

**MICROFLORA ESTAFILOCOCICA
DE LECHE NATURAL**

Por Guillermo Suárez Fernández

I N D I C E

I. INTRODUCCION.—A. Definiciones.—B. Naturaleza y concepto histórico del problema.—C. Estado actual del conocimiento científico del tema.—D. Aportación española a la investigación sobre intoxicaciones por estafilococos.—E. Principales directrices actuales.—F. Propósito y objetivos de la Investigación.
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.—A. Aislamiento: medios de cultivo.—1. Acción selectiva de naturaleza osmótica. 2. Empleo de antibióticos. 3. Medios a base de telurito potásico. 4. Uso de diferentes inhibidores del crecimiento bacteriano. 5. Medios de cultivo sin agentes selectivos.—B. Fisiología, bioquímica y enzimas.—1. Pigmentación. 2. Requerimientos de oxígeno. 3. Necesidades vitamínicas. 4. Aminoácidos. 5. Catalasa. 6. Propiedades reductoras. 7. Fosfatasa. 8. Lipasa. 9. Acción sobre polialcoholes. 10. Desoxirribonucleasa. 11. Lieuación de gelatina. 12. Fibrinolisin. 13. Coagulasa.—C. Crecimiento y competición microbianas.—D. Resistencia térmica.—E. Toxinas.—1. Hemolisinas. 2. Enterotoxina. Modo de acción.—F. Bacteriofagos.—G. Antibióticos.—PARTE EXPERIMENTAL.—III. MATERIALES Y METODOS.—A. Muestras.—1. Número, origen y periodicidad. 2. Técnica de muestreo y conservación. 3. Estudio previo (pH, acidez, temperatura y contejo de colonias).—B. Aislamiento de estafilococos de leche natural.—1. Medios de cultivo utilizados comparativamente. 2. Medio de cultivo original. 3. Siembra y contejo. 4. Comportamiento de los medios utilizados frente a cultivos puros de aislamiento reciente. 5. Aislamiento, purificación y mantenimiento de los cultivos puros.—C. Caracterización fisiológica y enzimática.—1. Cromogénesis. 2. Grado de aerobiosis. 3. Producción de catalasa. 4. Reducción del telurito potásico. 5. Determinación de fosfatasa. 6. Lipólisis en yema de huevo. 7. Desoxirribonucleasa. 8. Gelatinolisis. 9. Carbohidrasas: fermentación del manitol. 10. Propiedades fibrinolíticas. 11. Producción de coagulasa.—D. Crecimiento microbiano.—E. Destrucción térmica.—F. Hemolisinas.—G. Enterotoxina.—1. Producción, concentración y purificación.

ficación parcial. 2. Inoculación en gato. 3. Ensayo en órgano aislado (intestino). 4. Acción sobre presión sanguínea. 5. Preparación de un suero antienterotóxico. 6. Precipitación en gel (gel-difusión).—II. **Tipificación por medio de bacteriófagos.**—1. Series Internacional y Seto-Wilson.—1. Antibiogramas.—J. Análisis estadístico.—IV. **RESULTADOS.**—A. **Del estudio inicial de las muestras.**—1. Muestras de andén o muelle de recepción. 2. Muestras de estable.—B. **De cultivo y aislamiento.**—1. Estudio comparativo en diferentes medios de cultivo. 2. Pruebas de inhibición de cultivos puros. 3. Índices de crecimiento de otros microorganismos no estafilococos en los medios de cultivo comparados.—C. **Del estudio enzimático y bioquímico.**—D. **De crecimiento microbiano.**—E. **De destrucción térmica.**—F. **De hemólisis.**—G. **De producción de enterotoxina.**—I. Pruebas de gel-difusión e inoculaciones en gato. 2. Estudios sobre órgano aislado. 3. Acción sobre presión sanguínea de gato.—H. **De tipificación por bacteriófagos.**—I. **De resistencia a los antibióticos.**—J. Cuadros resumen de resultados (núms. 2 al 18 incl.).—V. **DISCUSIÓN.**—A. **Muestras.**—1. Técnica de recogida. 2. Valores de pH, acidez, temperatura y número total de bacterias.—B. **Cultivo y aislamiento.**—1. Investigación comparativa. 2. Análisis de los resultados obtenidos en los distintos medios empleados. a. Manitol-Sal-Agar. b. S-110. c. S-110-Yema de huevo. d. Terlurito-glicina. e. Medio de Vogel y Johnson. f. Medio de Finegold y Sweeney. g. Medios MAF.—C. **Determinación cualitativa de enzimas y otras características fisiológicas.**—1. Pigmentación. 2. Reducción del telurito potásico. 3. Producción de fosfatasa. 4. Opacidad en medios con yema de huevo. 5. Producción de desoxirribonucleasa. 6. Liquefacción de gelatina. 7. Fermentación del manitol. 8. Fibrinolisis. 9. Producción de coagulasa.—D. **Crecimiento microbiano.**—E. **Destrucción por el calor.**—F. **Hemolisis.**—G. **Enterotoxina.**—1. Tipo de enterotoxina investigado. 2. Inoculación en gato. 3. Precipitación en gel. 4. Órgano aislado (intestino de cobayo). 5. Presión sanguínea de gato.—H. **Tipificación por series de bacteriófagos.**—I. **Resistencia a los antibióticos.**—VI. **CONCLUSIONES.**—VII. **RESUMEN.**—VIII. **BIBLIOGRAFIA.**—IX. **ILUSTRACIONES.**—X. **APENDICE.**—A. Tablas.—B. Diagramas.

I. — INTRODUCCION

A. Definiciones.

1. Denominamos microflora estafilocócica al conjunto de bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* (ROSENBACH, 1884) y aceptamos la descripción que del mismo hacen BREED *et al.* en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1957).

2.º Entendemos por leche natural la leche fresca de vaca de acuerdo con el Decreto de 18 de abril de 1952 (B. O. E. de 27 de mayo de 1952).

3.º En la orientación y desarrollo de este estudio sobre flora microbiana de la leche, hemos tenido presente:

a) Que la leche natural es un producto que contiene con frecuencia estafilococos patógenos.

b) Que constituye un excelente medio de cultivo para los estafilococos y en ciertas condiciones ideal para la producción de toxinas por parte de estos microorganismos.

c) Que es un alimento de consumo cada día más generalizado y los trastornos que puede producir en el consumidor como tal alimento portador de estafilococos son, preferentemente, de carácter tóxico-alimentario.

B. Naturaleza y concepto histórico del problema.

El papel que a los estafilococos corresponde como agentes de infección, así como el estudio de las enfermedades que estos organismos producen en el hombre y animales, han quedado bien plasmados en las obras de SMITH (1958) y ELEK (1959) y WORMS (1960).

Las afecciones más frecuentes desde el punto de vista infeccioso son: forúnculos, abcesos, impétigo, acné, pielitis, cistitis y mastitis. Como realmente graves se citan las septicemias, endocarditis, sepsis puerperal, neumonías y osteomielitis.

Sin olvidar las enteritis estafilocócicas, que pueden presentarse y desarrollarse con gran rapidez, después de una prolongada terapia antibiótica por vía oral, en caso de aparecer cepas resistentes.

Como es sabido, independientemente de su capacidad infectante y tóxica "in vivo", los estafilococos pueden producir toxinas "in vitro", algunas de las cuales cuando son ingeridas por el hombre determinan en éste una intoxicación caracterizada por síntomas de gastro-enteritis aguda (salivación, náuseas, vómitos, calambres abdominales de variable intensidad y diarrea).

Según DACK (1962a) esta enfermedad fue primeramente descrita por DENYS (1894) en Bélgica, por OWEN (1907) en USA, por BARBER (1914) en Filipinas y finalmente fue descubierta de nuevo por DACK *et al.* (1930) en Estados Unidos. La intoxicación se debió, en este caso, al consumo de pasteles rellenos de crema.

Cuatro monos y algunos ratones inoculados por vía oral con una suspensión salina del material recogido no mostraron signo alguno de intoxicación, pero el aislamiento de colonias bacterianas a partir del producto sospechoso y estudio subsiguiente de los tipos predominantes, dio mejores resultados.

Un filtrado de caldo de cultivo incubado durante cuarenta horas y previamente sembrado con una de estas cepas, fue capaz de producir, en un conejo inoculado intravenosamente con dosis de 4 cc., una profusa diarrea.

Cuando tres personas bebieron voluntariamente 25, 10 y 5 cc. del filtrado letal para el conejo, se apreciaron síntomas típicos, a partir de las tres horas, en el voluntario que había ingerido la mayor dosis. En los otros las sensaciones de náuseas, escalofríos y desórdenes gastrointestinales fueron moderados.

El filtrado tóxico había sido preparado a partir de un estafilococo dorado y hemolítico.

A partir de este estudio, conocida y divulgada la causa de este tipo de intoxicaciones, éstas comienzan a diagnosticarse con gran frecuencia en todos los continentes y el problema entra en una fase científica (DACK, 1962a).

TANNER y TANNER (1953), DEWERRY (1959) y DACK (1962a) han revisado el tema ampliamente. Estos autores destacan el papel de la leche como vehículo de estafilococos y origen de intoxicaciones.

A la leche los estafilococos pueden llegar del ambiente o proceder de la misma ubre, incluso de vacas sanas.

Seún WILSON y MILES (1955) el "habitat" natural para los estafilococos sería el organismo animal.

DAVIDSON (1961) concluye un minucioso estudio señalando a la ubre misma como la fuente más importante de estafilococos en el ganado vacuno, estableciendo que éstos son capaces de multiplicarse tanto en el interior como en el exterior de la glándula.

Las vías respiratorias y las manos, especialmente de individuos convalecientes de catarros o con diversas lesiones (forúnculos, heridas infectadas, etc.), son factores muy importantes en la contaminación y difusión de estos microorganismos (WILSON y MILES, 1955).

En ocasiones, sin embargo, estafilococos aislados de alimentos inculpados de originar intoxicaciones han demostrado idénticas reacciones ante series de fagos a aquellos aislados de individuos aparentemente sanos y que habían intervenido en su manipulación (TANNER y TANNER, 1953; DACK, 1962a).

La leche, aún obtenida asepticamente y de vacas sanas, puede contener estafilococos.

MILLER (1943) señalaba, sobre la base de un amplio examen, que el 33,3 por 100 de las vacas examinadas contenían estafilococos "aureus" en la secreción láctea.

HAUGE (1951) encontró estafilococos en el 45 por 100 de las muestras de leche de los distintos establos que abastecían Oslo, con un 60 por 100 de estafilococos coagulasa positivos.

SCHALM y LASMANIS (1957) utilizando el test de Whiteside para una calificación previa de las muestras de establo, llegaron a los siguientes resultados:

Whiteside positivo (leche anormal): contenían estafilococos coagulasa negativos el 20 por 100 de las muestras y el 52 por 100 estafilococos coagulasa positivos.

Whiteside negativo (leche normal): estafilococos coagulasa negativos el 80 por 100 de las muestras y positivos el 48 por 100.

WALTERS (1959) estudiando muestras de leche de mezcla detectó estafilococos coagulasa positivos en un 61 por 100 de las mismas.

MURRAY (1960) trabajando sobre muestras de primera calidad (grado A) descubrió que un 58 por 100 de las muestras portaban estafilococos coagulasa positivos.

MONDINI y GASPARINI (1960) encuentran un bajo porcentaje de estafilococos patógenos (8 por 100 del total de los aislados) en la leche, si bien el número de muestras con estafilococos era del 70 por 100 aproximadamente.

TAKAGI *et al.* (1961) estudiaron 538 vacas en lactación y señalaron que un 75 por 100 de las ubres normales segregaban micrococaceas. De las muestras anormales ($\text{pH} > 6,6$) eliminaban micrococaceas el 66 por 100 y de las clínicamente anormales (ubre enferma) solamente el 55 por 100, siendo para todos los grupos el porcentaje de patógenos similar (5-8 por 100).

MUNCH-PETERSEN y GARDINER (1965) citan las siguientes cifras: 43,4 por 100 de las vacas examinadas contenían estafilococos en la secreción láctea, de las cuales a su vez el 75,3 por 100 eliminaban estafilococos hemolíticos.

La leche puede encontrar en el establo un ambiente muy propicio a la contaminación. OBIGER (1960) subraya el hecho de la abundancia de estafilococos en el medio ambiente en el que vive el ganado vacuno.

La posibilidad de contaminación por las manos o el aire expirado del ordeñador o personas que habitualmente trasiegan el producto, deben tenerse siempre presente.

Indudablemente los casos de mamitis estafilocócicas tienen una significación especial (NEWMAN, 1950) a este respecto, quizás más por el número inicial de estafilococos y por tratarse de un cultivo puro libre de otras especies microbianas que por la relación entre patogeneidad (virulencia) y capacidad enterotoxigénica.

La producción de enterotoxina requiere una variedad determinada de estafilococo, un medio adecuado de crecimiento, y unas condiciones de temperatura y tiempo que varían con la capacidad toxigénica del germen, número inicial y naturaleza de la microflora presente en el producto (DACK, 1962a).

La leche es, por su constitución física y composición química compleja, un excelente medio de cultivo microbiano; su pH desplazado ligeramente hacia la zona ácida resulta adecuado para el crecimiento inicial de los estafilococos y, estando sometida a tales riesgos de contaminación, es perfectamente lógico que se convierta con cierta frecuencia en alimento peligroso desde el punto de vista que nos ocupa.

En la historia de las intoxicaciones alimentarias por estafilococos son numerosas las incriminadas leche fresca o productos lácteos, como cremas, purés, pastas, helados o quesos fabricados a partir de leche sin pasterizar.

DOLMAN (1939) señalaba a la leche de vaca como portadora de un alto porcentaje de estafilococos capaces de producir enterotoxina.

STONE (1943) sustentaba similar criterio y en una revisión de 82 intoxicaciones por enterotoxina encontró que catorce habían sido originadas por productos lácteos y de ellas siete por leche fresca.

TANNER y TANNER (1953) relacionan y describen varias intoxicaciones de este origen, estudiadas por diferentes autores en los años treinta y cuarenta. Doce de ellas se debían al consumo de leche fresca.

Una de las primeras intoxicaciones descritas lo fue por BARBER (1914) en Filipinas, quien atribuyó la enfermedad a un estafilococo blanco aislado de la leche de una vaca y logró reproducirla en voluntarios dándoles a beber cultivos puros, en leche, del estafilococo aislado.

Este meritorio trabajo permaneció en el olvido hasta el descubrimiento de DACK *et al.* (1930) (citados por DACK, 1962a), atrayendo desde entonces el tema la importancia que merecía.

Respecto a la gravedad de esta enfermedad sigue en vigencia el juicio de DOLMAN (1939) "si bien no existen en la literatura antecedentes claros de muertes originadas por este tipo de intoxicación, el hecho de que los gatos puedan morir a consecuencia de la administración de grandes dosis de enterotoxina sugiere que esta condición pudiera ser fatal para el hombre".

Según DACK (1962a) otro factor importante a tener en cuenta sería la susceptibilidad individual, habiéndose podido comprobar, tanto en casos de intoxicación espontánea como en experiencias con voluntarios, que ésta puede variar entre grandes límites.

La literatura actual, aunque pocos, cita casos de probable fallecimiento debidos a este tipo de intoxicación.

DENYS (1894) (citado por DACK, 1962a) notificó una baja que se cree debida al consumo de carne contaminada por estafilococos.

WEED *et al.* (1943) (citados por DACK, 1962a), comunicaron la muerte de dos niños de cuatro años, intoxicados al beber 250 cc. de leche (aproximadamente) cada uno, procedente de una cabra afectada de una mastitis supurada debida a un estafilococo dorado.

DRISDALE (1950) (citado por DACK, 1962a) describe una grave intoxicación por leche hervida, con varios individuos hospitalizados gravísimos, en estado de colapso. La intoxicación se reprodujo experimentalmente en un mono y fue atribuida a los estafilococos presentes en la leche fresca, capaces de producir una toxina termoresistente.

En España en 1963 se produjo en Vallecas (Madrid) el fallecimiento de un niño debido muy probablemente a una intoxicación de este tipo.¹

La referida intoxicación fue determinada por el consumo de leche fresca y afectó a 208 personas.

