

CATEDRA DE INDUSTRIAS DE LECHE, CARNE Y PESCADO

Profesor encargado de Curso: Dr. F. REJAS GARCÍA

**Contribución al estudio de las intoxicaciones  
alimenticias provocadas por estafilococos  
enterotóxicos**

*Por F. Rejas García  
J. I. Ovejero Guisasola*

Con motivo de cuatro brotes de intoxicaciones alimenticias, en la provincia de León, motivadas por el consumo de conservas de jurel en aceite contaminadas por estafilococos enterotóxicos, y el disponer de material abundante, hecho poco frecuente en estos casos, nos decidimos a iniciar una investigación encaminada a comprobar la eficiencia de diversas técnicas de control, a determinar el origen de la contaminación de la conserva, y estudiar la influencia del aceite de cobertura en el desarrollo del microorganismo.

En el desarrollo de este trabajo comenzaremos por una revisión del estado actual del problema de las intoxicaciones estafilocócicas, así como de las técnicas para su estudio y control, para terminar con la exposición y discusión de nuestros resultados experimentales.

**ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA DE LAS INTOXICACIONES  
POR ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS**

Las intoxicaciones alimenticias de origen estafilocólico son sin duda las más frecuentes, dentro del amplio capítulo de toxi-infecciones alimenticias, llegando a cifras del 80 por 100 en U. S. A.,<sup>21</sup> y del 100 por 100 en algunas regiones españolas.<sup>42</sup> La primera cifra, a pesar de ser alta, es posible no sea totalmente representativa, si tenemos en cuenta que las intoxicaciones leves pasan desapercibidas, atribuyéndose a fenómenos alérgicos o trastornos digestivos.

La intoxicación estafilocócica se manifiesta en el hombre como un proceso gastro-intestinal agudo, de presentación rápida. Los síntomas comienzan a las 2-5 horas de haber ingerido el alimento. Son características diarreas, vómitos, deshidratación grave, cefalea, pulso débil, hipotensión, y síntomas de colapso. La temperatura, sin embargo, permanece normal. Los efectos de la intoxicación son cortos, con restablecimiento total generalmente a las 48 horas. A veces se producen casos letales, en niños y ancianos.<sup>43</sup> No todos los adultos son sensibles a la toxina, aunque sí una elevada proporción, 65-80 por 100.

El proceso gastro-intestinal es provocado por la enterotoxina, no por actuación directa sobre el intestino, sino, una vez absorbida, por su acción específica sobre el sistema nervioso central.

Entre los alimentos que con más frecuencia producen intoxicaciones estafilocócicas podemos citar carne y derivados cárnicos, pastas y pastelillos de carne, embutidos, jamón ahumado; leche y derivados, leches de vaca y oveja, leche condensada, quesos frescos y duros de vaca y oveja, helados, cremas; pescado y mariscos, ostras, conservas no ácidas de sardinas y afines y jurel, en aceite y en salsa de tomate, arenques ahumados.<sup>2 3 21 22 25 30 40 42 44 49 50</sup>

La presencia de los estafilococos enterotóxicos en los alimentos puede tener una doble procedencia, endógena o exógena. La primera por enfermedad del animal del que proceden, y la segunda generalmente por contaminación de portadores humanos durante la manipulación de los mismos. En carne y derivados, los estafilococos enterotóxicos aislados son de origen humano en su mayoría.<sup>38 50</sup> En productos de la pesca ocurre lo mismo. Está probado que los micrococos de intestino y piel del pescado, y los estafilococos responsables de algunas formas morbosas de los peces, no son enterotóxicos.<sup>45</sup> En la leche y derivados, sin embargo, son frecuentes ambas procedencias; las de origen humano por contaminación a partir del personal manipulador, y las de origen animal, por portadores sanos o enfermos, especialmente de mamitis.<sup>41</sup>

Los portadores humanos de estafilococos patógenos y enterotóxicos son bastante frecuentes. Los resultados encontrados por diversos autores son diferentes a causa de que su presencia es estacional.<sup>34</sup> Los estafilococos aislados de portadores nasofaríngeos sanos, eran patógenos entre un 6,4 por 100 a un 50 por 100.<sup>43 14</sup> Sin embargo está comprobado que solamente el 6 por 100 de los estafilococos patógenos son

enterotóxicos.<sup>53</sup> El estafilococo enterotóxico ha sido aislado entre el 1,07 — 10,2 por 100 de las secreciones nasofaríngeas examinadas.<sup>34 55</sup>

En la producción de enterotoxina por los estafilococos en los alimentos juegan diversos factores: naturaleza del substrato alimenticio, condiciones ambientales, competencia de otros microorganismos, termorresistencia, etc., que vamos a analizar brevemente.

