



INFORME BREVE

Brote de intoxicación alimentaria en un jardín de infantes de la provincia de Buenos Aires



Eduardo A. Manfredi* y Marta Rivas

Servicio de Fisiopatogenia, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas–ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 5 de abril de 2018; aceptado el 26 de agosto de 2018

Disponible en Internet el 15 de marzo de 2019

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus aureus;
Enterotoxinas;
PCR;
SmaI-PFGE

KEYWORDS

Staphylococcus aureus;
Enterotoxins;
PCR;
SmaI-PFGE

Resumen El 27 de noviembre de 2008 ocurrió un brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de salpichón de ave en un jardín de infantes de Hurlingham, provincia de Buenos Aires. Treinta y siete niños y 10 adultos presentaron síntomas gastrointestinales. Cinco niños fueron internados con signos de deshidratación, y uno de ellos requirió cuidados intensivos. Se aisló *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* del alimento involucrado, de 4/5 muestras de materia fecal de pacientes y de 3/5 manipuladores (nariz del manipulador 1, manos de manipuladores 2 y 3). Las cepas aisladas portaban los genes que codifican las enterotoxinas SEA y SED. Por electroforesis de campo pulsado con la enzima *SmaI*, los patrones de macrorrestricción presentaron 100% de similitud. La investigación oportuna del brote permitió identificar al agente causal de la intoxicación, determinar las fallas en la elaboración del alimento e implementar las medidas correctivas correspondientes.

Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Food poisoning outbreak in a kindergarten in the Province of Buenos Aires, Argentina

Abstract On November 27, 2008, a foodborne disease outbreak associated with the consumption of chicken salad occurred in a kindergarten in the District of Hurlingham, Province of Buenos Aires. Thirty-seven children and 10 adults with gastrointestinal symptoms were affected. Five children were hospitalized with signs of dehydration, one of them requiring intensive care. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* was isolated from the mentioned food in 4 out of 5 stool specimens from the patients, and in 3 out of 5 food handlers (nose of food handler #1, hands of food handlers #2 and 3). The isolates carried the genes coding for enterotoxins SEA and SED.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: emanfredi@anlis.gov.ar (E.A. Manfredi).

The macrorestriction patterns showed 100% similarity by pulsed-field gel electrophoresis using the *Sma*I enzyme. A timely outbreak investigation allowed us to identify the causative agent of the food poisoning as well as the failures in food processing and to implement corrective measures.

Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Staphylococcus aureus es un comensal que coloniza la piel, las mucosas y, persistentemente, las fosas nasales anteriores del 20% al 30% de la población mundial¹⁴. También puede causar intoxicaciones graves que ponen en riesgo la vida de los seres humanos y los animales. La intoxicación estafilocócica de origen alimentario es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más frecuentes en el mundo⁸. En general, es una enfermedad autolimitada, que se inicia con vómitos violentos, después de un período corto de incubación de 2-6 horas a partir de la ingestión del alimento contaminado, puede producir también una gastroenteritis aguda³. En la mayoría de los casos los síntomas remiten después de 24 horas. Se estima que solo el 10% de los pacientes con intoxicación estafilocócica de origen alimentario acuden a un hospital⁵, y la mortalidad varía del 0,03% al 4,4% y se da principalmente en niños y ancianos².

Se han descrito 23 enterotoxinas (SE)¹¹ y superantígenos, pero solo algunas de las primeras han demostrado inducir una respuesta emética en ensayos en monos. Entre las enterotoxinas con actividad emética se incluyen las clásicas SEA/SEB/SEC/SED/SEE, como así también SEG/SEH/SEI/SEJ¹.

S. aureus puede aislarse a partir de muestras de heces de pacientes, alimentos, muestras ambientales y manipuladores de alimentos. En los alimentos procesados la contaminación es introducida principalmente por los manipuladores, debido a inadecuadas prácticas de manufactura¹³. Por otra parte, las malas condiciones de almacenamiento de los alimentos favorecen la multiplicación de *S. aureus* y la consecuente producción de las enterotoxinas como principal factor de virulencia.

El presente trabajo tuvo como objetivos describir un brote de intoxicación estafilocócica de origen alimentario ocurrido en un jardín de infantes del partido de Hurlingham, provincia de Buenos Aires, e identificar y caracterizar la cepa de *S. aureus* responsable de ese brote.

