



IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS AISLADOS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN BROTE POR INTOXICACIÓN ALIMENTARIA EN EL DEPARTAMENTO DE ATLÁNTICO, COLOMBIA. 2008

IDENTIFICATION OF ETIOLOGIC AGENTS ISOLATED OF BIOLOGICAL SAMPLES IN OUTBREAK BY FOOD POISONING IN THE DEPARTMENT OF ATLÁNTICO, COLOMBIA. 2008

Guerra-Sarmiento Marlene¹
 Palacios-González Diosmary²
 Maestre-Serrano Ronald³
 Baena-Del Valle Javier⁴
 Gómez-Camargo Doris⁵

Correspondencia: degomez@hotmail.com

Recibido para evaluación: mayo –10 – 2013. Aceptado para publicación: julio – 24 – 2013.

RESUMEN

Introducción: las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un problema mundial de salud pública y generan negativo impacto socioeconómico.

Objetivo: identificar el agente causal de un brote de intoxicación alimentaria en un comedor escolar.

Material y métodos: estudio realizado en afectados por una intoxicación alimentaria en el municipio de Santo Tomás, departamento del Atlántico, Colombia, en el primer semestre de 2008. Se realizó identificación fenotípica de 24 cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de vómito, materia fecal, jugo gástrico, secreción de lesión en dedo, secreción nasofaríngea y faríngea en escolares y manipuladores de alimento. De estas cepas, 15 se analizaron por medio de la técnica de PCR-RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico (random amplification of polymorphic DNA-RAPD). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa, se analizaron por medio de un dendograma y se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard.

Resultados: en 16 muestras de materia fecal se identificó *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y en dos *Salmonella spp.* En vómito 6 fueron positivas para *S. aureus* coagulasa positiva y una para *Salmonella spp.* También en una muestra de secreción de uña y en una toma nasofaríngea se aisló *S. aureus* coagulasa positivo.

Conclusión: se identificaron cepas de *S. aureus* con amplia diversidad molecular, y constituye el posible agente causal de un brote por intoxicación alimentaria en un comedor escolar. **Rev.cienc.biomed. 2013;4(2):233-241**

¹ Bacterióloga. Maestría en microbiología. Field Epidemiology Training Programs (FETP) - Grupo de Epidemiología Aplicada (SEA), Bogotá - Colombia. Grupo de Investigación del Laboratorio de Salud Pública del Atlántico-Secretaría de Salud del Atlántico (GILSPA). Barranquilla. Colombia.

² Bacterióloga. Grupo de Investigación del Laboratorio de Salud Pública del Atlántico-Secretaría de Salud del Atlántico (GILSPA). Barranquilla. Colombia.

³ Biólogo. Estudiante doctoral en Medicina Tropical. Universidad de Cartagena. Colombia.

⁴ Médico. Estudiante de Postgrado. Especialidad en Patología. Grupo de Investigación Unimol. Universidad de Cartagena, Cartagena. Colombia.

⁵ Bacterióloga. Maestría en Microbiología Clínica. Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular. Especialista en Educación Médica. Doctorado en Medicina Tropical. Grupo de Investigación Unimol. Universidad de Cartagena. Cartagena. Colombia.

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus aureus; Brotes de enfermedades; Intoxicación alimentaria; *Salmonella*, Técnica del ADN polimorfo amplificado aleatorio.

SUMMARY

Introduction: foodborne diseases constitute a worldwide problem of public health and generate a negative socio-economic impact.

Objective: to identify the causal agent of an outbreak of food poisoning in a school cafeteria.

Methods: Study carried out in people affected by a food poisoning in the municipality of Santo Tomas, Atlántico, Colombia, in the first semester of 2008. Phenotypic identification of 24 families of *Staphylococcus aureus* isolated from vomiting, fecal material, gastric juices, secretion of injury in finger and nasopharyngeal and pharyngeal secretion in schoolchildren and food handlers was carried out. Of these families, 15 were analyzed by means of PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique. The products of PCR were visualized in agarose gels and analyzed by means of a dendrogram. The similarity coefficient of Jaccard was calculated.

Results: Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* was identified in 16 samples of fecal material and *Salmonella spp* was recognized in two samples. In vomiting, 6 samples were positive for Coagulase-positive *S. aureus* and one sample for *Salmonella spp*. Also, Coagulase-positive *S. aureus* was isolated in a sample of secretion of nail and in nasopharyngeal secretion.