El substrato nutritivo es fundamental para el desarrollo del estafilococo y la producción de enterotoxina. Esta parece ser se trata de un metabolito bacteriano, una amina de decarboxilación, producto de la desintegración proteica.<sup>19</sup> La acidez de los alimentos inhibe el estafilococo.<sup>44</sup> En las conservas de pescado en aceite parece ser que el desarrollo microbiano, y por consiguiente la producción de enterotoxina, tiene lugar cuando el pescado está fuera del contacto de aquél, a causa de una cierta acción bacteriostática del aceite para el estafilococo.<sup>2</sup> Substratos óptimos para la producción parecen ser carne y derivados, leche y pescado, excepto conservas esterilizadas de salmón.<sup>15</sup>

En todos los casos, el desarrollo del estafilococo y la producción de enterotoxina van acompañados de una absoluta normalidad de los caracteres organolépticos del producto.<sup>42</sup>

Las condiciones ambientales, temperatura, y el tiempo de conservación del alimento, influyen fuertemente en el desarrollo del estafilococo y la producción de enterotoxina.<sup>30</sup> La zona de desarrollo se encuentra situada entre 5 y 45° C, con óptimos entre 21-37° C. En condiciones óptimas puede producirse el desarrollo microbiano  $5 \times 10^6$  estafilococos/gramo, capaz de producir enterotoxina suficiente para la producción de intoxicación, en períodos de 4-6 horas.<sup>25 30 32</sup>

Por otra parte el desarrollo del estafilococo está condicionado a la presencia en el substrato alimenticio de otros microorganismos. Es un hecho comprobado que en alimentos ricos en enterotoxina, el estafilococo se encuentra prácticamente en cultivo puro<sup>25 35</sup>, y por el contrario se encuentra ausente en los alimentos muy alterados.<sup>22</sup> Se han encontrado dos microorganismos frecuentes en los alimentos: *Serratia marcescens* y *Pseudomonas sp.*, que eliminan al estafilococo por competición nutritiva, y otros *B. cereus*, *Prot. vulgaris*, *Esch. coli*, *A. aerogenes* y *Acromobacter*, que lo inhiben por medio de substancias antibióticas.<sup>51</sup>

En el estudio de las intoxicaciones provocadas por el consumo de conservas esterilizadas por el calor, es preciso reflexionar sobre la resistencia al calor del estafilococo y su enterotoxina. Está suficientemente

comprobado que el tratamiento térmico empleado en la fabricación de conservas es suficiente para la destrucción total de la enterotoxina formada antes del envasado. Para la destrucción total de los microorganismos parecen ser suficientes los baremos 61,5° C.-30 minutos, y 71-1.º C-15 segundos en tampón pH 7<sup>28</sup>, y los de 65°-30 minutos y 85°-3 minutos en alimentos.<sup>50</sup> Sin embargo algunos autores,<sup>3</sup> al aumentar la termorresistencia del estafilococo en presencia de aceite, aseguran son necesarias para su total destrucción en conservas de aceite, temperaturas y tiempos más elevados que los que normalmente utiliza la industria, en latas de 5 kgs. de capacidad baremos de 128° C-90 m. ó 130° C-60 m. Otros autores,<sup>42</sup> achacan a ese aumento de termorresistencia provocado por el aceite, la presencia de estafilococos enterotóxicos en conservas de este tipo, no explicándose sin embargo el fenómeno de que aparezcan en latas aisladas, no en lotes, y casi siempre en forma de cultivo puro.

Entre las medidas profilácticas recomendadas para la eliminación de la presencia de los estafilococos enterotóxicos en los alimentos, a parte de una higiene escrupulosa en la preparación, podemos destacar, pasteurización alta en la leche, esterilización adecuada en conservas, eliminación de portadores en el personal, y conservación de los alimentos a temperaturas disgenéticas para el desarrollo del microorganismo.<sup>14 34 43 50 55</sup> Sumamente sugestivos son los ensayos realizados con el antibiótico Tylosin, que permite la inhibición del estafilococo en los alimentos en dosis francamente bajas, 20 ppm. en helados, 2,5 ppm. en quesos, 3 ppm. en jamón, 5 ppm. en salchichas.

#### REVISION DE LAS TECNICAS DE ESTUDIO Y CONTROL DE LOS ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXICOS

La investigación de estafilococos enterotóxicos en los alimentos, puede realizarse directa o indirectamente, según que tratemos de buscar el organismo productor o algún producto característico de su metabolismo. El interés práctico de estos últimos es evidente. CHAPMAN ha propuesto la investigación de la coagulasa estafilocócica en el alimento,<sup>8</sup> afirmando que alimentos con 231 millones de estafilococos coagulasa positiva/gramo, dan la prueba de la coagulasa positiva a las dos horas, y con 750.000/gramo, a las siete horas.<sup>10</sup> Sin embargo es posible que numerosos factores puedan interferir la reacción: pH, concentración en-

zimática, presencia o ausencia de activadores (calcio ionizado, cationes bivalentes), etc.

En la investigación directa del microorganismo en los alimentos, se ha aprovechado la propiedad de su halotolerancia, medios con 7,5 por 100 de cloruro sódico, y sus propiedades de licuar la gelatina y acidificar la manita, empleándose como medios de enriquecimiento el de CHAMPAN,<sup>9 42</sup> triptycase soy broth 7,5 por 100 ClNa,<sup>24</sup> y en el aislamiento el Manitol Salt agar,<sup>9</sup> el Staphylococcus número 110,<sup>11</sup> el Chammam-Stone,<sup>12</sup> el triptycase soy agar 7,5 por 100 ClNa,<sup>24</sup> el telurito-glicina,<sup>13 36</sup> el agar yema de huevo,<sup>6</sup> etc.