El 27 de noviembre de 2008 un total de 117 personas (contabilizando niños, docentes y auxiliares) asistieron entre las 12 y las 13 horas al comedor de un jardín de infantes de Hurlingham, provincia de Buenos Aires. Entre las 14 horas y las 22 horas 47 personas (37 niños de 2 a 6 años y 10 adultos) acudieron al hospital de dicha localidad con síntomas gastrointestinales, principalmente vómitos (95%) y dolores abdominales; con menor frecuencia los pacientes informaron de diarrea (5%). De los niños afectados 5 fueron internados con signos de deshidratación y uno de ellos fue derivado a la Unidad de Terapia Intensiva del

Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. La tasa de ataque fue del 40%, con un período de incubación promedio de 6 horas. Durante el interrogatorio todos los afectados refirieron haber comido salpichón de ave durante el almuerzo.

Ante la presunción de un brote de enfermedad transmitida por alimentos a fuente común, se procedió a inspeccionar la cocina y a recolectar información sobre la manipulación de los alimentos. Se tomaron muestras de alimentos y se efectuaron hisopados de manos y narinas de 5 manipuladores, y se recolectó materia fecal de 5 pacientes. Las muestras de alimentos fueron procesadas para la detección y el aislamiento de *S. aureus* y *Bacillus cereus*, según los lineamientos normativos de la *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*⁶. Las muestras de materia fecal de los pacientes y los hisopados de nariz y manos de los manipuladores fueron sembrados en el medio Baird Parker (BP) directamente y también luego del enriquecimiento en caldo Gioliti Cantoni a 35 °C durante 24 horas. Las colonias presuntivas de *Staphylococcus* spp. fueron tipificadas por pruebas bioquímicas convencionales. La detección de los genes que codifican las diferentes enterotoxinas se realizó por 2 PCR múltiples (mPCR), mPCR1 para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec* y 16S rRNA, y mPCR2 para la detección de los genes *sed*, *see* y 16S rRNA⁹. Simultáneamente, se utilizó el sistema miniVIDAS® (bioMérieux, Argentina), determinación inmunoenzimática cualitativa y automatizada que permite la detección de las enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. en alimentos mediante la técnica *enzyme linked fluorescent assay* para determinar la capacidad de producir el *pool* de enterotoxinas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE.

Los aislamientos fueron subtipificados por la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE) con la enzima de restricción *Sma*I (Promega, Madison, WI, EE. UU.), según el protocolo descrito por Mulvey et al.¹⁰, con modificaciones. Los bloques de agarosa que contenían el ADN de cada cepa fueron digeridos con 15 U de la enzima *Sma*I. Se utilizó como cepa de referencia *Salmonella* Braenderup H9812 digerida con la enzima *Xba*I. Los fragmentos de ADN fueron separados en un gel de agarosa al 1% (Seakem LE Agarose, Rockland, ME, EE. UU.) en buffer tris borato EDTA 0,5X, en una cámara de electroforesis CHEF-DR III system (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). La captación de imágenes se realizó con el programa Doc-It Image Acquisition, y los patrones de macrorestricción generados fueron analizados con el software BioNumerics versión 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). La relación entre los patrones fue