El pronóstico fue de 14 graves, 31 menos graves, 124 reservado y 39 leves.

A los cuatro días de presentado el brote (27 de agosto de 1963) afallecía un niño, previamente hospitalizado, de una encefalopatía tóxica.

En la autopsia se apreciaron lesiones de gastritis y la causa de defunción se atribuyó a intoxicación por leche.

(1) Los datos técnicos necesarios para el estudio y análisis de esta erupción tóxica nos fueron facilitados por la Dirección General de Sanidad, permitiéndonos consultar el expediente incoado al efecto.

Aunque no se comprobó experimentalmente, por falta de medios, ni la presencia de una toxina termoestable, específica, en la leche, ni la aptitud para producir ésta por parte de las cepas de estafilococos presentes en dicho producto, el diagnóstico puede basarse en los siguientes puntos:

a) Evolución de la enfermedad en 208 enfermos, con una sintomatología típica, todos los cuales habían ingerido leche adquirida en el mismo establecimiento.

b) En la abundancia del número de estafilococos en la leche sospechosa que sobrepasaba las cifras admitidas como peligrosas por diferentes autores.

c) En la termorresistencia de la substancia tóxica ya que gran número de los afectados consumieron la leche hervida.

d) En la investigación negativa químico-biológica de otras substancias tóxicas.

Anteriormente al hecho citado SAIZ MORENO (1958) había atribuido el fallecimiento de dos niños en Ciudad Real al consumo de una conserva de pescado contaminada con enterotoxina.

Debido a la súbita aparición de los síntomas y su aparente gravedad, los brotes de intoxicación llaman la atención poderosamente. La prensa diaria señala con frecuencia la aparición de estas explosiones tóxicas que a veces afectan a cientos de personas.

Desafortunadamente no son muchos los casos en que se realizan estudios biológicos adecuados, ya que los pacientes, en general, se recuperan con rapidez.

Esto explica también, en parte, que las estadísticas sean incompletas y no revelen la situación real.

No obstante, los boletines de los Servicios de Sanidad de USA e Inglaterra indican un aumento anual del número de casos comunicados. En opinión de DACK (1962a) esto puede deberse más al creciente interés que los médicos muestran por el problema que a un aumento real del número de intoxicaciones.

Respecto a la leche fresca SMITH (1956) menciona diez y seis casos de intoxicación en Inglaterra, de los años 50 al 54, atribuidos a este alimento y posteriormente el Monthly Bulletin Ministry Health Laboratory Service (1962) cita siete accidentes, debidos a la misma causa, durante el año 1961.

En USA durante los últimos años han sido más frecuentes, en cambio, las intoxicaciones debidas al consumo de productos sin pasteurizar, especialmente quesos, Cheddar (HENDRICKS *et al.*, 1959) y Colby (ALLEN y STOVALL, 1960).

En Rusia KRASNITSKAYA (1960) manifestó que aproximadamente el 20-30 por 100 de las intoxicaciones alimentarias en aquel país se deben a estafilococos y en 1958 el 46 por 100 de los casos de intoxicación tuvieron su origen en productos lácteos. Describe también algunos casos típicos de intoxicación.

En relación con la leche y sus derivados y durante las últimas décadas se han descrito y estudiado diversos focos de intoxicación por estafilococos:

GRISWOLD (1950), NEWMAN (1950), HAUGE (1952), WARING (1952), STEEDE (1954), CIOFI (1954), ANDERSON y STONE (1955), ARMIJO *et al.* (1957), SAHA (1957), HUSLER *et al.* (1960), SAIZ MORENO (1958 y 1963).

En resumen: Las intoxicaciones alimenticias de origen estafilocócico constituyen, con toda probabilidad, el tipo más frecuente de esta clase de envenenamientos (DACK, 1962a) y un importante problema de salud pública.

La leche fresca ha sido considerada siempre como probable origen de estafilococos (MILLER, 1943) y desde antiguo se puso de manifiesto la capacidad enterotoxigénica de muchas de las cepas aisladas de este producto (DOLMAN, 1939; STONE, 1943), siendo una de las primeras intoxicaciones descritas (BARBER, 1914) producida, con toda seguridad por el consumo de este alimento.

Ultimamente la literatura científica mundial ha acumulado nueva evidencia sobre estos términos, por medio de un minucioso estudio de algunos de los focos de intoxicación presentados y de una investigación metódica sobre el tema.

C. Estado actual del conocimiento científico del tema.

Consideramos como hitos fundamentales en relación con el desarrollo de este conocimiento, los siguientes:

a) El uso del mono (*Macacus rhesus*) por DACK *et al.* (citados por DACK, 1962a) y del gato (DOLMAN y WILSON, 1940) como animales sensibles a la acción de la toxina.

b) La demostración por DOLMAN (1944) del carácter antigénico de la enterotoxina, hecho probado más tarde por SURGALLA *et al.* (1953) y CASMAN (1958, 1959).

c) La utilización por CHAPMAN (1946) de medios selectivos hipertónicos para el aislamiento de estafilococos.

d) Los trabajos de EVANS y NIVEN (1950) sobre clasificación y propiedades de estafilococos enterotóxicos incluyéndolos en un grupo homogéneo, dentro de los coagulasa positivos.

e) La aplicación de series de bacteriófagos a la identificación y caracterización de los estafilococos, sucesivamente por FISK (1942), WILLIAMS y RIPPON (1952) y BLAIR y CARR (1953).

f) La evidencia presentada por SURGALLA *et al.* (1953) de más de un tipo inmunológico de enterotoxina, confirmado más tarde por THATCHER y MATHESON (1955), BERGDOLL, *et al.* (1959) y CASMAN (1960).

g) La obtención de un suero específico frente a la enterotoxina tipo "F", utilizando técnicas de adsorción, por CASMAN (1958, 1960).

h) La demostración realizada por CASMAN (1958, 1960) poniendo de manifiesto por técnicas de gel-difusión la existencia de dos tipos de enterotoxina "F" y "E" distintas antigenicamente, y de las cuales solo la "F" parecía asociada a los casos de intoxicación.

i) Al mismo tiempo, BERGDOLL, *et al.* (1959) identificaban un anticuerpo específico con la propiedad de neutralizar únicamente la enterotoxina homóloga.

En este experimento utilizaron la enterotoxina *S-6* purificada y la *S-196E* parcialmente pura.

j) La unificación de la nomenclatura de enterotoxinas por CASMAN *et al.* (1963) designándoles A y B en lugar de F y E así como a las cepas prototípicas de cada una que son la *196E* (ATCC 13565) para la "A" y la 243 (ATCC 14458) para la "B".

Según estas normas la toxina "Tadmore" estudiada por THATCHER y ROBINSON (1962) y considerada por ellos como una toxina diferente a los otros tipos, deberá denominarse C, en caso de ser confirmada como entidad tóxica independiente.

D. Aportación española a la investigación sobre intoxicaciones por estafilococos.

Aunque meritoria, es escasa y un poco fuera de su época. Como aportaciones de mayor valor señalamos los trabajos de SAIZ MORENO (1958, 1963) y REJAS y OVEJERO (1962).

No conocemos publicaciones referentes a leche fresca natural.

SAIZ MORENO (1958) realizó una serie de investigaciones epidemiológicas y de laboratorio a partir de algunos brotes de intoxicación por queso de cabra fresco y conservas de pescado enlatadas y posteriormente (1963) da cuenta de haber estudiado nuevos focos en carne y tartas.

REJAS y OVEJERO (1962) estudiaron brotes de intoxicación alimenticia de este origen a partir de conservas de jurel en aceite enlatado.

E. Principales directrices actuales.

Las investigaciones actuales, en este campo, siguen las siguientes líneas:

- a) Perfeccionamiento de los medios selectivos de aislamiento, observándose gran inquietud en torno a este punto.
- b) Estudios bioquímicos, enzimáticos y de purificación de enzimas y toxinas.
- c) Mejoramiento de técnicas de diagnóstico serológicas "in vitro" mediante el uso de la inmunodifusión y de la hemoaglutinación.
- d) Desarrollo de mejores medios para la producción de enterotoxina.
- e) Extracción de la enterotoxina a partir de alimentos sospechosos, mediante el empleo de columnas de adsorción con posterior elución y concentración hasta un límite que permita la realización de reacciones serológicas.
- f) Estudios de purificación de los tipos A y C de toxina.
- g) Aplicación de anticuerpos fluorescentes como reactivos de tinción específicos.
- h) Aislamiento de nuevos fagos a partir de estafilococos enterotóxicos, procedentes de casos de intoxicación alimenticia.
- i) Resistencia de los estafilococos a diferentes agentes biológicos, físicos y químicos.

j) Estudio de mutantes, fenómenos de inducción (por antibióticos principalmente) y transducción (por fagos).

k) Influencia en el crecimiento de aminoácidos y otras substancias.

m) Fenómenos de antagonismo o inhibición del crecimiento de estafilococos en medios de flora variada.

n) Nuevos métodos de clasificación basados en el análisis del principal componente.

F. Propósito y objetivos de la investigación.

El propósito de realizar este estudio ha sido determinado por los siguientes factores:

a) Peligros que para la salud humana puede significar el consumo de leche fresca si ésta es portadora de estafilococos patógenos.

b) La legislación española (Decreto de 18 de abril de 1952 y Reglamento de 31 de julio de 1952 para su aplicación) (B. O. E. de 27 de mayo y de 14 de agosto, 1952) disponiendo la creación de Centrales lecheras en núcleos de población con censo superior a 25.000 habitantes, se ha visto incumplida y, siendo todavía pocas las ciudades que disponen de dichos Centros de higienización, no se ha previsto plan alguno futuro para tratar de resolver el problema en los núcleos de población inferiores al número citado.

c) La mencionada legislación admite la venta al público de leche certificada cruda, en circunstancias de garantía especiales, pero que en ningún modo pueden evitar la presencia de gérmenes saprofitos o patógenos en la leche.

d) La resistencia de la toxina estafilocócica a temperaturas de pasterización. Sin embargo, la pasterización, al destruir la flora patógena disminuye el riesgo de intoxicación al mínimo, ya que los estafilococos necesitan ciertas condiciones de temperatura y tiempo para producir la toxina y la pasterización corta esta posibilidad casi en su origen.

e) La ausencia absoluta, en nuestro país, de estudios experimentales que nos permitan conocer la exacta dimensión del problema por lo que a la leche se refiere.

f) Los casos graves de intoxicación por leche fresca y productos lácteos registrados en nuestro país durante los últimos años.

Los objetivos que pretendemos cubrir son:

a) Realizar una valoración del peligro real que para la salud humana supone la presencia de estafilococos en la leche fresca, así como analizar los problemas que esto puede significar para la industria, y para ello:

1) Verificar las condiciones de origen, acidez, temperatura y época del año en relación con el desarrollo de la flora mixta y de los propios estafilococos, así como su grado de resistencia térmica.

2) Caracterizar desde los puntos de vista bioquímico y fisiológico los estafilococos aislados de las diferentes muestras.

3) Determinar la antibiorresistencia y el espectro de lisis frente a series de bacteriófagos, con el fin de establecer tanto la magnitud del primer problema como la eficacia de las series internacionales de fagos y los cuadros de lisis característicos de los estafilococos aislados.

4) Comprobar la propiedad de producir toxinas y muy especialmente enteroxina, por parte de los estafilococos coagulasa positivos aislados.

b) Estudiar simultáneamente varios medios de cultivo selectivos, con el doble fin de asegurar un aislamiento lo más correcto posible y disponer al mismo tiempo de la oportunidad de valorar comparativamente las cualidades de cada medio frente a la flora láctica.

c) Disponer de suficiente número de gérmenes de reciente aislamiento y origen lácteo estudiados en sus características y correctamente clasificados que permitieran el estudio e investigación de aquellos puntos de un interés especial o que en el pasado han sido estudiados utilizando microorganismos de colecciones internacionales, muchos de ellos sometidos a centenares de resiembras.

II.—REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

A. AISLAMIENTO: MEDIOS DE CULTIVO

El empleo de medios selectivos, cultivo en superficie y aislamiento de colonias, constituye la técnica más general, en este caso, a utilizar con poblaciones bacterianas mixtas.

1. Acción selectiva de naturaleza osmótica.

KOCH (1942) utilizó un medio salino, a base de 7,5 por ciento de cloruro sódico, en el aislamiento selectivo de estafilococos. Este tra-

bajo fue confirmado por CHAPMAN (1945) quien encontró los medios hipersalinos superiores a los utilizados anteriormente en este tipo de aislamientos.

A partir de los estudios de CHAPMAN (1945, 1946) el uso de los medios hipertónicos se generalizó rápidamente.

MAITLAND y MARTIN (1948), COLBECK *et al.* (1956), COLBECK y SUTHERLAND (1957), CARTER (1960), HERMAN y MORELLI (1960), RAJ y LISTON (1961), GALTON *et al.* (1963), han descrito nuevos medios a base de cloruro sódico como agente selectivo, en tanto otra serie de autores: HEINEMANN (1957), GEORGE *et al.* (1959), MASUROVSKY y JORDAN (1960), FOLTZ *et al.* (1960), WALKER *et al.* (1961), MICKELSEN *et al.* (1961), BUSTA y JEZESKI (1963), ANGELOTTI (1963), etc., continuaban usando los medios salinos (S-110) de CHAPMAN en sus investigaciones.

2. Empleo de antibióticos.

GREER y MENARD (1958) describen un medio con neomicina como agente inhibidor (citado por DIFCO SUPPLEMENTARY LITERATURE, code 0620). KLASTRUP (1958) y más tarde FINEGOLD y SWEENEY (1961) utilizan la polimixina B con excelentes resultados.

Sin embargo, los obtenidos por BAIRD-PARKER (1962) y JAY (1963), con este medio, lo definen como de uso inaceptable en el control de estafilococos de los alimentos.

Muy recientemente, DAVIS y DAVIS (1965), aplican, con gran éxito, el medio de FINEGOLD ligeramente modificado (adición de manita e indicador) al aislamiento de estafilococos a partir de las fosas nasales de portadores clínicamente normales en Nigeria.

3. Medios a base de telurito potásico.

LUDLAM (1949) fue el primero en usar este compuesto, juntamente con el cloruro de litio y un pH elevado (9.6) en el aislamiento de estafilococos.

CHAPMAN (1949) y Mc DIVITT y HUSSEMAN (1954) encontraron que el medio de LUDLAM inhibía un número significante de colonias de un cultivo coagulasa positivo.

Posteriormente ZEBOVITZ *et al.* (1955) modifican el primitivo medio de LUDLAM variando las proporciones de telurito potásico y cloruro de litio, añadiendo glicina y ajustando el pH a 7.2.

El medio anterior alcanzó rápida difusión y se consideró el más idóneo en el aislamiento de estafilococos coagulasa positivos a partir de alimentos.

No obstante, HOEPRICH *et al.* (1960), SEVEL y PLOMEET (1960), INNES (1960) y MOORE y NELSON (1960) señalan que el medio inhibe muchas cepas de estafilococos en el primer aislamiento.

A partir de este momento han surgido una serie de modificaciones tratando de corregir el defecto y de darle, al mismo tiempo, mayor especificidad.

Las fórmulas más conocidas son las de INNES (1960) y BAIRD-PARKER (1962), quienes utilizan la yema de huevo como indicador de lipolisis y atenuante de la fuerte acción selectiva del medio de ZEBOVITZ.

4. Uso de diferentes inhibidores del crecimiento bacteriano.

No ha sido frecuente la utilización de otros agentes selectivos a no ser desempeñando una función de carácter secundario en el medio de cultivo.

El uso del cristal violeta propuesto por CHAPMAN (1935) y KLASTRUP (1955), no ha tenido eco alguno. Lo mismo ha sucedido con el trifeniltetrazolio estudiado por KENNEDY y BARBARA (1952).

En cambio, el empleo de la actidiona o cicloheximida¹ (FINEGOLD y SWEENEY, 1961; WALKER *et al.*, 1961) y del ácido sórbico (RAJ y LISTON, 1961) parecen prometedores por su función inhibidora sobre mohos y levaduras principalmente, sin que, en general, resulte afectado el desarrollo microbiano.

