

Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay

NATALIE WEILER^{1*}, GERARDO A. LEOTTA^{2,3}, MIRIAN N. ZARATE¹, EDUARDO MANFREDI²,
MERCEDES E. ALVAREZ¹, MARTA RIVAS²

¹Departamento de Bacteriología y Micología, Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social de la República del Paraguay. Av. Venezuela y Florida, (1429) Asunción, Paraguay; ²Servicio Fisiopatología, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563, (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*Correspondencia. E-mail: natalieweiler@gmail.com

RESUMEN

Durante marzo de 2007 ocurrió un brote epidémico asociado al consumo de leche ultrapasteurizada que afectó a las ciudades de San Lorenzo, Ciudad del Este y Asunción, de la República del Paraguay. Las personas afectadas fueron 400, de las cuales 60 requirieron hospitalización. Se aisló *S. aureus* subespecie *aureus* de 5 pacientes, 3 operarios y 3 muestras de leche. Todas las cepas fueron productoras de enterotoxinas. Las aislamientos de 3 pacientes, de un operario y de las muestras de leche portaron los genes que codifican las enterotoxinas C (*sec*) y D (*sed*), y presentaron un patrón único de macrorestricción (*Sma*I-PFGE). Se identificó a la leche como fuente de intoxicación y a un operario de la línea de producción como origen de la contaminación. Este es el primer brote de ETA denunciado en Paraguay en el cual se pudo aislar, caracterizar y subtipificar el agente etiológico en la planta de elaboración, en el alimento y en las personas afectadas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*; Paraguay; gastroenteritis; enfermedad alimentaria; leche ultrapasteurizada

ABSTRACT

Foodborne outbreak associated with consumption of ultrapasteurized milk in the Republic of Paraguay. During March 2007 there was an epidemic outbreak associated with the consumption of ultrapasteurized milk. Four hundred people were affected and 60 required hospitalization. *S. aureus* subspecies *aureus* was isolated from 5 patients, 3 operators and 3 milk samples. All strains produced enterotoxins. Strains isolated from 3 patients, one operator and all the milk samples carried the genes encoding enterotoxins C (*sec*) and D (*sed*), and showed an indistinguishable macrorestriction pattern (*Sma*I-PFGE). Milk was identified as the source of intoxication and a production line operator as the source of contamination. This is the first foodborne outbreak reported in Paraguay whose agent was isolated, characterized and subtyped in the production plant, the food and the affected people.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Paraguay, gastroenteritis, foodborne disease; ultrapasteurized milk

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud más relevantes. Las ETA de origen infeccioso pueden estar asociadas a agentes virales, parasitarios y bacterianos. Entre las bacterias se incluye *Staphylococcus aureus*, un microorganismo que coloniza la piel, la mucosa y la nasofaringe del hombre y de los animales (8). Su presencia en los alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, debido a inadecuadas prácticas de manufactura, o por la utilización de materia prima contaminada (3).

Entre los alimentos implicados en brotes de ETA asociados a *S. aureus* se encuentran la leche y sus derivados. La multiplicación de *S. aureus* en el alimento se favorece

frente a determinadas condiciones como, por ejemplo, temperatura de almacenamiento >10 °C, actividad acuosa > 0,86 y pH >5 (15). Los principales factores de virulencia de *S. aureus* son las enterotoxinas (SE), proteínas simples de bajo peso molecular (26 000 - 34 000) y termotolerantes (4). Se considera que las SE asociadas a brotes de ETA son SEA, SEB, SEC, SED y SEE (5, 14). Sin embargo, en la actualidad se reconocen 13 nuevos tipos de toxinas y su implicancia en la salud pública todavía no está totalmente dilucidada. Los signos clínicos aparecen en forma brusca después de 1 a 6 h de haber ingerido los alimentos con SE y comprenden vómitos, náuseas, dolor abdominal, malestar general, debilidad, postración, calambres y diarrea moderada. La mayoría de los enfermos se recu-

peran en 24-48 h sin necesidad de tratamiento, aunque las personas debilitadas, los niños y los ancianos pueden requerir atención hospitalaria (5, 10, 11).

En el presente trabajo se describe la investigación microbiológica de un brote de ETA asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay.