Conclusion: Families of *S. aureus* with wide molecular diversity were identified. It constitutes the possible causal agent of an outbreak by food poisoning in a school cafeteria. **Rev.cienc.biomed. 2013;4(2):233-241**

KEYWORDS

Staphylococcus aureus; Outbreaks; Food poisoning; *Salmonella*; Random Amplified Polymorphic DNA technique.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son síndromes originados por la ingestión de alimentos o agua, que contienen microorganismos en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor a nivel individual o grupal (1).

Las ETA constituyen un problema mundial de salud pública, debido a: la alta morbilidad, surgimiento de nuevas formas de transmisión, existencia de poblaciones vulnerables, aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y negativo impacto socioeconómico (1-4).

No se tienen datos exactos de la incidencia de ETA a nivel mundial por subregistro en los sistemas de vigilancia epidemiológica y deficiente respuesta institucional para su adecuada prevención y control. No obstante la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la incidencia anual de diarrea en el mundo es de aproximadamente

1.500 millones de casos, de los cuales aproximadamente el 70% se originan por intoxicaciones por alimentos contaminados con microorganismos y sus toxinas (5).

En Colombia se ha observado una tendencia al incremento de las ETA. En el año 2005 se reportaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) 7.941 casos lo que representa un incremento del 30,39% con respecto al año 2004, cuando se reportaron 6.090 (Datos no publicados: SIVIGILA- Instituto Nacional de Salud). En el año 2006 se notificaron al SIVIGILA 8.183 casos de ETA, lo que representó un aumento de 3,9% con respecto al año anterior (Datos no publicados: SIVIGILA- Instituto Nacional de Salud).

Particularmente el departamento del Atlántico durante el periodo 2004 a 2008, registró 946 casos para este tipo de patología con tasas entre 0,75 y 3,02 por 10.000 habitantes. (Datos sin publicar: Secretaria de Salud del Atlántico, SIVIGILA - INS). Entre las causas más frecuentemente encontra-

das en la investigación de estos casos para esta zona del país se encuentran: alimentos contaminados por deficientes hábitos higiénicos, manejo inapropiado de temperaturas y almacenamiento.

A nivel de Latinoamérica se ha reportado a las siguientes especies bacterianas como agentes implicados en las ETA: *Campylobacter* spp, *Clostridium* spp y *Listeria monocytogenes*, la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. (1,6-10).

La enfermedad transmitida por alimentos debido a *S. aureus* es común e importante a nivel mundial (11); este microorganismo coloniza piel, mucosas y nasofaringe en hombres y animales (12,13). Su presencia en los alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los operadores debido a prácticas de manufacturas inadecuadas o bien a la utilización de materia prima contaminada (14). Por lo tanto, se puede aislar de una amplia gama de alimentos, incluyendo carne y productos lácteos (15).

Los grupos de mayor riesgo afectados por las ETA son niños, ancianos, mujeres embarazadas y pacientes inmunosuprimidos, aunque se presentan casos en población sana entre 15 y 44 años (16). El presente trabajo tiene como objetivo identificar el agente causal de aislados de muestras biológicas en un brote por intoxicación alimentaria en un comedor escolar y determinar diferencias genotípicas entre el agente aislado por medio de la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (random amplification of polymorphic DNA – RAPD).

MATERIAL Y MÉTODOS

El departamento del Atlántico se encuentra ubicado al norte del territorio colombiano, entre los 11° 37' 16" y 10° 16' de latitud norte y los 74° 43' y 75° 16' de longitud occidental; el departamento del Atlántico tiene 23 municipios incluida su capital Barranquilla; tiene un área de 3328 Km² y una temperatura promedio de 28° (17).

Participantes. 120 niños entre cuatro y seis años de edad de un centro escolar del municipio

de Santo Tomas, departamento del Atlántico en Colombia, que ingirieron alimentos entre las 6:45 AM y 9:45 AM del día 19 de mayo de 2008 en el comedor de la institución y que presentaron uno o más de los siguientes signos y síntomas: vómito, náusea, mareo, diarrea, fiebre, deshidratación, dolor abdominal, cefalea y diaforesis. Adicionalmente, dos personas involucradas en la preparación de alimentos de la misma institución, también se encontraron.

Se analizaron microbiológicamente 64 muestras biológicas que incluían vómito, materia fecal, jugo gástrico, secreción de lesión en dedo, secreción nasofaríngea y faríngea. Estas fueron tomadas a 47 niños escolares y a dos personas encargadas de la preparación de alimentos. No se pudieron tomar todas las muestras porque no todos acudieron a la jornada de recolección.

