, se investiga la capacidad del microorganismo de producir enzimas que hidrolicen el ADN. La aparición de halos transparentes al momento de añadir HCL 1N alrededor del área de crecimiento se considera resultado positivo, ya que estas corresponden a zonas de hidrólisis del ADN. La prueba es considerada negativa cuando los halos característicos no están presentes (Silva *et al.*, 2006).

### **2.6.3 Catalasa.**

Se utiliza para probar la capacidad de el microorganismo de producir la enzima catalasa, la cual facilita la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, siendo de utilidad para

evitar la formación de radicales tóxicos por el sistema de la mieloperoxidasa en las células fagocíticas. La prueba es positiva cuando la bacteria reacciona produciendo la liberación de burbujas, que es la característica dada por la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (MacFaddin JF. 2003).

#### **2.6.4 Coagulasa.**

Esta prueba se emplea para determinar y diferenciar especies dentro del género *Staphylococcus*, así como para probar la presencia de *Staphylococcus aureus*. Dicho microorganismo tiene la capacidad de producir y llevar adelante la coagulación del plasma (MacFaddin JF. 2003). La coagulasa es un factor de agregación y constituye una prueba muy sensible y específica para esta bacteria (Anexo 4).

La coagulasa puede unirse al fibrinógeno y convertirlo en fibrina insoluble, la cual tiende a formar depósitos donde los estafilococos pueden agregarse (MacFaddin JF. 2003). La prueba puede hacerse de dos maneras: en portaobjeto, en la cual la solución se ha tratado previamente con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y plasma de conejo. Por otra parte, la prueba se puede realizar en tubo, para lo cual se inoculan 0.5 ml de una dilución de plasma de conejo con la colonia sospechosa (Nuñez *et al.*, 2007).

#### **2.7 Placa seca rehidratable.**

La placa seca rehidratable para recuento de *Staphylococcus aureus* es una placa que ya contiene el medio de cultivo listo para ser utilizado (figura 1; Anexo 7), el cual posee un agente gelificante en frío (Beuchat *et al.*, 2016). Es un medio modificado cromogénico de Baird Parker el cual en la placa es selectivo y diferencial para *S. aureus*, donde se debe de añadir 1 mL de la dilución de la muestra a ensayar por placa, posterior incubación por  $24 \pm 2$

horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  o  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las colonias que presentan una coloración rojo-violeta en la placa son colonias sospechosas de ser *S. aureus*, solo se procede al recuento y la prueba se ha completado (Anexo 19).

Cuando no se observan el desarrollo de colonias de color rojo-violeta en la placa, pero se observa el desarrollo de colonias negras o colonias azul-verde. Se aplica el disco *Staph Express* que contiene azul de *o*-toluidina, la enzima DNasa que produce *S. aureus* reacciona este colorante y se forma una zona rosada alrededor de la colonia. El disco se inserta en la placa incubándose a continuación durante un tiempo mínimo de 1 h y una máximo de 3 hrs. a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  o  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . *S. aureus* (*S. hyicus*, *S. intermedius*, que puede producir enterotoxinas) dan reacción positiva para la prueba de la DNasa zona rosa. Contar las zonas de color rosa como *S. aureus*, siendo independientemente del tamaño del halo formado (Silbernager *et al.*, 2003).

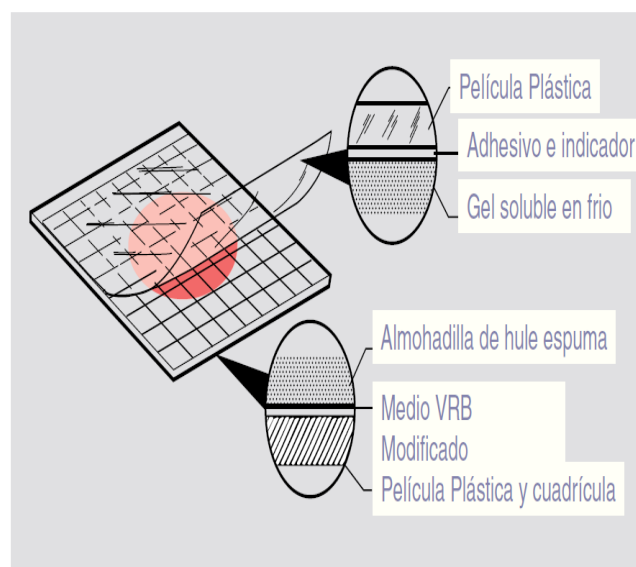


Figura 1.- Partes de una placa seca rehidratable ([www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology))

## 2.8 Muestreo por atributos.

El plan de muestreo sólo se aplica a lote o lotes de alimentos y bebidas. Se sustenta en el riesgo para la salud y las condiciones normales de manipulación y consumo del alimento, y establece:

a) Categoría de riesgo: Escala relativa al riesgo que representa un alimento y a la manipulación posterior prevista tabla 4 podemos observar con remarque a la categoría de riesgo que presenta la presencia de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

b) Componentes del plan de muestreo: "n" (minúscula) número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis, que se eligen separada e independientemente, de acuerdo a normas nacionales o internacionales referidas a alimentos y bebidas apropiadas para fines microbiológicos. "c" número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o unidades de muestra provisionalmente aceptables en un plan de muestreo de 3 clases. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a "c" se rechaza el lote. "m" (minúscula): Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable.

En general, un valor igual o menor a "m", representa un producto aceptable y los valores superiores a "m" indican lotes rechazables en un plan de muestreo de 2 clases.

"M" (mayúscula): Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

c) Tipos de plan de muestreo para lote o lotes:

**2.8.1 Plan de dos clases:** Es un plan de muestreo por atributos, donde puede establecerse únicamente la condición de "aceptable" o "rechazable". Un plan de 2 clases queda definido por "n" y "c".

Para microorganismos patógenos:

Condición de "aceptable" = ausencia

Condición de "rechazable" = presencia

Para otros microorganismos

Condición de "aceptable" = menor o igual al nivel crítico establecido, "c"

Condición de "rechazable" = mayor al nivel crítico establecido, "c"

**2.8.2 Plan de tres clases:** Es un plan de muestreo por atributos que queda definido por "n", "c", "m", "M"; donde se establece:

Condición de "aceptable":

Cuando todas las unidades de muestra presentan recuentos igual o inferiores a "m". Cuando hasta "c" unidades de muestra pueden tener recuentos entre "m" y "M" (incluido "M").

Condición de "rechazo":

Cuando más de "c" unidades de muestra presentan recuentos entre "m" y "M" (incluido "M")

Cuando al menos 1 de las unidades de muestra presentan recuentos superiores a "M".

Tabla 4.- Planes de muestreo para combinaciones de diferente grado de riesgo para la salud y diversas condiciones de manipulación (FAO).

Grado de importancia en relación con la utilidad y riesgo sanitario	Condiciones esperadas de manipulación y consumo del alimento o bebida luego del muestreo		
	Grado de peligrosidad reducido	Sin cambio de peligrosidad	Aumento de Peligrosidad.
Vida útil y alteración	Aumento de vida útil Categoría 1 3 clases n = 5, c=3.	Sin modificación Categoría 2 3 clases n = 5, c=2.	Disminución de vida útil Categoría 2 3 clases n = 5, c=3.
Indicadores de riesgo bajo indirecto para la salud	Disminución del riesgo Categoría 4 3 clases n = 5, c=3.	Sin modificación Categoría 5 3 clases n = 5, c=2.	Aumento del riesgo Categoría 6 3 clases n = 5, c=1.
Patógenos de riesgo moderado directo, de diseminación limitada.	<b>Categoría 7 3 clases n = 5, c=2.</b>	Categoría 8 3 clases n = 5, c=1.	Categoría 9 3 clases n = 10 c=1.
Patógenos de riesgo moderado directo, de diseminación potencialmente extensa.	Categoría 10 2 clases n = 5, c=0.	Categoría 11 2 clases n = 10 c=0.	Categoría 12 2 clases n = 20 c=0.
Patógenos de riesgo grave directo para la salud.	Categoría 13 2 clases n = 15, c=0.	Categoría 14 2 clases n = 30 c=0.	Categoría 15 2 clases n = 60 c=0.

## **2.9 Legislación y normativa.**

La industria de los alimentos y el gobierno comparten la responsabilidad de asegurar que los alimentos proporcionados al consumidor sean seguros y que no se conviertan en un foco de brote o de contagio de enfermedades transmisibles. Esta responsabilidad compartida es de amplio alcance con el fin de asegurar que se cumplan las expectativas del consumidor, procurar que los alimentos no sean alterados y que sean preparados en unos entornos limpios y procesados adecuadamente.

El control de la inocuidad de los alimentos juega un papel muy importante en la salud del ser humano. Por esta razón se trata de un campo que se rige por numerosas normas y directrices que abarcan cada uno de los distintos ámbitos en la industria de los alimentos, desde la producción de materia prima, hasta el muestreo que ha de realizarse para el control de la inocuidad de los productos, incluyendo los límites establecidos para cada para cada parámetro medido, este control normativo no solo se aplica a los centros productores, sino también a los laboratorios.

En el siguiente apartado se hace una selección de las principales normas de aplicación en laboratorio de análisis microbiológico. Tanto en su actividad de rutina como en los procesos de validación, así como aquella más específica para el recuento de *Staphylococcus aureus*.

Es importante diferenciar entre legislación y normativa. En el primer caso el cumplimiento de la legislación es *obligatorio*, mientras que el seguimiento de la normativa es voluntario por parte del laboratorio, que puede decidir si quiere o no trabajar bajo las normas ISO, AOAC, AFNOR u otra normativa vigente.

## **2.9.1 Normativa.**

### **2.9.1.1 ISO 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.**

Esta norma establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados. Es aplicable a todos los laboratorios independientemente del número de empleados o la extensión de sus actividades (ISO 4833: 2003 AENOR-2004).

### **2.9.1.2 ISO/TS 19036. Directrices para la estimación de la incertidumbre de las medidas en determinaciones cuantitativas.**

Esta especificación técnica sirve de orientación para el cálculo y expresión de la medida de incertidumbre asociada a los resultados en microbiología de los alimentos. Es aplicable al análisis cuantitativo de 1) productos para consumo humano y de alimentación de animales y 2) muestras ambientales en el área de producción y manejo de alimentos, llevados a cabo mediante la enumeración de microorganismos usando la técnica de recuento en placa, siendo también aplicable a análisis cuantitativos mediante métodos alternativos instrumentales. Esta especificación técnica no es aplicable a la enumeración usando la técnica del número más probable ni para el análisis de bajos niveles de microorganismos (ISO/TS 19036:2006).

### **2.9.1.3 ISO 7218:2007. Requisitos generales y guía para el análisis microbiológico.**

Esta es la norma de referencia para cualquier laboratorio de análisis microbiológico y la más importante en este aspecto. Esta norma internacional indica los requerimientos generales y ofrece una guía orientativa con tres objetivos principales: 1) Implementación de las normas del Subcomité ISO/TC 34/SC9 o del subcomité ISO/TC34/SC5 para la detección o recuento de los microorganismos, 2) Establecer las buenas prácticas de laboratorio en los laboratorios de microbiología de los alimentos y 3) Ser una guía orientativa para la acreditación de los laboratorios de microbiología de los alimentos. Abarca el análisis de bacterias, levaduras y mohos, pero no cubre el análisis de toxinas u otros metabolitos de los microorganismos. Su objeto es ayudar a la validez de los análisis de los alimentos, brindando respaldo de que las técnicas generales que se utilizan para realizar dichos análisis sean las mismas en todos los laboratorios, de manera que los resultados sean homogéneos en todos los laboratorios y además de contribuir a la seguridad del personal (ISO/TS 19036:2006).

### **2.9.1.4 Requerimiento microbiológico NB: 33009-2003. Productos lácteos-Queso fresco.**

Dentro de la normativa boliviana tabla 5, se describen los requerimientos microbiológicos para queso fresco.



Tabla 5.-Requerimiento microbiológico para queso fresco de acuerdo a la NB: 33009-2003 (IBNORCA).

Norma técnica	Parámetros	Valor de referencia	Norma de referencia
NB – 32005	Coliformes totales	1 X10 <sup>3</sup> UFC/g	NB 33009-2003
NB – 32005	<i>Escherichia coli</i>	10 UFC/g	NB 33009-2003
NB – 32004	<i>Staphylococcus aureus.</i>	10 UFC/g	NB 33009-2003
NB/ISO 6579	<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia en 25g	NB 33009-2003

### 2.9.1.5 Recuento de *Staphylococcus aureus* ISO 6888-1: 2003; NB 32004:2004.

Esta normativa describe un método sin enriquecimiento previo para el recuento de *Staphylococcus aureus*. Es aplicable a productos para consumo humano y alimentación animal, así como muestras ambientales en el área de producción y manejo de productos alimentarios.

La enumeración de los estafilococos coagulasa positivos por este método implica la inoculación en la superficie de un medio de agar selectivo diferencial con un volumen especificado de una dilución 10<sup>-1</sup> y otras diluciones decimales adecuadas al tipo de matriz con la que se esté trabajando incubando las placas de Baird Parker a 37°C durante 48hrs. Cálculo del número de estafilococos coagulasa positivos (UFC por g/mL de muestra) se hace a partir del número de colonias típicas y / o atípicos obtenidos en el medio selectivo y posteriormente confirmado por la coagulasa y pruebas de DNasa (ISO 6888-1: 2003; NB 32004:2004).

### 2.9.1.6 Evaluación del desempeño de un método alternativo.

Antes de que un método sea utilizado en un laboratorio, es necesario que una organización externa y el propio laboratorio, evalúen el desempeño del método alternativo frente al método de referencia. La que es quizás la principal organización encargada de validar los métodos analíticos, la Asociación Oficial de Agroquímica (AOAC), tiene como objetivo primordial "obtener, desarrollar, probar y adoptar métodos uniformes, precisos y exactos para el análisis

de los alimentos" (Wallce, 1996). Para que la AOAC le confiera carácter oficial, el método ha de satisfacer tres criterios.