La identificación de enterotoxigenidad de los estafilococos puede realizarse investigando su capacidad de producción de enterotoxina, método seguro pero lento y complicado, o bien investigando determinadas características metabólicas del microorganismo generalmente ligadas a su capacidad enterotóxica, método más sencillo pero no siempre seguro. Se sabe que la capacidad de producción de enterotoxina está limitada a los estafilococos coagulasa positivos<sup>7</sup>; sin embargo no todos son enterotóxicos.<sup>20</sup> Las cepas enterotóxicas elaboran una potente toxina  $\alpha$ , pero no todas las cepas toxina  $\alpha$  positivas son enterotóxicas.<sup>50</sup>

La aglutinación de los estafilococos por suero de caballo, técnica original de SLOCUM,<sup>46</sup> permite diferenciar con un cierto porcentaje de errores los estafilococos no enterotóxicos, ya que parece ser que cuando el título es igual o superior a 1/160 el estafilococo no es enterotóxico.<sup>4</sup>

La resistencia a los antibióticos es indicativa de poder enterotóxico, especialmente la resistencia a la penicilina.<sup>13</sup>

La tipificación por fagos puede ser indicativa de enterotoxigenidad, ya que las variedades enterotóxicas muestran tendencia a agruparse en ciertos tipos sensibles a la acción bacterifágica.<sup>32 48</sup> La identificación por fagos permite, por otra parte, relacionar los estafilococos aislados en los alimentos y en el personal o animales sospechosos.

Las cepas toxina  $\alpha$  positivas, entre las que se encuentran las enterotóxicas, son en general gelatina positiva, coagulasa positiva, fosfatasa ácida positiva, lipasa positiva, y con poder hemolítico y fibrinolítico positivo.<sup>29 37 47 50 54</sup>

La investigación de la capacidad de producción de enterotoxina puede realizarse a partir del alimento sospechoso o de las cepas aisladas. En el primer caso puede investigarse en voluntarios humanos, técnica peligrosa, o en animales sensibles, especialmente gatos, por vía intrape-

ritoneal.<sup>31 42</sup> Cuando se parte de las cepas aisladas se seguirán las normas dictadas por DOLMAN,<sup>16 18</sup> para la preparación de enterotoxina.

Entre los animales sensibles: gatos,<sup>17 31</sup> *Macacus rhesus*,<sup>47</sup> lechones,<sup>26</sup> rana pipiens,<sup>39</sup> rana esculenta,<sup>35</sup> parece ser que el más sensible es el gato,<sup>1 47</sup> pues a pesar de las objeciones hechas al Kitten-test<sup>27 33 36</sup> revisiones de la misma,<sup>1 5</sup> afirman que son poco frecuentes las causas de error, gatos refractarios, destrucción incompleta de la toxina capaz de producir vómitos, producción de vómitos por acción refleja a la inyección, etc.

### TECNICAS EMPLEADAS

En el desarrollo de nuestro trabajo han sido empleadas las siguientes técnicas:

Apertura de envases: Previa limpieza con solución detergente de la tapa, e inflamación de alcohol sobre la misma, apertura con abrelatas manual estéril, en campana de siembras.

Investigación de coagulasa en la conserva: Prensado por papel de filtro estéril al objeto de eliminar aceite, turmizar estérilmente 100 gramos de pulpa de pescado en 100 c. c. de agua destilada estéril. Maceración a 5º C, 24 horas. Filtración por papel de filtro estéril. Depositar 0,2 c. c. de plasma de conejo oxalatado y 0,3 c. c. de filtrado en tubos de hemólisis estériles. Incubación a 37º C. Lectura 1, 2, 5, 10 y 24 horas.

Investigación de enterotoxina estafilocócica en la conserva: A partir del filtrado obtenido para la prueba de la coagulasa. Calentamiento de 20 c. c. a 100º, 30 minutos en baño maría. Filtración por Seitz para eliminar microorganismos esporulados viables. Inyección de 5 c. c. por vía intraperitoneal a gatos de 1,5-3 meses con peso entre 350-1.000 grs.

Técnica de enriquecimiento en la investigación del estafilococo en la conserva: Turmizar estérilmente 150 gramos de pescado en 150 c. c. de agua destilada estéril. Sembrar 200 c. c. sobre erlenmeyer con 200 c.c. de "Triptycase soy broths B. B. L. 7,5 por 100 ClNa", preparado a doble concentración. Incubación a 37º, siete días.

Técnica del conteo y aislamiento del estafilococo: A partir del turmizado preparado anteriormente, se preparan diluciones seriadas sobre suero fisiológico estéril. Siembra en profundidad, en placas con medio Champan-Stone Difco. Incubación a 37º 48 horas, y a 25º 72 horas.

Se consideran colonias positivas las que presentaron coloración amarilla, rodeadas de halo transparente con modificación del color del medio al contacto con unas gotas de indicador púrpura de bromocresol.