Recolección de muestras y análisis microbiológico. Las muestras biológicas se almacenaron en envases estériles, debidamente rotulados y se transportaron al área de microbiología clínica del Laboratorio de Salud Pública (LSP) del Atlántico donde se les asignó un código correspondiente al estudio del brote.

Las muestras de vómito, jugo gástrico y materia fecal se sembraron en los medios de agar: XLD-Xilosa, lisina desoxicolato (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) hecctoén (BD, Franklin Lakes, NJ, EU) y Baird Parker (BD, Franklin Lakes, NJ, EU) incubándose a 35°C por 24 horas para el aislamiento de *Shigella* sp, *Salmonella* sp y *Staphylococcus* spp respectivamente. Paralelamente, se realizó inoculación en medio de selenito para enriquecimiento. A las 18 horas se realizó replique a partir del medio selenito a los medios XLD y Hecctoén. Las muestras nasofaríngeas, faríngeas y secreción de uñas se sembraron en medio de agar sangre y se incubaron a 35°C por 24 horas.

A las colonias sospechosas de *Shigella* spp y *Salmonella* spp aisladas del XLD y Hecctoén se les realizó: TSI (Triple azúcar hierro), LIA (Lisina), movilidad, citrato e índole y se confirmaron con el panel de cristal para Gram negativas (BD, Franklin Lakes, NJ, EU).

A las colonias sospechosas de *S. aureus* aisladas del medio Baird Parker y agar sangre se les realizó test de catalasa y pruebas de coagulasa por técnica de tubos y látex. En el medio de baird parker se evaluó la reducción de telurito de potasio y la producción de lecitinasa.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Se empleó el método de difusión de disco de Kirby Bauer, basado en las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Para *S. aureus* se utilizaron los siguientes agentes antibacterianos: oxacilina (1 ug), gentamicina (10 ug), clindamicina (2 ug), vancomicina (30ug), eritromicina (15 ug), ciprofloxacina (5 ug) y trimetoprim-sulfametoxazol (23,75/1.25 ug). Mientras que para *Salmonella spp*, se utilizó: ampicilina (10 ug), cloranfenicol (30 ug), trimetoprim-sulfametoxazol (25 ug), cefotaxima (30 ug), ciprofloxacina (5 ug), como control se usaron las cepas ATCC 25922 de *E. coli* y ATCC 25923 de *S. aureus*.

Los aislamientos de *Salmonella spp* se enviaron para confirmación a los laboratorios de microbiología del Instituto Nacional de Salud. Los aislamientos de *S.aureus* fueron identificados en el LSP.

Extracción de ADN genómico bacteriano.

Las cepas identificadas se cultivaron en caldo LB (Tripton 10g/L, extracto de levadura 5gr/L y NaCl 0,5gr/L) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) por 24 horas a 37°C. Posteriormente se realizó extracción de ADN bacteriano a las cepas aisladas, siguiendo las instrucciones del fabricante Wizard Promega Corporation (catálogo N° A 1120).

Tipificación molecular de los distintos aislamientos bacterianos.

Se les realizó el RAPD a las 15 cepas de *S. aureus*, de las cuales 7 se aislaron de materia fecal, 5 de vómitos, 1 de secreción faríngea y 2 de manos. Para determinar las diferencias genotípicas entre los agentes aislados se aplicó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificación de segmentos polimórficos de ADN (PCR-RAPD).

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas de amplificación para el análisis de los

ADN genómicos, se realizaron varias reacciones de PCR en las cuales se ensayaron diferentes concentraciones de los distintos componentes de la reacción. Los resultados obtenidos llevaron a concluir las siguientes concentraciones óptimas para la reacción: 100 ng de ADN molde, 7.5 pM de Cebador (Cebador 2: 5' CATCGCCGCC 3' y Cebador 5: 5' GGTCCGACA 3') (Operon Technologies), 200 mM de cada desoxirribonucleotidotrifosfato (dNTPs) (PharmaciaBiotech) y 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Brasil Ltda, Sao Paulo, Brasil), en un amortiguador que consistió en Tris-HCl 10 mM (pH8.8), MgCl₂ 3 mM en un volumen final de 25 ul. Las reacciones se realizaron en tubos de PCR de pared delgada de 200 ul de capacidad (Axygen, Union City, CA, EU).