Primero, el método ha de facilitar datos de un grado predecible de precisión y exactitud cuándo lo empleen analistas cualificados. Siendo la precisión la medida de la variabilidad del método en un determinado laboratorio, y entre varios laboratorios y la exactitud indica el grado en que el método determina el verdadero nivel del analito.

El segundo aspecto a ser tomado en cuenta, que cuando se ha de aplicar un método este sea práctico. Para satisfacer este criterio, el procedimiento ha de ser lo más rápido y sencillo que sea posible, sin dejar por ello de reunir los requisitos de fiabilidad. A veces puede ocurrir que el único método fiable de que se dispone no sea práctico, por su costo y por el tiempo que consume. En tal caso, la AOAC puede aceptar el método por razón de su necesidad. No obstante, entretanto los analistas deberán seguir buscando un método que sea a la vez fiable y práctico.

El tercer criterio es la disponibilidad del método. El método no debe contener un "*secreto comercial*" ni formar parte de un documento confidencial que no esté a la disposición de los analistas interesados.

Un laboratorio puede tener que realizar la evaluación del desempeño de un procedimiento que se desea utilizar corrientemente, si no se ha validado aún ningún procedimiento para una determinación analítica en particular. En otros casos el laboratorio podrá optar por la verificación de la validez del método, que ya haya sido validado por la AOAC u otra organización internacional. Existen varios motivos para proceder a una validación interna o verificación.

Primero, el laboratorio puede querer asegurarse de que el método es aplicable al alimento que está examinando. Muchos métodos son evaluados que pueden aplicarse al análisis de un solo

tipo específico de alimento o unos pocos. Si el método no es aplicable al alimento o alimentos que analice el laboratorio interesado, éste deberá realizar su propia evaluación de desempeño del método de análisis de los alimentos de que se trate. Segundo, un laboratorio desea determinar la exactitud del método.

Tercero, puede ser conveniente determinar si es posible que se planteen problemas al utilizar el método en un laboratorio en particular. Puede ocurrir que un estudio en colaboración, en condiciones de estricto control en el laboratorio, haya demostrado que el método es fiable, rápido y rentable, pero por alguna razón desconocida no puede utilizarse corrientemente en un laboratorio determinado.

Cuarto, el laboratorio quizás desee poner a prueba la capacidad del analista de utilizar el método. Si no se obtienen resultados aceptables, el laboratorio deberá emplear otro método igualmente aceptable o considerar la conveniencia de que al analista sea capacitado de nuevo.

Siempre que sea posible, el método que deba evaluarse se comparará con un método existente o estándar. El analista deberá emplear alimentos que estén naturalmente contaminados por el analito deseado. Si no dispone de alimentos de este tipo, el analista deberá contaminar artificialmente los alimentos con el analito objetivo, cuando prepare las muestras de ensayo para un estudio de evaluación, el analista deberá considerar la conveniencia de emplear células de analitos sometidas y no a tensión; tipo y grado de la tensión (congelación, secado, calentamiento, radiación y cloración); niveles de inoculación; inclusión de no analitos; uso de analitos atípicos, y número de las muestras de ensayo.

### 3. Antecedentes.

El recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos se lo realiza siguiendo la normativa ISO 6888-1:1999 y en nuestro medio por medio de la normativa boliviana 32004:2004, ambas normativas empleando medio Agar Baird Parker.

La última revisión ISO 6888-1 fue en el año 2003 (Microbiología de la alimentación humana y animal -Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies) - Parte 1: Técnica usando agar Baird -Parker medio).

Fedio (2008), realizó el recuento de *Staphylococcus aureus* en placa seca rehidratable en quesos contaminados artificialmente, con la finalidad de buscar la respetabilidad y reproducibilidad, se contaminaron lácteos con niveles que iban desde 3UFC/g hasta 300UFC/g de alimento, siguiendo las directrices de la AOAC, por medio del análisis estadístico se obtuvo un  $p < 0,05$  concluyendo que este método puede ser utilizado con la seguridad ya que sus resultados son confiables.

Nogueira (2010), evaluó los medios de cultivo y las metodologías utilizado para la enumeración de coagulasa y *Staphylococcus* spp termonucleasa-positivo en la leche cruda y queso de pasta blanda fresca. Las muestras de leche contaminada artificialmente (con *Staphylococcus* coagulasa positiva cepas de referencia) y muestras de leche cruda contaminada de manera natural y queso se sometieron a enumeración en agar Baird-Parker (BP), Agar fibrinógeno plasma de conejo (RPFA) y en placa seca rehidratable. Hecha la comparación metodológica no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre la media de los recuentos obtenidos en todos los medios de cultivo evaluados. RPFA y STX tenían buenos índices de correlación entre los totales y los recuentos de colonias típicas, así como con la coagulasa y la termonucleasa-positivo los recuentos de colonias. Concluyendo que existe una mejor asociación entre coagulasa y síntesis de termonucleasa con respecto a la

morfología típica de la colonia desarrollada. El cultivo con BP presento baja correlación entre los recuentos.

Soares (2011) realizó el recuento de *Staphylococcus coagulasa* positivos por la metodología convencional, en dicho estudio denota la importancia de los tiempos de incubación y la variación de la morfología de las colonias, concluye que dichos cambios suceden por la perdida en el porcentaje de humedad, consumo de nutrientes y acumulación de sustancias toxicas para el microorganismo.

En el estudio realizado por Ruaro (2013) donde se empleó el cultivo convencional para el aislamiento y posterior identificación de *Staphylococcus coagulasa* positiva, denota que si las colonias pierdes sus características morfológicas, dan lugar a un recuento erróneo.

El sistema de recuento por placa seca rehidratable fue validado en el año 2003 (certificado N° 3M 01/9-04/03). El método de referencia fue la norma ISO 6888-1:1999. El estudio de 2007 de renovación fue revisado para cumplir con la norma ISO 16140, con la finalidad de validar la técnica, llegando a analizar la precisión relativa donde se obtuvo un valor de 0.116 en método de referencia y un RSD de 0,074 para el método de placa seca rehidratable, linealidad donde se obtuvo un  $R^2 = 0.9997$ , llegando a evaluarse además la Inclusividad, exclusividad del método de placa seca rehidratable. El último estudio de renovación fue realizado por ISHA (2015) realizo el estudio de validación de placa seca rehidratable para el recuento de *Staphylococcus aureus* llegando a obtener la certificación por la AFNOR (NF VALIDATION 16140™) se validó el método con cinco matrices diferentes de acuerdo a las directrices de la ISO: 16140/A1 (2011). Los resultados del estudio se encuentran acreditados por el Formulario Nacional (NF) de acuerdo con los requisitos vigentes de los Estados Unidos. Loiane (2015), estudio la aplicabilidad de las placas secas rehidrables para enumerar grupos microbianos en la leche de oveja. Las muestras de leche de oveja (n = 30) se sembraron

simultáneamente, para enumerar, *Staphylococcus aureus* utilizando protocolos de referencia Convencional y placas secas rehidratables. Los resultados obtenidos se compararon mediante la prueba de regresión lineal y ANOVA ( $p < 0,05$ ). Los resultados muestran significancia entre las metodologías convencionales y placa seca rehidratable. Además, por el método de cultivo en placa seca rehidratable para el recuento de *S. aureus* tuvieron mayor recuperabilidad de bacterias en comparación con la metodología convencional. Sobre la base de los resultados se concluyó considerar el método de placa seca rehidratable como método alternativo para el análisis microbiológico en la leche de oveja.

Si bien dentro del apartado de metodologías que son sugeridas por el IBNORCA se encuentra el análisis de microorganismos por placa seca rehidratable, dentro de nuestro medio aún no existen reportes sobre estudios con la metodología de placa seca rehidratable para *Staphylococcus aureus* en queso fresco de elaboración artesanal, o de otra matriz.

#### 4. Planteamiento del problema.

Uno de los mayores problemas en estos tiempos tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo son las enfermedades diarreicas agudas (EDA'S), dentro de ello, los alimentos se constituyen en vehículos de transmisión de patógenos dando lugar a las (ETA'S) y también cuadros de Intoxicación alimentaria (IA) de origen microbiano, siendo la población más vulnerable niños menores de 5 años y personas de la tercera edad, los primeros por tener el sistema inmunológico en desarrollo y los segundos por tener un sistema ya deteriorado.

*Staphylococcus aureus* es considerado un microorganismo patógeno que se caracteriza por provocar un cuadro de intoxicación acompañado por vómitos, constituyéndose en un problema de salud pública en nuestro medio, la masiva producción de los alimentos limita el control por las entidades oficiales que controlan la inocuidad de los mismos; de manera que se incrementa la posibilidad de que estos alimentos contaminados lleguen a ser consumidos por poblaciones susceptibles. Por ello se considera necesario contar con métodos sensibles de laboratorio para recuento de este agente en alimentos que permitan su recuperación cuando se encuentren en poblaciones bajas.

El cultivo convencionales utiliza la siembra en medio Agar Baird Parker es considerado como *Gold Standard*, pero se puede citar algunas limitaciones entre estas están el requerimiento de medios de cultivo que se deben de suplementar, gran cantidad de material de vidrio, un mayor requerimiento en cuanto a infraestructura y equipamiento se refiere; también se debe de considerar que los costos de energía eléctrica, agua potable y de recursos humanos que son mayores, además de generan residuos sólidos en mayor cantidad.

Por ello es necesario buscar metodologías alternativas y una de ellas sería el cultivo por placa seca rehidratable u otro, que permitan optimizar gastos por concepto de infraestructura,

equipamiento y sobre todo acortar tiempo en el análisis de una matriz, lo cual permitiría tener resultados más rápidos y toma de acciones ya sean estas preventivas o correctivas.

En nuestro medio no existe subnotificación sobre la incidencia de intoxicaciones causada por la enterotoxina estafilocócica por consumo de alimentos, tal es el caso de queso fresco de elaboración artesanal, ni del comportamiento de microorganismos patógenos de importancia en leche y derivados; además se conoce poco sobre la frecuencia de bacterias patógenas en productos lácteos en nuestro medio. Esta información es indispensable ya que con base en ella sería posible la toma de medidas tendientes a controlar o disminuir las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos contaminados como son la leche y derivados.

Por las consideraciones anteriores, este estudio plantea la siguiente *pregunta de investigación*:

**¿El método de cultivo en placa seca rehidratable para el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos, es similar en su desempeño al cultivo convencional ISO 6888-1 y NB: 32004?**



## 5. Justificación.

Desde el punto de vista social, dos son las razones fundamentales para justificar la búsqueda de este microorganismo en quesos frescos: (i) por su composición, estos alimentos se constituyen en un medio que favorece el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, cuya presencia en altas poblaciones puede conllevar a la producción de enterotoxina termoestable; (ii) la toxina generada en el alimento puede ocasionar un cuadro de intoxicación en la población que consume el alimento, ya que una deficiente calidad sanitaria de los mismos se traduce en daños de variada naturaleza en los consumidores. Los daños incluyen presentación de enfermedades, gastos por atención médica, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos y en otros casos puede ser causa de muerte.

Siendo el queso fresco de elaboración artesanal forma parte del consumo habitual de la población paceña, formando parte de varios platos tradicionales y el consumo de este alimento es por todos los grupos etarios.

Desde la perspectiva del análisis laboratorial, en nuestro medio el control microbiológico de los alimentos se realiza por medio del método de cultivo microbiológico convencional, que utiliza en medio Baird Parker presentando algunas limitaciones: requiere aproximadamente 4 días en el aislamiento e identificación del microorganismo requiriendo una mayor inversión de tiempo por parte de los operadores.

Por lo citado anteriormente existe la necesidad de contar con metodología alternativa para obtener resultados precisos en tiempo más corto para el control de la inocuidad de los alimentos, y que al mismo tiempo generen información oportuna y reproducible para prevenir los peligros microbiológicos asociados al consumo de alimentos contaminados.

El desarrollo de este trabajo apoyará a brindar resultados en corto tiempo, teniendo la capacidad de trabajar con varias muestras en casos de brotes, dichos resultados podrán ser empleados en estudios epidemiológicos de incidencia y prevalencia de este patógeno en quesos frescos elaborados artesanalmente. De modo que el presente estudio puede ser considerado además, como base en la metodología sugerida por entes normalizadores como el IBNORCA en nuestro medio, si bien esta metodología de *placa seca rehidratable* está dentro del catálogo para otro grupo de microorganismos pero no así para *Staphylococcus aureus*.

## 6. Planteamiento de la hipótesis.

**H<sub>0</sub>**= El método placa seca rehidratable para el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos de elaboración artesanal, es igual de acuerdo a su desempeño en relación al cultivo convencional a ISO 6888-1 y NB: 32004.

**H<sub>i</sub>**= El método placa seca rehidratable para el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos, es mayor de acuerdo a su desempeño en relación al cultivo convencional ISO 6888-1 y NB: 32004.

## 7. Objetivos

### 7.1 Objetivo General.

Comparar el desempeño de los métodos de cultivo convencional y placa seca rehidratable, para el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos de elaboración artesanal, de expendio en mercados populares de la ciudad de La Paz.

### 7.2 Objetivos específicos.

1. Elegir una matriz de queso fresco de elaboración artesanal libre de *Staphylococcus aureus*.
2. Evaluar la marcha microbiológica para *Staphylococcus aureus* cepa ATCC en base a la norma ISO 6888-1:2003 y norma boliviana 32004:2004.
3. Determinar indicadores de desempeño: exactitud relativa, precisión relativa, linealidad y curva de calibración y límite de cuantificación del método cultivo en placa seca rehidratable en muestras fortificadas.
4. Comparar estadísticamente el límite de cuantificación de *Staphylococcus aureus* del método de cultivo en placa seca rehidratable frente al método de cultivo convencional en queso fresco de elaboración artesanal.
5. Aplicar los métodos de cultivo convencional y cultivo en placa seca rehidratable de recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos de fabricación artesanal, para evaluar la capacidad de recuperación de ambos métodos.