Las ciudades de San Lorenzo y Asunción pertenecen al Departamento Central; Asunción es la capital de la República; Ciudad del Este pertenece al Departamento de Alto Paraná. Estas ciudades cuentan con una población de 450 000, 519 000 y 250 000 habitantes, respectivamente. Entre los días 6 y 11 de marzo de 2007 ocurrió un brote de ETA que afectó a las tres ciudades. Se registraron aproximadamente 400 denuncias sobre personas con signos y síntomas de enfermedad gastrointestinal luego del consumo de leche ultrapasteurizada. De estas personas, 279 fueron atendidas en servicios de salud, donde se realizaron las encuestas epidemiológicas pertinentes para el estudio de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. La edad promedio de los afectados fue de $10,3 \pm 13,7$ años (rango: 0,25 - 78 años). La mayoría de ellos presentó un cuadro emético a las 3 h de haber consumido la leche, y posteriormente un cuadro de diarrea asociada. En dos casos se observó un cuadro de *shock*, uno de los cuales afectó a un niño menor de un año que falleció. Los pacientes refirieron en común el consumo de leche ultrapasteurizada adquirida en bocas de expendio. Se definió como "caso clínico" a toda persona que informó la presencia de dolor cólico abdominal o de diarrea a partir del 6 de marzo y que había consumido leche ultrapasteurizada del mismo lote y marca comercial.

Ante la presunción de un brote de ETA por una fuente común con origen en el consumo de leche ultrapasteurizada, se tomaron tres tipos de muestras: 1) de casos clínicos ($n = 12$); 2) de operarios de la planta elaboradora ($n = 5$); y 3) de leche ultrapasteurizada ($n = 3$). El 11 de marzo se recibieron en el laboratorio tres envases cerrados de leche ultrapasteurizada adquiridos en bocas de expendio, de la misma marca y lote que las unidades consumidas por las personas afectadas. Entre los días 8 y 11 de marzo se recibieron 12 muestras de materia fecal de casos clínicos. El día 23 de marzo se tomaron muestras de secreción nasal a 5 operarios de la planta elaboradora de leche ultrapasteurizada mediante la utilización de hisopos estériles, las que fueron colocadas en medio de transporte Stuart (Laboratorios Britania, Argentina) hasta su procesamiento.

Las tres muestras de leche fueron procesadas según la norma ISO 6888-1 para la detección y el aislamiento de *S. aureus* (13). Las muestras de materia fecal y de secreción nasal fueron sembradas en agar sangre de carnero al 5% (agar base tripticasa soja, Laboratorios Britania) y agar manitol salado (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, EE.UU.), y se incubaron durante 24 h a 35 °C. Las colonias compatibles con *Staphylococcus* spp. fueron reaisladas en agar sangre y los aislamientos

caracterizados por pruebas bioquímicas, ELISA y PCR. Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas (9): catalasa, coagulasa en tubo, DNAsa (Laboratorios Britania), producción de acetoina (caldo RM/VP, Laboratorios Britania) y reducción de nitrato (caldo cerebro corazón 2,5% KNO_3 0,1% Standard, EE.UU.). Luego se determinó la fermentación de azúcares al 1% en caldo base de rojo fenol (Becton Dickinson). Los azúcares probados fueron trehalosa, lactosa y manosa (ICN Biomedicals Inc., Ohio, EE.UU.). Simultáneamente se utilizó el equipo de inmunoensayo TECRA (International Pty Ltd, Australia) para determinar la capacidad de los aislamientos de producir el *pool* de enterotoxinas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE. Para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* y 16S ARNr, se utilizaron los protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estandarizados por Manfredi *et al.* (11). Las cepas de *S. aureus* que se obtuvieron fueron subtipificadas mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado con la enzima *SmaI* (*SmaI*-PFGE), según el protocolo utilizado por López *et al.* (10). El análisis de los patrones de restricción se realizó con el programa informático BioNumerics versión 3.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). La relación entre los perfiles fue estimada por la proporción de bandas compartidas aplicando el coeficiente de Dice y generando dendrogramas basados en el método UPGMA.