Se utilizó un termociclador marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania), con el siguiente programa de ciclos: 94°C por 2 minutos; 3 ciclos de (94°C por 5 minutos, 36°C por 5 minutos); 31 ciclos de (94 °C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos); finalizando con 10 minutos a 72°C.

Electroforesis para visualización de ADN.

Los ADN obtenidos en las extracciones y los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% p/v en tampón TAE 1X (tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM de EDTA, y ácido acético, Ph8) teñido con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de talla molecular de 1kb con 11 fragmentos de 100 a 10 kb (Sigma Catalogo D-0428). La visualización de las bandas se llevó a cabo a través de foto- documentador marca EDA-290 (Kodak).

Análisis de los perfiles generados por PCR-RAPD (Dendrograma).

Las imágenes fueron digitalizadas y los patrones de bandas se analizaron graficando un dendrograma por medio de coeficientes de similitud de Jaccard, para lo cual se utilizó el software Biodiversity Pro Versión 2 (NHM & SAMS, Londres, UK).

RESULTADOS

De las 64 muestras biológicas procesadas, 47 (73,4%) correspondieron a materia fecal, 8 (12.5%) vómitos, 3 (4.7%) jugos gástrico,

2 (3,1%) secreciones de uña, 2 (3,1%) muestras nasofaríngea y 2 (3,1%) muestras faríngea: de las 47 muestras de materia fecal, 16 resultaron positivas para *S. aureus* coagulasa positiva y 2 para *Salmonella spp*; en vómito las muestras arrojaron resultado positivo para *S. aureus* coagulasa positiva; en 1 muestra de secreción de uña y nasofaríngea se aisló *S. aureus* coagulasa positiva respectivamente.

Las especies de *Salmonella sp*, aisladas por el Laboratorio de Salud Pública del Atlántico fueron identificadas por el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Salud como *S. anatum* (aislada de materia fecal) y *S. nottingham* (aislada de materia fecal y vómito).

El presente estudio se centró solo en muestras biológicas; sin embargo, en aras de profundizar se estudiaron los alimentos y se aisló *S. aureus* y otros patógenos indicadores de contaminación en muestras de alimentos ingeridos por los escolares (Tabla N°1).

TABLA N°1. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS INGERIDOS DURANTE UN BROTE POR INTOXICACIÓN ALIMENTARIA EN UN COMEDOR ESCOLAR DEL MUNICIPIO DE SANTO TOMÁS (ATLÁNTICO), DURANTE EL PRIMER SEMESTRE DE 2008			
ALIMENTO	AGENTE	VALOR	CONCEPTO MICROBIOLÓGICO
Leche en polvo	Mesófilos aerobios	25.500 UFC/g	No conforme
	Coliformes totales	> 2400 NMP/g	No conforme
	Levaduras	630 UFC/G	No conforme
Esencia concentrada con sabor a vainilla	Mohos	90 NMP/g	No conforme
Esencia concentrada con sabor a kola	Mohos	50 NMP/g	No conforme
Leche en polvo preparada con agua hervida y esencia de vainilla	Mesófilos aerobios	> 300 x 10 ³ UFC/g	No conforme
	Coliformes totales	> 2400 NMP/ml	No conforme
	Coliformes fecales	> 2400 NMP/ml	No conforme
	<i>S.coagulasa</i> positiva	90 x 10 ⁴ UFC/ml	No conforme
	Mohos	140 x 10 ³ UFC/g	No conforme
	Levaduras	300 x 10 ³ UFC/g	No conforme
Harina de maíz precocida y sal	Coliformes totales	> 2400 NMP/g	No conforme
	Coliformes fecales	> 2400 NMP/g	No conforme
	<i>S.coagulasa</i> positiva	195 x 10 ⁴ UFC/g	No conforme

Los cebadores de 10 bases utilizados (2 y 5) generaron patrones de amplificación diferenciales entre los distintos aislados, esencialmente aptos para el tipo de estudio de tipado molecular que se pretendía desarrollar en este trabajo. Se realizaron tres repeticiones, el cebador dos mostraron un patrón de bandas discriminatoria, por eso fueron seleccionados para el análisis de los resultados del presente estudio (Figura N°1).