5. Medios de cultivo sin agentes selectivos.

Algunas de las más valiosas técnicas de estudio (producción de coagulasa y fibrinolisin, de desoxirribonucleasa, de fosfatasa y hemolisinas), no pueden realizarse sobre un medio hipertónico. Si se decide utilizar estas técnicas en el primer aislamiento los medios a utilizar deberán carecer de acción selectiva.

Figuran en este grupo los medios de BARBER y KUPER (1951), WEECKMAN y CATLIN (1957), FUSILLO y WEISS (1959), ESBER y FAULKNER (1959) (citados por DIFCO SUPPLEMENTARY y LITERATURE, code 0501), DENEKE y BLOBEL (1962), etc.

¹ Esta sustancia antibiótica es elaborada únicamente por Laboratorios UPJHON (Kalamazoo, Michigan, USA).

CUADRO NUM. 1

PRINCIPALES MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL AISLAMIENTO DE ESTAFILOCOCOS

AUTOR	Año	Agentes selectivos	Indicadores	Azúcares fermentables	Funcióñ	Diagnóstico	
						Estafilococos (fern. manita).	Estafilococos (fern. manita).
CHAPMAN	1945	Cloruro sódico.	Rojo de fenol.	Manitol	Selectiva y fermentadora.	Estafilococos (fern. manita).	Estafilococos (fern. manita).
CHAPMAN	1946	Cloruro sódico.	Gelatina.	Manitol	Selectiva, fern. y licuación Est. de gelatina.	Est. (fern. manita y licuación de gelatina).	Est. (fern. manita y licuación de gelatina).
CHAPMAN	1946	Cloruro sódico.	Sulfato amónico.	—	Selectiva y líc. de gelatina.	Est. (líc. de gelatina).	Est. (líc. de gelatina).
MAITLAN y MARTIN	1948	Cloruro sódico.	—	—	Selectiva.	—	—
LUDLAM	1949	Telurito potásico y cloruro de litio.	Telurito.	—	Selectiva y red. del telurito.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
BARBER y KUPER	1951	—	fenolftalein fosfato sódico.	—	Producción de fosfatas.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
GUILLERPIE y ALDER	1952	—	yema de huevo (en medio líquido).	—	Producción de lipasa (opacidad).	Est. productores de lipasa (cong. positivos).	Est. productores de lipasa (cong. positivos).
DUTHIE y LORNEZ	1952	—	Plasma.	—	Producción de coagulasa.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
ZEOBOVITZ et al.	1955	Telurito potásico, cloruro de litio y glicina.	Telurito.	—	Selectiva y red. del telurito.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
WEEKMAN y CATLIN	1957	—	Ácido desoxirribonucleico. Yema de huevo.	—	Producción de desoxiribonucleasa (DNase).	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
COLBECK et al.	1956	Cloruro sódico.	Plasma (fibrinógeno).	—	Selectiva y opacidad de la yema.	Est. productores de lipasa.	Est. productores de lipasa.
KLEMPERER y HAUGHTON	1957	—	Sangre.	—	Producción de coagulasa y fibrinolínsa.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
KLASTRUP	1958	Polimixina B	Sangre.	—	Selectiva y hemolisís.	Est. patógenos.	Est. patógenos.
GREER y MENARD ¹	1958	Neomicina.	Púrpura de bromocresol.	—	Selectiva y hemolisís.	Est. patógenos.	Est. patógenos.
ESBER y FAULKNER ²	1959	—	Ácido desoxirribonucleico.	—	Perm. de manita y producción de coagulasa.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
FUSULLO y WEIS	1959	—	—	—	Prod. de desoxirribonucleico.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
VOGEL y JOHNSON	1960	Telurito y glicina.	Rojo de fenol y telurito.	Manitol	Selectiva, red. del telurito y fern. del manitol.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
SEVEL y PLOMMET	1960	Telurito y glicina.	Telurito, hematós de oveja y factor CAMP.	—	Selectiva, red. del telurito y hemolisís I.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
INNES	1960	Telurito y glicina.	Telurito y yema de huevo.	—	Selectiva, red. del telurito y transparencia.	Est. coag. positivos y lipasa positivos.	Est. coag. positivos y lipasa positivos.
CARTER	1960	Cloruro de sodio.	Yema de huevo.	Manitol	Selectiva, opacidad y caract. del S-110.	Est. lipasa positivos y pigmento.	Est. lipasa positivos y pigmento.
HERMAN y MORELLI	1960	Cloruro sódico y sorbitol.	Yema de huevo.	Manitol	Selectiva y fermentación Est. con. anaeróbica del manitol.	Est. lipasa positivos y pigmento.	Est. lipasa positivos y pigmento.
RAJ y LISTON	1961	Cloruro sódico y sorbitol.	Crema i en t o en medio líquido.	—	Transparencia en medio opaco.	Est. lipasa positivos y pigmento.	Est. lipasa positivos y pigmento.
HOPTON	1961	—	Yema de huevo.	—	—	—	—
FINEGOLD y SWEENEY	1961	Polimixina y actidonia.	—	—	Selectiva. Morfología y colonización únicamente.	Est. patógenos.	Est. patógenos.
BAIRD-PARKER	1962	Telurito y glicina (con piruvato sódico).	Telurito potásico y yema de huevo.	—	Selectiva, red. del telurito y transparencia.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
DENEKE y BILOBEL	1962	—	Fibrinógeno y plasma de conejo en superficie de un medio sólido.	—	Prod. de «halos» característicos.	Est. coagulasa positivos.	Est. coagulasa positivos.
GALTON et al.	1963	Cloruro de sodio.	Yema de huevo.	Manitol	Prod. de opacidad en yema de huevo.	Est. lipolíticos.	Est. lipolíticos.
DAVIS y DAVIS	1965	Polimixina.	Púrpura de bromocresol.	—	Selectiva y fern. del manitol.	Est. patógenos.	Est. patógenos.
Mc DIVITT y JEROME	1965	Polimixina.	Fibrinógeno.	—	Prod. de coagulasa.	—	—

^{1, 2} Citados por Difco Supplementary Literature.

B. FISIOLOGIA, BIOQUIMICA Y ENZIMAS

1. *Pigmentación.*

En la última década ha sido unánime el criterio de considerar la cromogénesis como un carácter de escaso valor en la clasificación de los estafilococos.

Este punto de vista es el que sigue el BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1957), prescindiendo del color de las colonias para definir la especie *Staphylococcus aureus*, atendiendo únicamente a la producción de coagulasa y fermentación del manitol.

Posteriormente WILLIS y TURNER (1962) y SOMPOLINSKY (1962) destacan de nuevo el valor taxonómico de esta propiedad cuando se aplica a cepas recientemente aisladas.

Los medios recomendados son a base de leche-agar (medio clásico de CHRISTIE y KEOCHI, 1940), medios salinos (CHAPMAN, 1945, 1946) o bien con otros compuestos estimulantes de la cromogénesis como el monoacetato de glicerina (WILLIS y TURNER, *loc. cit.*) o el calcio-caseína (RITTMAYER, 1964).

La aplicación de las técnicas de espectrofotometría a la caracterización de pigmentos de estafilococos es de uso novísimo (SANDVIK y BROWN, 1965).

2. *Requerimientos de oxígeno.*

La utilización del oxígeno en un medio complejo conteniendo glucosa es una cualidad que permite una clara distinción entre los micrococos (aerobios obligados) y estafilococos (anaerobios facultativos).

EVANS *et al.* (1955), BREED (1956), HILL (1959) y MOSEL (1962) han dado la consideración de fundamental a este carácter para la clasificación de la familia Micrococcaceae.

3. *Necesidades vitamínicas.*

KNIGT (1937) demostró que varias cepas de *Staphylococcus aureus* requerían tiamina y ácido nicotínico para su crecimiento.

GRETLER *et al.* (1956) confirmaron estos resultados y encuentran que la biotina estimula moderadamente el crecimiento de los estafilococos coagulasa positivos mientras que para los coagulasa negativos era imprescindible esta vitamina para su desarrollo.

4. *Aminoácidos.*

CASTELLANI (1953) (citado por DACK, 1962a), considera el ácido tioglicólico, DL-serina, L-cisteína y glicina, como agentes bacteriostáticos para los estafilococos.

MEDILL-BROWN y BRYSON (1964) estudian la acción de varios aminoácidos en medio sintético entre los que se incluyen glicina, serina y cisteína y deducen que el medio soporta bien el crecimiento de estafilococos coagulasa positivos. Sin embargo, incrementando la cisteína el crecimiento no se lograba.

5. *Catalasa.*

EVANS *et al.* (1950) señalan la posibilidad de confundir ciertos estreptococos (enterococos) con estafilococos coagulasa positivos. Algunos enterococos son gérmenes halotolerantes, hemolíticos, pueden hidrolizar la gelatina, su cuadro fermentativo es muy similar al de los estafilococos y coagulan el plasma sanguíneo aunque más tardíamente.

Sin embargo, la capacidad de los estafilococos para producir catalasa es suficiente para poder diferenciar rápidamente a estos microorganismos.

6. *Propiedades reductoras.*

Todos los estafilococos reducen los nitratos a nitritos (BERGEY'S MANUAL, 1957), pero esta reducción no se continúa en el caso de la especie *Staphylococcus epidermidis* (JONES *et al.*, 1963), no produciendo amoníaco ni óxido nítrico.

La reducción del telurito potásico se ha considerado importante por su correlación con la producción de estafilocoagulasa.

Los medios de LUBLAN (*loc. cit.*) y de ZEBOVITZ *et al.* (*loc. cit.*) llevan este indicador, así como varios de los medios descritos (Cuadro número 1). No obstante, JAY (1961), JEFFRIES (1961) y MOSEL (1963) encuentran que esta correlación no es significativa.

La propiedad de reducir el trifeniltetrazolio propuesto por KENNEDY y BARBARA (*loc. cit.*) no resulta tampoco de gran valor (JEFFRIES, 1961).

7. Fosfatasa.

La investigación de este enzima ha sido considerada particularmente importante por BARBER y KUPER (*loc. cit.*) para la detección de estafilococos patógenos.

Otros autores comparten este criterio afianzado por el hecho de que, en contacto con los antibióticos, los estafilococos pueden perder la propiedad de coagular el plasma, mientras que la fosfatasa persiste por más tiempo (BUTTIAUX, 1962).

Los indicadores más empleados en esta técnica son el ácido fenolftalein difosfórico, el fenolftalein fosfato sódico (BARBER y KUPER, *loc. cit.*) el nitrofenilfosfato disódico (BUTTIAUX, 1962) y el fosfato de fenolftaleína-colamina (ZENNER, 1961), (citado por RITTMAYER, 1964).

8. Lipasa.

GUILLESPIE y ALDER (*loc. cit.*) y ALDER *et al.* (1953) demostraron que los estafilococos producían turbidez en filtrados de yema de huevo. Esta turbidez era distinta a la producida por la lecitinasa de las especies del género *Clostridium* descrita por MC FARLANE *et al.* (1941).

SHAH y WILSON (1963) prueban que el factor mencionado es una lipasa. RENSHAW y SAN CLEMENTE (1964) purifican dicho enzima y últimamente SHAH y WILSON (1965) han realizado un completo estudio del mismo.

COLBECK *et al.* (*loc. cit.*) confirman los trabajos de GUILLESPIE y ALDER (*loc. cit.*) y, utilizando un medio sólido salino con yema de huevo, señalan que la mayoría de los estafilococos coagulasa positivos producen opacidad alrededor de las colonias.

GRABER *et al.* (1958) usando un medio similar no pudieron demostrar una correlación definida entre ambas propiedades.

CARTER (*loc. cit.*) y HERMAN y MORELLI (*loc. cit.*) sostienen, sin embargo, la opinión de COLBECK *et al.* (*loc. cit.*), mientras que WILLIS y TURNER (*loc. cit.*) concluyen que la actividad lipolítica de los estafilococos sobre medios de agar y yema de huevo no constituye un sistema adecuado para distinguir estafilococos coagulasa positivos de los coagulasa negativos.

SHAH *et al.* (1963) descubren que un alto porcentaje de cultivos procedentes de procesos infecciosos agudos eran lipasa positivos para

la yema de huevo mientras que los aislados de flora normal daban porcentajes inferiores.

Otros autores han utilizado diferentes glicéridos como substrato obteniendo resultados similares (CLARK *et al.*, 1961; WILLIS y TURNER, *loc. cit.*)

9. Acción sobre polialcoholes.

El carbohidrato más importante en el estudio bioquímico del género *Staphylococcus* es el manitol.

EVANS (1947, 1948) y EVANS y NIVEN (*loc. cit.*) demuestran que la fermentación aerobia del manitol (producción de ácido) era de muy escaso valor en la clasificación del género (fermentación positiva del 100 por 100 en los estafilococos coagulasa positivos estudiados y del 81 por 100 en los coagulasa negativos).

La fermentación del polialcohol en anaerobiosis fue más expresa siendo el 100 por 100 de los estafilococos coagulasa positivos fermentadores del manitol y solamente el 5 por 100 de los coagulasa negativos.

Basado en estos estudios el BERGEY'S MANUAL (1957) considera la correlación entre las propiedades de producción de coagulasa y fermentación del manitol como perfecta.

SHAW *et al.* (1951), THATCHER y SIMON (1957) y COWAN y STEEL (1964) no han podido confirmar los anteriores resultados.

MOSSEL (1962) en un estudio sobre 580 cepas de diverso origen (390 coagulasa positivas) ha corroborado las investigaciones de EVANS y NIVEN (*loc. cit.*).

La fermentación anaeróbica de la glucosa permite distinguir los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* ya que las especies del primero la oxidan únicamente, en tanto las del segundo la fermentan.

La producción de acetoina a partir de este azúcar es del 100 por 100 para los coagulasa positivos y del 47 por 100 para los negativos.

La lactosa es fermentada fácilmente por los estafilococos coagulasa positivos pero únicamente por 65 por 100 de los negativos (EVANS *et al.*, 1955).

El resto de los carbohidratos tiene un menor interés taxonómico.

10. *Desoxirribonucleasa.*

WEECKMAN y CATLIN (*loc. cit.*) ponen de manifiesto una estrecha correlación entre la producción de este enzima y la estafilocoagulasa.

JEFFRIES *et al.* (1957) incorporan DNA a un medio de agar para estudiar la producción de desoxirribonucleasa por bacterias y mohos. Las bacterias productoras de la diastasa despolimerizan el DNA, lo que se revela inundando las placas con una solución de CLH N, al quedar zonas transparentes circundando las colonias sobre un fondo opaco.

DI SALVO (1958) obtuvo también una excelente concordancia entre la producción de coagulasa y la referida actividad enzimática.

FUSILLO y WEISS (*loc. cit.*) estudian las necesidades de calcio de los estafilococos para la producción de desoxirribonucleasa y consideran a éste innecesario cuando se use un medio nutritivo completo.

JEFFRIES (*loc. cit.*) encuentra una correcta armonía entre los dos enzimas, si bien no tan perfecta como DI SALVO (*loc. cit.*) y JAY (1962) señala el 92 por 100 de los estafilococos coagulasa positivos por él estudiados como productores de DNasa.

11. *Licuación de gelatina.*

Esta prueba ha sido una de las primeras utilizadas ampliamente en el estudio de este tipo de gérmenes. Ha caído en desuso paulatinamente.

STONE (1935) (citado por TANNER y TANNER, 1953) descubrió un medio de cultivo para clasificar los estafilococos enterotóxicos, basado en su capacidad para licuar la gelatina. Utilizando dicho medio CHINN (1936) (citado por DACK, 1962a) estableció que los estafilococos enterotóxicos procedentes de casos de intoxicación no podían diferenciarse por este método.

CHAPMAN *et al.* (1937) obtienen resultados de la misma significación.

EVANS y NIVEN (*loc. cit.*) logran con el procedimiento de STONE (citado por TANNER y TANNER, 1953) casi idénticos porcentajes de gelatinolisis para estafilococos enterotóxicos, no enterotóxicos, coagulasa positivos y coagulasa negativos.