## 8. Materiales y métodos.

### 8.1 Tipo o diseño del estudio.

Analítico, test diagnóstico.

#### 8.1.1 Variable en estudio.

Tabla 6.- Operacionalización de variables.

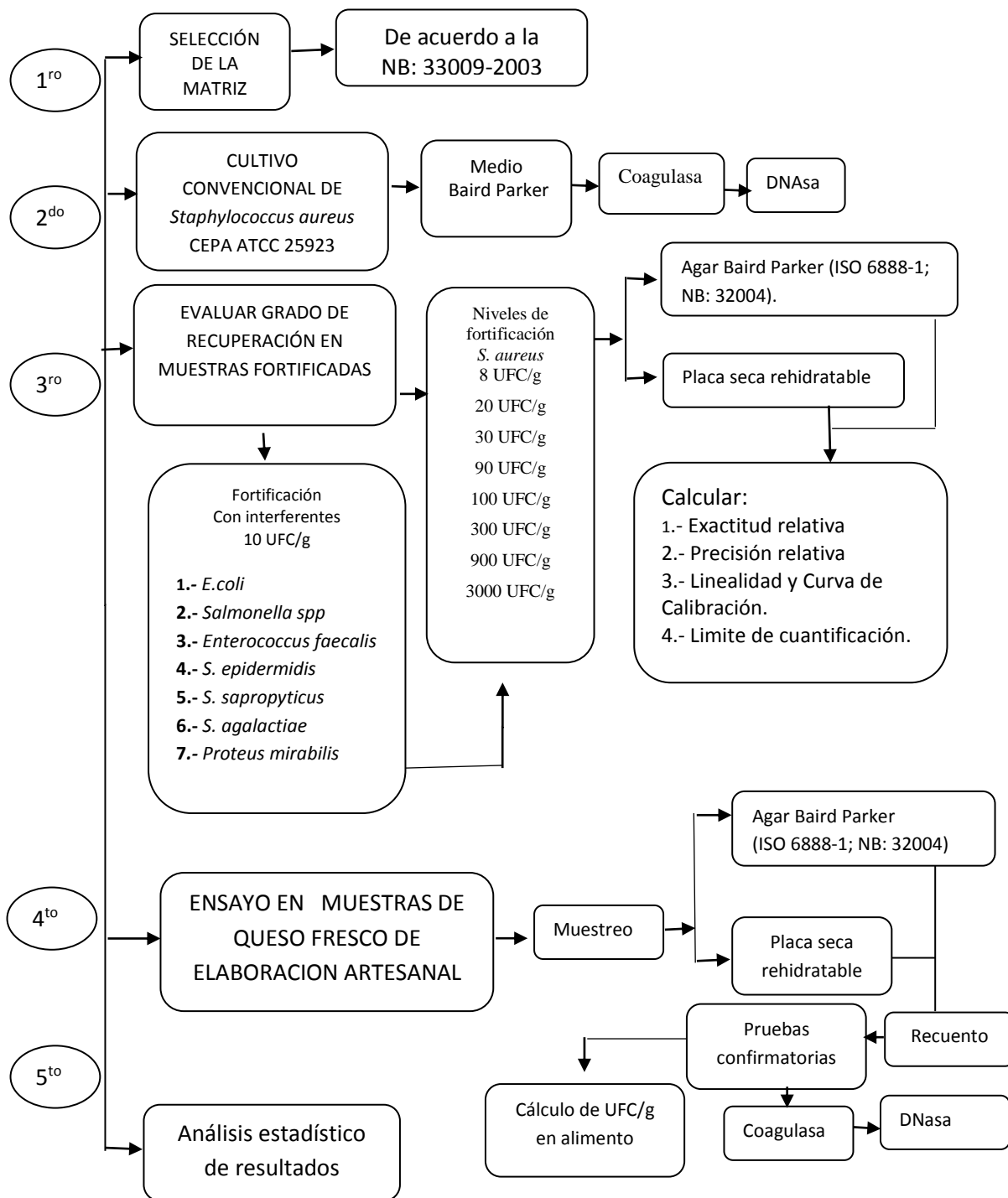
Variable	Tipo de variable	Operacionalización	Categorización o dimensiones	Definición
<b>Método de cuantificación</b> <i>S. aureus</i>	Cuantitativa	Comparación entre el recuento por placa seca rehidratable vs. NB:32004 ; ISO 6888-1	Disminución del tiempo en la emisión de resultados. Disminución del uso de energía eléctrica por uso de autoclave e incubadoras. Disminución el uso de agua potable para el lavado de material.	Incubación de 24 horas para Petrifilm, sin la necesidad de la preparación de medios de cultivo, por ende no se requiere el lavado del material ya utilizado, ahorro de energía eléctrica
<b>Método de muestreo</b>	Cuantitativo	muestreo probabilístico	Todos los individuos de la población pueden formar parte de la muestra.	Es el tipo de muestreo se utiliza en investigaciones de carácter analítico por ser riguroso y científico.
<b>Lugar de muestreo</b>	Cualitativo	Los lugares donde se procederá al muestreo serán: mercados populares de la ciudad de La Paz.	Se trabajara con estos centros de abasto por la gran afluencia de personas y por el comercio de quesos de fabricación artesanal.	Sitio donde serán recolectadas las muestras.

### 8.2 Universo y población o muestra.

La población de estudio estuvo constituida por 30 muestras de queso fresco de elaboración artesanal de expendio en mercados populares de la ciudad de La Paz.

### 8.3 Procedimiento.

El siguiente esquema, resume la metodología que se siguió en el desarrollo del presente trabajo.



### **8.3.1 Selección de la matriz.**

Para la selección de la matriz se ensayaron varios quesos frescos de diferentes marcas, analizando los parámetros definidos por la norma boliviana (NB) 33009-2003 (Tabla 5) e ISO 6888-1:2003 (siguiendo los pasos mencionados en el apartado **8.4.2.3-8.4.2.4**) procediendo a realizar seis repeticiones de la matriz a ensayar. Se pesaron 25g de muestra que fue diluida con un volumen de 250mL de agua peptonada, se homogenizó la muestra en un homogeneizador stomacher<sup>R</sup> 400 (circulater *pbi international*) durante 30s a 230rpm, posteriormente se realizaron diluciones seriadas  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$  en agua peptonada.

## **8.4 Cultivo convencional de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.**

### **8.4.2.1 Preparación de medio Baird Parker según norma NB: 32004; ISO 6888-1.**

Se preparó medio de cultivo Agar Baird Parker (Anexo 1), que fue esterilizado por calor húmedo (autoclave Medical USA healthcare) durante 15min a 1,5 atm de presión, a una temperatura de 121°C; después del proceso de esterilización se llevó a baño María a 42°C, ya atemperado el medio se le añadió Telurito de potasio al 1% y yema de huevo al 50% procediendo a su plaqueado, las placas preparadas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

### **8.4.2.2 Reactivación de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.**

Se inóculo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Anexo 19) en caldo cerebro corazón (BHI de sus siglas en inglés) (anexo 2), ya inoculada la cepa se incubó a 35°C durante 24 horas, conforme a lo descrito por la norma ISO y norma boliviana (apartado **8.4.2.3-8.4.2.4**) luego se realizó la siembra en medio Agar Baird Parker, realizándose posteriormente las pruebas de confirmación, de coagulasa y de la DNasa (anexo 3 y 4 respectivamente).

### **8.4.2.3 Recuento de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la norma ISO 6888-1.**

En una bolsa stomacher estéril, se procedió a pesar 25g de muestra, añadiéndose 225mL de agua peptonada, obteniéndose una dilución  $10^{-1}$ , de ahí se realizó una dilución más llegando a  $10^{-2}$ . Hechas las diluciones se procedió a inocular la dilución  $10^{-2}$  un volumen de 0,1mL por duplicado sobre la superficie de Agar Baird Parker, se distribuyó el inóculo con la ayuda de un asa de drigalsky, posteriormente se incubo las placas a 35°C por 48hrs. Pasado este tiempo se logró el desarrollo de colonias negras rodeadas de zonas claras características de *Staphylococcus aureus*. Como procedimiento confirmatorio para determinar la identidad del analito de interés, este método utiliza la prueba de coagulasa y DNasa.

Las *colonias típicas* son de color negro o gris, brillante y convexa (1 mm a 1 a 3 mm de diámetro después de la incubación durante 24hrs, y el 1 de 3 mm a 2,5 mm de diámetro después de la incubación durante 48 hrs.) y están rodeadas por una zona clara que puede estar parcialmente opaco. Después de la incubación durante al menos 24 hrs. un anillo opalescente inmediatamente en contacto con las colonias puede aparecer en esta zona clara.

Las *colonias atípicas* tienen el mismo tamaño que las colonias típicas y pueden presentar una de las siguientes morfologías: colonias negras brillantes con o sin un borde blanco estrecha; la zona libre está ausente o es apenas visible y el anillo opalescente está ausente o es apenas visible; Colonias grises libres de zona clara (ISO 6888-1: 2003).

Para realizar la prueba confirmatoria de la coagulasa, se inocularon cinco colonias típicas y cinco colonias atípicas en caldo BHI resiembra a 35°C por 24hrs. al cabo de este tiempo en un tubo estéril se puso 0,3mL de plasma y 0,1mL de cultivo, se homogenizo y se incubo a 35°C por 6 horas, se realizó la inspección cada 2 hrs. del cultivo para ver la formación del coagulo.

#### **8.4.2.4 Recuento de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la NB 32004:2004.**

En una bolsa stomacher estéril, se procedió a pesar 25g de muestra, inmediatamente se añadieron 225mL de agua peptonada obteniéndose una dilución  $10^{-1}$ , de ahí se realizaron



diluciones seriadas llegando a  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ . Hechas las diluciones se procedió a inocular un volumen de 0,3mL de la dilución  $10^{-3}$  en dos placas y un volumen de 0,4mL en una tercera placa sobre la superficie de Agar Baird Parker, se distribuyó el inóculo con la ayuda de un asa de drigalsky, posteriormente se incubaron las placas a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 48hrs. Como procedimiento confirmatorio para determinar la identidad del analito de interés, se realizó la prueba de coagulasa y DNasa. Tomando en cuenta el criterio de recuento presuntivo descrito en la tabla 7.

Tabla 7.- Criterio de confirmación del recuento presuntivo por la prueba de la coagulasa (NB 32004: 2004).

<b>N° de Colonias presuntivas en placa</b>	<b>Colonias a confirmar</b>
<b>&lt; 50</b>	3
<b>51 a 100</b>	5
<b>101 a 200 ó más</b>	7

### **8.5 Recuento de *Staphylococcus aureus* por placa seca rehidratable.**

En una bolsa de stomacher estéril, se pesó 25 gramos de la muestra, donde se agregó 225 ml de agua peptonada constituyéndose en la primera dilución  $10^{-1}$ , se homogenizo en un stomacher por 30s. Se hizo una dilución más, llegando  $10^{-2}$ . Se ubicaron las placas en una superficie plana y lisa. Se elevó la lámina superior y se inóculo 1mL de la dilución en el centro de la placa de la placa seca rehidratable sin hacer burbujas, se tocó suavemente la superficie de la placa con la pipeta para depositar la última gota. Se dejó caer la lámina superior suavemente, posteriormente se aplicó el esparcidor plano en el centro de la placa y se ejerció presión para distribuir la muestra de manera uniforme. Se esperó por 1 minuto para permitir que solidifique el gel. Dentro de los 10 minutos posteriores a la inoculación de las placas, se incubo en posición horizontal con el lado transparente hacia arriba; a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24hrs; llegando

a colocar hasta 20 placas secas rehidratables una sobre otra.

Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias rojo-violetas. No se contaron las colonias azul-verdosas (Anexo 19b).

### **8.6 Fortificación con interferentes.**

Se sometió a un proceso de fortificación la matriz elegida, con siete microorganismos interferentes perteneciente a la familia Micrococcaceae y Enterobacteriaceae (Anexo 10-18) los mismos fueron obtenidas del laboratorio de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés y del Laboratorio de Microbiología de alimentos del Instituto SELADIS.

Partiendo de cultivos axénicos inoculándolos en caldo BHI para poder obtener microorganismos en fase estacionaria, después de las 24 horas de incubación se procedió a realizar diluciones seriadas hasta alcanzar un recuento aproximado de 10 UFC/mL del desarrollo en caldo BHI.

Por lo descrito anteriormente se realizó el recuento en duplicado de las diluciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  en agar de recuento (PCA). Ya ensayado el volumen de inóculo se fortificó la matriz. De manera que se pesaron seis muestras de 25g de la matriz por nivel, posteriormente se añadió agua peptona en un volumen de 225mL, a los mismos se añadió el volumen ya ensayado para que las matrices presenten aproximadamente 10 UFC/g de cada cepa interferente, se homogeneizó las matrices en un stomacher<sup>R</sup> 400 (*circulater pbi international*), realizada esta acción se dejaron las muestras a 4°C hasta ser fortificadas.

### 8.7 Fortificación con *Staphylococcus aureus*.

Se fortifico la matriz elegida en diferentes niveles con poblaciones conocidas de *Staphylococcus aureus*, para poder realizar los indicadores de desempeño, las muestras contaminadas fueron ensayadas a paralelo aplicando las tres metodologías para determinar:

- 1.- Exactitud relativa.
- 2.- Precisión relativa.
- 3.- Linealidad y Curva de Calibración.
- 4.- Limite de cuantificación.

Para llevar adelante la comparación primero se establecieron niveles de contaminación con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29325 (Anexo 20) en la matriz previamente seleccionada. Para ello se procedió a la siembra de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en medio BHI, se incubo por 24 horas a 35°C, obteniendo un cultivo en fase estacionaria, se realizó diluciones seriadas hasta tener un recuento de 30 a 300 UFC/mL, conociendo la población aproximada se realizó el ajuste para poder obtener recuentos descritos en la tabla 8 según la AOAC, (2002).