Estudio metabólico y enzimático en las cepas aisladas: Se siguieron las técnicas usuales en Microbiología.

Prueba de Slocum: Siguiendo la técnica clásica de la reacción de aglutinación, con diluciones de suero normal de caballo al 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320. Lectura a las doce horas de incubación a 37º.

Determinación de la resistencia a la penicilina: Sobre caldo nutritivo con concentraciones de 0,1, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 u/cc. Lectura tras una incubación de 24 horas a 37º.

Investigación de la producción de enterotoxina en las cepas aisladas: Preparación de la enterotoxina: Sobre medio Dolman, en placas de 12 cm. Ø, con 25 c.c. de medio por placa. Siembra en superficie con dos c. c. de cultivo en caldo. Incubación, en campana de anaerobios, en atmósfera de aire con 30 por 100 de CO<sub>2</sub>, a 37º, 48 horas. Filtración del cultivo por algodón. Centrifugación y decantación. Ajuste a pH 7 del decantado con ácido acético. Calentamiento en baño maría a 100º, 30 m. Filtración esterilizante por filtro Seitz.

Preparación de los gatos a inyectar: Al objeto de facilitar el vómito los gatos fueron inyectados dos horas más tarde de realizar la única comida diaria.

Técnica de la inyección: Intravenosa: a gatos adultos, mínimo de un kilogramo de peso, 3 c. c. en la safena. Intraperitoneal: a gatos de 1,5-3 meses, de 350-1.000 gramos de peso, 4 c. c.

Interpretación de resultados en gatos: En caso positivo apatía, lasitud, seguidas por una o más crisis de náuseas y vómitos, frecuentemente diarrea, en un plazo que generalmente comienza a los 30 minutos en los inyectados por vía intraperitoneal, y a los 15-20 minutos los de intravenosa, y que termina a las cuatro horas.

### RESULTADOS

En la Tabla I se detallan los resultados obtenidos directamente en las conservas.

Se han estudiado nueve latas, cuatro productoras de intoxicaciones, latas 1, 2, 3 y 4; y 5 abiertas por nosotros, latas 5, 6, 7, 8 y 9. Todas ellas proceden de la misma factoría, de idéntico formato, latas de 4,5

kilogramos, sin número de lote, y como único dato de la fecha de fabricación, la leyenda "Fabricación de 1963".

En todas las latas productoras de intoxicación se han aislado estafilococos enterotóxicos. De las abiertas por nosotros solamente en dos: latas 5 y 7.

La concentración de estafilococos por gramo de producto, en las latas productoras de intoxicación, en el momento de su llegada al laboratorio, de dos a cinco días después de su apertura, osciló entre 8-1.720 millones/gramo. En las latas abiertas en el laboratorio, positivas, una 140.000/gr., y la otra 300.000/gr.

En todas las latas positivas, sobre medio Chapman-Stone, ha crecido el estafilococo enterotóxico en cultivo puro, excepto en las 5 y 7. En la primera se aislaron un *Staphylococcus epidermidis* que no presentaba las características típicas de enterotoxigenidad, y un *Micrococcus flavus*, y en la segunda un gérmen esporulado, que más tarde se identificó como *B. cereus* var. *mycoides*.

Las latas negativas se manifestaron como estériles, excepto las latas 6 y 8, en que sobre Chapman-Stone se aislaron un *Micrococcus flavus* y un *B. cereus* v. *mycoides* en la primera, y un *B. cereus* v. *mycoides* en la segunda.

El control de gémenes esporulados sobre medio thioglicolato, en las latas abiertas en el laboratorio, fue positivo en los números 6, 7 y 8.

Todas las latas abiertas en el laboratorio se mostraron normales exteriormente, excepto la 6, abombada, y la 7, que presentaba fugas de aceite.

La prueba de la coagulasa realizada directamente sobre el alimento fue negativa en todas las latas. El Kitten-test por vía intraperitoneal a partir de las conservas, se realizó en todas las latas, excepto las 1 y 2, por no disponer en principio de animales para su ejecución. En todos los casos de aislamiento de estafilococos enterotóxicos, se manifiesta como positiva.

En la Tabla II reflejamos los resultados encontrados en el estudio microbiológico y toxicológico de las cepas de estafilococos y micrococos aisladas. Las cepas llevan la numeración de la lata en que se aislaron. En el caso de la lata número 5 de la que se aislaron tres en total, la numeración dada es 5, 5<sub>1</sub> y 5<sub>2</sub>, respectivamente.