MOSSEL (1962) emplea métodos más sensibles para determinar esta cualidad y concluye señalando que no constituye un criterio útil para la clasificación de los cocos coagulasa positivos.

12. *Fibrinolisisina.*

Su determinación se estima importante para distinguir las cepas de origen humano y animal (BUTTIAUX, 1957; ELEK, 1959).

Otros autores, basados en el mismo principio, utilizan la reacción de coagulasa en placa, con fibrinógeno, para aislar y diferenciar los estafilococos coagulasa positivos (DUTHIE y LORNEZ, 1952; KLEMPERER y HAUGHTON, 1957).

13. *Coagulasa.*

Descubierta por LOEB (1903) (citado por GRIFFITH y OSTRANDER, 1959) su investigación sistemática fue aplicada a la valoración de la patogeneidad de los estafilococos por CHAPMAN *et al.* (1934). Posteriormente fue estudiada por CRUICKSHAN (1937) y más modernamente por numerosos autores.

EVANS *et al.* (1950) establecen que los estafilococos enterotóxicos están comprendidos entre los coagulasa positivos.

El criterio de considerar patógenos a todos los estafilococos coagulasa positivos ha sido unánime.

CHAPMAN *et al.* (1945) señalan la pigmentación, hemolisina y producción de coagulasa como los caracteres menos estables y más afectados por fenómenos de variación, disociación y degeneración.

ELEK (*loc. cit.*) dice que la prueba de coagulasa es generalmente aceptada como la más segura en el diagnóstico de estafilococos potencialmente patógenos.

Actualmente se considera a los antibióticos como agentes inducidores de mutaciones en los estafilococos y que, al mismo tiempo, ocasionan la pérdida de esta propiedad de coagular el plasma (BUTTIAUX, 1962).

BROWN y EVANS (1963) estudian una colección de cepas antibiorresistentes, de origen clínico y no observan cambios respecto a sus necesidades nutritivas y pruebas de diagnóstico comunes.

En la práctica sigue en vigor el criterio de limitar tanto las propiedades enterotóxicas como las patógenas propiamente dichas a los estafilococos coagulasa positivos.

Las excepciones a esta creencia general son escasas.

En una amplia revisión bibliográfica del aspecto tóxico hemos encontrado dos opiniones en desacuerdo con la doctrina expuesta: THATCHER y SIMON (1957) señalan que microorganismos coagulasa negativos pueden, algunas veces, producir enterotoxina.

BIRZU *et al.* (1961) (citados por BUTTIAUX, 1962) dicen haber encontrado entre los portadores de gérmenes un alto número de estafilococos coagulasa negativos y enterotóxicos.

SAN CLEMENTE y ZOLLI (1963) han realizado estudios de purificación y caracterización de la estafilocoagulasa confirmando "in vitro" su capacidad antigenica.

En la técnica a elegir para la determinación cualitativa de coagulasa debe tenerse presente la opinión de CLAPPER y WOOD (1954) para quienes los resultados del empleo de plasma humano mezclado con agar y distribuido en placas, sembradas o incubadas por espacio de doce horas, son equivalentes al método del tubo con plasma de conejo y superiores al resto de las técnicas.

C. CRECIMIENTO Y COMPETICION MICROBIANAS

DACK (1962a) señala como factores importantes en la producción de enterotoxina en los alimentos la cepa o variedad de estafilococo, el número inicial de microorganismos de este género presentes, la competición microbiana, la composición y estado físico del alimento, la temperatura y el tiempo de incubación y, concluye "entre las cepas toxicinas de estafilococos la producción de enterotoxina es una función del crecimiento".

Aunque no se conoce el número exacto de estafilococos, por gramo de alimento, necesario para causar una intoxicación y la cifra podría variar con la clase de alimento y otras circunstancias, existen en la literatura algunos datos y opiniones orientadoras a este respecto.

ALLISON (1949) sugiere que 500.000 por gramo es el número mínimo de estafilococos coagulasa positivos que se requieren para juzgar un alimento como causa de intoxicación.

TANNER y TANNER (*loc. cit.*) mencionan números de 1.000, 600, 18 a 36, 93 y 25 a 30 millones por gramo en diversos alimentos que

fueron capaces de originar, bajo condiciones de experimentación, síntomas de intoxicación en voluntarios que ingirieron cantidades de 20 a 60 gramos.

GASTALDI (1954), por el contrario, cita la muerte de dos gatos inyectados con una crema a base de huevo, leche y azúcar, en la que se habían inoculado estafilococos enterotóxicos, sin que la carga bacteriana diera indicación de patogeneidad.

DACK (1962a) ha señalado que los alimentos incriminados de casos de intoxicación contienen cientos de millones de estafilococos por gramo.

FRAZIER (1958) indica que niveles de enterotoxina necesarios para producir envenenamiento son posibles únicamente con cifras de varios millones de estafilococos por gramo.

ELEK (*loc. cit.*) subraya que se requiere una abundante proliferación de estafilococos para convertir un alimento en peligroso desde este punto de vista. POST (1959) y POST *et al.* (1961), confirman esta opinión.

HEINEMANN (*loc. cit.*) estudia el crecimiento de estafilococos en leche fresca y calentada, estableciendo que la leche no es un buen medio para su desenvolvimiento, creciendo pobremente a 27° C y siendo dominados rápidamente por el resto de la flora láctica a temperaturas favorables para su desarrollo (44° C).

JONES *et al.* (1957) estudian el crecimiento de *S. aureus* en leche obtenida: a) de vacas con una infección natural de estafilococos; y, b) ordeñada asépticamente de vacas sanas. La leche aséptica fue sembrada con cepas de *S. aureus* seleccionadas. Se obtuvo buen crecimiento en ambas muestras a 30° y 37° C pero por bajo de 25° C el crecimiento fue extremadamente lento.

GIBSON y ABD-EL-MALEK (1957) encontraron que de todos los microorganismos presentes en la leche fresca, mantenida entre 10° y 20° C, los estafilococos mostraban el menor índice de crecimiento.

TAKAHASHI y JOHNS (1959) observaron una correlación negativa entre el número inicial de colonias en leche y la multiplicación de estafilococos.

OBERHOFER y FRAZIER (1960) creen que el efecto de competición de otras bacterias sobre el crecimiento del *Staphylococcus aureus* puede ser importante para la formación de enterotoxina en alimentos con flora variada. Comprueban asimismo que algunos gérmenes de los alimentos son inhibitorios para los estafilococos "in vitro" sobre placa de cultivo y que algunos, como el *E. coli*, que no poseen esta cualidad, podían limitar fuertemente su crecimiento como simples competidores.

TROLLER (1962) comunica que 7 de 64 especies de bacterias aisladas de alimentos inhibían el crecimiento de la cepa *S. aureus 196E*.

CLARK y NELSON (1961) señalan que incubada a 10° C durante varios días la leche adquiere sabores extraños, a causa de la actividad microbiana, antes de que la población de estafilococos sea suficientemente alta como para representar un peligro de intoxicación.

PETERSON *et al.* (1962, 1964) utilizando gamas de temperatura más amplias llegan a resultados similares en otros alimentos.

CLARK (1964) concluye que los estafilococos pueden multiplicarse con facilidad en leche pasterizada a temperaturas de crecimiento de 32° y 37° C, pero la presencia de *Streptococcus lactis* restringe en gran medida esta cualidad.

STOLMAKOVA (1954) había demostrado que en leche hervida e inoculada posteriormente con estafilococos enterotóxicos éstos producían niveles de toxina detectables sin cambio de olor o sabor en el alimento.

Son numerosos los estudios, por otra parte, que confirman los de BARBER (*loc. cit.*) demostrando que la leche fresca es un excelente substrato para el desarrollo de estafilococos y formación de enterotoxina (CLARK y NELSON, *loc. cit.*).

Esto siempre que la temperatura y período de incubación sean los adecuados a este desarrollo y exista una predominancia de la flora estafilocócica.

D. RESISTENCIA TERMICA.

Los estafilococos figuran entre las bacterias no esporuladas más resistentes al calor (TANNER y TANNER, *loc. cit.*).

SASLAW *et al.* (1940) (citados por TANNER y TANNER, *loc. cit.*) aislaron de ostras una cepa de estafilococo que mostró una resistencia de diez minutos a 95° C.

HUSSEMAN y TANNER (1947) (citado por TANNER y TANNER, *loc. cit.*) estudiaron otra que resistió 30 minutos a 55° C y fue destruida en algo menos de tres minutos a 85° C.

HEINEMANN (1957) comunica que si bien los estafilococos son frecuentes en la leche fresca, la pasterización reduce el número a menos de uno por ml. Empleando la cepa 196E y leche desnatada obtiene valores *z* (grados Farenheit necesarios para reducir diez veces el tiempo de destrucción térmica) de 9,2 y tiempos de destrucción de 30 minutos a 57° C, 24 a 60° C, 6,8 a 63° C, 1,9 a 65,6° C y 0,14 a 71° C.

Las cepas 161 C y 56 no resistieron la temperatura de 61,5° C durante diez minutos.

ANGELOTTI *et al.* (1961) trabajando con la misma cepa 196E en otros alimentos (natillas, pollo en salsa) señalan tiempos de destrucción térmica dos o tres veces más altos y un valor *z* (media) de 10,5.

KADAN *et al.* (1963) determinan que el azúcar, las grasas y el extracto seco magro de la leche, ejercen una acción protectora sobre el *S. aureus*, haciéndolo más resistente al calor.

TAKAHASHI y JOHNS (1959) manifiestan que la pasterización rápida de la leche a 65,6° C destruye los estafilococos que normalmente se hallen presentes.

GIBSON y ABD-EL-MALEK (1957) determinaron que la mayoría de las especies de estafilococos de la leche fresca son coagulasa negativas y sensibles al calor.

WALKER y HARMON (1963) señalan que las cepas de estafilococos estudiadas no son destruidas en función logarítmica del tiempo a una temperatura dada, pero se observa una declinación en la proporción de muertos a medida que el tiempo de calentamiento transcurre.

Recientemente BHATT y BENNET (1964) han estudiado el comportamiento de los estafilococos frente a temperaturas de 61,5° y 71,5° C

utilizando la leche como excipiente de una mezcla de 171 cepas de estafilococos.

De los resultados obtenidos por estos autores se deducen los valores D para las temperaturas de 61,5° C y 71,5° C (curva de destrucción proporcional), siendo éstos de 14,5 y 0,128 minutos respectivamente.

La curva de tiempos de destrucción térmica se caracterizó por un valor z de 9,45 y un valor F de 60×10^{-9} minutos.

E. TOXINAS.

WILSON y MILES (*loc. cit.*) señalan que el estudio de caracteres patógenos no constituye el criterio más adecuado para basar en él diferencias específicas en orden a una clasificación.

Sin embargo, dejando a un lado el aspecto taxonómico, la investigación de toxinas es necesaria para fijar el grado de patogenicidad de las especies del género *Staphylococcus*.

1. *Hemolisinas.*

La producción por el *Staphylococcus aureus* de dos hemolisinas, alfa y beta, es conocida desde antiguo.

La alfa, que hemoliza los globulos rojos de la oveja y conejo, y cuya producción se favorece en atmósfera de CO₂ y, la beta, que hemoliza los de oveja pero no los de conejo y es una lisina caliente-fria. También se consideraba la existencia de otro tipo (gamma) que determinaba la lisis rápida de los glóbulos rojos de gran número de animales pero no los de caballo.

WILLIAMS y HARPER (1947) demuestran la existencia de una cuarta hemolisina (delta), cuyas propiedades no eran neutralizadas por las antitoxinas alfa o beta.

ELEK y LEVI (1950) determinan que las hemolisinas gamma y delta son idénticas y apuntan la posible existencia de la hemolisina epsilon distinta a éstas.

Los patrones o cuadros hemolíticos descritos por estos autores son: alfa, alfa-beta, alfa-delta, alfa-beta-delta, beta, delta y beta-delta.

Los tres primeros mostraban predominancia en los estafilococos de origen humano y el tipo beta y sus combinaciones en los de origen animal.

JAY (1962) describe una tabla de interpretación de cuadros hemolíticos utilizando tres clases de sangre de (conejo, de oveja y humana).

OBIGER (*loc. cit.*), CLARK *et al.* (*loc. cit.*), LOKEN y HOYT (1961), RITTMAYER (*loc. cit.*), MUNCH-PETERSEN (*loc. cit.*) y ZEMELMAN y LONGUERI (1965), confirman los trabajos de ELEK y LEVI (*loc. cit.*) encontrando con más frecuencia el tipo beta y sus combinaciones en estafilococos de origen bovino, mientras que GEORGE *et al.* (1962) detectan porcentajes similares (427 alfa y 461 beta) para ambos orígenes.

Estudios de purificación y caracterización de estas toxinas han sido llevados a efecto por ROBINSON *et al.* (1958), KUMAR y LINDORFER (1962), ROBINSON y THATCHER (1963), COOPER *et al.* (1963) y RIAZUL y BALDWIN (1964).

La cualidad de inducir a estafilococos no hemolíticos, por vía de sinergismo con cepas hemolíticas, a la hemólisis, ha sido puesta de manifiesto por SMITH *et al.* (1963).

2. *Enterotoxina.*

A partir de los trabajos de DACK *et al.* (1930) (citados por DACK, 1962a) los estudios sobre esta toxina se suceden ininterrumpidamente hasta el momento actual. En la introducción hemos descrito los hitos fundamentales del desarrollo de su conocimiento, así como las directrices de estudio actuales.

Los objetivos principales no cumplidos son: el estudio de mejores métodos para la detección de la enterotoxigenidad y la demostración serológica de enterotoxina en los alimentos. Para esto último es necesario la purificación de la toxina.

El aislamiento de estafilococos de un alimento sospechoso, producción de toxina "in vitro" con cada cepa aislada, e inoculación de esta toxina a animales sensibles o su demostración por técnicas de difusión en gel, no pueden darnos la certeza absoluta de que un microorganismo determinado sea exactamente el que produjo la enterotoxina en el alimento (HALL *et al.*, 1963).

La prueba positiva, en este caso, depende de la demostración de la enterotoxina en el alimento mismo.

Por otra parte la inoculación de extractos de alimentos a animales es inespecífica (DACK, 1962a).

Otras causas de inespecificidad se atribuyen a los animales de experimentación.

HAMMON (1941) comunica haber encontrado reacciones no específicas en el gato, con toxina producida en medios de cultivo adecuados, recomendando la inoculación del gato por vía intravenosa, en lugar de peritoneal, como medio de diagnóstico más seguro.

FULTON (1943) no encontró paralelismo entre los resultados de inoculación al gato y las pruebas con voluntarios.

Según DACK (1962a) el *Macacus rhesus* es el animal más adecuado a la experimentación de este tipo de toxina. No obstante, su utilización es prohibitiva para la mayoría de los laboratorios y el gato se utiliza más ampliamente, siendo considerado como animal muy sensible aunque con variaciones de susceptibilidad individual frente a la enterotoxina (CASMAN, 1958).

La demostración de la toxina por gel-difusión a partir de la producida "in vitro" de estafilococos aislados de alimentos sospechosos requiere disponer de un suero adecuado y de una toxina de gran potencia producida en medios especiales (CASMAN, 1963; CASMAN y BENNET, 1963).

Las dudas acerca del grado de termo-resistencia de la toxina parecen haber sido resueltos recientemente por READ *et al.* (1965), empleando enterotoxina B pura y técnicas de gel-difusión, en el sentido de una parcial termoresistencia, con pérdida evidente de potencia, a temperaturas próximas a 100° C.

La naturaleza química de la enterotoxina B (S-6) es conocida (HIBNICK y BERGDOLL, 1959). Se trata de una proteína de peso molecular de 23.000, punto isoelectrónico de pH 8,5 e integrada por 17 aminoácidos, entre los que predominan la lisina, tirosina y ácido aspártico.

FRIEDMAN y WHITE (1964) demostraron, por técnicas de fluorescencia, que la enterotoxina B tiene las características de los constituyentes de la superficie celular de los estafilococos enterotóxicos.

Modo de acción.

El modo de acción de la enterotoxina no se conoce todavía perfectamente.