Tabla 8.- Niveles de fortificación con cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

NIVEL	FORTIFICACIÓN ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	NÚMERO DE REPETICIONES POR NIVEL	FORTIFICACIÓN (INTERFERENTES)
0	0 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	0 UFC/g
1	8 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g
2	20 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g
3	34 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g

4	90 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g
5	112 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g
6	270 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g
7	1020 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g
8	5300 UFC/g	6 muestras de la matriz (recuento por duplicado)	70 UFC/g

### 8.7.1 Exactitud relativa.

Para conocer si el método obtiene resultados que se acerquen al valor real se debe de evaluar la exactitud del mismo; sin embargo, en este trabajo se manejó la exactitud relativa debido a que se trabaja con microorganismos, los mismos que pueden variar de número por varios factores como ser temperatura, procedimiento del laboratorio, operador, tiempo de incubación entre otros.

La exactitud relativa se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación, es decir, mediante el número de microorganismos que se recuentan en placas de Agar Baird Parker y placa seca en comparación con los inóculos de fortificación. Para ello se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación\%} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Valor de referencia}} * 100 =$$

Se calculó la recuperación de cada muestra analizada, empleando el promedio de los duplicados, y se obtuvo la recuperación total. Para que el método se considere exacto ha de cumplir un porcentaje de recuperación que se encuentre entre 70 y 120%.

### 8.7.2 Precisión relativa.

Se analizó la precisión relativa para observar la dispersión de los recuentos de los diferentes niveles por el método de cultivo alternativo a ser evaluado en relación al método de referencia.

Se realizó el cálculo a partir del recuento de las matrices contaminadas (9 niveles de diferente concentración), cada nivel de 6 repeticiones en condiciones de reproducibilidad y estimar la desviación estándar de reproducibilidad (RSD), comparándolo con el del método de referencia o bien con el valor RSD teórico. La precisión del método es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% de la del método de referencia o la RSD teórica para cada nivel de inóculo (ISO/TS 19036:2000).

$$RSD_{real} = \frac{S}{\bar{X}} \qquad RSD_{teórico} = \frac{1}{\sqrt{X}}$$

### **8.7.3 Linealidad y curva de calibración.**

Para determinar la linealidad se trabajó con 6 niveles de fortificación del análisis (0 UFC/g; 8 UFC/g; 34 UFC/g; 100 UFC/g; 1020 UFC/g; 5300 UFC/g) los ensayos se realizaron por duplicado, aplicando los tres métodos en paralelo para establecer su linealidad.

Para constituir una curva de calibración se trabajó en base a los datos obtenidos en el ensayo de linealidad donde se representara un gráfico donde el eje Y se encontraran los resultados obtenidos con el método alternativo (en valor logarítmico) y en el eje X el valor obtenido con el método de referencia (o con el material de referencia utilizado). En base a este gráfico se obtuvo una estimación del método de regresión.

A partir de los mismos se hizo un estudio de regresión ( $Y=a+bx$ ) en el que no solo se evaluó el coeficiente de correlación ( $r$ ) además de verificar que la hipótesis planteada en el trabajo se cumpliera (ejemplo: los valores de la recta están dentro de un intervalo de confianza del 95%) evaluando de este modo la linealidad o defecto de ajuste (Aptitud del método para dar resultados que estén en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la muestra).

#### **8.7.4 Límite de cuantificación.**

El límite de cuantificación se determinó con el objeto de poder conocer el número de UFC/g que puede ser recuperado por el método. El límite de cuantificación se obtuvo a través del nivel crítico (menor cantidad que puede ser detectada (no nula) pero no cuantificada como un valor exacto. Para ello se seleccionaron tres niveles de fortificación del microorganismo (mínimo, medio y alto) (0 UFC/g; 8 UFC/g; 30 UFC/g; 300 UFC/g) y se ensayaron cada uno de los niveles por seis replicas. Como dato importante, indicar que la AOAC define el límite de cuantificación como aquella en la que el coeficiente de variación (S/X) es inferior al 10%.

### **8.8 Muestreo de quesos frescos de elaboración artesanal.**

#### **8.8.1 Criterios de aceptación y rechazo**

Realizada la comparación de los métodos se procedió a la toma de muestras de quesos aplicando muestreo al azar tomadas de diferentes mercados populares de la ciudad de La Paz. Aplicando criterios de inclusión y exclusión como se indica líneas abajo.

##### **8.8.1.1 Criterios de inclusión.**

Las muestras fueron incluidas cuando se cumplían los siguientes criterios de elaboración: peso, almacenamiento y expendio.

- De manufactura artesanal.
- Conservados sin refrigeración.
- provenientes de mercados populares.
- Presentación del producto mayor a 250 gramos.

##### **8.8.1.2 Criterios de exclusión.**

No se incluyeron en el estudio las muestras que eran:

- Quesos maduros.
- Provenientes de supermercados.
- Conservados en refrigeración.
- Elaborados con leche pasteurizada.
- Presentación menor a 250 gramos.

### **8.8.2 Material y equipo de muestreo.**

El material que fue necesario para proceder con el muestreo fue:

- Conservador de plástico o de otro material aislante con tapa.
- Bolsas refrigerantes o bolsas de plástico impermeables con hielo cerradas.
- Marcadores indelebles.
- Cinta adhesiva.
- Formulario de muestreo.

### **8.8.3 Recolección de la muestra, Identificación y conservación de la muestra.**

Se adquirieron los quesos frescos de elaboración artesanal de diferentes mercados populares de la ciudad de La Paz al azar, se llenaron los datos del formulario de muestreo (Anexo 20) donde se registraron: la temperatura, descripción del entorno, sí existía la presencia de vegetales, frutas, legumbres, embutidos; tomando en cuenta si su expendio era en el suelo o en tarima. Como el expendio de quesos frescos de elaboración artesanal es expuesta al aire libre y a otros contaminantes, los recipientes para la recolección de muestras se abrieron únicamente en el momento de introducir las muestras y cerrarlos de inmediato. Se

identificaron las muestras por códigos numéricos, asegurando que cada muestra estaba correctamente identificada. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento.

#### **8.8.4 Recuento de *Staphylococcus aureus* en muestras de queso fresco de producción artesanal.**

Se rotularon las bolsas estériles stomacher con el código designado a cada muestra, a continuación con la ayuda de unos utensilios estériles se procedió a picar y homogenizar cada muestra, se pesó 25g de muestra, y puesta en 225mL de agua peptonada, siendo sometida a homogenización en un stomacher<sup>R</sup> 400 (circulater *pbi international*) durante 30s a 230 rpm, a continuación se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$  con agua peptonada, las diluciones a ser empleadas en el análisis fueron conservadas a 4°C hasta su análisis aplicando los métodos de placa seca rehidratable, NB-32004 e ISO 6888-1.

Se trabajó con la dilución  $10^{-2}$  para el análisis por placa seca rehidratable e ISO 6888-1 porque se consideró el volumen del inóculo y el diseño del método, para el método alternativo la presencia del agente cromogénico que ayuda la diferenciación de las colonias de *S. aureus* el inóculo de 1mL no presenta ningún inconveniente, pero si para el método descrito por la ISO, porque el inóculo es de 0,1mL llegando a diluir indirectamente una vez más la muestra, de modo que si se trabaja con muestras más diluidas el analito también se diluye. Por otro lado se trabajó con la dilución  $10^{-3}$  para la NB 32004, considerando lo descrito anteriormente, en este caso el inóculo de 1mL fue fraccionado en 3 placas de Agar Baird Parker (2 placas con un inóculo de 0,3mL y 1 placa con un inóculo de 0,4mL) de modo de obtener un recuento que se encuentre entre un intervalo de 25 a 250UFC/g de alimento.



Se analizaron las muestras por las tres metodologías en paralelo, buscando ensayar todo en un mismo tiempo, una misma matriz y un mismo operador. Con la finalidad de que la variación sea mínima.

### **8.9 Análisis estadístico.**

En una primera instancia se transformaron los datos UFC/g a logaritmo en base 10 ( $\log_{10}$  UFC/g), porque los datos obtenidos como UFC/g siguen una distribución asimétrica, de modo que fue necesaria una normalización previa a fin de realizar el tratamiento estadístico. Se evaluaron los datos que presentaban un comportamiento normal (Anexo 21). Los paquetes estadísticos utilizados: Microsoft Office Excel 2013, minitab16 y Epi Info<sup>TM</sup> 7.0.

## 9. Resultados.

### 9.1 Elección de la matriz.

Tabla 9.- Evaluación de matriz a ser empleada para la fortificación.

NORMA TÉCNICA	PARÁMETRO	VALOR ENCONTRADO	VALOR DE REFERENCIA	NORMA DE REFERENCIA
NB – 32004	<i>Staphylococcus aureus</i> .	< 10 UFC/g	10 UFC/g	NB 33009-2003

Se ensayaron diferentes matrices de queso fresco de elaboración artesanal de acuerdo a los requerimientos microbiológicos de la NB: 33009-2003. La tabla 9, muestra el valor encontrado referente a la carga bacteriana de la matriz elegida y la misma se encontró en el valor de < 10 UCF/g del analito de interés.

### 9.2 Cultivo convencional de *Staphylococcus aureus*, de acuerdo a la ISO 6888-1-2003 y NB 32004: 2004.

Tabla 10.- Morfología de colonias de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird Parker.

Medio de cultivo	Colonia típica	Colonia atípica
Agar Baird Parker	Gris-negro, brillante. Rodeada por dos halos opaca resultante de la lipólisis y otra trascendencia debido a la proteólisis.	Ausencia o presencia de un halo, formato irregular de color marrón o blanco.

La tabla 10, describe la morfología de una colonia típica y atípica en medio de cultivo Baird Parker, Tras la reactivación de la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* se obtuvo el desarrollo de colonias características en agar Baird Parker (Anexo 9). Además se realizó las pruebas confirmatorias coagulasa y DNasa (Anexo 10).

### 9.3 Fortificación de la matriz.

Tabla 11.- Recuperación de *Staphylococcus aureus* en los diferentes niveles de fortificación aplicando los métodos de cultivo en placa seca rehidratable y cultivo convencional según NB 32004: 2004 e ISO 6888-1:2003.

Nivel	CONTROL	RECuento			log base 10		
		NORMA ISO UFC/g	NORMA BOLIVIANA UFC/g	PLACA SECA REHIDRATABLE UFC/g	NORMA ISO UFC/g	NORMA BOLIVIANA UFC/g	PLACA SECA REHIDRATABLE UFC/g
0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	0	0	8	0	0	0,9
2	20	20	18	19	1,3	1,3	1,3
3	34	30	24	29	1,5	1,4	1,5
4	112	90	96	101	2,0	2,0	2,0
5	278	260	260	269	2,4	2,4	2,4
6	350	330	340	313	2,5	2,5	2,5
7	1020	900	1000	919	3,0	3,0	3,0
8	5300	3500	4800	4766	3,5	3,7	3,7

La tabla 11, muestra el recuento del ensayo de los diferentes niveles de fortificación por el método de cultivo en placa seca rehidratable y método de cultivo convencional descrito por las normas ISO 6888-1 y NB 32004. Se realizó la fortificación de la matriz seleccionada para evaluación de los indicadores de desempeño.

#### 9.3.1 Exactitud relativa.

Tabla 12.- Exactitud relativa de los métodos de cultivo placa seca rehidratable y cultivo convencional a distintos niveles de fortificación.

VALOR ESPERADO	Recuento	NORMA ISO		NORMA BOLIVIA		PLACA SECA REHIDRATABLE	
		MEDIA±SD	% RECUPERACIÓN	MEDIA±SD	% RECUPERACIÓN	MEDIA±SD	% RECUPERACIÓN
NIVEL	Log UFC/g						
1	0,9	-----	-----	-----	-----	0,86 ± 0,0476	95,60%
2	1,3	0,90 ± 0,2458	69,20%	1,1 ± 0,0517	82,82%	1,27 ± 0,0295	97,90%
3	1,53	1,29 ± 0,0995	84,42%	1,3 ± 0,0280	84,99%	1,45 ± 0,0164	95,00%
4	2,05	1,87 ± 0,0412	91,39%	1,9 ± 0,0164	93,77%	2,00 ± 0,0235	97,80%
5	2,44	2,35 ± 0,0205	96,38%	2,4 ± 0,0070	97,62%	2,43 ± 0,0098	99,40%
6	2,54	2,45 ± 0,0336	96,50%	2,5 ± 0,0196	97,41%	2,49 ± 0,0186	98,10%
7	3,01	2,88 ± 0,0221	95,79%	2,9 ± 0,0190	96,16%	2,96 ± 0,0172	98,50%
8	3,72	3,43 ± 0,0494	92,25%	3,6 ± 0,0327	97,27%	3,68 ± 0,0288	98,70%

Como se puede observar en la tabla 12, la exactitud relativa del método de placa seca rehidratable es de 95,6% de recuperación para el nivel más bajo (aproximadamente 8 UFC/g)

y 98,7% de recuperación para el nivel de contaminación más alto (aproximadamente 5300 UFC/g), teniendo como promedio un valor de 97.6% de exactitud relativa.

El método convencional descrito por la norma ISO, fue de 69,2% de recuperación para el segundo nivel más bajo (aproximadamente 20 UFC/g) y 92,25% de recuperación para el nivel de contaminación más alto (aproximadamente 5300 UFC/g),

Para el caso de la norma boliviana, la exactitud relativa fue del 82,82% para el segundo nivel más bajo (aproximadamente 20 UFC/g) y 92,25% para el nivel de contaminación más alto (aproximadamente 5300 UFC/g),

### 9.3.2 Precisión relativa.

Tabla 13.- Precisión relativa de los métodos de cultivo en placa seca rehidratable y cultivo convencional a distintos niveles de fortificación.