Las cepas 1, 2, 3, 4, 5 y 7 se comportan como cepas patógenas, gelatina positiva, acidifican la manita, coagulasa positiva, fibrinolisina

TABLA I  
RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS CONSERVAS

Lata	Intoxicados	Presencia de estif. en la conserva. M. enriquecim.	Estif. enterot. M. Chapman - Stone Millions/gr conserva	Presencia de otros micr. M. Chapman - Stone	Prueba de la coagulasa en alimento	Kitten-test en alimento	Observaciones
1	16 (2 graves)	+	225			+++	
2	6 (4 graves)	+++++	470			-	
3	2	+++++	1.720			-	
4	20	+++++	8			+++	
5	Abierta Lab.	0,14					
6	"		0,3				
7	"						Abombada
8	"						Fugas aceite
9	"						

TABLA II  
ESTUDIO MICROBIOLOGICO Y TOXICOLOGICO DE LAS CEPAS DE ESTAFILOCOCOS Y MICROCOCCOS

	1	2	3	4	5	5 <sub>1</sub>	5 <sub>2</sub>	6	7
Morfología	Stf.G+	Stf.G+	Stf.G+	Stf.G+	Stf.G+	Stf.G+	Stf.G+	Micr.G+	Stf.G+
Agar Triptosa	Am	Am	Am	Am	Am	NP	NP	NP	Am
Chapmon-Stone	CT	CT	CT	CT	CT	CA	CA	CA	CT
C. nutritivo	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
Arabinosa	—	—	—	—	—	A	—	—	—
Celobiosa	—	—	—	—	—	A	—	—	—
Dextrina	—	A	—	—	A	—	—	—	A
Dulcita	—	A	—	—	A	—	—	—	—
Fructosa	—	A	A	—	A	—	—	—	A
Galactosa	A	A	A	—	A	—	—	—	—
Glicerina	A	A	A	—	A	—	—	—	A
Glucosa	A	A	A	—	A	—	—	—	A
Inosita	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Inulina	—	A	A	—	A	—	—	—	A
Lactosa	A	A	A	—	A	—	—	—	A
Maltosa	A	A	A	—	A	—	—	—	A
Manita	A	A	A	—	A	—	—	—	A
Manosa	A	A	A	—	A	—	—	—	A
Rafinosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ramnosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacarosa	A	—	A	—	A	—	—	—	A
Salicina	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sorbita	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Xilosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—

| 150 |

TABLA II (continuación)

	1	2	3	4	5	5 <sub>1</sub>	5 <sub>2</sub>	6	7
L. Tornasolada	LC,R	LC,R	LC,R	R	R	LC	—	—	LC,R
Gélatina	+	+	—	—	—	+	—	—	+
N. Inorgánico	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SH <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Indol	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nitratos	+	+	+	+	+	+	—	—	+
R. M.	+	—	—	—	—	—	—	—	—
V. P.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Coagulasa	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Fibrinolísina	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Hemolis	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	—	—	$\alpha$
Thioglicolato	A-AF	A-AF	A-AF	A-AF	A-AF	A-AF	Ae	Ae	A-AF
Resistencia a penicilina u/cc	50	>100	>100	>100	50	<0,1	<0,1	50	50
Test Slocum	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kitten-test:									
Intraperitoneal	+60m	+60m	+30m	+30m	+30m	+15m	+15m	+60m	+60m
Intravenosa	+60m	+30m	+15m	+15m	+15m	+15m	+15m	+30m	+30m

| 151 |

Clave: Am= amarillo. NP= no pigmentado. CT= colonias típicas. CA= colonias atípicas. TS= turbidez-sedimento. A= ácido. LG= ligera coagulación. R= reduce. Ae= aerobio. A-AF= aero-bio-anaerobio facultativo.

TABLA III  
INFLUENCIA DEL ACEITE DE COBERTURA EN EL DESARROLLO  
DEL ESTAFILOCOCO \*

	Hora 0	Hora 24		Hora 72		Hora 120	
Pulpa de jurel	4,5	5. <sup>o</sup>	18. <sup>o</sup>	5. <sup>o</sup>	18. <sup>o</sup>	5. <sup>o</sup>	18. <sup>o</sup>
Pulpa de jurel recubierto de aceite estéril	4,4	4,4	132	4,4	4.000	3,8	20.000

\* Los resultados se expresan en millones de estafilococos por gramo de conserva.

positiva, de origen humano, hemolisina  $\alpha$  positiva y hemolisina  $\beta$  negativa. Todas ellas son resistentes a la penicilina entre 50 y más de 100 u/cc. El test de Slocum se manifiesta como negativo no apareciendo aglutinación visible en ninguna de las diluciones. Así mismo se comportan como enterotóxicas, produciendo cantidad suficiente de enterotoxina, capaz de dar Kitten-test positivos tanto por vía intraperitoneal como por vía intravenosa.

Las cepas 5<sub>1</sub>, 5<sub>2</sub> y 6 se comportan como cepas apatógenas; la primera se identifica como un *S. epidermidis* atípico, y las dos segundas como *M. flavus*. La primera es manita y gelatina positivas, las dos segundas negativas. Todas ellas son coagulasa, fibrinolisina y hemolisina negativas. Son sensibles a la penicilina, y no productoras de enterotoxina. El test de Slocum se manifiesta como negativo.

En la Tabla III damos a conocer los resultados obtenidos en el estudio realizado para conocer la influencia de la temperatura y del aceite de cobertura sobre el desarrollo del estafilococo en la pulpa del pescado. Para ello se partió de pulpa de jurel en conserva, nuevamente esterilizada, sembrada con un cultivo de estafilococo y perfectamente homogeneizada. En esta tabla se observa un rápido crecimiento del estafilococo en la pulpa de pescado libre de aceite, a temperatura de 18.<sup>o</sup> frente a un lento desarrollo en la sumergida en líquido de cobertura. A cinco grados el desarrollo microbiano se halla interrumpido. La diferencia del número de estafilococos entre las dos muestras, en la hora cero, refleja sin duda una inbibición de aceite en la pulpa, no eliminado durante el prensado por papel de filtro.