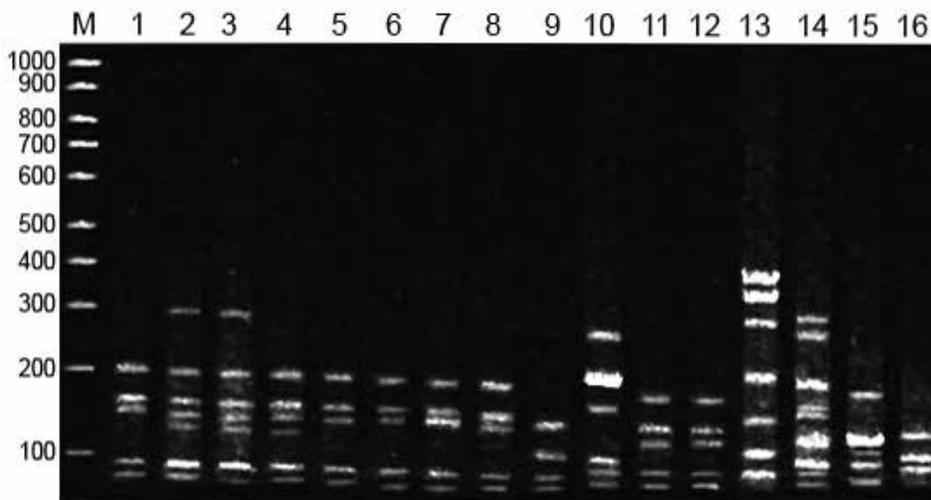


FIGURA N°1. Patrones de RAPD-PCR obtenidos de aislamientos de *S. aureus*: MPM (Marcador de talla molecular de 1 kb); 1, 2, 4, 7, 9, 11, 12 (materia fecal); 3, 5, 6, 8, 10 (vómito); 13 (Secreción faríngea); 14 (ATCC); 15 y 16 (Secreción de dedo). Gel de agarosa al 2% (p/v) tampón TAE 1X teñido con bromuro de etidio

Los aislados 1-9 presentaron el mismo patrón de bandas, la mayoría de ellas entre 90 y 300 pares de bases, con una ligera diferencia en el aislado 9. El aislado 10 muestra un patrón diferente con los anteriores y con los aislados 11 y 12, que a su vez guardan similitud con los aislados 1 y 8. El aislado 13 correspondiente a una muestra de secreción faríngea y los aislados 15 y 16 correspondientes a secreción del dedo, proceden de la persona procesadora de los alimentos; estos son iguales entre sí pero presentan patrones diferentes a los anteriores. El aislado 14 corresponde a la cepa ATCC control y presenta similitud en al menos tres bandas con los aislados de los pacientes. Se observó que el cebador 2 es discriminatorio y útil para diferenciar estas cepas.

El análisis del dendrograma permitió identificar 5 aislamientos diferentes de *S. aureus* a partir de 15 aislados analizados (Figura N°2).

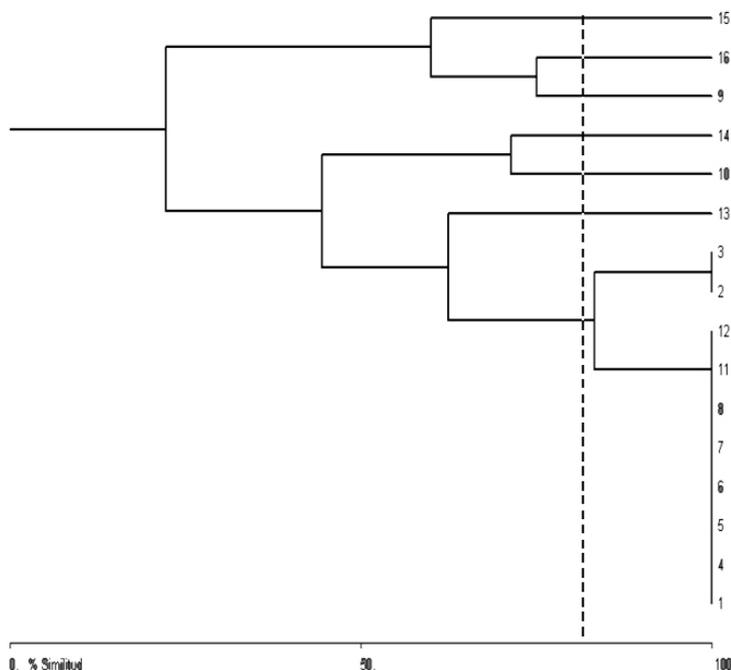


FIGURA N° 2. Dendrograma de 15 cepas aisladas de muestras biológicas de escolares intoxicados en el municipio de Santo Tomas (Atlántico) más una cepa ATCC control analizadas por la técnica de RAPD para oligonucleótido arbitrario.