BAYLISS (1940) sugiere que su acción es periférica más que central afectando a las terminaciones nerviosas que inervan la musculatura lisa del intestino delgado.

BORISON y WANG (1953) (citados por DACK, 1962a) hallan que la sensibilidad del gato a la enterotoxina se reduce cuando se practica una doble vagotomía.

REED *et al.* (1942) (citados por DACK, 1962a) creen que la enterotoxina produce un espasmo en segmentos aislados de intestino de conejo.

ANDERSON (1953) (citado por DACK, 1962a) confirma estos resultados.

SURGALLA *et al.* (1952) (citados por DACK, 1962a) indican que la respuesta del intestino no es debida a la enterotoxina y ésta tampoco afecta a la reacción de los segmentos aislados a la adrenalina.

La acción farmacológica de la enterotoxina ha sido estudiada extensamente por SUGIYAMA *et al.*, 1958; SUGIYAMA, *et al.*, 1961; SUGIYAMA *et al.*, 1962 y SUGIYAMA *et al.*, 1963).

Uno de los estudios más significativos de estos autores muestra que la destrucción bilateral de cierta zona de la base del cuarto ventrículo convierte al *Macacus rhesus* en completamente refractario a las enterotoxinas A y B (DACK, 1962b).

La importancia de la especie, no obstante, es subrayada por DACK (1963) considerando los trabajos de CLARK (1962) (citados por BERGDOLL, 1963) quien no obtuvo los mismos resultados en gatos con toxina purificada.

NIVEN (1962) cree que la información acerca del modo de acción de la enterotoxina deja mucho que desear, pero parece tratarse de una neurotoxina.

El hecho de que persista el nombre de enterotoxina expresa bien a las claras las dudas acerca de una acción neurotóxica exclusiva.

F. BACTERIOFAGOS.

FISK (1942) fue el primero en utilizar la técnica de tipificación por fagos en la clasificación de los estafilococos.

El método ha sido perfeccionado por WILLIAMS y RIPPON (1952), BLAIR y CARR (1953) y BLAIR y WILLIAMS (1961).

SETO *et al.* (1956) aislan y estudian una serie de fagos adaptados al ganado vacuno (procedentes de estafilococos de origen bovino).

Numerosos autores han utilizado la tipificación lítica por bacteriofagos en la microflora estafilocócica, de origen bovino, presente en la leche (PRICE *et al.*, 1954; SETO y WILSON, 1958; COLES y EISENTARK, 1958; MONDINI y DOVADOLA, 1959; MONDINI y GASPARINI, *loc. cit.*; NAKAGAWA, 1960abc; TAKAGAKI, 1960; NANI *et al.*, 1961; SLANETZ y BARTELEY, 1962; PARGAONKER *et al.*, 1962; JONES *et al.*, 1963b).

La tipificación de estafilococos es, como en el caso de la antibiorresistencia, de un gran valor epidemiológico ante todo.

Según ALLISON (1949) y WILLIAMS y RIPPON (*loc. cit.*) la mayor parte de los estafilococos productores de enterotoxina pertenecen al grupo III.

El grupo IV (42 D) también ha sido citado con cierta frecuencia (WORSECK *et al.*, 1960; THATCHER y ROBINSON, 1962).

Los últimos autores señalan también que el mismo patrón aislado de distintos orígenes se diferenciaba en su capacidad para producir enterotoxina en un mismo medio, pero SUGIYAMA *et. al.* (1960) han apuntado semejantes variaciones entre colonias de un mismo cultivo creciendo en la misma placa de Petri.

THATCHER y ROBINSON (*loc. cit.*), no obstante, han logrado aislar una toxina procedente de estafilococos de reacción negativa ante las series de fagos, y con propiedades eméticas para el gato y mono.

ELEK (*loc. cit.*) manifestaba que la tipificación por fagos puede descubrir las cepas productoras de toxina pero, con seguridad, solamente cuando se utilizasen fagos aislados de cepas lisogénicas y enterotóxicas.

Algunos autores (BAILEY y SCOTT, 1962; PRICE *et al.*, *loc. cit.*) describen una relación entre la antibiorresistencia y los distintos grupos de fagos, mientras que otros (MONDINI y GASPARINI, *loc. cit.*; TAKAGAKI, *loc. cit.*) no han encontrado esta relación.

Las series de fagos más utilizadas son la *Internacional* (BLAIR y WILLIAMS, *loc. cit.*) y, para los estafilococos de origen bovino, la de (SETO-WILSON, *loc. cit.*).

La serie *Internacional* se compone actualmente de los fagos 29, 52, 52 A, 79, 80, 3 A, 3 B, 3 C, 55, 71, 6, 7, 42 E, 47, 53, 54, 75, 77, 42 D, 81, 187 y 83 A, agrupados en cuatro grupos serológicos. Se hallan en condiciones de experimentación los fagos 77, Ad, B 5 y D.

La serie de SETO-WILSON está integrada por los fagos S 1, S 2, S 3, S 4, S 5, S 6.

G. ANTIBIOTICOS.

La especie *Staphylococcus aureus* es básicamente susceptible a la mayoría de los antibióticos con acción sobre las bacterias Gram positivas, pero el microorganismo puede adquirir resistencia, tanto a los antibióticos de amplio uso como a los de más reciente empleo, con sorprendente facilidad (BAILEY y SCOTT, *loc. cit.*)

La técnica de determinación de susceptibilidad y resistencia de los estafilococos frente los antibióticos es eminentemente clínica y epidemiológica. Con alguna frecuencia se ha incluido en los estudios de estafilococos enterotóxicos, intentando determinar la existencia de correlación con otras propiedades o la modificación misma que la resistencia puede originar en éstas.

BROWN y EVANS (1963) citan varios autores que han encontrado en mutantes de cepas antibio-resistentes, alteraciones respiratorias, nutritivas y otros cambios fisiológicos. Lo que es contrario a sus investigaciones sobre cepas antibio-resistentes de origen clínico, ya que las estudiadas eran miembros típicos de la especie *Staphylococcus aureus* sin que variase ningún carácter taxonómico.

Según estos investigadores la mayoría de los trabajos que citan cambios en la fisiología y requerimientos nutritivos de cepas antibio-resistentes de *Staphylococcus aureus* están basados sobre estudios de cepas resistentes seleccionadas después de expuestas a niveles tóxicos de antibióticos, substancias químicas o irradiación.

Tales cepas pueden estar más ampliamente dañadas en su patrimonio genético que las aisladas de material clínico representando mutantes espontáneas.

A los fenómenos de inducción a la resistencia antibiótica hay que añadir los de transducción de resistencia por fagos no solamente "in vitro" sino "in vivo" (JAROLMEN *et al.*, 1965).

GRAVENKEMPER *et al.* (1965) demuestran la existencia de una resistencia cruzada de estafilococos productores de penicilinasa para la meticilina y oxacilina.

De las últimas investigaciones se deduce el creciente interés de las técnicas de determinación de susceptibilidad y resistencia antibiótica no solamente en el campo clínico, sino en el más general de estudio biológico de los estafilococos.

PARTE EXPERIMENTAL

III.—MATERIALES Y MÉTODOS

A. MUESTRAS.

Las muestras ensayadas fueron obtenidas de leche natural (fresca de vaca) admitida como normal por los servicios de recepción industrial de este producto o recogidas en establos a partir de vacas sanas.

1. Número origen y periodicidad.

Se estudiaron un total de 86 muestras de leche. De éstas, 50 se recogieron en la plataforma de recepción de una industria lechera, en León capital, y las 36 restantes fueron tomadas en establos de la provincia.

Las muestras de leche de mezcla recogidas en el andén o plataforma de recepción fueron representativas de distintas localidades pertenecientes a las diferentes zonas leonesas de recogida.

Para las muestras de establo se eligieron puntos de gran producción lechera (Villamañán, Toral de los Guzmanes y Vega Magaz) y se tomaron en los meses de agosto, 1964 y enero y mayo, 1965, del ordeño vespertino.

Con las muestras de andén se siguió la norma de recoger cuatro muestras por mes, durante el período julio 1964-agosto 1965, a excepción del mes de julio de 1964 en el que se recogieron solamente dos muestras.

2. Técnica de muestreo y conservación.

En las muestras de recepción se utilizaron frascos estériles de boca ancha, de 250 cc. de capacidad. De cada localidad se tomó una parte alícuota de los correspondientes bidones, con cacillos o pipetas estériles. Los bidones de acidez elevada o con cualquier anormalidad (leche sucia o calostral) eran excluidos de la toma de muestras.

Para las muestras en origen se utilizaron tubos de ensayo de tapón roscado de 10 cc., estériles.

Las muestras eran compuestas e individuales, extraídas de los cuatro cuarterones de cada vaca a partir del segundo chorro, e inmediatamente de obtenidas se depositaron en recipientes isotermos (vasos de Dewar) con hielo. Una vez en el Laboratorio se mantenían en la nevera a temperaturas de 2.º C (\pm 1) hasta el momento de proceder a su estudio dentro de las veinticuatro horas siguientes a su recogida.

Todas las vacas muestreadas eran clínicamente normales y White-side negativas.

3. Estudio previo (pH, acidez, temperatura y contejo de colonias).

En las muestras de andén el estudio se comenzó a continuación de ser obtenidas y en las de establo después de una conservación por el frío de veinticuatro horas como máximo.

El pH fue determinado con un potenciómetro BECKMAN modelo ZEROMATIC, siendo aquél ajustado antes de cada determinación en tres puntos de la escala, con soluciones tampón BECKMAN (pH 4,0; pH 6,86 y pH 7,41).

Solamente se precisó la acidez potencial en las muestras de andén.

La acidez total se determinó, en todas las muestras, por el método de Dornic, sobre 10 cc. para las de recepción y 5 cc. para las de establo.

La temperatura fue comprobada en los mismos bidones o en las muestras recién tomadas.

Para el conteo de colonias se siguieron las técnicas preconizadas por STANDARD METHODS for the Examination of Dairy Products (1960) y el medio de cultivo recomendado se preparó a partir de productos DIFCO.

Atención especial se prestó a las causas de error en el método de conteo en placa enumeradas por SNYDER (1947).

Se utilizaron al menos tres placas por cada dilución.

B. AISLAMIENTO DE ESTAFILOCOCOS A PARTIR DE LECHE NATURAL.

1. *Medios de cultivo utilizados comparativamente.*

Se usaron ocho medios para las veintidós muestras primeras y tres para las restantes.

Estos medios fueron:

- a. Manitol-Sal-Agar (CHAPMAN, 1945).
- b. S-110 (CHAPMAN, 1946).
- c. S-110-Yema de huevo (CARTER, 1960).
- d. Telurito-glicina (ZEBOVITZ *et al.*, 1955).
- e. De VOGEL y JOHNSON (1960).
- f. De BAIRD-PARKER (1962).
- g. De FINEGOLD y SWEENEY (1960).
- h. Medio original del autor (MAF).

La procedencia de estos medios fue: a y b DIFCO, d y e BBL. El medio f se preparó a partir de productos DIFCO excepto Lab-lemco (OXOID), glicina (HOPKIN y WILLIAMS) y piruvato sódico (L. LIGHT). En el medio g se utilizó agar nutritivo BBL y polimixina B (BURROUGHS WELLCOME).

En la preparación se siguieron rigurosamente las normas de elaboración prescritas por las casas preparadoras (a, b, d y e) o por sus propios autores (c, f y g).

2. *Medio de cultivo original.*

Llamaremos a este medio MAF, abreviatura derivada de las palabras Manitol, Anaerobiosis, Fermentación (o Fuchina) y MAF-2 para su variante con yema de huevo.

Composición:

Extracto de levadura (DIFCO)	4 g.
Tripticasa (BBL)	12 "
d-Manitol (DIFCO)	10 "
Cloruro sódico (MERCK)	75 "
Bacto-Agar	15 "
Fuchina ácida (SCHERING-KHALBAUM) al 0,5 por 100 decolorada con NaOH	10 cc.
L-Cistina (DIFCO)	0,25 g.
Ácido tioglicólico (DIFCO)	0,3 cc.
Acti-diona (UPJOHN)	400 mg.
Agua	1.000 cc.

pH=7,3±0,1

El medio se preparó con y sin adición de yema de huevo.

En el segundo caso la elaboración consistía en disolver todos los componentes, excepto el agar, en un litro de agua bidestilada a temperatura de ebullición. A continuación se ajustaba el pH a 7,3 con NaOH (pH inicial del medio $6,4 \pm 0,1$), por método electrométrico (pH metro BECKMAN ZEROMATIC), se disolvía el agar, se repartía en tubos en cantidad de 10 cc. y se esterilizaba a 121° C durante quince minutos.

La conservación de estos tubos en la nevera a temperaturas de dos grados C, en ambiente húmedo, era perfecta durante 25-30 días. Cuando era necesario los tubos se fundían y repartían en placas de Petri estériles, secando la superficie del medio ya repartido en estufa de cultivo a 37° C.

En la preparación de la variante MAF-2 (con yema de huevo) la técnica anterior tuvo que ser modificada para evitar que el producto sufriese cambios físico-químicos por el calor (coagulación con fuerte opacidad y destrucción vitamínica). En este caso una vez ajustado el pH a 7,3 se transferían 250 cc. del medio, aproximadamente, a un matraz erlemeyer de 500 cc. y se añadía el agar al matraz principal, con el medio base MAF, esterilizando al mismo tiempo los dos matraces (de caldo y agar) a 121°C durante quince minutos.

Enfriados los matraces en baño termostático a 45-50° C se adicionaban dos yemas de huevo al caldo estéril, previa rotura de la cáscara y separación de la clara y chalazas con la mayor asepsia, desgarran-

do la membrana vitelina con un asa de platino estéril y agitando suavemente hasta disolver de manera uniforme. A continuación se mezclaba el contenido de ambos matraces en el de mayor volumen, evitando la formación de burbujas.

Los huevos empleados, fresquísimos y de cáscara limpia, se mantenían sumergidos en alcohol de 96° a la temperatura de 2° C (± 1) durante 12-15 horas antes de ser usados.

Preparado el medio de esta forma se distribuía en placas de Petri estériles y éstas se conservaban en la nevera a 2° C en estuches apropiados y ambiente húmedo, durante períodos máximos de quince días.

Antes de cada uso, tanto si éste era inmediato a su preparación como después de mantenidas al frío, la superficie de las placas se seca en estufa de cultivo.

3. Siembra y contejo.

La siembra se realizó extendiendo la leche en superficie con varilla acodada de vidrio de 5 milímetros \varnothing . La cantidad de leche depositada en la superficie del medio era de 0,1 cc. de una solución al 1 : 10 de leche en líquido Ringer al 1 : 4 (BDH) y de la misma cantidad al 1 : 100 en una segunda serie de placas.

La leche sobrante se almacenaba en la nevera para realizar un segundo contejo en los casos extremos de número muy elevado o ausencia de estafilococos. En este segundo caso 2,5 cc. de leche se mezclaban a 7,5 cc. de leche estéril con ClNa al 12 por 100 para obtener una concentración salina final del 9 por 100.

Estas muestras se incubaban durante veinticuatro horas a 37° C y solamente se sembraban placas a partir de este medio de enriquecimiento si la primera siembra resultaba negativa.

La incubación de los distintos medios se realizó a las temperaturas y tiempos señalados por sus autores. Para nuestro medio (MAF) la incubación era a 37° C durante 48-72 horas.

En el medio MAF se siguió en ocasiones un doble método de siembra, inoculando en superficie y entre dos capas de agar. En este caso una vez sembrada y seca la superficie del medio MAF o MAF-2 se añadía una nueva capa de agar MAF, fundido y enfriado a 45° C. El objeto de esta técnica era conseguir un ambiente inicial netamente anaerobio e incrementar la superficie de siembra.

El contejo de colonias de estafilococos se realizó procurando distinguir, de acuerdo con las indicaciones suministradas por cada medio, entre estafilococos potencialmente patógenos (coagulasa positivos) y saprofitos (*Staphylococcus epidermidis* o *saprophyticus*).

Se determinó asimismo el número de microorganismos no estafilococos por placa y su clasificación aproximada en la clave de BERGEY.