Al objeto de comprobar la eficacia de la técnica de esterilización de la factoría elaboradora de las conservas responsables de intoxicación, realizamos una esterilización de ensayo, con arreglo a la siguiente pauta: Esterilización a 132<sup>o</sup>, 90 m., al objeto de lograr una esterilidad total, de una lata de jurel en aceite similar a las anteriores. Una vez fría, se perforó estérilmente, se sembró el centro de la lata con 10 c. c. de cultivo en caldo de estafilococo enterotóxico con la ayuda de aguja y jeringa adecuadas, y se cerró por estañado del orificio. Se sometió 24 horas más tarde a un tratamiento en autoclave idéntico al realizado por la factoría, cuatro horas a 103<sup>o</sup>, seguido de enfriamiento por inmersión en agua helada. Tras una incubación a 37<sup>o</sup> durante 15 días, y tras de los exámenes correspondientes, se comprobó que no existía ningún estafilococo enterotóxico viable en 100 gramos de conserva.

## DISCUSION

De los resultados obtenidos se comprueba la significación de algunos caracteres de los estafilococos frente a su enterotoxigenidad. La propiedad de ser coagulasa, fibrinolisina y hemolisina  $\alpha$  positivos va unida a la capacidad enterotóxica. El poder gelatinolítico y fermentador de la manita no es tan seguro, ya que fracasa en la cepa 5<sub>1</sub>.

El hecho de que todas las cepas enterotóxicas estudiadas sean resistentes a la penicilina, concuerda con su origen humano, ya que la casi totalidad de los estafilococos patógenos humanos aislados en la actualidad son resistentes a la misma.

El hecho de presentarse como negativa la prueba de la coagulasa en todos los ensayos directos sobre la conserva, aún en las latas con altas cifras de estafilococos, nos hace suponer o bien que las conservas en aceite se comportan como medios disgenéticos para la producción del enzima, o que en las mismas existe un factor inhibidor.

Los resultados obtenidos con el Kitten-test permiten aconsejar su empleo como medio de detección de la enterotoxina directamente en el alimento. Por otra parte la constancia y paralelismo de resultados entre la prueba intraperitoneal y la intravenosa, en filtrados de cultivos, y la rapidez de aparición junto con el fuerte aumento en la sintomatología intravenosa, presenta a ésta como la más idónea.

El menor desarrollo del estafilococo en pescado sumergido en aceite que cuando se encuentra fuera del mismo, puede ser interpretado con BERARDUCCI y PALAZZETTI <sup>2</sup> por acción antibiótica del aceite, aunque creemos más bien sea debido a fenómenos respiratorios, ya que a pesar de ser el estafilococo un microorganismo aerobio-anaerobio facultativo, su desarrollo es más rápido y amplio en condiciones aerobias.

El hecho de encontrar varias latas del mismo fabricante, y de idénticas características, contaminadas por estafilococos enterotóxicos de procedencia humana, nos hace pensar en un origen único. Ahora bien, el hecho de encontrarse en cultivo puro en la mayoría, con ausencia de esporulados, y la comprobación de la eficacia de la técnica usada en su esterilización, nos hace sospechar en una contaminación posterior a la esterilización. Sin embargo la aparición de intoxicaciones por consumo de conserva inmediatamente a la apertura de la lata, y el hallazgo de un número elevado de estafilococos en las latas abiertas en el laboratorio, nos asegura que la contaminación es anterior a la apertura. Por

otra parte, de las dos latas abiertas en el laboratorio y contaminadas por estafilococos enterotóxicos, solamente en una se pudieron apreciar fugas de aceite, lo que destruye la hipótesis de una contaminación a través de fisuras en el cierre de la lata.

Esto nos hace suponer que los datos y elementos de que disponemos son insuficientes para poder enjuiciar el origen de la contaminación.

## RESUMEN

Se han estudiado cuatro brotes de intoxicación alimenticia de origen estafilocócico. Los alimentos responsables de la intoxicación fueron conservas de jurel en aceite, en latas de idéntico formato, 4,5 kgs., del mismo fabricante, y cuyo único dato de identificación del lote de fabricación era la leyenda "Fabricación de 1963".

Se ha realizado un estudio microbiológico y toxicológico de las cuatro latas responsables de la intoxicación y de cinco de idénticas características que las primeras. Estas últimas fueron abiertas en el laboratorio.

Se aislaron estafilococos enterotóxicos de las cuatro primeras y de dos de las segundas.

Se investigó la presencia de enterotoxina, Kitten-test, directamente en las conservas, manifestándose como positivas aquéllas en las que se aisló estafilococos enterotóxicos.

La prueba de la coagulasa realizada directamente sobre macerados de conservas, se manifiesta como negativa.