NIVEL	<i>RSD teórico</i>	NORMA ISO		NORMA BOLIVIA		PLACA SECA REHIDRATABLE	
		MEDIA±SD	RSDcal	MEDIA±SD	RSDcal	MEDIA±SD	RSDcal
1	1,0523	-----	-----	-----	-----	0,86 ± 0,0476	0,0147
2	0,8767	0,90 ± 0,2458	0,2731	1,1 ± 0,0517	0,0470	1,27 ± 0,0295	0,0038
3	0,8081	1,29 ± 0,0995	0,0771	1,3 ± 0,0280	0,0215	1,45 ± 0,0164	0,0009
4	0,7153	1,87 ± 0,0412	0,0220	1,9 ± 0,0164	0,0086	2,00 ± 0,0235	0,0012
5	0,6986	2,35 ± 0,0205	0,0087	2,4 ± 0,0070	0,0029	2,43 ± 0,0098	0,0001
6	0,6405	2,45 ± 0,0336	0,0137	2,5 ± 0,0196	0,0078	2,49 ± 0,0186	0,0008
7	0,5765	2,88 ± 0,0221	0,0076	2,9 ± 0,0190	0,0065	2,96 ± 0,0172	0,0004
8	0,5182	3,43 ± 0,0494	0,0144	3,6 ± 0,0327	0,0090	3,68 ± 0,0288	0,0009

Como se puede observar la tabla 13, se calculó la *RSDcal* de todos los niveles ensayados, tanto del método de cultivo en placa seca rehidratable como en el método de cultivo convencional descritos por las normas ISO y NB, obteniéndose en todos los casos valores por debajo del *RSDt*. Teniendo en consideración que la precisión relativa del método a ser evaluado es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% de la del método de referencia o la *RSD* teórica (segunda columna tabla 13) para cada nivel de inóculo (ISO/TS 19036:200).

### 9.3.3 Linealidad y curva de calibración.

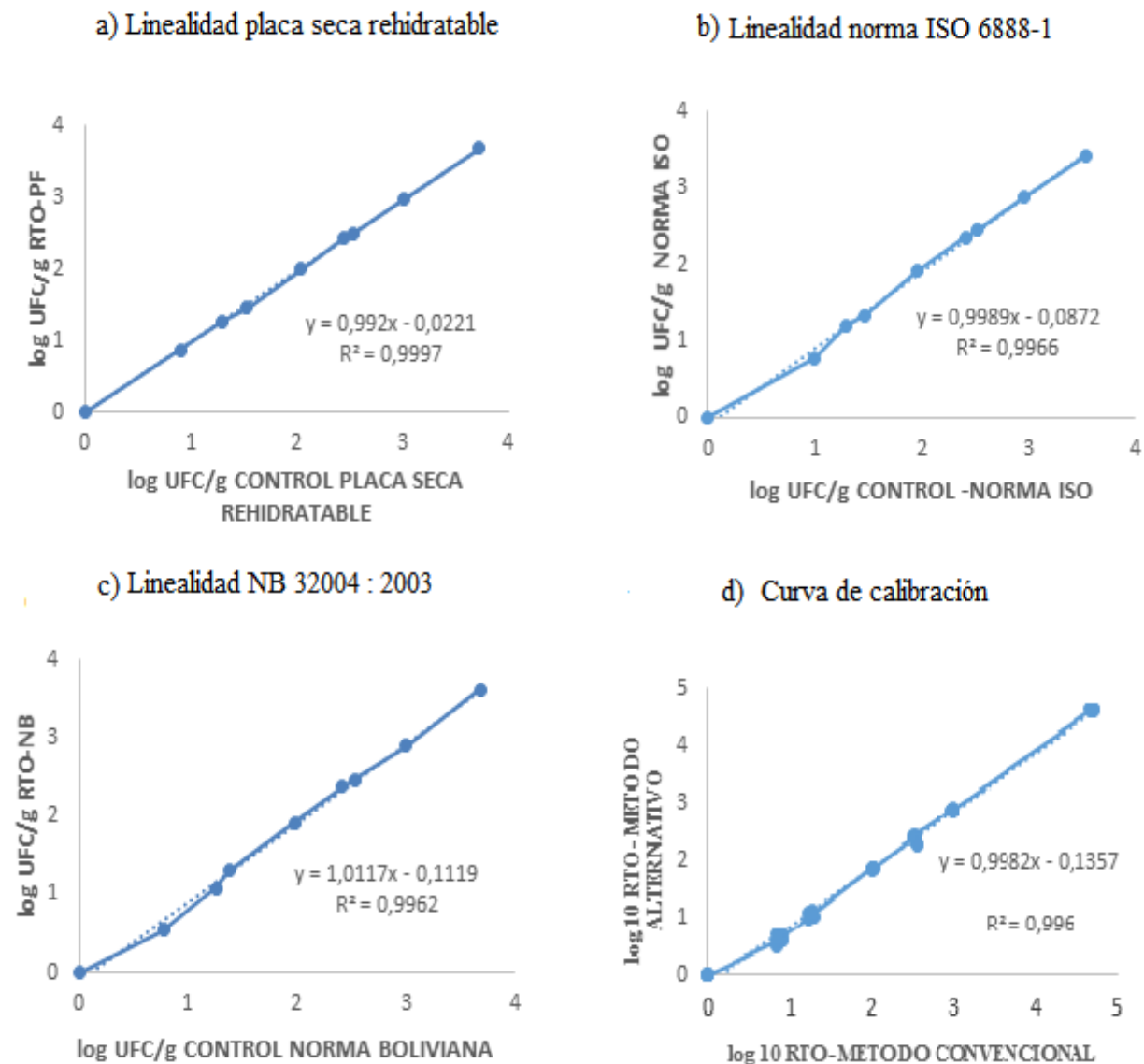


Figura 2.- Correlación del recuento de *Staphylococcus aureus*: niveles de fortificación en relación a controles. Obteniéndose en promedio una correlación de  $R^2 = 0,997$  tanto en la evaluación de la linealidad de los métodos como en la correlación de la curva de calibración. Los valores en UFC/g fueron transformados en valores de log de base 10, para poder realizar el análisis estadístico de las tres metodologías.

TABLA 14.- Análisis de varianza (ANOVA) de doble vía: recuento por diferentes métodos versus nivel de concentración de *Staphylococcus aureus*.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
niveles	49,953637	7	7,13623386	12,6367661	2,8814E-06
métodos	36,0347329	3	12,0115776	21,2699724	1,4355E-06
Error	11,8591188	21	0,56471994		
Total	97,8474888	31			

En la tabla 14, se muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de doble vía, niveles de concentración de *Staphylococcus aureus* y los métodos de recuento, donde se obtuvo un  $P < 0,05$ .

#### 9.3.4 Límite de cuantificación.

Tabla 15.- Límite de cuantificación de los métodos de cultivo en placa seca rehidratable y cultivo convencional.

	<b>MEDIA ± SD</b>	<b>CV% 8 UFC/g</b>	<b>MEDIA ± SD</b>	<b>CV% 20 UFC/g</b>	<b>MEDIA ± SD</b>	<b>CV% 30 UFC/g</b>
<b>NORMA ISO</b>	0,64 ± 0,17	26,56	1,08 ± 0,05	27,32	1,30 ± 0,03	2,16
<b>NORMA BOLIVIANA PLACA SECA</b>	0,53 ± 0,10	18,87	1,00 ± 0,25	4,80	1,29 ± 0,10	7,1
<b>REHIDRATABLE</b>	0,86 ± 0,01	1,163	0,10 ± 0,11	0,09	0,17 ± 0,16	0,17

En la tabla 15, el método *placa seca rehidratable* presentó un coeficiente de variación del 1,16%, llegando a cuantificar por debajo de 10 UFC/g, en relación a los métodos de cultivo convencional donde por la norma ISO presentó el 2,16%, llegando a cuantificar a partir de 30 UFC/g de alimento y para la norma boliviana se obtuvo un coeficiente de variación del 4,80%, llegando a cuantificar a partir de 20 UFC/g de alimento.

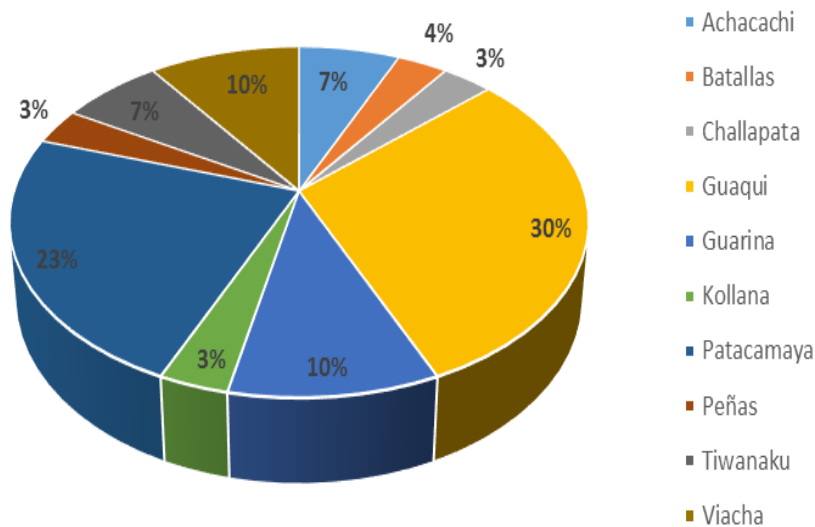
Tabla 16.- Análisis de varianza (ANOVA) de una vía: límite de cuantificación versus método de recuento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	0,35287778	2	0,17643889	9,52179649	0,00214003
Dentro de los grupos	0,27795	15	0,01853		
Total	0,63082778	17			

En la tabla 16, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, donde se obtuvo un  $P < 0,05$  donde pone de manifiesto que existe diferencia estadísticamente significativa, resultado que concuerda con el cálculo del coeficiente de variación, donde el método de placa seca rehidratable puede realizar un recuento  $< 10$  UFC/g, a comparación de los métodos convencionales donde su límite de cuantificación es  $\geq 10$  UFC/g.

#### 9.4 Muestreo de quesos frescos de elaboración artesanal.

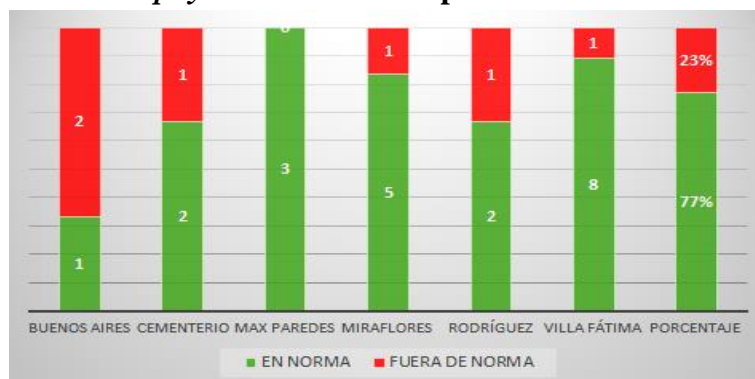
##### 9.4.1 Porcentaje de muestras según su procedencia.



La Figura 3, muestra que los quesos objetos de este estudio proceden de Guaqui con un porcentaje del 30%, seguido de Patacamaya con un 23,3%.

## 9.4.2. Relación de recuperación de *Staphylococcus aureus* en muestras de queso fresco de elaboración artesanal.

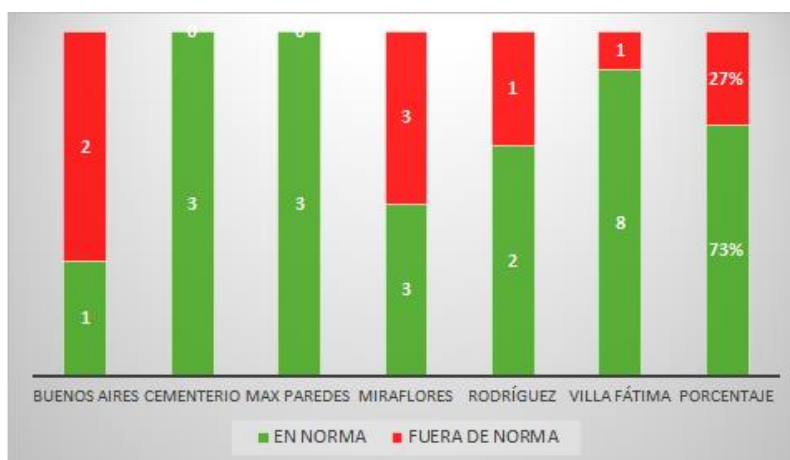
### 9.4.2.1 Recuperación de *Staphylococcus aureus* aplicando norma ISO 6888-1:2003



$\chi^2$	gl	P
9,1925	8	0,3263

Figura 4, podemos observar que por el método de cultivo convencional ISO 6888-1:2003 que de las 30 muestras analizadas un 77% de las muestras analizadas se encuentran en norma y el 23% de las muestras presenta un recuento  $>10$  UFC/g de *Staphylococcus aureus* (NB: 33009:2003). De acuerdo al estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con 8 grados de libertad no existe significancia estadística  $\chi^2$  13,9286  $<$  15,51 que la presencia de *Staphylococcus aureus* no se encuentra relacionado al mercado de expendio.