Se aisló *S. aureus* coagulasa positivo de 5 muestras de materia fecal de las personas afectadas, de 3 muestras de secreción nasal de operarios de la planta elaboradora y de las 3 muestras de leche ultrapasteurizada. Las 11 cepas fueron identificadas como *S. aureus* subespecie *aureus*. Mediante la técnica de ELISA se demostró que todas las cepas eran productoras de una o más enterotoxinas del *pool* SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE. Por PCR múltiple fue posible diferenciar los genes que codifican la expresión de cada una de estas enterotoxinas. Se demostró que las cepas aisladas de 3 casos clínicos, de un operario y de la leche ultrapasteurizada fueron portadoras de los genes *sec* y *sed*. Las cepas aisladas de los otros dos casos clínicos sólo portaron el gen *sed*. Respecto de los otros operarios, la cepa aislada de la secreción nasal de uno de ellos fue positiva para el gen *seb*, en tanto que la cepa aislada del otro operario fue negativa para todos los genes. Sobre un total de 11 cepas de *S. aureus* analizadas, se establecieron 4 patrones de *SmaI*-PFGE (Figura 1), los cuales presentaron entre 12 y 14 bandas bien definidas de 45 a 630 kb. Las 3 cepas aisladas de las muestras de leche ultrapasteurizada, las 3 cepas aisladas de las muestras de materia fecal de casos clínicos y la cepa aislada de la muestras de secreción nasal de uno de los operarios (patrón *SmaI*-PFGE #3) presentaron un 100% de similitud entre sí, un 93,7% de similitud con las cepas aisladas de otros dos casos clínicos (patrón *SmaI*-PFGE #4) y un 44% de similitud con las cepas aisladas de los otros dos operarios (patrones *SmaI*-PFGE #1 y #2, respectivamente).

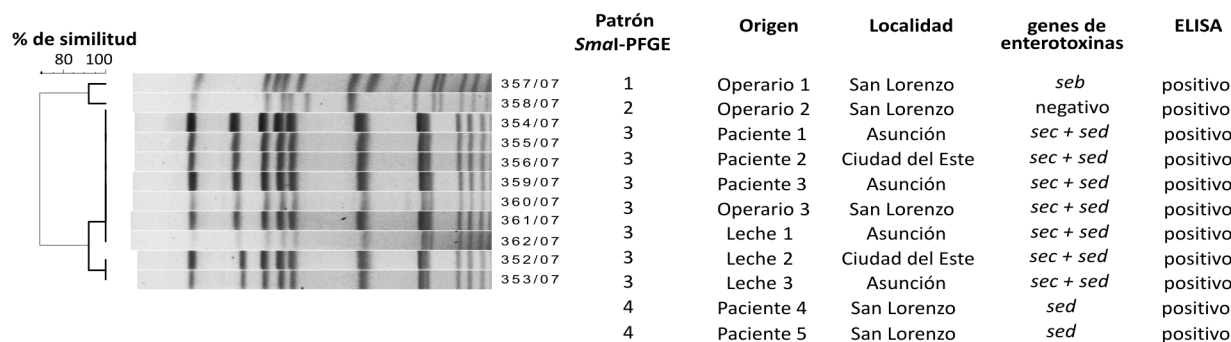


Figura 1. Dendrograma de la relación genética de cuatro patrones *SmaI*-PFGE, origen y perfil fenotípico de los aislamientos.

Luego del brote se inspeccionó la planta elaboradora. Se identificaron inconvenientes durante el proceso de producción de los 50 000 litros de leche ultrapasteurizada. Los operarios involucrados repararon un desperfecto técnico en la línea de producción, pero no se realizó la recirculación de la leche hacia la etapa de ultrapasteurización.

La notificación de un brote de ETA como el descrito causa un gran impacto en la sociedad y pone en evidencia la fragilidad de los sistemas de control de los alimentos, y en menor medida, de los sistemas preventivos de salud. En la mayoría de los brotes de ETA es difícil relacionar la fuente de intoxicación con los pacientes afectados, y más difícil aún es establecer el origen de la contaminación de los alimentos involucrados, sobre todo si consideramos que, en general, el lote del alimento involucrado en un brote de ETA no se encuentra en las bocas de expendio cuando las personas afectadas manifiestan los síntomas de la intoxicación alimentaria. Es por ello que muchos brotes de ETA pasan inadvertidos, lo que genera un importante subregistro de casos. En otras oportunidades, particularmente en brotes masivos, se toman medidas de intervención sin identificar las causas que originaron el brote. En tales casos son escasas las posibilidades de cortar la cadena de transmisión, y muchas veces la investigación queda reducida a una descripción de los hechos, sin recuperación de muestras biológicas ni de alimentos (10).

Si bien en este trabajo se identificó el alimento involucrado en el brote y se analizaron muestras de dicho alimento y de materiales clínicos obtenidos de los pacientes afectados así como de los operarios de la planta elaboradora, no se realizó un estudio epidemiológico de tipo caso-control.