4. Comportamiento de los medios utilizados frente a cultivos puros de aislamiento reciente.

Se realizaron pruebas de inhibición de crecimiento con diez estafilococos coagulasa positivos de nuestra colección. Todas las cepas eran de origen lácteo y habían sido aisladas dentro de los diez días anteriores a la experiencia.

La siembra se realizó, con la misma técnica que para la leche, a partir de suspensiones de gérmenes de una densidad óptica aproximada a 500.000-1.000.000 de estafilococos por cc. y como medio testigo se utilizó Bacto Tryptose Blood Agar Base y sangre de oveja fresca y desfibrinada al 5 por 100.

Las suspensiones de gérmenes se estandarizaron con solución Ringer al 1 : 4 a partir de un cultivo de diez y ocho horas en Milk agar OXOID.

En esta prueba se utilizaron los medios siguientes: S-110, S-110-Yema de huevo, MAF y MAF 2.

Los tubos con suspensiones standard fueron agitados en un agitador excéntrico con el fin de romper las aglomeraciones de estafilococos, extremo que se comprobó varias veces al microscopio en preparaciones teñidas con azul de metileno.

5. Aislamiento, purificación y mantenimiento de los cultivos puros.

El aislamiento propiamente dicho se realizó a partir de colonias típicas, macroscópicamente diferenciables y de los medios MAF y MAF-2, utilizando como control el resto de los medios de cultivo empleados.

A partir de la muestra número 23 y en todas las de estable se utilizaron solamente los medios MAF, MAF-2 y S-110 como testigo.

Las colonias se seleccionaban inmediatamente de la incubación, marcando un número en la placa de Petri debajo de cada una y tomando nota de sus características. La incubación de las placas se continuó tres días a temperatura ambiente, procediendo entonces a una nueva selección y al aislamiento definitivo.

El contenido de cada asa de platino, cargada con estafilococos procedentes de colonias distintas, era purificado por diseminación sobre medio S-110. A las cuarenta y ocho horas de incubación a 37° C se elegía una colonia típica y bien desarrollada siendo la cepa transferida con asa de platino a tubos de agar inclinado (Milk Agar OXOID).

Los cultivos de 18-24 horas eran almacenados a temperaturas de 2° C hasta su estudio, siendo los tubos herméticamente cerrados o colocados en ambiente húmedo y frío. Toda cepa conservada en la nevera fue transferida de nuevo al medio Milk Agar (OXOID) cada segundo mes.

La pureza de cada cultivo de estafilococo se comprobó por el método de Gram modificación de BURKE y KOPELOFF-BEERMAN (*Manual of Microbiological Methods, Society of American Bacteriologists, 1957*).

La selección de colonias, con fines de estudio posterior, a partir de otros medios, no se hizo, pero en las muestras números 1, 7, 8, 11, 13, 16, 17 y 18 en que no aparecieron estafilococos probables coagulasa positivos sobre el medio MAF y si en todos o en parte de los restantes, se eligieron de cada uno de estos medios colonias aparentemente patógenas o coagulasa positivas. A partir de éstas se sembraron estrias sobre el medio de ESBER y FAULKNER (DIFCO) para confirmar la presunta propiedad de coagular el plasma.

Esta prueba se realizó en lo sucesivo siempre que en el medio testigo (S-110) aparecían colonias posibles productoras de coagulasa y por el contrario, de las indicaciones suministradas por los medios MAF, no se deducía su presencia.

C. CARACTERIZACION FISIOLOGICA Y ENZIMATICA.

1. Cromogénesis.

La producción de pigmento, color, tonalidad e intensidad de éste, fue un carácter en el que se basó la diferenciación de las colonias de estafilococos en el primer aislamiento, sobre medios MAF.

Por otra parte las placas de medio S-110, utilizadas en la purificación de colonias, fueron mantenidas durante cinco días a temperatura ambiente, lo que permitía confirmar este dato, obtenido primariamente del medio MAF.

2. Grado de aerobiosis.

Las necesidades de oxígeno en relación con el crecimiento en un medio con glucosa se determinaron por el método general de BUTTIAUX y GAGNON (1959) ligeramente modificado (MOSSEL, 1962), utilizando un agar nutritivo a pH 7,2 con glucosa al 1 por 1.000 y cistina al 5 por 10.000, distribuido en tubos de 8 mm. Ø

Antes de su uso todos los tubos se calentaron en baño de agua hirviendo durante diez minutos, siendo enfriados e inoculados con una gota de un cultivo líquido (en Brain Heart Infusión) de diez y ocho horas, de la cepa de estafilococo en estudio.

Después de una incubación de 48 horas a 30° C se observó la extensión de la zona de crecimiento.

Una cepa era clasificada como aerobia obligada cuando había formado colonias en los 5 mm. superiores del medio. Si el desarrollo era uniforme a lo largo del medio la cepa era considerada anaerobia facultativa, siendo en este caso clasificada como estafilococo (catalasa positivo) y seleccionada definitivamente para su estudio posterior.

3. Producción de catalasa.

Se realizó sobre un cultivo de 18-24 horas en agar inclinado (Milk Agar OXOID) normalmente en la primera resiembra y cuando el tubo con la correspondiente variedad de estafilococo había cumplido la misión de servir de proveedor de la cepa para las diversas pruebas encaminadas a su caracterización.

Se empleó agua oxigenada al 2 por 100 dejando gotear 2,5 cc. sobre la superficie del agar, observando la formación de burbujas.

4. Reducción del telurito potásico.

La reducción del telurito potásico se comprobó en el medio telurito glicina cloruro de litio (ZEBOVITZ *et al.*, *loc. cit.*). De la suspensión de gérmenes (cultivo de diez y ocho horas en Brain Heart Infusión)

utilizados en otras pruebas, se sembraron líneas de 2,5 cm. (tres en cada mitad de una placa de Petri de 10 cm.) y sobre la superficie del medio que previamente había sido secado en la estufa.

En cada placa se estudiaron seis cepas y para cada serie de gérmenes se utilizó una placa como testigo, siendo ésta sembrada con una cepa positiva y un micrococo (*Micrococcus caseolyticus*, ATCC número 13.548).

En la preparación del medio se siguieron fielmente las normas de los manufacturadores (BBL) y las placas fueron incubadas 48 horas a 37° C.

En el caso positivo las líneas sembradas sobre la placa adquirían un color negro intenso.

5. Determinación de fosfatasa.

A este fin se utilizó la técnica de BARBER y KUPER (*loc. cit.*) adicionando al agar nutritivo (pH 7,4) fenolftalein fosfato sódico (SIGMA) para una concentración final de 0,01 g. por 100.

El medio, distribuido en placas de Petri de 10 cm. Ø y seca la superficie, fue sembrado con dos o tres estrias en cada mitad de la placa e incubado a 37° C durante veinticuatro horas. Cada estria de 2,5 cm. correspondía a una cepa distinta y como testigo se emplearon placas sembradas con estafilococos coagulasa positivos y negativos.

La aparición de un color rojo en las estrias se consideraba prueba de que la cepa de estafilococo era productora de este enzima.

6. Lipolisis en yema de huevo.

Se empleó el medio de COLBECK *et al.* (*loc. cit.*) siguiendo las instrucciones dadas por DIFCO SUPPLEMENTARY LITERATURE. La siembra se realizó, como en los casos anteriores, a partir de un cultivo de 18-24 horas en Brain Heart Infusión, sobre la superficie seca del agar y en estrias.

La incubación se hizo a 37° C durante 48 horas.

El medio de COLBECK *et al.* (*loc. cit.*) sirvió en este caso para confirmar, comparando resultados, aquellos obtenidos sobre MAF-2 en el aislamiento inicial.

La formación de una opacidad alrededor o debajo de las líneas de siembra se consideró como el caso positivo.

7. Desoxirribonucleasa.

Se determinó sobre el medio de DI SALVO (BBL) con ácido desoxirribonucleico, utilizando como agente revelador el CIH N. En el uso de este medio se siguieron las instrucciones específicas dadas por los BALTIMORE BIOLOGICAL LABORATORIES (BBL) y las generales de siembra y cultivo señaladas en las pruebas anteriores.

La producción de DNase se manifestó por una transparencia rodeando las estrias de siembra.

8. Gelatinolisis.

La licuación de gelatina se investigó en Thiogel Medium (BBL) repartido en tubos de 15 cm. por 15 mm. en cantidades de 10 cc.

Los tubos se sembraban por picadura, con aguja de platino, a partir de un cultivo en agar inclinado (Milk Agar OXOID) de 18-24 horas. La incubación se realizó a 37° C por espacio de una semana observando diariamente la licuación mediante el enfriamiento de los tubos sumergidos en agua fría.

Se utilizaron también a este fin las placas de medio S-110 empapeladas en la purificación y producción del pigmento de cada cepa, las cuales eran inundadas con una solución al 20 por 100 de ácido sulfosalicílico (MERCK) observando, en caso positivo, zonas transparentes alrededor de las colonias pasados diez minutos (Reacción de STONE modificada por CHAPMAN).

9. Carbohidratos: fermentación del manitol.

Se estudió esta propiedad por vez primera en los medios MAF y MAF-2 y a partir del cultivo puro se utilizó la técnica descrita por MOSSEL (1962) con el fin de comprobar el metabolismo de este azúcar en medio anaerobio por parte de los estafilococos.

El medio de MOSSEL (1962) se repartía y esterilizaba en tubos de 15 cm. por 15 cm. en cantidad de 10 cc. por tubo. Antes de ser utilizados todos los tubos se calentaban a vapor fluente en el autoclave durante diez minutos y a continuación se enfriaban con rapidez en agua fría, siendo inmediatamente sembrados por picadura con aguja de platino hasta el fondo y a partir de las cepas resembradas en Milk Agar OXOID).

La incubación se continuó cuatro días a 37° C realizando lecturas al segundo y cuarto día.

Se consideró fermentación del manitol si todo el tubo viraba al amarillo y oxidación cuando solamente lo hacía la parte superior.

En los casos en que el color púrpura del tubo permanecía inalterable o se intensificaba la cepa era considerada sin actividad para atacar a este polialcohol.

10. *Propiedades fibrinolíticas.*

Se determinaron sobre Trypticase Soy Agar (BBL) al que se añadió (a la temperatura de 45° C) 12 por 100 de plasma humano. La mezcla se calentó a 55-60° C hasta lograr un medio opaco. El agar se distribuyó en placas de Petri de 10 cm. de diámetro y una vez seca la superficie se procedió a la siembra en estrias en la forma ya descrita.

En los casos positivos aparecía una transparencia en los márgenes de las estrias, después de una incubación de 72 horas a 37° C.

11. *Producción de coagulasa.*

En esta técnica se emplearon simultáneamente plasma de conejo liofilizado DIFCO y plasma humano adicionado al medio de ESBER y FAULKNER (DIFCO SUPPLEMENTARY LITERATURE). En todas las series de esta prueba se utilizaron estafilococos coagulasa positivos y negativos, como controles.

El plasma de conejo, (0,5 cc.) se repartió en una placa de polivinilo alveolada y en los alveolos se depositaban dos gotas de una suspensión de estafilococos en Brain Heart Infusión (cultivo de 18-24 horas).

Las placas ESBER se sembraron en la forma usual.

En los detalles restantes se siguieron las técnicas aconsejadas por DIFCO (SUPPLEMENTARY LITERATURE).

Toda cepa que producía opacidad en la placa de cultivo en veinticuatro horas a 37° C o coagulaba el plasma en tres horas a la misma temperatura, fue considerada coagulasa positiva.

Los casos dudosos fueron repetidos con proporciones distintas de "inoculum".

D. CRECIMIENTO MICROBIANO.

Esta experiencia no se realizó bajo un control de laboratorio dirigido, quedando reducida a un estudio numérico comparativo de la flora natural de la leche y la estafilocócica, en las distintas épocas del año, en relación con la acidez y temperatura (muestras de andén) y acidez solamente (muestras de establo).

E. DESTRUCCION TERMICA.

En esta prueba, como en la anterior, el estudio versó sobre la flora estafilocócica normal de cada muestra de leche y no sobre la colección de microorganismos aislados a lo largo de la experimentación.

El objeto fue solamente comprobar si las relaciones tiempo-temperatura mínimas que se utilizan en la pasterización de la leche eran suficientes para destruir la carga estafilocócica de la leche natural.

La técnica (basada en los métodos capilares para determinación de termorresistencias en gérmenes esporulados y adaptada por nosotros a las exigencias de este estudio) fue la siguiente:

El calentamiento de la leche se verificó en capilares estériles de vidrio muy finos de siete centímetros de longitud (ARTHUR H. THOMAS COMPANY, PHILADELPHIA, U.S.A.). Cada capilar lleno contenía 0,033 cc. de leche con error de \pm 0,0015 comprobado en balanza de precisión monoplato "SARTORIUS" pesando vacíos y llenos varios capilares hasta adquirir la certeza de una perfecta uniformidad en los lotes.

Una vez aspirada la leche se cerraban los extremos del capilar al soplete y se colocaba uno en baño de agua, prácticamente estéril por calentamiento previo y, en ese momento, a 71,5° C. El baño termostático utilizado (ULTRA-THERMOSTAT HORYZONT UT12) tenía una sensibilidad de 0,05° C.

El capilar era extraído rápidamente a los dieciséis segundos por medio de pinzas estériles y depositado en un tubo de Brain Heart Infusión previamente enfriado a 2° C y cuyo contenido alcanzaba suficiente nivel para cubrir el capilar.

La misma operación se repetía con cada uno de los seis capilares empleados por muestra. Posteriormente con espátula estéril, larga y fina, se provocaba la rotura de los capilares dentro del medio líquido.

Los tubos de cultivo se incubaban durante 18 horas a 37° C y en los que existía crecimiento se pasaba un cc. a otro tubo del mismo medio.

Después de una segunda incubación de 18-24 horas se sembraban dos placas de S-110 por cada tubo, en una se extendían en superficie, con varilla de vidrio, dos o tres gotas de cultivo y otra era sembrada con asa de platino sobre la superficie bien seca.

En caso positivo las colonias aisladas fueron sometidas a la prueba de coagulasa, archivadas y posteriormente comparadas con los estafilococos aislados normalmente de la muestra correspondiente.

Cuando no se detectaban estafilococos en ninguno de los seis capilares (0,2 cc. de leche) se consideraba que la cantidad había sido reducida a menos de cinco estafilococos por cc., como mínimo. En caso contrario la cifra se suponía superior a este número.

Esta técnica simplificada (micrométodo) de número probable, se llevó a efecto en cámara de siembra estéril, evitando con el mayor cuidado contaminaciones externas.

El número de muestras analizadas por el método descrito fue de 24 (números 1 al 24 de las muestras andén).

F. HEMOLISINAS.

En la investigación del tipo de hemólisis se emplearon para cada germen placas de sangre de conejo, de oveja y humana.

En los casos de duda se repitió la prueba colocando en el centro de las placas de agar sangre, con la superficie bien seca, tiras de papel EDEROL número 2 impregnadas en sueros específicos antihemolíticos alfa y beta.

Estos sueros nos fueron remitidos por el Instituto Pasteur de París y su potencia era de 64 unidades para el alfa y 36 unidades para el beta.

El medio básico fue Bacto Tryptose Blood Agar Base al cual, esterilizado y enfriado a 45° C, se le añadía 5 por 100 de sangre desfibrinada de una de las especies citadas.

Preparados tres lotes diferentes de placas, de acuerdo con la clase de sangre, se secaba la superficie y se procedía a la siembra en estría de cepas utilizando tres placas distintas para cada variedad de estafilococo.

G. ENTEROTOXINA.

1. *Producción, concentración y purificación parcial.*

La producción de enterotoxina se realizó con diferentes fines: a) producción de pequeñas cantidades para inoculación en el gato; b) para producción de suero antienterotóxico en conejo; c) para estudios de gel-difusión y órgano aislado.

En los casos a y b el medio utilizado fue Brain Heart Infusión a pH de 5,5, semisólido, con 0,7 por 100 de agar, siguiendo la técnica de CASMAN y BENNET (1963).

En el caso c) el medio empleado fue de la siguiente composición: Tripticase (BBL) 17 g.; Phytona (BBL) 3 g.; ClNa 5 g.; fosfato disódico 4 g.; Agar 7 g.; Agua destilada 1.000 cc. pH = 5,5.