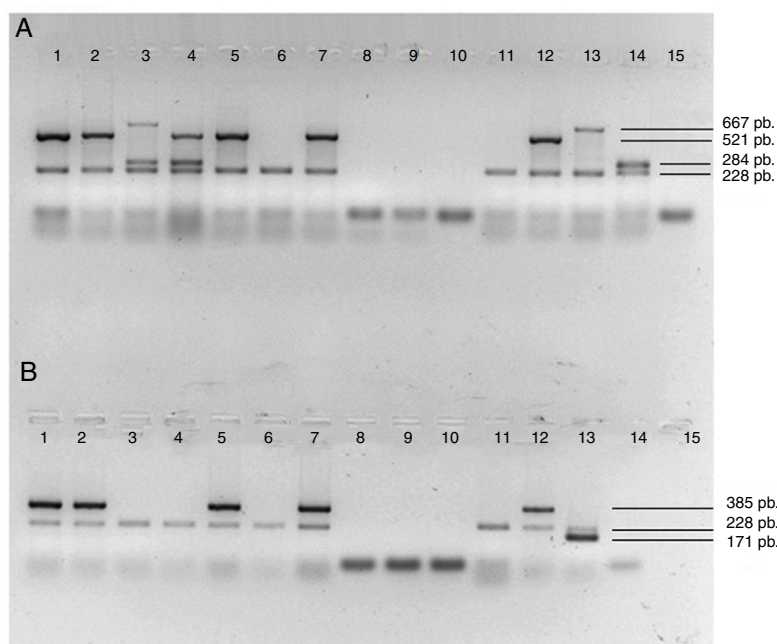


Figura 1 A. PCR múltiple para la detección de los genes *sea* (521pb), *seb* (667 pb), *sec* (284 pb) y 16S rRNA (228 pb) de *Staphylococcus aureus*. Calle 1: aislamiento del alimento; calles 2 y 3: nariz y mano del manipulador 1, respectivamente; calles 4 y 5: nariz y mano del manipulador 2, respectivamente; calles 6 y 7: nariz y mano del manipulador 3, respectivamente; calle 12: control positivo *sea*; calle 13: control positivo *seb*; calle 14: control positivo *sec*; calle 15: control de reactivos. B. PCR múltiple para la amplificación de los genes *sed* (385 pb), *see* (171 pb) y 16S rRNA (228 pb) de *Staphylococcus aureus*. Calle 1: aislamiento alimento; calles 2 y 3: nariz y mano del manipulador 1, respectivamente; calles 4 y 5: nariz y mano del manipulador 2, respectivamente; calles 6 y 7: nariz y mano del manipulador 3, respectivamente; calle 12: control positivo *sed*; calle 13: control positivo *see*; calle 14: control de reactivos.

estimada por la proporción de bandas compartidas aplicando el coeficiente de Dice, generando dendrogramas basados en el método UPGMA. Los patrones moleculares obtenidos por *Sma*I-PFGE fueron agrupados en conjuntos clonales cuando presentaron una similitud del 100%.

La muestra de salpicón de ave fue positiva para la presencia del pool de enterotoxinas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE mediante la utilización del sistema miniVIDAS. Se aisló *S. aureus* subsp. *aureus* portador de los genes que codifican las enterotoxinas SEA y SED, y no se aisló *Bacillus cereus*.

De 4/5 muestras de materia fecal y de 3/5 muestras de manipuladores de alimentos se aislaron cepas de *S. aureus* subsp. *aureus*. Las cepas aisladas de la nariz del manipulador 1 (M1) y de las manos de los manipuladores 2 (M2) y 3 (M3) portaban los genes que codifican las enterotoxinas SEA y SED. Por otra parte, la cepa de *S. aureus* aislada de las manos del M1 codificaba SEB y SEC, y aquella aislada de la nariz del M2 portaba genes codificantes de SEA y SEC. Si bien la portación de genes codificantes de SEA es la más frecuente en *S. aureus*, también se ha descrito en este microorganismo la asociación entre 2 o más enterotoxinas¹².

De la muestra de narinas del M3 solo se recuperó *Staphylococcus coagulasa* negativo, no toxigénico (fig. 1). Las muestras de manos y narinas de los manipuladores M4 y M5 fueron negativas.

No se observaron diferencias en la recuperación de aislamientos a partir de materia fecal cuando las muestras se sembraron directamente en BP en comparación con

aquellas muestras sometidas al enriquecimiento previo en Gioliti Cantoni. Sin embargo, la etapa de enriquecimiento resultó ser más eficaz para la recuperación de *S. aureus* a partir de hisopados de manos o de nariz (5 positivos) que la siembra directa en BP (2 positivos).

Sobre un total de 10 cepas de *S. aureus* analizadas se establecieron 3 patrones de macrorrestricción por *Sma*I-PFGE, los cuales presentaron entre 7 y 9 bandas bien definidas, de 45 a 630 kb. Los patrones de las cepas aisladas de la nariz de M1, de las manos de M2 y M3, las 4 cepas aisladas de materia fecal de los pacientes y la cepa recuperada del salpicón de ave presentaron el 100% de similitud entre sí (patrón *Sma*I-PFGE #1), el 75% de similitud con la cepa de nariz de M2 (patrón *Sma*I-PFGE #2) y el 61% de similitud con la cepa de manos de M1 (patrón *Sma*I-PFGE #3) (fig. 2).

El agente etiológico de la intoxicación alimentaria —identificado como *S. aureus* subsp. *aureus*— fue productor de las enterotoxinas A y D y fue aislado del salpicón de ave, de la materia fecal de los pacientes y de 3 manipuladores (M1, M2 y M3); los perfiles de bandas fueron indistinguibles por *Sma*I-PFGE y, por lo tanto, estos aislamientos pertenecieron a un mismo clon, lo que permite inferir que hubo una contaminación durante el proceso de preparación del alimento.

A partir del interrogatorio se pudo establecer que los manipuladores eventuales M1 y M2 fueron los encargados del troceado y picado del pollo, mientras que el manipulador M3 trabajó con el producto ya elaborado.