Los aislamientos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11 y 12 tienen una similitud del 100% y este clúster comparte una similitud de 83.3% con el que contiene a las cepas 2 y 3, ambas con semejanza de 100%. La cepa 13 comparte una similitud de 62,4% con los dos grupos antes mencionados. Las cepas 10 y 14 tienen similitud de 71,3%.

El clúster que contiene las cepas 9, 15 y 16 tiene una similitud de 59,8% y dentro de este las cepas 9 y 16 tienen una semejanza de 75%.

DISCUSIÓN

En Colombia existen pocos estudios de epidemiología alimentaria que muestren la importancia de las ETA, lo que impide tener datos actualizados sobre el comportamiento de los microorganismos como agentes causales de esta patología y medidas de vigilancia epidemiológica para la toma de decisiones en salud pública (1). Para este país se ha observado alta incidencia por ETA en los últimos años, algunos de estos brotes han sido documentados recientemente (10); estos al igual que el presente estudio reportan en mayor frecuencia la contaminación de alimentos por patógenos como *S. aureus* y *S. spp.*

En el presente estudio *S. aureus* se aisló con mayor frecuencia en las muestras biológicas de la población estudiada y en algunos de los alimentos consumidos como leche en polvo preparada y harina de maíz; lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde *S.aureus* es el agente más común e importante a nivel mundial aislado en las enfermedades transmitidas por alimentos (11); mientras que *Salmonella spp* solo se aisló en dos muestras biológicas de dos pacientes. La alta frecuencia de aislamiento para *S. aureus* y la presentación de manifestaciones clínicas entre ellas el vómito entre una y seis horas en los pacientes a partir de la ingesta de los alimentos, coincide con

otros estudios y orienta a la sospecha para señalar a este microorganismo como agente etiológico del brote analizado en el presente estudio (12); a esto se suma la identificación de varios factores ambientales presentes durante el proceso de elaboración y distribución de los alimentos. *S. aureus* se caracteriza por producir enterotoxinas (SE) que contaminan los alimentos, produciendo una reacción inmediata de acuerdo al inoculo ingerido. Estas SE son de naturaleza termoestable, lo que les confiere una especial peligrosidad ya que no se destruye por los tratamientos convencionales de cocción; las enterotoxinas son potentes agentes eméticos, que se producen en la fase exponencial del desarrollo del microorganismo. En la actualidad se reconocen 18 tipos de SE además de SEC1, SEC2 y SEC3 (18-20).

Otra evidencia para identificar a *S. aureus* como agente causal del brote es que según la Food and Drug Administration (FDA) para que las SE provoquen sintomatología clínica, es necesario que *S. aureus* se encuentre en una concentración mayor o igual a 105 UFC/ gr de alimento. En los resultados se encontró que en algunas de las muestras de alimentos ingeridos y analizados el recuento de *S. aureus* coagulasa positiva se encontró por encima de este límite (20).

En el presente estudio se descartó la *Salmonella spp* como agente causante del brote, ya que las manifestaciones clínicas producidas por intoxicaciones por estos agentes pueden tardar de 12 a 24 horas debido a que las bacterias deben llegar hasta la luz intestinal para multiplicarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde ahí alcanzar otros órganos o sistemas; asimismo no generan vómito en las reacciones producidas a los pacientes (5).

En el presente brote se presume que el mecanismo de contaminación fue una inadecuada manipulación y conservación de los alimentos, ya que al realizar el estudio de campo se encontró que estos habían sido preparados en un sitio diferente al comedor escolar donde las condiciones de higiene e infraestructura no eran las adecuadas. El pollo no se mantuvo en cadena de frío constante por corte en el fluido eléctrico; además, se

preparó la noche anterior y fue transportado al comedor escolar al día siguiente en recipientes y bolsas no adecuadas.

En la actualidad, el diagnóstico de estas patologías se apoya en los resultados de las técnicas de cultivo microbiológico convencionales, que permiten identificar y aislar las bacterias (21). Este procedimiento es una rutina que tarda como mínimo 48 horas para tener los resultados, los cuales deben ser confirmados con réplicas debido a la naturaleza de la bacteria. Como la gravedad de muchas de estas infecciones no permite esperar los resultados del cultivo para aplicar el tratamiento, en la mayoría de estos casos se inicia una terapia con antibióticos preestablecidos de acuerdo a criterios médicos internacionales. Estas terapias, en general utilizan antibióticos efectivos contra un amplio espectro de bacterias, frente a los cuales *S. aureus* muchas veces resistente.