El agente etiológico de la intoxicación alimentaria fue identificado como *S. aureus* subespecie *aureus* enterotoxigénico. Por *SmaI*-PFGE se demostró que el mismo clon

de *S. aureus* se encontraba en la leche ultrapasteurizada, en la materia fecal de 3 casos clínicos y en la secreción nasal de un operario. Este hallazgo demuestra que el operario tuvo contacto con el alimento en una etapa posterior al tratamiento térmico. Esta hipótesis fue confirmada en una entrevista posterior realizada a los operarios de la planta elaboradora. Además, estos resultados permitieron confirmar que luego de la intervención del operario, los 50 000 litros de leche afectados no fueron reprocesados. Debemos considerar que la leche ultrapasteurizada se conserva a temperatura ambiente debido al tratamiento térmico que recibe, y que esta temperatura favorece la multiplicación de *S. aureus*, que puede alcanzar o incluso superar niveles de 10^5 UFC/ml de alimento, concentración en la que este microorganismo produce las enterotoxinas causantes de la intoxicación alimentaria (7).

En la última década se describieron varios brotes de intoxicación alimentaria por la presencia de enterotoxinas de *S. aureus* en los alimentos (2, 12) y se caracterizaron aislamientos de *S. aureus* enterotoxigénico a partir de alimentos (1, 6). En este trabajo se demostró el valor de recolectar rápidamente los alimentos en las bocas de expendio, investigar la planta elaboradora del alimento y analizar muestras del alimento, de los casos clínicos y de los operarios de las plantas elaboradoras mediante técnicas bacteriológicas y de subtipificación molecular. Este es el primer brote de ETA denunciado en Paraguay en el cual se pudo identificar al patógeno implicado en el alimento y en muestras de pacientes; además, se pudo establecer el origen de la contaminación. Los resultados de este trabajo permitieron proponer recomendaciones de prevención en la planta elaboradora de leche ultrapasteurizada.

Agradecimientos: Se agradece al Instituto Nacional de Alimentación y Nutrición de la República del Paraguay (INAN), al Instituto Nacional de Tecnología y Normalización de la República del Paraguay (INTN) y al Laboratorio Tesai de Ciudad del Este.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aragon-Alegro LC, Konta EM, Suzuki K, Silva MG, Fernandes JA, Raal R, Rall VLM. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. *Food Control* 2007; 18: 630-4.
2. Araújo VS, Pagliares VA, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 1172-7.
3. Bean N, Goulding JS, Lao C, Angulo FJ. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States (1988-1992). *MMWR CDC Surveill Summ* 1996; 45: 1-66.
4. Bergdoll MS, Huang IY, Schantz EJ. Chemistry of staphylococcal enterotoxins. *J Agricult Food Chem* 1994; 22: 9-13.
5. Brizzio A. Aplicación de una PCR múltiple para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* toxigénicas. Tesis de Maestría en Microbiología Molecular 2009. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y Universidad Nacional de San Martín.
6. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to detect classical enterotoxin genes (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (*tst*) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. *Arq Inst Biol São Paulo* 2006; 73: 165-9.
7. Food and Drug Administration - FDA. [Online] <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BAM/UCM071429>
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) Microorganism in Foods 5, Microbiological Specifications of Food Pathogens. London, Blackie Academic and Professional, 1996, p. 299-333.
9. Koneman EW, Stephen DA, Williams MJ, Schrenberger PC, Washington CW. Capítulo II. Diagnóstico Microbiológico. 5ª edición, Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana, 1999, p.528-562.
10. López C, Feltri A, Leotta GA, González G, Manfredi E, Gottardi G, Elder M, De Las Carreras S, Patri C, Guajardo F, San Martín A, Rivas M. Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Rev Argent Microbiol* 2008; 40: 198-203.
11. Manfredi E, Leotta GA, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev Argent Microbiol* 2010; 42: 212-5.
12. Mejía Nuñez MR, Murillo AS, Suazo H, Campos JC, Rodríguez H, Espinal O, Avelar G. Brote por *Staphylococcus aureus* en una guardería infantil en Choluteca, Honduras. *Rev Med Hondur* 2009; 77: 67-70.
13. Norma ISO 6888-1:1999/Amd.1:2003(E). Método horizontal para la enumeración de *Staphylococcus* coagulasa positivo (*Staphylococcus aureus* y otras especies) - Parte 1: Técnica utilizando agar Baird Parker.
14. Ren K, Bannan JD, Pancholi V, Cheung AL, Robbins JC, Fischetti VA, Zabriskie JB. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. *J Exp Med* 1994; 180: 1675-83.
15. Rivas M, Moro A. *Staphylococcus aureus* en alimentos. *Rev INFYB* 1981; 313-16.