Todas las cepas de estafilococos enterotóxicos aisladas presentan los caracteres de los estafilococos patógenos de origen humano. Existe una perfecta correlación entre la capacidad fibrinolítica, hemolítica, coagulasa y de resistencia a la penicilina, y la enterotóxica.

El test de SLOCUM se presenta como negativo en todas las cepas, enterotóxicas o no, estudiadas.

En la investigación de la enterotoxina, el Kitten-test se muestra más rápido y manifiesto por medio de la prueba intravenosa que por la intraperitoneal.

Se comprueba que las técnicas de esterilización usuales en la industria para este tipo de conservas, es suficiente para la destrucción del estafilococo enterotóxico.

El desarrollo del estafilococo es inhibido en una cierta proporción por el líquido de cobertura.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la contaminación de las latas se produjo después de la esterilización y antes de su apertura, faltando elementos suficientes para poder enjuiciar con certeza la forma de realizarse la contaminación.

#### RESUME

On a étudié quatre foyers d'intoxication alimentaire produite par le staphylocoque. Les aliments responsables de l'intoxication ont été des conserves de "jurel" (poisson de mer) à l'huile, dans des boîtes de forme similaire, de 4,5 kgs., du même fabricant, et dont le seul renseignement d'identification du lot de fabrication était l'écrivain: "Fabrication 1963".

On a fait une étude microbiologique et toxicologique des 4 boîtes responsables de l'intoxication et de 5 autres de caractéristiques identiques à celles des 4 premières. Les 4 premières boîtes furent ouvertes au laboratoire.

On isolera des staphylococques entérotoxiques des 4 premières boîtes et de 2 des 5 dernières.

On fit des recherches sur la présence d'entérotoxine, par le "Kitten test", directement dans les conserves, et l'on trouva positives celles où l'on avait isolé des staphylococques entérotoxiques.

L'essai de la coagulase, fait directement sur des macérations de conserves, fut négatif.

Toutes les souches de staphylococques entérotoxiques isolées présentent les caractéristiques des staphylococques pathogènes d'origine humaine. Il y a une corrélation parfaite entre le pouvoir fibrinolitique, hémolytique, présence de coagulase et de résistance à la penicilline, et le pouvoir entérotoxique.

Le test de Slocum se présente comme négatif dans toutes les souches étudiées, soit entérotoxiques soit non-entérotoxiques.

Dans les recherches de l'entérotoxine, le Kitten test se montre plus rapide et plus évident par la voie intravéneuse que par la voie péritonéale.

On prouve que les techniques de stérilisation usuelles dans l'industrie sont suffisantes pour détruire le staphylocoque entérotoxique.

Le développement du staphylocoque est inhibé dans une certaine mesure par le liquide qui sert de couverture.

On peut conclure, d'après les résultats obtenus, que la contamination des boîtes s'est produite après la stérilisation et avant de les ouvrir; nous n'avons pas assez de preuves pour pouvoir juger avec une assurance complète la manière dans laquelle la contamination s'est produite.

#### SUMMARY

We have studied four nidus of nutritive intoxication from staphylococcal origin. The food responsible of the intoxication was "jurel" (a sea fish) canned into oil into tins of similar shape containing 4,500 grams net weight each, of the same manufacturer; the only information to identify the manufacturing lot was the motto "Manufactured in 1963".

We have carried out a microbiological and toxicological study on the 4 tins responsible of the intoxication and on 5 other tins of same characteristics as those of the first 4 ones. The tins of the second group were opened at the laboratory.

Enterotoxic staphylococcus from the four tins and from two of the second group were isolated.

We have researched directly in the canned food by the Kitten test the occurrence of enterotoxin and those from which the enterotoxic staphylococcus had been isolated were positive.

The coagulase test carried out directly on macerations or steepings of canned food was negative.

All the strains of enterotoxic staphylococcus isolated have the same characteristics of pathogenic staphylococcus of human origin. There exists a complete correlation between the fibrinolitical capacity, the hemolytical capacity, the presence of coagulase and the resistance to the Penicillin, and the enterotoxic capacity.

The Slocum test is negative in all the strains, either enterotoxic or not enterotoxic, we have studied.

In the research of enterotoxin, the Kitten test is more rapid and more evident through the intravenous route than through the intraperitoneal one.

We have observed that the sterilization techniques usually used in the industry of this type of canned food are sufficient to destroy the enterotoxic staphylococcus.

The development of staphylococcus is inhibited in a certain rate by the liquid which covers same.