### 9.4.2.2 Recuperación de *Staphylococcus aureus* aplicando norma boliviana 32004:2004.



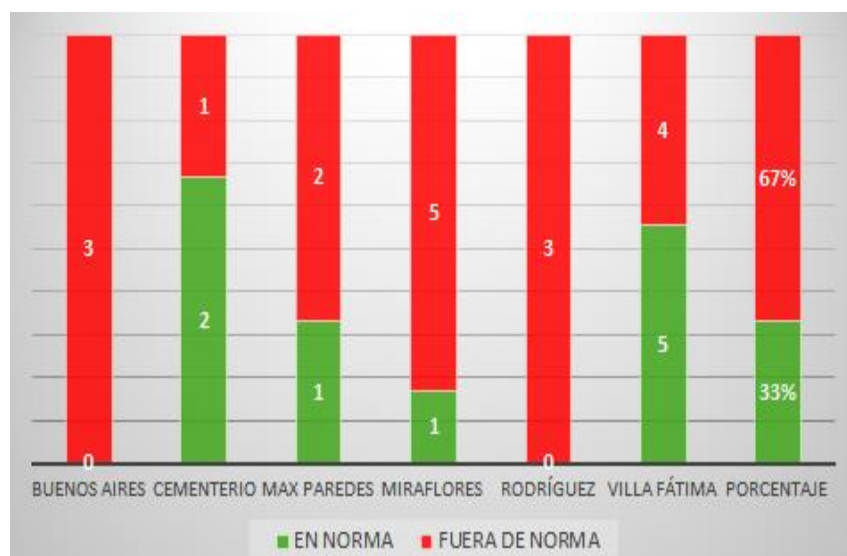
$\chi^2$	gl	P
10,9659	8	0,2036

Figura 5, podemos observar que por el método de cultivo convencional NB 32004:2004, que de 30 muestras analizadas un 73% de las muestras analizadas se encuentran en norma y el 27% de las muestras presenta un recuento  $>10$  UFC/g de *Staphylococcus aureus*



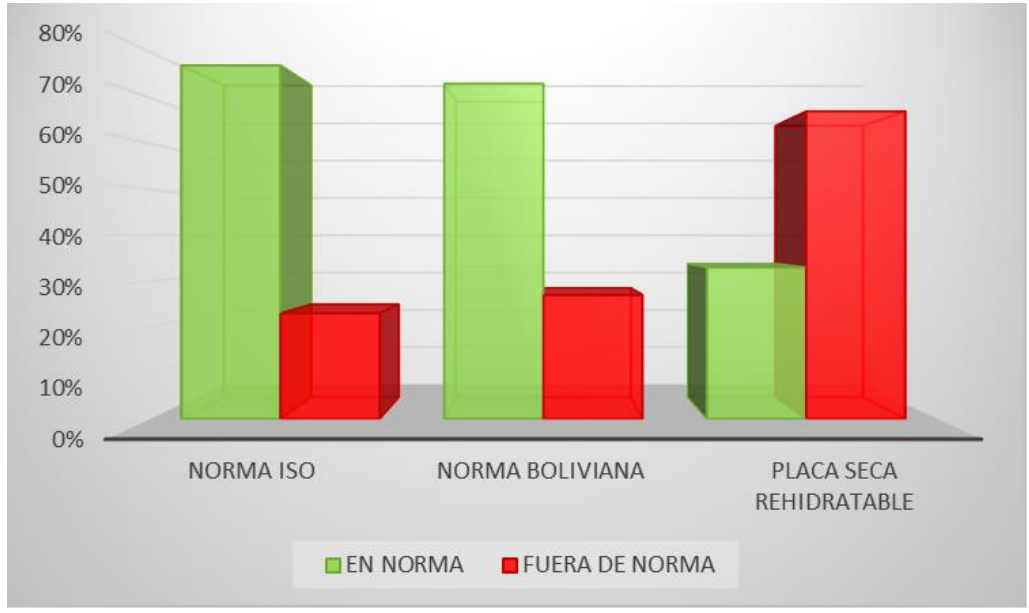
(NB: 33009: 2003). De acuerdo al estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con 8 grados de libertad no existe significancia estadística  $\chi^2$  13,9286 < 15,51 ( $\chi^2$  tabulado Software minitab16), que la presencia de *Staphylococcus aureus* no se encuentra relacionado al mercado de expendio.

#### 9.4.2.3 Recuperación de *Staphylococcus aureus* aplicando placa seca rehidratable.



$\chi^2$	gl	P
10,25	8	0,2479

Figura 6.- podemos observar que por el método de cultivo en placa seca rehidratable que de las 30 muestras analizadas solo el 33% de las muestras se encuentran en norma y el 67% de las muestras presenta un recuento >10 UFC/g de *Staphylococcus aureus* (NB: 33009: 2003). De acuerdo al estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con 8 grados de libertad no existe significancia estadística  $\chi^2$  13,9286 < 15,51 ( $\chi^2$  tabulado Software minitab16), que la presencia de *Staphylococcus aureus* no se encuentra relacionado al mercado de expendio.



*Figura 7.-* Se muestra la interacción del porcentaje de las muestras que se encuentran en norma y fuera de ella por las metodologías, donde por medio del cultivo en placa seca rehidratable se obtuvo un 33% de muestras que están en norma y el 67% fuera de norma, por otro lado se observa que por el método de cultivo convencional se obtiene que el 77% de las muestras están en norma y solo el 23% fuera de norma.

## **10. Discusión**

### **10.1 Selección de la matriz.**

En esta etapa del estudio es importante trabajar con una matriz sin carga microbiana y principalmente que carezca del analito objeto de estudio para evitar resultados erróneos por interferencias o valores errados y de esta forma realizar la evaluación de desempeño, porque cuando se realizó la fortificación se notó que si bien la matriz carecía de la presencia de *S. aureus* la matriz presentaba microbiota acompañante que al momento de fortificar la matriz con los interferentes y con el analito de interés el recuento salía del rango de trabajo recomendado entre (25 a 250UFC/g de alimento NB 32004:2004) que se sugiere en esta norma. Por lo tanto concordamos con Calasso (2016) quien sugiere trabajar estos ensayos con matrices comerciales las cuales se encuentran libres de microorganismos, sin embargo estas matrices presentan un costo extra.

### **10.2 Cultivo convencional de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, de acuerdo a la ISO 6888-1-2003 y NB 32004: 2004.**

Es muy importante seguir las directrices de la normativa vigente para hacer el recuento respetando los tiempos habiéndose observado por el método convencional, que pasado el tiempo de incubación y dejando los medios de cultivo a temperatura ambiente para hacer el recuento y posterior confirmación con la prueba de coagulasa y DNasa, se observó que la variación en el tiempo de lectura conlleva a variaciones en la morfología de las colonias que desarrollan sobre la superficie del medio Agar Baird Parker perdieron sus características morfológicas, por lo observado se concuerda con Soares (2011) quien indica que este

fenómeno sucede por la pérdida en el porcentaje de humedad, consumo de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas para el microorganismo. Por otra parte afirmamos que las colonias que no presentan características morfológicas del agente de estudio pueden dar lugar a errores por de igual forma que Ruaro (2013) quien realizó el estudio empleando el cultivo convencional para el aislamiento y posterior identificación de *Staphylococcus coagulasa* positiva, denota que si las colonias pierden sus características morfológicas, dan lugar a un recuento erróneo.

Por otro lado las normas ISO 6888-2:1999 y NB: 32004-2004 proporcionan las directrices para poder realizar la prueba de la coagulasa donde se indica que la relación de plasma y cultivo es de 3:1, sin embargo, se observó que con esta relación se obtenía una coagulación parcial, similar a la que es descrita por Alonso (2008) quien realizó la comparación de métodos de recuento por placa seca rehidratable, observa que en las pruebas de la coagulasa, la coagulación del plasma era parcial (hasta 2 cruces); el investigador argumenta que esto puede deberse a que los microorganismos aislados en alimentos se encuentran injuriados por el tratamiento de elaboración del producto y condiciones de almacenamiento. Por lo citado anteriormente en este estudio se modificó la relación de plasma y cultivo llevando a una relación 1:1 para obtener una coagulo consistente con la finalidad de no dar como resultado un falso negativo.

### **10.3 Indicadores de desempeño.**

En el presente estudio se trabajó con diferentes niveles de concentración del analito de interés, siguiendo las directrices de la AOAC (2002) que recomienda el uso niveles de fortificación para el ensayo de métodos alternativos, los mismos fueron desde un nivel bajo donde se determinó el límite de cuantificación hasta un nivel mal alto donde se estableció la linealidad del método. Se coincide con la metodología descrita por ISHA (2015) quien valido el método de placa seca rehidratable ante la AFNOR, realizo la misma metodología pero no para una matriz sino para cinco matrices como lo exige la ISO: 16140/A1 (2011).

#### **10.3.1 Exactitud relativa.**

Se trabajó con la exactitud porque no podemos manejar a los microorganismos como analitos químicos, su variación en número se puede deber a muchos factores, por un lado relacionados con la matriz a ensayar y por el otro lado las condiciones de laboratorio para poder realizar el recuento de este microorganismo en una matriz dada. Por otra parte la AOAC (2002) quien considera aceptable la exactitud relativa de un método alternativo cuando presenta un rango de 70-120% de recuperación, en este estudio se obtuvo valores dentro del rango de aceptación en todos los niveles por los tres métodos ensayados a excepción del cultivo convencional que aplico la norma ISO llegando a no aceptar el segundo nivel más bajo (20UFC/g) que fue de 69,2% (tabla12), esto estaría dado por la concentración del nivel de fortificación porque a partir de 30UFC/g la exactitud es aceptable. Coincidiendo con Nogueira (2010) quien realizo

la comparación entre el medio Baird Parker, agar plasma fibrinógeno de conejo y placa seca rehidratable para el recuento de *Staphylococcus aureus* en leche cruda. Sin embargo, no se llegaría a coincidir con Nyachuba (2007) quien obtuvo un porcentaje de recuperación de 82,6% para el método de placa seca rehidratable y 92,5% para el método referencia ISO. Esta variación puede deberse por los factores intrínsecos e extrínsecos de la matriz a ser ensayada, porque Nyachuba trabajó con leche de oveja.

### **10.3.2 Precisión relativa.**

Por lo descrito por la ISO/TS (19036:2000) que define que la precisión relativa del método es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% en comparación con el método de referencia o la RSD teórica. Se coincide con ISHA (2015) quien realizó la validación del método de placa seca rehidratable obtenido valores de RSD de 0.116 en método de referencia y un RSD de 0,074 para el método de placa seca rehidratable, siguiendo la normativa ISO 16140/A1 (2011). Los valores mencionados se asemejan a los obtenidos en el presente estudio, en todos los niveles tanto de la placa seca rehidratable y método de cultivo convencional.

### **10.3.3 Linealidad y curva de calibración.**

Se convirtieron los recuentos en UFC/g en log de base 10 para poder realizar el análisis estadístico al igual que Loiane (2015). Por el análisis de regresión lineal se llega a coincidir con los resultados obtenidos por ISHA (2015) quien realizó la validación del método de placa

seca rehidratable para *Staphylococcus aureus* en cinco matrices diferentes como lo sugiere ISO: 16140/A1 (2011).

En este estudio se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de doble vía, niveles de concentración de *Staphylococcus aureus* y los métodos de recuento, donde se obtuvo un  $P < 0,05$ . Coincidiendo con Nogueira (2010) quien obtuvo valores de  $P < 0,05$  en el análisis estadístico de las pruebas que desarrollo comparando el método de placa seca rehidratable frente al medio Baird Parker y agar plasma fibrinógeno de conejo, Nogueira hace referencia que la mejora de este método radica en la incorporación de un cromógeno que evidencia la presencia y facilita el recuento de las colonias de *Staphylococcus coagulasa* positivos y el volumen del ensayo.

#### **10.3.4 Límite de cuantificación.**

En el presente estudio se trabajó con  $\approx 8$  UFC/g de alimento en el nivel más bajo. En este ensayo se determinó que el método de placa seca rehidratable es por debajo de  $< 10$  UFC/g a comparación del método convencional donde para norma ISO el límite de cuantificación es de 30UFC/g de alimento y para la norma boliviana es de 20UFC/g. De modo que por el método convencional no se llegaría a cumplir lo requerido por la norma NB: 33009-2003 donde se cita como límite 10 UFC de *Staphylococcus aureus* por gramo de alimento.

Lo anterior posiblemente se deba al inóculo en la NB de 1mL esta fraccionada en tres (0,3mL; 0,3mL y 0,4mL) y en el caso de norma ISO, el volumen de inóculo es de 0,1mL. (Sí por

ejemplo tenemos una matriz con 100 UFC/g, al hacer la dilución  $10^{-1}$  solo se tendrá 10 UFC/g en la dilución y de acuerdo a la norma ISO se sembró 0,1mL por duplicado, en este caso se tendría que esperar el desarrollo de una colonia de *Staphylococcus aureus*), se debe de tomar en cuenta que las matrices alimenticias cuentan con una microbiota variada propia, lo que ocasionaría que se emita un recuento erróneo. En el caso del recuento por el método de placa seca rehidratable es de 1mL evitándose este fraccionamiento que conlleva a ser un punto crítico cuando no se cuenta con personal calificado y que además el recuento es más sencillo por la presencia del agente cromogénico que poseen las placas.

#### **10.4 Muestreo de quesos frescos de elaboración artesanal.**

Hecha la comparación de las metodologías, se buscó evaluar el rendimiento en muestras naturalmente contaminadas, de modo que se optó por muestrear quesos frescos de elaboración artesanal porque los mismos carecen de controles de calidad estrictos, según Caballero (2015) y Beuchat (2016) que se encuentra trabajando con el método de placa seca rehidratable en alimentos comparando con el cultivo convencional, consiguieron resultados representativos en los ensayos realizados. Donde por análisis estadístico se obtuvo un  $p < 0,05$  comparando ambas metodologías, de modo que Caballero (2015) propone considerar el método de placa seca rehidratable como método alternativo para el análisis microbiológico de alimentos.

Se observó que por medio del método de placa seca rehidratable se obtuvieron los resultados en menos tiempo y con menos mano de obra en comparación con el método de cultivo



convencional, además que con la metodología de la placa seca rehidratable se pueden realizar recuentos de niveles bajos, que según Silva (2005) se debe a una mejor sensibilidad esto debido al volumen del inóculo de la muestra que es de 1mL y la presencia del agente cromógeno,

Por otro lado Beuchat (2016) quien hace mención que el recuento por placa seca rehidratable se facilita por la presencia del azul de *o*-toluidina que facilita la visualización de la reacción de desoxirribonucleasa (DNasa) organismos DNasa positivos son *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*. Estos tres microorganismos representan la mayoría del grupo de organismos comúnmente conocidas como estafilococos coagulasa positiva. De modo que el recuento en placa seca rehidratable consiste en contar solamente las colonias rojo violeta. Por lo citado anteriormente solo se debería citar el análisis de un alimento como recuento de *Staphylococcus* spp., porque *Staphylococcus aureus* no es el único microorganismo coagulasa positivo que podría estar presente en queso u otra matriz.