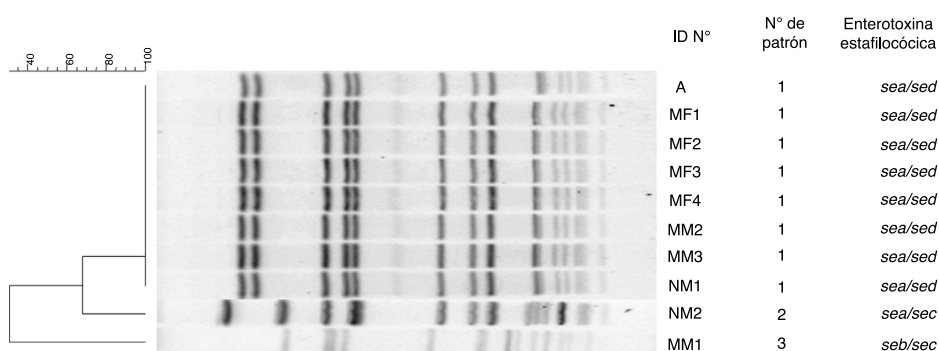


Figura 2 Relación clonal de aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a un brote de intoxicación alimentaria en un jardín de infantes.

A: alimento; MF: materia fecal; MM1: manos del manipulador 1; MM2: manos del manipulador 2; MM3: manos del manipulador 3; NM1: nariz del manipulador 1; NM2: nariz del manipulador 2.

Si bien la portación nasofaríngea de *S. aureus* es frecuente (al igual que la de cepas enterotoxigénicas⁷) y un 50% de los adultos sanos puede transmitir *S. aureus* a través de sus mucosas⁴, su presencia en el alimento demuestra malas prácticas de manufactura¹⁵. Como hipótesis sobre el origen del brote se puede suponer que M1 pudo haber contaminado el pollo durante el troceado y picado a partir de sus narinas. Posteriormente, M2 y M3 se contaminaron las manos al entrar en contacto con el alimento. Esto enfatiza la necesidad de capacitar al personal de cocina en normas básicas de higiene y buenas prácticas de manufactura¹⁵.

Además, hubo factores que favorecieron la proliferación de *S. aureus* y la producción de enterotoxinas, como las altas temperaturas (aproximadamente 38 °C en el ambiente externo) y el tiempo prolongado en completar toda la operación de picado, mezclado, fraccionamiento y distribución del alimento para el consumo. A raíz de la ocurrencia de este brote se intensificaron las medidas de higiene en la cocina del establecimiento y se capacitó a todo el personal eventual de cocina, junto con el personal estable de todos los jardines de infantes del municipio, en lo referente a buenas prácticas de manufactura.

La investigación oportuna de este brote pone de manifiesto la importancia del trabajo conjunto en términos de epidemiología, clínica y laboratorio, a fin de poder identificar el agente causal y detectar situaciones predisponentes para la ocurrencia de brotes, lo cual ayuda a implementar medidas correctivas y preventivas.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no presentar conflicto de intereses.

Bibliografía

- Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* (Basel). 2010;2:1751–73.
- Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. 3rd edition Washington, DC: American Society for Microbiology; 2007. p. 505.
- Fueyo Mendoza JM. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: tipos y relaciones. Oviedo: Editorial Universidad de Oviedo; 2008. p. 25.
- Halablab MA, Hijazi SM, Fawzi MA, Araj GF. *Staphylococcus aureus* nasal carriage rate and associated risk factors in individuals in the community. *Epidemiol Infect.* 2010;138:702–6.
- Holmberg SD, Blake PA. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA.* 1984;251:487–9.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganism in foods 5, microbiological specifications of food pathogens. London: Blackie Academic and Professional; 1996. pp. 299–333.
- Jordá GB, Marucci RS, Guida AM, Pires PS, Manfredi EA. Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. *Rev Argent Microbiol.* 2012;44: 101–4.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int.* 2014;2014:827965.
- Manfredi E, Leotta G, 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.
- Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, Alfa M. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2001;39: 3481–5.
- Ono HK, Sato Y, Narita K, Naito I, Hirose S, Hisatsune J, Asano K, Hu DL, Omoe K, Sugai M, Nakane A. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:7034–40.
- Roussel S, Felix B, Vingadassalon N, Grout J, Hennekinne JA, Guillier L, Brisabois A, Auvray F. *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France: Comparison of different molecular typing methods, including MLVA. *Front Microbiol.* 2015;6:882.

13. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Radstrom P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*. 2011;2:580–92.
14. Van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, Verbrugh HA, Wertheim HFL. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis*. 2009;199:1820–6.
15. Von Specht MH, Zingaretti AQ, Grenon SL. Perfiles de resistencia a los antibióticos y portación del gen sea en aislamientos de *Staphylococcus aureus* de origen ambiental en Posadas Misiones. *Rev Cienc Tecnol*. 2013;20:61–7.