According to the results obtained, we may conclude that the contamination of the tins took place after sterilization and before they were opened. We have not sufficient information to be able to pass a right judgement on the way in which the contamination takes place.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ARTIOLI, D., (1951).—La Nuova Vet., 5, 153.
2. BERARDUCCI, C., y PALAZZETTI, G., (1949).—Riv. Med. Vet. e Zoot., 1, 452.
3. ———. (1950).—Zooprofilassi, 5, 291.
4. BURDIN, J. C., LAVERGNE, E., y BEUREY, J., (1955).—Laboratorio, 10, 425.
5. BUTTIAUX, R., y BROUGNIART, R., (1948).—Rev. Sanidad Vet., 4, 384.
6. CARTER, C. H., (1960).—J. Bacteriol., 79, 753.
7. CHAPMAN, G. B., LIEB, C. W., y CURCIO, L. G., (1937).—Food Res., 2, 349.
8. ———. (1944).—Food Res., 9, 377.
9. ———. (1945).—J. Bact., 50, 201.
10. ———, y DOMINGO, E., (1946).—J. Bact., 51, 405.
11. ———. (1946).—J. Bact., 51, 409.
12. ———. (1948).—Food Res., 13, 100.
13. CLARK, W. S., MOORE, T. D., y NELSON, F. E., (1961).—App. Microbiology, 9, 195.
14. CORDONE, P., GÜLLOTTI, y SPANO, C., (1963).—Laboratorio, 35, 515.
15. DACK, G. M., (1949).—Food Poisoning: The University of Chicago.
16. DOLMAN, L. E., (1934).—J. Infection Diseases, 55, 172.
17. DOLMAN, C. E., WILSON, R. J., y COCKROFT, W. H., (1936).—Can. Pub. Health J., 27, 489.
18. ———, y ———. (1940).—Can. Pub. Health J., 31, 68.
19. EATON, M. D., (1938).—Bact. Review, 2, 1.
20. EVANS, J. B., BUETTNER, L. G., y NIVEN, C. F., (1950).—J. Bact., 60, 481.

21. FEIG, M., (1950).—Am. J. of. Publ. Health, 40, 1.372.
22. GRACIA, G., 1962.—Rev. Sanidad e Hig. Públ., 36, 469.
23. GREENBERG, R. A., y SILLIKER, J. H., (1962).—Jour. of Food Science, 27, 60.
24. GALTON, M. M., NAHMIAS, A. J., SULZER, C. R., DELLI QUADRI, C. A., SMITH, P. B., y UPDYKE, E. L., (1963).—XVII Conf. Int. Vet. Hannover, 2, 983.
25. GUIJO, F., (1959).—A. Asoc. Vet. Hig. Brom., 7, 125.
26. HOPKINS, E. W., y POLAND, E. F., (1942).—Food Res., 7, 414.
27. HUSSEMAN, O. I., y TAWNER, E. W., (1949).—Food Res., 14, 91.
28. JENSEN, L. B., (1954).—Microbiology of Meats, Barrard Press, Champaign, III.
29. KASAROV, L. B., y BAJLJOZOW, D., (1963).—XVII Conf. Int. Vet., 2, 839, Hannover.
30. LJUNGQUIST, A., (1963).—XVII Cong. Int. Vet., 2, 843, Hannover.
31. MATHESON, B. H., y THATCHER, F. S., (1955).—Can. J. Microbiol., 1, 372.
32. MONACI, V., (1953).—Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 32, 362.
33. NEVOT, A., (1951).—Bull. Acad. Nat. Med., 115, 324.
34. PERELLI, C., (1963).—Laboratorio, 35, 327.
35. PISU, I., (1951).—Boll. Ist. Sierot. Milanese, 30, 622.
36. RICHOU, R., (1953).—Revue Path. gen. comp., 53, 368.
37. ———, PANTALEON, J., y QUINCHON, Cl., (1959).—Annali Sacavo, 1, 647.
38. ———, ———, BILLON, J., y CAZAILLET, M., 1959.—Rev. Inmul. et Therap. Art., 23, 31.
39. ROBINSON, E. D., (1949).—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72, 265.
40. ROSATI, T., (1951).—Zooprofilassi, 6, 1.
41. ———. (1953).—Bull. Off. Intern. Epiz., 40, 265.
42. SAINZ, L., (1958).—Rev. Sanidad e Hig. Públ., 32, 139.
43. ———. (1963).—Veterinaria, 28, 539.
44. SEGALOVE, M., DAVISON, E., y DACK, G. M., (1943).—Food Res., 8, 54.
45. SHEWAN, J. M., (1949).—Jour. of the Royal Sanitary Inst., 69, 349.
46. SLOCUM, G., y LINDEN, S. A., (1939).—Amer. J. Publ. Health J., 29, 1.326.

47. STARR, M. P., (1941).—Science, 93, 333.
48. TARGON, A., y FIABANE, L., (1962).—Boll. Ist. Sieroter Milanese, 41, 193.
49. TASSI, L., IGNESTI, E., (1951).—Zooproflassi, 6, 143.
- 50.—THIENLIN, G., PANTALEON, J., y ROSSET, R., (1963).—XVII Cong. Int. Vet., 2, 885, Hannover.
51. TROLLER, J. A., FRAZIER, W. C., (1963).—Appl. Microbiology, 11, 163.
52. ———, y ———. (1963).—Appl. Microbiology, 11, 11.
53. TROPA, E., (1954).—*Toxi-infeções alimentares de origem animal*. Ministerio de Economía, Lisboa.
54. VERGE, J., GORET, P., JOUBERT, L., PARAF, A., y ASSO, J., (1960).—Rec. Med. Vet., 136, 527.
- 55.—VIRIDIS, F., (1956).—Igiene Mod., 49, 467.
56. ZEBOVITZ, E., EVANS, J. B., y NIVEN, E. F., (1955).—J. Bacteriol., 70, 686.