Este medio, Tripticase Soy Broth, semisólido por la adición de agar, es citado por HALL *et al.* (*loc. cit.*) que lo utilizan en técnicas de difusión en gel y se usó ligeramente modificado (pH 5,5 y adición de fosfato disódico) de acuerdo con los estudios de CASMAN y BENNET (1963), sobre influencia de pH y fosfatos en la producción de enterotoxina.

Ambos medios se repartieron en placas de Petri en 5 cm. Ø en cantidad de 25 ml., y fueron sembradas en superficie extendiendo cuatro gotas de una suspensión de gérmenes en caldo BHI o TSB, respectivamente, después de un cultivo de 18 horas a 37° C. La incubación se realizó en atmósfera normal y durante 72 horas.

El medio incubado se exprimía a través de una tela tupida y los gérmenes eran separados decantando después de centrifugar diez minutos a 5.000 rpm.

En especial para las técnicas de gel-difusión se filtraba, además, la parte decantada por un filtro SEITZ.

El pH era ajustado a 6,9 por medio de un potenciómetro BECKMAN.

La concentración de la toxina en los casos necesarios (gel-difusión) se realizó en un concentrador de laboratorio, diseñado por nosotros (Fig. 37), a baja temperatura (37° C) y durante períodos inferiores a una hora.

El concentrador estaba integrado por las siguientes partes: serpentín de calentamiento interior, matraz Kitasato, tres condensadores de vidrio, tipo liofilizador, tres vasos de Dewar, bomba de vacío Mc Leod e indicador de vacío de mercurio "Milésima Edwards".

El serpentín iba conectado en circuito con un ultratermostato "HORYZONT" regulado a la temperatura deseada. Cuando la cantidad de líquido a evaporar era pequeña se utilizó simplemente el calentamiento externo del matraz en un baño termostático corriente.

La evaporación se efectuó en plazos inferiores a una hora cuando las cantidades de líquido eran de 100 a 200 cc., tomando la parte concentrada con una pipeta estéril.

La purificación parcial se realizó en parte de la toxina a inocular al conejo, con el fin de obtener un suero específico.

La cepa utilizada para producir enterotoxina tipo A fue la *S-196E* (ATCC 13565).

El filtrado obtenido del cultivo semisólido fue acidificado, a la temperatura de 0° C, con ClH al 1 : 5, hasta un pH de 3,2-3,3 con lo que se obtenía un precipitado libre de enterotoxina y la parte sobrante se decantaba y precipitaba a —5° C, por la adición lenta de alcohol metílico hasta una concentración del 25 por 100, dejando la mezcla varias horas en el congelador de la nevera hasta el momento de obtener el precipitado.

Este se recogía sobre una membrana "millipore" y se redissolvía en una pequeña cantidad de agua bidestilada para obtener una concentración de 50 veces el volumen inicial, aproximadamente.

2. Inoculaciones en gato.

Se llevaron a efecto en el Departamento de Animales de Experimentación de Antibióticos, S. A., en Armunia (León) y se realizaron en los meses de febrero, abril y junio de 1965 utilizando lotes distintos de 13, 11 y 15 gatos respectivamente.

El número de gérmenes ensayados fue de 6, 5 y 7. Los gatos eran adultos, de peso superior a dos kilos y sin que previamente hubiesen sido sometidos a prueba de experimentación alguna.

Los estafilococos utilizados en la producción artificial de enterotoxina eran coagulasa positivos y elegidos al azar en nuestra colección de origen lácteo.

Los gatos fueron distribuidos en jaulas individuales e inoculados por vía intravenosa siguiendo la técnica de HAMMON (*loc. cit.*)

La única comida diaria a base de carne les era suministrada con dos horas de anticipación a la prueba.

Por cada germen se utilizaron dos gatos que fueron inyectados con tres y cinco cc. de enterotoxina que había sido calentada a 100° C durante treinta minutos.

En cada lote fue inoculado un gato con 12 cc. del medio base usado en la preparación de la enterotoxina.

La aparición de vómitos o diarrea a partir de los veinte minutos de la inoculación fue considerada como prueba de la existencia de enterotoxina.

Cuando los síntomas se presentaron solamente en un gato la prueba se consideró dudosa y se repitió en dos nuevos animales del mismo lote.

3. Ensayos en órgano aislado (intestino).

Esta determinación se efectuó sobre un fragmento de íleon de cobayo mantenido en supervivencia en una solución nutritiva.

Ensayos previos con útero de cobaya virgen e intestino de conejo y gato no dieron resultados uniformes frente a la acción de filtrados enterotóxicos de cultivos de estafilococos.

Los gérmenes sometidos a prueba fueron los mismos 18 que se utilizaron en las inoculaciones.

El cultivo utilizado en la producción de la toxina fue el Tripticase Soy Broth, con la modificación ya citada, y hecho semisólido por adición de 0,7 por 100 de agar. Se eligió este medio por ser su acción sobre íleon de cobayo muy poco marcada comparativamente con la acción del BHI.

A los filtrados de los cultivos estudiados se les agregó el 1 por 100 de antihemolisina alfa y el 2 por 100 de beta de acuerdo con la potencia de ambos sueros.

Los tubos con el filtrado y las antihemolisinas se colocaban en el baño yuxtapuesto al quimógrafo, con una hora de anticipación al comienzo de la determinación.

Los métodos seguidos en esta técnica fueron los recomendados por la PHARMACOPEE FRANCAISE (1965) en la valoración de histamina.

La longitud del íleon era de 2,5 — 4 cm.

El trozo de íleon se prendía en un gancho de hilo de platino situado en la parte inferior del tubo de aireación del baño de órgano, y por el otro extremo se sujetaba con hilo de seda a la palanca inscriptora en conexión con el tambor de Marey.

En el baño de órgano, antes de comenzar a trabajar con órgano aislado, se ponían cinco gotas de una solución de sulfato de atropina al 1/100.000 y al minuto se lavaba el órgano vaciando y llenando el baño hasta la total relajación del intestino.

La posible acción de la enterotoxina sobre órgano se comparó con la acción de la histamina en dos aspectos: a) disminución de la amplitud de contracción debida a la acción de la histamina y b) en contactos más prolongados (un minuto como mínimo) observación de la capacidad de contracción posterior frente a la histamina.

En el primer caso se añadían diez gammas de histamina por 20 cc. de filtrado y lo mismo al medio base comparando ambos tipos de contracción. El lavado era inmediato a la contracción.

En el segundo caso se permitía una acción más amplia de la enterotoxina sobre el órgano y a continuación se lavaba éste y se comparaba la respuesta del íleon a la histamina con una contracción anterior frente a ésta. Despues de repetir varias veces la operación se añadía histamina, lavando en medio, para ver la capacidad del órgano de recobrar la reacción ante un estímulo continuado.

En algún caso se empleó enterotoxina concentrada y parcialmente purificada así como suero antienterotóxico.

Como testigos se utilizaron cultivos de cepas enterotoxigénicas de la ATCC, números 13565 y 13566 (S-6), de *Micrococcus caseolyticus* (ATCC 13548) y de estafilococos coagulasa negativos.

4. Acción sobre presión sanguínea.

Los efectos de la enterotoxina sobre la presión sanguínea del gato anestesiado por fenobarbital sódico fueron comprobados con cinco cepas de estafilococo enterotóxico.

Dos de ellas se utilizaron como control (cepas 196E y S-6) y tres restantes fueron aisladas de leche fresca y se habían mostrado positivas en las pruebas de inoculación al gato.

El lote de gatos empleados fue homogéneo en cuanto a peso (de 2,750 a 3,250 grs.)

Las determinaciones se hicieron a continuación de las pruebas de contenido en histamina en estreptomicina y, como las anteriores, fueron realizadas en los Laboratorios de Farmacología Experimental de Antibióticos, S. A.

La técnica seguida fue la de los MANUFACTURING STANDARDS OF SCHENLEY LABORATORIES, 1950.

Anestesiado el gato se descubría la carótida derecha, previa incisión de la piel en la región yugular, situando en la corriente sanguínea una cánula fina conexionada al quimógrafo registrador de la presión sanguínea.

Asimismo se descubría la vena femoral y poniendo en marcha el tambor de Marey se comprobaba la amplitud de desplazamiento del indicador (triángulo de metal) sobre la cartulina ahumada (estabilidad relativa de la presión sanguínea).

A continuación se inoculaba un gamma de histamina por kilo de peso, provocando una disminución en la presión sanguínea (acción hipotensora). Alternativamente se comparaba la acción de la histamina con la del problema (enterotoxina fresca y calentada).

5. Preparación de un suero antienterotóxico.

Se preparó un suero en conejo utilizando como antígeno enterotoxina tipo A (producida por la cepa S-196E en medio BHI a pH 5,5), fresca y parcialmente purificada.

En la técnica de preparación se siguió el protocolo de CASMAN (1958) con las variaciones que se expresan a continuación.

Se inocularon cuatro conejos de buen tamaño y la técnica seguida en la preparación fue la siguiente: se comenzó la inoculación por vía

intradérmica con un cc. de una dilución de toxina fresca al 1 : 10. Dicha toxina tenía una potencia entre diez y veinte dosis vomitivas por cc. aproximadamente ya que un cc. al 1 : 10 (neutralizada con hemolisinas) producía vómitos en gato, pero no al 1 : 20.

Se realizaron inoculaciones, cada segundo día, con esta dosis, hasta un total de tres y a continuación se eligió la vía subcutánea, inoculando con la misma periodicidad tres dosis idénticas, pero mezcladas con "Freund's adjuvant" (HYLAND LABORATORIES) a partes iguales.

Se dejó descansar a los animales una semana y se inocularon nuevamente por vía subcutánea 2 cc. de enterotoxina fresca sin diluir y "Freund's adjuvant".

A los diez días se repitió la inoculación con 5 cc. y, a los diez días de ésta, se comenzó a utilizar toxina parcialmente pura, inoculando cada doce días, siempre con "Freund's adjuvant", cantidades aproximadas de 500, 1.000 y 2.000 dosis vomitivas para el gato.

Los conejos habían perdido peso y las inoculaciones se dieron por finalizadas.

A los veinte días de la última inoculación 0,5 ml. de suero obtenido de sangre extraída a los cuatro conejos, inoculados al gato por vía intravenosa le protegían contra la acción de 1 cc. de la dilución al 1 : 10 de enterotoxina, pero no frente a 2 cc., aunque en este caso los síntomas no eran muy marcados.

A los treinta días se obtuvieron idénticos resultados y los cuatro animales fueron sangrados y separado el suero.

El suero fue absorbido por células bacterianas de las cepas *Wood 46* (ATCC 10.832) y *M-19* (enviada por el doctor *LOKEN*, Department of Veterinary Bacteriology and Public Health, St. Paul, Minnesota), lavadas con acetona a bajas temperaturas y siguiendo fielmente la técnica descrita por *CASMAN* (1958).

Una vez absorbido el suero a éste se le añadió mertiolato (LILLY) en proporción 1 : 1.000 y se conservó en la nevera a 2° C ± 1.

6. *Precipitación en gel (gel-difusión).*

En esta técnica se siguió el procedimiento de Ouchterlony modificado por *CASMAN* (1958, 1960), con los siguientes variaciones:

Las fuentes de antígeno y suero se distribuyeron con arreglo al modelo y distancias recomendados por *CAMPBELL et al.* (1963) y el agar utilizado fue Ionagar OXOID recomendado por *HALL et al.* (*loc. cit.*)

En lugar de bloques de aluminio en la preparación de las fuentes o pocillos se emplearon anillos de vidrio de 10 mm. de longitud y diámetro.

La técnica seguida por *CASMAN* (1958) fue ampliada en todos los detalles con arreglo a la descripción del método Ouchterlony dada por *CROWLE* (1961).

Las depresiones circulares o pocillos se llenaron, una sola vez, con cantidades de 0,2 cc. de suero la cavidad central y la misma cantidad de antígeno las laterales. Normalmente el antígeno se utilizó sin diluir y diluido al 50 por 100 en la misma placa.

El antígeno (enterotoxina) fue preparado por cultivo en Tripticase Soy Broth semisólido, distribuído en placas. Este medio producía niveles de 10-15 dosis vomitivas por cc. con las cepas control *S-6* y *S-196E* pero fue necesario concentrar la enterotoxina de los gérmenes aislados de la leche para obtener reacciones de precipitación positivas en las placas.

A esta prueba fueron sometidos nueve de los gérmenes cuya enterotoxina había sido inoculada en gatos. Cinco de los ensayados eran enterotóxicos y cuatro negativos con arreglo a dicha técnica de inoculación en gato.

Como testigos se utilizaron las cepas de control citadas.

H. TIPIFICACION POR MEDIO DE BACTERIOFAGOS.

1. *Series Internacional y Seto-Wilson.*

El total de cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados fueron sometidas a la acción de 21 bacteriófagos considerados como básicos y de uso recomendado por el COMITE INTERNACIONAL DE TIPIFICACION BACTERIOFAGICA DE ESTAFILOCOCOS. Se incluyó asimismo el fago 83A no considerado fundamental por dicho organismo.

También fue usada la serie de fagos, adaptados a estafilococos de origen bovino, de SETO-WILSON (*loc. cit.*) integrada por los fagos S 1, S 2, S 3, S 4, S 5 y S 6.

La serie INTERNACIONAL de fagos con sus cepas propagadoras nos fue remitida por el STAPHYLOCOCCUS REFERENCE LABORATORY (Cobindale, London) y los de SETO por J. B. WILSON (Madison, Wisconsin).

Las técnicas seguidas fueron las descritas por BLAIR y WILLIAMS (1961) y SETO y WILSON (1958).

En los casos en que se necesitó nueva propagación por haberse agotado el "stock" inicial o baja potencia del mismo (R.T.D. < 1 : 100) se siguió la técnica de SWASTROM y ADAMS (1951) cultivando la cepa propagadora y el virus en agar blando distribuido en placas de Petri de 15 cm. Ø

La dilución de rutina (R.T.D.) o dilución más alta que produce una lisis confluente en la cepa de propagación fue determinada diluyendo el filtrado de 1 : 10 a 1 : 10⁶ y cada dilución comprobada con arreglo a la siguiente técnica: a partir de un cultivo de seis horas, de la cepa propagadora, en Trypticase Soy Broth (BBL), se sembraba una placa del mismo medio (solidificado por adición de 1,5 por 100 de agar) utilizando una torunda de algodón estéril humedecida en el medio líquido cultivado.

Una vez seco el "inoculum" se colocaba una gota de cada dilución empleando un asa de platino con un bucle de 4 mm Ø, separando las gotas 2 cm. como mínimo. Como R.T.D. fue considerada la dilución más alta que producía una lisis confluente.

Las diluciones de rutina se mantuvieron a una temperatura de 2.⁰ C en nevera y su potencia se comprobaba antes de usarse nuevamente cuando la titulación anterior se había realizado con más de una semana de antelación.

Para la tipificación propiamente dicha cada cepa de estafilococo coagulasa positivo fue sembrada en superficie, sobre placas de 15 cm Ø con el medio Trypticase Soy Agar, por medio de torundas de algodón estériles empapadas en un cultivo del gérmen de seis horas a 37⁰ C. Las placas se secaban a 37⁰ C una hora, antes de colocar las series de bacteriófagos.

Bajo cada placa se colocaba un patrón con la situación de cada fago y éstas se ponían en serie depositando en el sitio correspondiente una gota de la R.T.D. con pipetas de Pasteur estériles y distintas. Cuando la serie de fagos se hallaba distribuida se dejaban secar las placas por espacio de treinta minutos y se procedía a la incubación a 30⁰ C durante 18-24 horas.

La interpretación de las reacciones líticas era:

50 placas o más (lisis confluente)	+	+
20 a 50	+	
Menos de 20	±	
Sin lisis		No tipificable

Solamente las reacciones + + fueron consideradas significantes y el patrón lítico de cada gérmen se determinó en términos de lisis + +, aunque las reacciones + y ± se consideraron para catalogar a un gérmen como tipificable, cuando la dosis 1.000 x R.T.D. daba reacciones claras (+ +) sobre dicha cepa.