Se comprende la importancia que tendría para el LSP del Atlántico contar con técnicas moleculares como la PCR que permitan identificar a *S. aureus* u otras bacterias en el menor tiempo posible, ya que permitiría aplicar un tratamiento orientado desde los primeros momentos de la sintomatología; esto sin perjuicio que los métodos de cultivo clásicos sigan siendo el estándar de oro. Por lo anterior, se fortalecerá la vigilancia con la estandarización de la técnica de PCR con oligos específicos para las bacterias causantes de estos brotes a partir de fluidos biológicos, comúnmente utilizados en el laboratorio clínico como son: líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, esputo, heces, vómito y orina. Sin embargo, se ha obtenido un avance en el fortalecimiento de la vigilancia de las ETA al implementar por primera vez a través de este estudio la técnica de PCR-RAPD que permite realizar análisis de los patrones de bandas al examinar y comparar el tamaño de ellas y sus diferencias entre los aislamientos, permitiéndolos agrupar de acuerdo al grado de similitud para generar diagramas de asociación entre los agentes bacterianos responsables del brote por intoxicación alimentaria, determinando además la dinámica de transmisión y diseminación bacteriana en los brotes, información de utilidad en los programas de vigilancia epidemiológica

de cada una de las seccionales del país. En el presente estudio se identificó un cebador para esta técnica que permite realizar un tipo molecular de cepas de *S. aureus*; por lo tanto, puede ser de utilidad en futuros estudios epidemiológicos relacionados con esta especie bacteriana.

Un hecho importante, es el relativo a cuantas bandas de un patrón de amplificación deben ser idénticas al de otros patrones para considerarlos como un patrón común. Esto es especialmente relevante a la hora de decidir acerca de si dos o más aislados corresponden o no a la misma cepa. Al analizar los dendrograma obtenidos al aplicar la PCR-RAPD a las cepas de *S. aureus* aisladas, se puso de manifiesto esta situación y muchas veces se concluyó que el patrón electroforético era idéntico y correspondía a una misma cepa, aún cuando la comparación de los respectivos patrones revelaba al menos una banda distinta en tamaño e intensidad. Con relación a esto, es importante considerar que para esta técnica la literatura acepta como patrón idéntico cuando existen al menos tres o más bandas comunes (22), y esa es la razón por la cual en este trabajo se consideró como idénticos algunos patrones que diferían en una sola banda.

En los aislados de muestras de *S. aureus* se encontró similitud en al menos tres bandas a la cepa ATCC control, la diferencia se puede deber a mutaciones de las cepas analizadas por el medio ambiente. Lo anterior, es interesante en términos prácticos puesto que permite pensar que la bacteria de *S. aureus* que infectó a los niños guarda similitud con

la cepa control que podría dar información sobre género y especie, pero que las cepas son diferentes a la cepa control, tal vez por la procedencia del alimento, leche en polvo o harina. Sin embargo, no se realizó PCR-RAPD del aislado del alimento, lo que hubiera sido de una gran utilidad.

Los resultados de este trabajo son importantes porque es el primero para el departamento del Atlántico donde se caracterizan molecularmente cepas de *S. aureus* de un brote, lo cual permitió determinar la diversidad de las mismas y a su vez obtener resultados que pueden ser utilizados para relacionar cepas causantes de brotes de intoxicación alimentaria en humanos y su procedencia. El aislamiento e identificación de bacterias causantes de ETA en combinación con la tipificación molecular, son herramientas que permiten determinar la relación genética entre los aislamientos y la posible fuente de infección (10,23). Sería conveniente en un futuro relacionar molecularmente los agentes aislados de alimentos ingeridos y los aislados de muestras biológicas en estudios de brotes.

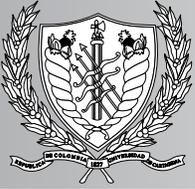
AGRADECIMIENTOS: al laboratorio de microbiología de alimentos y al grupo de epidemiología de la Secretaría de Salud del Atlántico – Subsecretaría de Salud Pública por la recolección y procesamiento de las muestras de alimento e investigación de campo.