## 11. CONCLUSIONES

- Se comparó el desempeño del método de placa seca rehidratable frente al cultivo referido en las normas ISO 6888-1:2003 y NB 32004: 2004 para el recuento *Staphylococcus aureus* en quesos frescos de elaboración artesanal por medio del ensayo de niveles de fortificación. De acuerdo al análisis estadístico se obtuvo un  $p < 0,05$  que evidencia que sí existe diferencia estadísticamente significativa por lo que se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula que se planteó en este trabajo, siendo el método de cultivo en *placa seca rehidratable* aplicado para el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos, superior en desempeño en relación al cultivo convencional.
- Se utilizó las diferentes marchas microbiológica convencional y alternativo para evaluar la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, habiéndose recuperado al analito según lo descrito por las normas ISO 6888-1:2003 y NB: 32004 2004. En cuanto a sus características morfológicas se refiere.
- Se determinaron los indicadores de desempeño del método de cultivo en placa seca rehidratable por medio de la fortificación de la matriz elegida, donde podemos concluir que tanto la exactitud relativa, precisión relativa y linealidad se asemejan al del método convencional, pero no así límite de cuantificación.
- Por medio del análisis del límite de cuantificación se concluye que el método alternativo llega a recuperar por debajo de 10 UFC/g y no así la metodología convencional.
- Se evaluó la capacidad de recuperación de los métodos objeto de este estudio aplicando los mismos, habiéndose obtenido en placa seca rehidratable una recuperación del 67% de muestras que no se encontraban en norma frente al 27% de recuperación por el método de cultivo convencional. Donde se constató que el límite de cuantificación para norma ISO se

encuentra por encima de 30UFC/g de alimento y para norma boliviana es de 20UFC/g de alimento, de modo que ambas normativas no respondían al valor límite de 10UFC/g citado por la norma NB33009:2003, llegando a concluir que el método de placa seca rehidratable tiene una recuperación mayor en relación a los métodos citados con respecto al tiempo del análisis y al límite de cuantificación.

## **12.- Recomendaciones**

- Utilizar matrices comerciales para la fortificación con el microorganismo de interés, porque los mismos presentan certificación que no presenta contaminación microbiana, garantizando que en el proceso de fortificación las concentraciones responderán a los niveles propuesto en el ensayo.
- Trabajar con cepa ATCC de referencia, con la finalidad de poder observar el desarrollo característico en el medio para su estudio.
- La comparación de métodos se debe realizar en iguales condiciones en paralelo, en una misma marcha ensayar la matriz fortificada por las metodologías a ser comparadas, para evitar las variaciones por factores de tiempo o carga microbiana de la matriz entre otros.
- Difundir la información generada hacia las entidades reguladoras de control y vigilancia de alimentos con el objeto de coadyuvar con la toma de medidas preventivas o correctivas para evitar el consumo de alimentos contaminados y de esta forma garantizar la inocuidad de los mismos.

### 13.- Perspectivas futuras

Dentro de las perspectivas futuras se tienen:

- Realizar el análisis molecular por qPCR de las cepas aisladas en el presente estudio para determinar su capacidad toxigénica.
- Aplicar la metodología de la placa seca rehidratable para recuento de *Staphylococcus aureus* en otras matrices diferentes a queso fresco.
- Aplicar la metodología de placa seca rehidratable para el análisis de otros indicadores sanitarios como: *Escherichia coli*, Coliformes, entre otros que se requieran realizar recuento.
- Recomendar la metodología de la placa secar rehidratable como NB para el recuento de *Staphylococcus aureus* al IBNORCA como entidad normalizadora en nuestro medio para su incorporación dentro del apartado del análisis microbiológico.

## 14. Bibliografía.

- A. Ruaro, Andrighetto G, Sandra Torriani, Angiolella Lombardi; 2013. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiology* 34:10-11.
- AOAC International. 2002. Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.
- Asociación Española de Normalización y certificación. 2004. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos UNE-EN ISO 4833: AENOR
- Bamberger DM, Boyd SE. 2005. Management of *Staphylococcus aureus* Infections. *Am Fam Physician*. 72(12): 2474-2481.
- Bhatia A, Zahoor S. 2007. *Staphylococcus Aureus* Enterotoxins: A Review. *J Clin Diag* 3(1): 188-197.
- Borbolla Sala ME, Vidal Pérez MR, Piña Gutiérrez OE, Ramírez Messner I, Vidal Vidal JJ. 2004. Contaminación de los alimentos por *Vibrio colerae*, Coliformes fecales, *Salmonella*, Hongos, Levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante el 2003. *Salud en Tabasco*. 10(2): 221-232.
- Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*. 17(4): 287-305.
- Cairns, B.J., Timms, A.R., Jansen, V.A.A., Connerton, I.F., Payne, R.J.H., 2009. Quantitative models of in vitro bacteriophage–host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathogens* 5:1–10.

- Chapman, GH. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J Bacteriol.* 50(2): 201-203.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Chen, T.R., Chiou, C.S., Tsen, H.Y., 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 92, 189–197.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., Brasca, M., Castiglioni, B., 2007. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology* 45, 586–591.
- Danish Institute for food and Veterinary Research. NORDVAL 2004. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2014b. Microbial ecology dynamics reveal a succession in the core microbiota involved in the ripening of pasta filata Caciocavallo Pugliese cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6243-6255.
- Forsythe SJ. 2000. *Alimentos seguros: Microbiología*. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA S. A.
- Garay UA, Zacate-Palacios Y, López-Herrera JR, Hernández-Sánchez EA, Jarill-Quijada MD, Alcantar-Curiel MD. 2011. Brote de neumonía asociada al ventilador (NAV) por *Staphylococcus aureus* meticiloresistente (SARM) en unidad de cuidados intensivos de adultos. *Enf Infec Micro.* 31(1): 17-25.
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., Martínez, B., 2010. Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology* 21, 373–382.

- Guadalupe Socorro Zendejas-Manzo, Héctor Avalos-Flores, Marisela Yadira Soto-Padilla 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Biomed 25:129-143.
- International Organization for Standardization. 2003. International Standard ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs Protocol for the validation of alternative methods.
- International Standardization Organization. 2006. Microbiology of food and animal feedign stuff- Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. ISO/TS 19036.
- Karen m. Silbernagel, robert p. Jechorek, and charles n. Carver. 2003. 3M Petrifilm Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of Staphylococcus aureus in Selected Types of Processed and Prepared Foods: Collaborative Study Journal of AOAC international VOL. 86:5-20.
- Lahou, E., Uyttendaele, M., 2014. Evaluation of three swabbing devices for detection of *Listeria monocytogenes* on different types of food contact surfaces. Int. J. Environ. Res. Public Health 11, 804-814.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Involvement of Panton-Valentine Involvement of Panton-Valentine Leukocidin–Producing *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 29(5):1128–32.
- Loiane Mayra Jacó de SOUZA, Anna Carolina COSTA, Luis Augusto Nero, Emanuel Pereira COUTO, Márcia de Aguiar FERREIRA; 2015. Evaluation of Petrifilm™ system compared



with traditional methodology in count of indicators of sanitary-hygienic quality and pathogenic microorganisms in sheep milk. *Food Sci. Technol, Campinas*, 35(2): 375-379.

M. Luisa de Garnica, Borja Linage, Juan A. Carriedo, Jesus A. Santos, Carlos Gonzalo. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* prevalence in ovine bulk tank milk. *Small Ruminant Research* 115: 108– 112.

MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3era edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2003.

Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., Herman, L., 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 133-147.

Maria Calasso, Danilo Ercolini, Leonardo Mancini, Giuseppina Stellato, Fabio Minervini, Raffaella Di Cagno, Maria De Angelis, Marco Gobbetti 2016. Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiology* 54:115-126.

Messelhäuser, U., Ziegler, H., Elmer-Englhard, D., Busch, U., Hoermansdorfer, S., Kahlau, D., Pudich, U., Hoeller, C., 2006. Development of real-time-PCR assays for detection and characterization of *Clostridium perfringens* in food samples. *Archiv für Lebensmittel hygiene* 57, 102–105.

Muñoz AB. 2008. La infección nosocomial y los trabajadores de la salud portadores de *Staphylococcus aureus* meticilo-resistente. *Semillas Rev Invest*; 10(3): 59-62.

Naber CK. 2009. *Staphylococcus aureus* bacteremia: Epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin Infect Dis.*48 (4):s231-s237.

- Núñez-Martínez JP. “Detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia antibacteriana en niños portadores asintomáticos de Pachuca, Hidalgo”. Tesina Médico Cirujano. Instituto de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma
- Ömer Akineden, Abdulwahed Ahmed Hassan, Elisabeth Schneider, 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology 124: 211-216.
- Parlapani, F.F., Haroutounian, S.A., Nychas, G.J.E., Boziaris, I.S., 2015. Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2\_C. Food Microbiol. 50, 44-53.
- Perdomo IL, Meléndez P. 2004. Determinación y aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* enterotoxigénicos a partir de alimentos. Rev Col Cienc Quím Farm. 33(1): 59-69.
- Rasmussen RV, Fowler VG Jr, Skov R, Bruun NE. 2011. Feature challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis in the MRSA. Future microbiol. 6(1): 43-56.
- Ruiz-Quezada SL, Orozco Anguiano AE, Martínez Acosta DG, López Sandoval MG, Rodríguez M. OA, Flores Calzada SC, Salazar García PR. 2010. Estudio piloto sobre la frecuencia en chorizo de *Staphylococcus aureus* en la zona metropolitana de Guadalajara. RESPYN. 9(13):1-3.
- Silva García MC, García Bermejo MJ, Castillo Torres L, Ania Palacio JM, Gómez Martíne D. 2006. Técnico Especialista en Laboratorio del Servicio Vasco de Salud Osakidetza 2da Edición. Editorial MAD. S.L. Sevilla, España.

- Soares, J.C., Marques, M.R., Tavaría, F.K., Pereira, J.O., Pintado, M.M., 2011. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 146:123-129.
- Suarez MJ, Arias ML, Gamboa MM. 2008. Detección de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su correlación con las pruebas de coagulasa y termonucleasa. *Arch Latinoam Nutr.* 58(1): 59-63.
- Vasconcelos NG, de Souza da Cunha MLR. 2010. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and methods. *J Public Health Epidemiol.* 2(3): 29-42.
- Villaseñor Martínez R, Farías Flores G, Carrillo Macías ME, Jáuregui Lomelí JJ, Castañeda Rico FE, Lepe Cruz BE, 2012. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en un Hospital Pediátrico, comunidad urbana y rural. *Enf Infec Micro.* 32(1): 6-10.
- Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 5(12): 751-762.

AneXos

### Anexo 1.- Composición Agar Baird Parker

triptona	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Glicina	12,0 g
Piruvato sódico	10,0 g
Telurito potásico	0,1 g
Agar	20,0 g
Emulsión de yema de huevo	50,0 mL
Agua destilada	1000 mL

Agar Baird Parker contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos. La yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y, además, la actividad de lipasa. Los estafilococos producen colonias de color de gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito; los estafilococos que producen lecitinasa descomponen la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes. Es posible que se forme una zona de precipitación debido a la actividad de lipasa.

### Anexo 2.- Composición Infusión cerebro corazón (BHI).

Infusión de cerebro y corazón de (sólidos)	8,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	16,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Glucosa	2,0 g
Fosfato disódico de hidrógeno	2,5 g
Agua destilada	1000mL

La infusión de cerebro y corazón (BHI) ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se utiliza como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos. BHI sin suplemento se recomienda actualmente como medio universal para bacteriología aerobia, para la recuperación primaria y reactivación de cepas liofilizadas (<http://www.bd.com/europe/regulatory/>).

Anexo 3.- Composición agar DNasa

Bacto Triptona	20,0g
Cloruro sódico	5,0g
Acido desoxirribonucleico	2,0g
Agar	15,0g
Agua destilada	1000mL

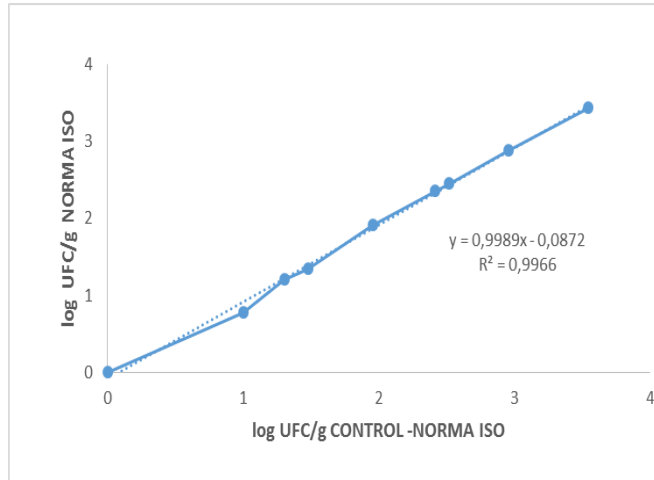
La triptona proporciona nutrientes para el crecimiento. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico. El alto nivel de ácido desoxirribonucleico molecular hace posible la detección de la desoxirribonucleasa (DNasa) que despolimeriza el ADN. Después de la incubación del medio con la cepa de prueba, la placa se inunda con ácido clorhídrico 1N, que causa la precipitación del ADN polimerizado y hace al medio opaco.

Anexo 4.- Prueba de la coagulasa

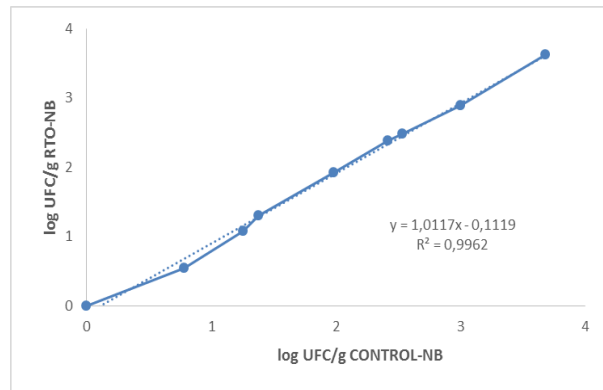
Plasma (EDTA)	0.3mL
Cultivo en fase logarítmica	0.1mL

Se deben de inocular las colonias a confirmar en medio BHI, para obtener un cultivo en fase logarítmica, en un tubo estéril añadir los volúmenes indicados, incubar a 35°C de 18-24hrs. controlar cada 2 horas hasta las 6 horas (NB: 32004-2004).