CONFLICTO DE INTERESES: ninguno que declarar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Figueroa G, Navarrete P, Caro M, Troncoso M, Faúndez G. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. *Rev Med Chil.* 2002;130(8):859-864.
2. Flores TG, Herrera RAR. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública Méx.* 2005;47(5):388-390.
3. Calderón R, Riveros JC, Valencia A, Pozo LD, Sacaquispe R, Soto J. Estudio de un brote intrahospitalario por *Salmonella typhimurium* productora de beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5. *Anales de la Facultad de Medicina.* 2006;67(4):318-326.
4. Valdiviezo Lugo N, Villalobos de B LB, Martínez Nazaret R. Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumana - Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2006;26(2):95-100.
5. Bolaños-Acuña HM, Acuña-Calvo MT, Duarte-Martínez F, Salazar-Castro W, Oropeza-Barrios G, Sánchez-Salazar LM. Brotes de diarrea e intoxicaciones transmitidas por alimentos en Costa Rica, 2005. *Acta Médica Costarricense.* 2007;49(4):205-209.
6. Durango J, Arrieta G, Mattar S. Presence of *Salmonella* as a risk to public health in the Caribbean zone of Colombia. *Biomedica.* 2004;24(1):89-96.

7. Bonifaz, Vesna. Aplicaciones de la epidemiología molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Avances en Latinoamérica*. BIOFARBO. 2008;16(1):92-97.
8. Nava LM, Saldade EO, Parrilla MC, Vázquez JL. Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias De Origen Microbiano y Parasitario. *Salud Pública de México*. 1993;35(5):456-463.
9. Arias M, Antillon F. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. *Revista Biomedica*. 2000;11(2):113-122.
10. Rodríguez E, Muñoz N, Realpe M, Montañó A. Caracterización fenotípica y molecular de un brote de enfermedad transmitida por alimento causada por Salmonella Enteritidis en la cárcel nacional Bellavista de Bello, Antioquia. *Informe Quincenal epidemiológico Nacional*. 2009;14(20):310-36.
11. Santos M, González J, López M. Brote de intoxicación alimentaria en el municipio de Honda, Tolima, Colombia. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional*. 2009;14(21):321-326.
12. Bendahou A, Lebbadi M, Ennane L, Essadqui FZ, Abid M. Characterization of Staphylococcus species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2(3):218-225.
13. Fueyo JM, Mendoza MC, Álvarez MA, Martín MC. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of Staphylococcus aureus from Asturias, Spain. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243(2):447-454.
14. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol*. 2007;115(3):290-296.
15. Berrada H, Soriano JM, Mañes J, Picó Y. Real-time quantitative PCR of Staphylococcus aureus and application in restaurant meals. *J. Food Prot. enero de 2006*;69(1):106-111.
16. Vanegas C, Rojas LB. Detección de patógenos en alimentos. *Revista Hipotesis*. 2004;1(1):36-40.
17. Corporación Autónoma Regional del Atlántico. Evaluación del estado actual de la flora y fauna en los municipios de Soledad y Malambo. Barranquilla - Colombia. *Revista Corporación Autónoma Regional del Atlántico*. 2002;1(1):87-125.
18. Bhatia A, Zahoor S. Characterization of Staphylococcus species isolated from rawmilk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *J ClinDiag res*. 2007;1(3):188-197.
19. López C, Feltri A, Leotta G, González G, Manfredi E, Gottardi G. Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Revista argentina de microbiología*. 2008;40(4):198-203.
20. Rivas M, Manfredi EA, Leotta GA. PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de Staphylococcus aureus. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Revista Argentina de Microbiología*. 2010;42(3):212-215.
21. Vanegas MC, Martínez AJ, Medrano MV. Caracterización molecular de cepas toxigénicas de Staphylococcus aureus aisladas de operarios de plantas de alimentos. *Infectio*. 2011 ;10(3):167-174.
22. Power EG. RAPD typing in microbiology--a technical review. *J. Hosp. Infect*. 1996;34(4):247-265.
23. Ruppitsch W, Indra A, Stöger A, Mayer B, Stadlbauer S, Wewalka G, et al. Classifying spa types in complexes improves interpretation of typing results for methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J. Clin. Microbiol*. 2006;44(7):2442-2448.



Universidad de Cartagena
Fundada en 1827

MISIÓN
La Universidad de Cartagena, como institución pública, mediante el cumplimiento de sus funciones sustantivas de docencia, investigación, internacionalización y proyección social, forma profesionales competentes en distintas áreas del conocimiento, con formación científica, humanística, ética y axiológica, que les permitan ejercer una ciudadanía responsable, contribuir con la transformación social, y liderar procesos de desarrollo empresarial, ambiental, cultural en el ámbito de su acción institucional.