Anexo 5.- Linealidad del método ISO 6888-1:2003



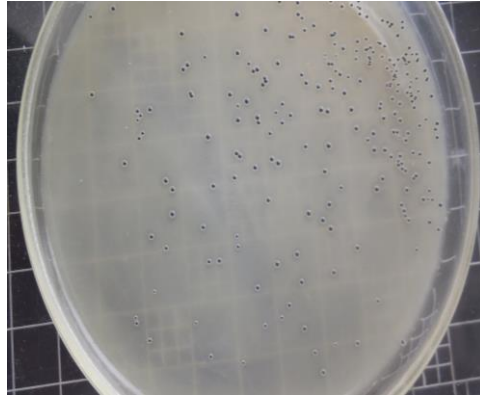
Anexo 6.- Linealidad del método NB32004:2002



Anexo 7.- Placa seca rehidratable

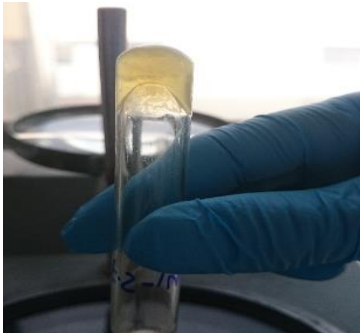


Anexo 8.- *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 en medio Baird Parker

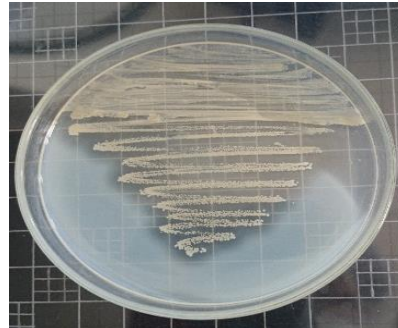


Anexo 9.- Pruebas confirmatorias para *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923

a) Coagulasa positiva

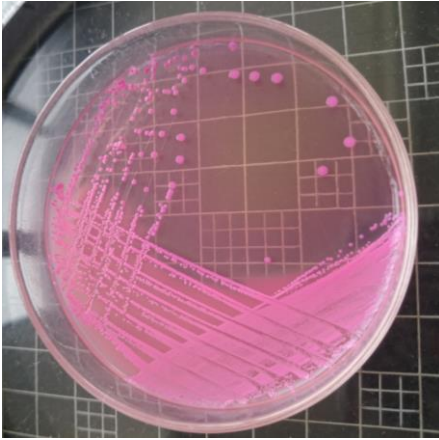


b) DNasa positiva

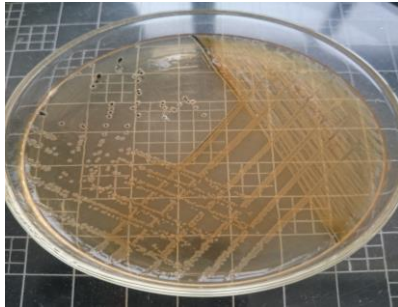


Anexo 10.- *Escherichia coli* en medio Agar SS (interferente).

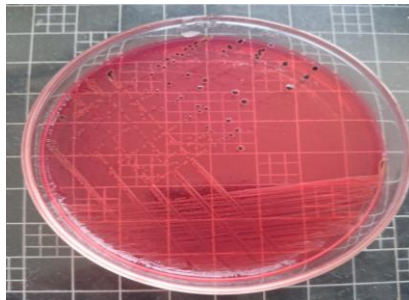




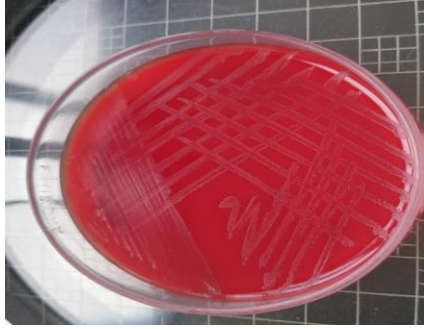
Anexo 11.- *Salmonella spp.* en medio SS (interferente).



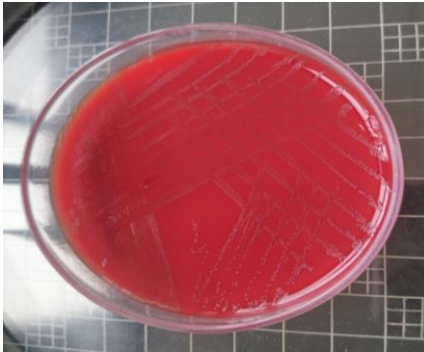
Anexo 12.- *Proteus mirabilis* en medio XLD (interferente).



Anexo 13.- *Streptococcus agalactiae* en medio Agar Sangre (interferente).



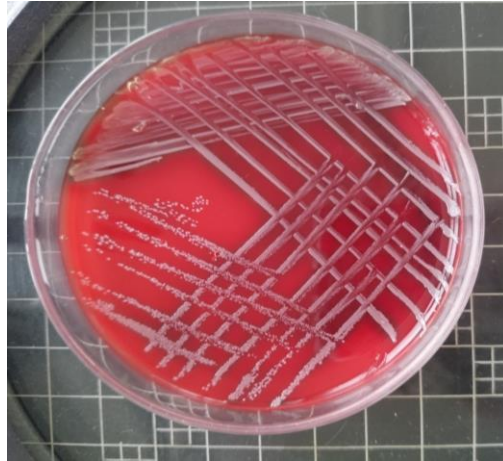
Anexo 14.- *Enterococcus faecalis* en medio Agar Sangre (interferente).



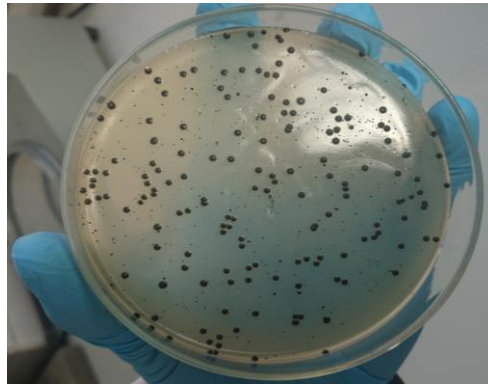
Anexo 15.- *Staphylococcus saprophyticus* en medio Agar Sangre (interferente).



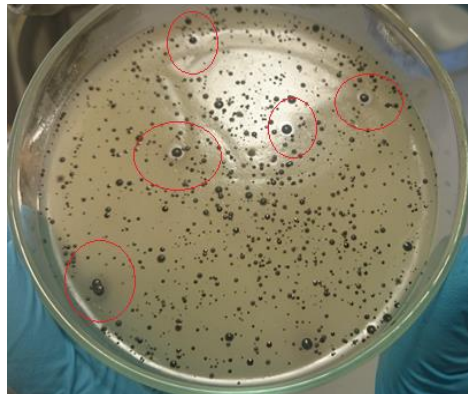
Anexo 16.- *Staphylococcus epidermidis* en medio Agar Sangre (interferente).



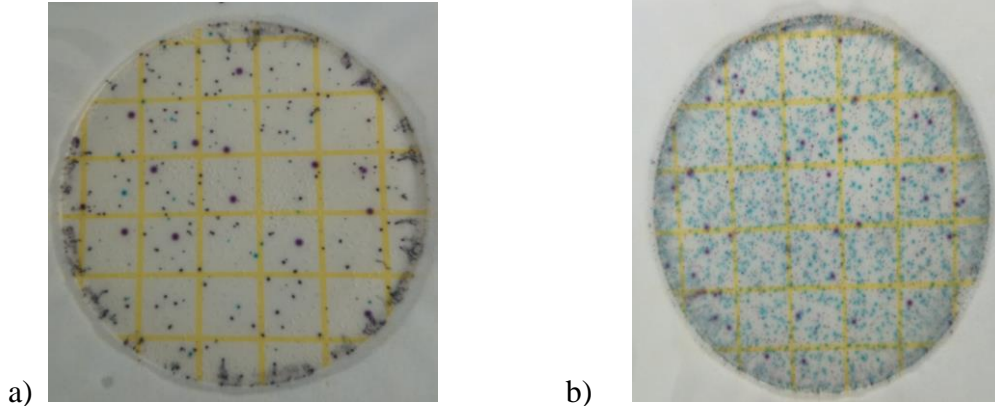
Anexo 17.- Desarrollo de colonias atípicas en medio Baird Parker.



Anexo 18.- Desarrollo de colonias típicas de Staphylococcus en medio Baird Parker.



Anexo 19.- Desarrollo de colonias características de *Staphylococcus* (colonias violetas) en placa seca rehidratable.



Anexo 20.- Certificado de calidad de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Certificate of Quality**  
*See front side of this document for description.*

  
200 Cooper Avenue North, St. Cloud, MN 56303 USA  
320-253-1640 • Fax 320-253-6250  
1-800-599-BUGS (2847)  
www.microbiologics.com

**CERTIFICATE OF QUALITY**  
**LOT-SPECIFIC LYFO DISK® and**  
**KWIK-STIK™ Microorganisms**

This Certificate of Quality applies to the specified lot number(s) of the microorganism(s) listed on the opposite side of this record.

**QSR.** All elements of the FDA Quality System Regulation (QSR) have been met for the microorganism(s) listed.

**Purity.** Purity specifications have been met for the microorganism(s) listed.

**Identification.** Microscopic examination, selected identification parameters, and when applicable, antibiotic sensitivity testing have been employed to confirm the identity of the microorganism(s) and verify special features. Identification specifications have been met for the microorganism(s) listed.

**Alterations.** Selected tests are employed to confirm that phenotypic alterations have not occurred as a result of lyophilization processes. Phenotypic specifications have been met for the microorganism(s) listed.

Selective and non-selective media select identification protocols, and specific incubation conditions are employed in the assay methods. Information regarding morphology, phenotypic characteristics, and test results can be obtained by contacting Microbiologics' Technical Service Department at [techsupport@microbiologics.com](mailto:techsupport@microbiologics.com) or by visiting our website at [www.microbiologics.com](http://www.microbiologics.com) and clicking on the Certificate of Analysis button.

If these items are going to be exported, you need to comply with all appropriate regulations.

The microorganisms listed on reverse side meet the Certificate of Quality provisions stated above on this record. Microbiologics' Quality System Program is designed to meet standards set forth in 21 CFR Part 820: FDA Quality System Regulation (QSR). The standards apply to methods used in, and the facilities and controls used for: the design; component purchasing; suppliers, contractors and consultant evaluation; manufacture; packaging; labeling; product specifications and performance; storage; and distribution of in-vitro, medical diagnostics products. These provisions are intended to ensure that finished product will be safe and effective and otherwise in compliance with the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. Products which are not under the jurisdiction of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, are nevertheless, subjected to and meet the guidelines and standards set forth in 21 CFR Part 820: FDA QSR.

LIT:2139 Revision B



Anexo 21.- Formulario de muestreo de quesos frescos de manufactura artesanal.

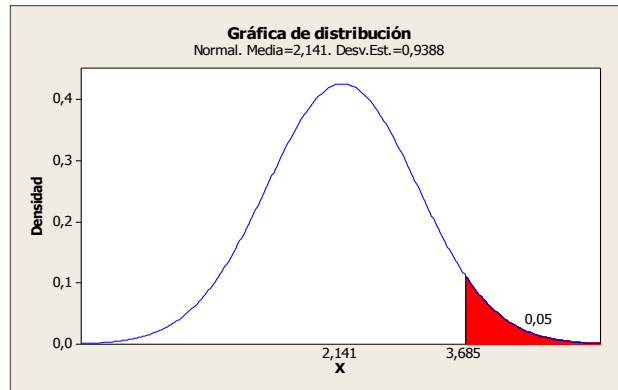
FORMULARIO DE MUESTREO

CODIGO DE MUESTRA:		CANTIDAD APROX.	
TEMPERATURA			
PRODUCTO:		MERCADO:	
PROCEDENCIA:			
MUESTREADOR:			
FECHA DE ELABORACION:			
FECHA DE MUESTREO:		Hra.	
FECHA DE RECEPCION:		Hra.	
DESCRIPCION DEL ENTORNO PRESENCIA DE	VEGETALES		
	FRUTAS		
	CARNICOS		
	LEGUMBRES		
	EMBUTIDOS		
	HUEVO		
DESCRIPCION DEL PUESTO DE VENTA	SUELO	TARIMA	

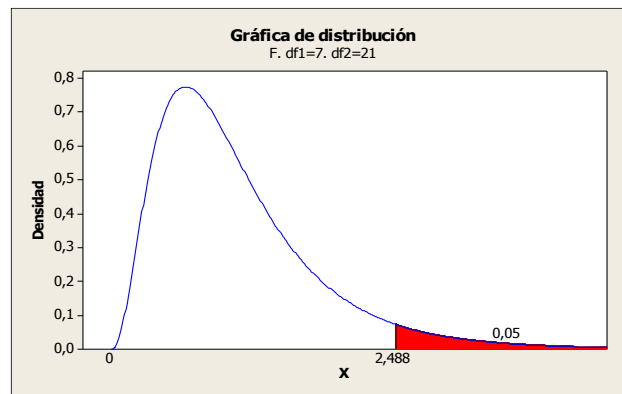
OBSERVACIONES:

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Anexo 22.- Prueba de normalidad de los recuentos en log en base 10 (Software minitab16).



Anexo 23.- Valor crítico de  $F$  niveles de concentración de *Staphylococcus aureus* (Software minitab16).



Anexo 24.- Valor crítico de  $F$  métodos de recuento de *Staphylococcus aureus* (Software minitab16).