I. ANTIBIOGRAMAS

Las 58 cepas de estafilococos coagulasa positivos y 11 coagulasa negativos elegidos entre los de mayor complejidad enzimática fueron sometidas a la acción de 18 antibióticos (BBL) con el fin de estudiar el fenómeno de antibiorresistencia en estafilococos de origen bovino.

La técnica utilizada fue la de los discos de sensibilidad antibiótica tal y como se expone por la casa preparadora (B-D LABORATORIES: Techni TOPICS número 10 y Catálogo BBL).

Los discos de 0,6 cm. de Ø nos fueron suministrados en cartuchos de 50 discos, adaptables a un distribuidor automático.

En ambos lados iban marcados con una letra y un número que expresaban el nombre del agente y su concentración en mg, mcg o unidades.

Las cepas a ensayar se cultivaban en B H I durante 18 horas a 37⁰ C.

Los estafilococos fueron catalogados como sensibles, moderadamente sensibles o resistentes según el diámetro de las zonas de inhibición y la concentración en antibiótico del disco.

Los antibióticos empleados y concentraciones, así como las abreviaturas que figuran en los discos y origen, fueron los siguientes:

Aureomicina (Aureomycin) - A 30-30 mcg.
(Chlorotetracycline: Laboratorios Lederle).
Bacitracina (Bacitracin) - B 10-10 unidades.
(Sin referencia de origen).
Cloromicetina (Chloromycetin) - C 30-30 mcg.
(Chlorotetracycline: Laboratorios Lederle).
Dihidroestreptomicina (Dihydrostreptomycin) - D S 10-10 mcg.
(Sin referencia).
Dimetilclorotetraciclina (Demethylchlorotetracycline) - D M
30-30 mcg.
(Declomycin: Laboratorios Lederle).
Dimetoxifenil penicilina (Dimethoxyphenyl Penicillin) - D P
5-5 mcg.
(Staphcillin: Laboratorios Bristol).
Eritromicina (Erytromycin) - E 15-15 mcg.
(Erytrocin: Laboratorios Abbott).
Estreptomicina (Streptomycin) - S 10-10 mcg.
(Sin referencia).
Fenoxietil penicilina (Phenoxyethyl penicillin) - P P 2-2 unidades.
(Sin referencia).
Kanamicina (Kantrex) - K 30-30 mcg.
(Kanamicin: Laboratorios Bristol).
Neomicina (Neomycin) - N 30-30 mcg.
(Mycifradin: Laboratorios Upjohn).
Novobiocina (Novobiocin) - N B 30-30 mcg.
(Cathomycin: Merk-Sharp y Dohme).
Oleandomicina (Oleandomycin) - O L 15-15 mcg.
(Matromycin: Laboratorios Pfizer).
Oxacilina (Oxacillin) - O X 1-1 mcg.
(Sin referencia).
Penicilina (Penicillin) - P 2 y P 10-2 y 10 unidades.
(Sin referencia).

Polimixina B (Polymyxin B) - P B 300-300 unidades.
(Aerosporin: Laboratorios Burroughs Wellcome).
Terramicina (Terramycin) - T 30-30 mcg.
(Oxytetracycline: Laboratorios Pfizer).
Tetraciclina (Tetracycline) - Te 30-30 mcg.
(Achromycin: Laboratorios Lederle).

J. ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizó con arreglo a las normas dadas por FISHER (1946) y SNEDECOR (1948).

IV. — RESULTADOS

A. DEL ESTUDIO INICIAL DE LAS MUESTRAS.

1. *Muestras de andén o muelle de recepción.*

Se examinaron 50 muestras y los resultados obtenidos en el estudio previo se expresan y comparan en los Cuadros números 2, 3, 5, 7, 9, 11, Tabla I y Diagramas números 1, 3, 4, 5, 8 y 9.

Se aislaron un total de 180 estafilococos, de los cuales 46 eran coagulasa positivos.

2. *Muestras de establo.*

Se estudiaron 36 muestras. Los resultados alcanzados se señalan en los Cuadros números 4, 5, 6, 8, Tabla II y Diagramas números 2, 6, 7.

Fueron aislados 28 estafilococos en total y de éstos 12 eran coagulasa positivos.

B. DE CULTIVO Y AISLAMIENTO.

1. Estudio comparativo en diferentes medios de cultivo.

Se utilizaron a este fin ocho medios de cultivo en 22 muestras (Cuadros núms. 11 y 12).

En las 64 muestras restantes se emplearon únicamente los medios MAF, MAF-2 y S-110, este último como testigo.

Las medias del número total de estafilococos por muestra en estas 64 fueron: S-110=26.500 MAF=23.200 y MAF-2=23.700.

Las medias de estafilococos considerados coagulasa positivos en las muestras anteriores resultaron: S-110=1.100; MAF=590 y MAF-2=600.

En varias ocasiones se sometieron a la prueba de coagulasa colonias aisladas del medio S-110 como sospechosas de ser coagulasa positivas y en los casos en que en las placas paralelas de medios MAF no se detectaba la presencia de este tipo de gérmenes. Los resultados fueron negativos al no hallarse estafilococos capaces de coagular el plasma.

2. Pruebas de inhibición de cultivos puros.

Los resultados de esta experiencia se reseñan en el Cuadro número 13.

Los porcentajes se hallan referidos al contejo de colonias en agar-sangre, que se consideró como prueba testigo.

3. Indices de crecimiento de otros microorganismos no estafilocócicos en los medios de cultivo comparados.

Los porcentajes de contaminación para hongos, levaduras y bacterias (especificando en éste último caso los géneros cuyo crecimiento se detectó sobre los medios selectivos), figuran relacionados en el Cuadro número 14.

C. DEL ESTUDIO ENZIMATICO Y BIOQUIMICO.

(Necesidades de oxígeno, catalasa, reducción del telurito, fosfataza, lipasa, desoxirribonucleasa, gelatinasa, fermentación del manitol, fibrinolisis y coagulasa).

Todos los estafilococos clasificados como tales eran catalasa positivos y anaerobios facultativos.

Solamente tres de cincuenta y ocho coagulasa positivos produjeron fibrinolisis en placas de plasma humano. Estas cepas fueron los números 19, 36 y 52 (numeración de las Tablas III, IV y V).

El resto de las características fisiológicas y enzimáticas estudiadas se resume en el Cuadro número 15, para la totalidad de estafilococos aislados, y se detalla para los estafilococos coagulasa positivos, numerados del 1 al 58, en la Tabla III.

La licuación de gelatina en Thiogel Medium (BBL) resultó inferior al método Chapman-Stone, al correlacionar ambos con la producción de coagulasa, ya que solamente produjeron gelatinolisis en tubo el 20 por 100 de los estafilococos coagulasa positivos y el 28 por 100 de los negativos.

D. DE CRECIMIENTO MICROBIANO.

Los resultados de un estudio comparativo, numérico, de la flora estafilocócica de la leche natural en las distintas épocas del año, con relación a la acidez, temperatura de la muestra y número total de bacterias, se establecen, con sus valores medios, en los Cuadros núms 7 y 8.

La correlación entre las distintas variables se señala mediante diagramas de dispersión (Diagramas núms. 1 al 9) y los valores biométricos de las variables cuyos diagramas indican una mejor correlación (temperatura, número total de bacterias y de estafilococos por cc.) se expresan en los Cuadros núms. 9 y 10.

E. DE DESTRUCCION TERMICA.

De 24 muestras examinadas solamente una, recogida en la plataforma de recepción en el mes de diciembre de 1964, mostró estafilococos resistentes a la temperatura de 71,5° C. Las colonias parecían idénticas, por su morfología y coloración, sobre el medio S-110. Sometidas varias de ellas a la prueba de coagulasa resultaron ser coagulasa negativas.

Las características bioquímicas coincidieron con las de colonias semejantes aisladas de la misma muestra. En ésta el número total de estafilococos por cc. había sido elevado, alcanzando la cifra de 1.200.000.

En el resto de las muestras analizadas no se detectaron estafilococos resistentes a la temperatura de 71,5° C, durante dieciséis segundos, lo que significa, con arreglo a la técnica seguida, que el número de estafilococos quedó reducido probablemente a menos de 5 por cc.

F. DE HEMOLISIS.

En el Cuadro núm. 16 se señalan los patrones hemolíticos encontrados en la microflora estafilocócica de origen lácteo, así como las frecuencias y porcentajes tanto en los estafilococos coagulasa negativos como en los positivos.

En la Tabla IV se especifican las propiedades hemolíticas de los estafilococos coagulasa positivos al mismo tiempo que otras propiedades toxigénicas estudiadas.

G. DE PRODUCCION DE ENTEROTOXINA

1. Pruebas de gel-difusión e inoculaciones en gato.

Considerando estas pruebas como específicas los resultados obtenidos son los siguientes:

De 18 estafilococos coagulasa positivos sometidos a la prueba de inoculación al gato, cinco dieron resultados positivos como productores de enterotoxina.

De este mismo grupo los cinco positivos anteriores confirmaron esta propiedad en pruebas de gel-difusión, mientras que cuatro negativos no dieron reacción de precipitación alguna en gel.

Los resultados de estas determinaciones se reflejan en la Tabla IV.

2. Estudios sobre órgano aislado.

El ensayo sobre órgano aislado (intestino de cobayo) resultó positivo en 18 estafilococos coagulasa positivos sometidos a prueba (Ta-

bla IV), bien disminuyendo la capacidad de contracción futura del órgano frente a la histamina o la amplitud de contracción del intestino cuando ambas substancias (histamina y filtrado de cultivo del estafilococo problema) se ensayaban al mismo tiempo.

En general las cepas empleadas como control S-196E y S-6 daban reacciones netamente positivas mientras que los estafilococos coagulasa negativos utilizados con el mismo fin carecían de acción o ésta era muy débil y el *Micrococcus caseolyticus* no mostraba acción alguna.

Sin embargo durante el desarrollo de la experiencia se pudieron apreciar diferencias en cuanto a sensibilidad del intestino de cobayo frente a la acción de los productos ensayados (histamina y toxinas o productos del metabolismo de los estafilococos), debiéndose quizás estas variaciones a una diferente condición individual o idiosincrasia de los animales utilizados.

La adición de suero específico no modificó la contracción intestinal debida a la histamina, en presencia del filtrado de cultivo sometido a prueba, en ninguno de los cuatro casos examinados con esta técnica. Previamente el suero anti A había mostrado carecer de acción alguna propia sobre el intestino de cobayo.

3. Acción sobre presión sanguínea de gato.

Ninguno de los cultivos de las cinco cepas ensayadas poseía acción alguna sobre la presión sanguínea.

Las cinco cepas eran enterotóxicas, perteneciendo dos de ellas a la ATCC (S-196E y S-6) y tres a nuestra colección.

H. DE TIPIFICACION POR BACTERIOFAGOS.

(Series INTERNACIONAL y SETO-WILSON).

Los resultados obtenidos con estas técnicas, sobre 58 estafilococos coagulasa positivos, figuran en la Tabla V, donde se reseñan los patrones de lisis correspondientes a los distintos estafilococos.

Las frecuencias halladas para los fagos utilizados son dadas en el Cuadro núm. 17.

De los 58 gérmenes sometidos a prueba 41 resultaron tipificables por los fagos de la Serie Internacional empleando la dosis de rutina (RTD) y los 17 restantes con una dilución menor (RTD x 1.000).

Con la Serie Seto-Wilson se lograron tipificar 50 con la dosis corriente (RTD).

I. DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS.

Unicamente se encontraron estafilococos resistentes a estas drogas en el grupo de los coagulasa positivos (Cuadro núm. 18).

El porcentaje total de resistencias (incluyendo los medio resistentes) es de 22,2 por 100 para los coagulasa positivos lo que significaría el 4,6 como mínimo del total de gérmenes aislados.

Para los distintos antibióticos los porcentajes hallados (sobre estafilococos coagulasa positivos) son: dihidroestreptomicina, 5,1 por 100; estreptomicina, 5,1 por 100; penicilina 10,2 por 100; fenoxietil penicilina 1,8 por 100.

Uno de los estafilococos ensayados mostró a la vez resistencia a dos concentraciones de penicilina (P10 y P2) y a la estreptomicina y dihidroestreptomicina (DS10 y S10).

Otro de los estafilococos resistentes a la penicilina también resultó ser resistente a la fenoxietil penicilina.

No se encontraron estafilococos resistentes al resto de la gama de antibióticos utilizados en esta prueba.

J. CUADROS-RESUMEN DE RESULTADOS

CUADRO NUM. 2

Estafilococos coagulasa positivos aislados de muestras tomadas sobre muelle de recepción.

N.º muestras	Cepas diferentes por muestras	N.º TOTAL
4	3	12
9	2	18
16	1	16
21	0	0
50	← TOTALES →	46

CUADRO NUM. 3

Estafilococos aislados de las muestras a que se refiere el cuadro núm. 2.

N.º muestras	Cepas por muestras	N.º TOTAL
3	6	18
11	5	55
15	4	60
10	3	30
6	2	12
5	1	5
50	← TOTALES →	180

CUADRO NUM. 4

Estafilococos aislados de muestras de estable (1)

N.º muestras	Cepas diferentes por muestra	N.º TOTAL
6	2	12
16	1	16
14	0	—
36	← TOTALES →	28

(1) De ninguna muestra se aisló más de una cepa de estafilococos coagulasa positivos.

CUADRO NUM. 5

Estafilococos aislados (total)

	Estafilococos	Est. Coag. Posit.
Muestras andén	180	46
Muestras establo	28	28
TOTALES	208	58

CUADRO NUM. 6

Secreción mamaria de estafilococos. Muestras compuestas.
(Cuatro cuarterones).

N.º Vacas	Positivas	Coag. Posit.	Negativas
36	22	12	14
PORCENTAJE	61,1	33,3	38,8

CUADRO NUM. 7
Valores medios de las muestras de leche natural (1)

MUESTRAS	Julio-Setiembre 1964	Octubre- Diciembre 1964	Enero-Marzo 1965	M E S E S			MEDIAS TOTALES
				Julio 1965	Julio 1965	Julio 1965	
MEDIAS:							
1. pH	6,55	6,57	6,62	6,53	6,57	6,58	
2. Acidez (Dornic)	17	16,6	16,2	16,95	16,5	16,6	
3. Temperatura	19,4°	13,6°	11,3°	17,5°	21,7°	16,7°	
4. Gérmenes totales	1.623,8*	1.390,33	693,33	1.164,33	4.120	1.798,459	
5. Estafilococos	114	138,25	11,70	21,658	138,75	84,871	
6. Est. coag. posit.	17,8	22,25	1,708	3,40	2,0	9,431	
INDICES:							
1. Total gérmenes/est.	14,243**	10,006	59,25	53,75	29,693	33,388	
2. Total gérmenes/est. coag. posit.	91,22	62,50	400,0	342,45	206,0	220,43	
3. Estafilococos/est. coag. posit.	6,40	6,20	6,848	6,37	6,93	6,585	

(1) Determinados sobre las muestras recogidas en la plataforma de recepción.

* Miles de bacterias por cc.

** Número de bacterias por estafilococo.

CUADRO NUM. 8

Valores medios de las muestras de leche natural (1)

MUESTRAS	ESTABLOS			MEDIAS TOTALES
	N.º 1	N.º 2	N.º 3	
MEDIAS:				
1. Acidez (Dornic)	15,6	15,3	15,9	15,6
2. Gérmenes totales	68.479*	58.758	35.450	54.229
3. Estafilococos	13,6	5.150	26.283	14.816
4. Est. coag. posit.	1.958	1.458	22.308	8.574
INDICES:				
1. Total gérmenes/estafilococos	5.261**	11.409	1.348	6.002
2. Total gérmenes/est. coag. posit.	34.973	35.268	1.589	23.943
3. Estafilococos/est. coag. posit.	6.647	3.532	1.178	3.785

(1) Determinados sobre las muestras individuales de establo.

* Miles de bacterias por cc.

** Número de bacterias por estafilococo.

CUADRO NUM. 9

Analisis de distribución bidimensional

(Sobre muestras de andén y variables temperatura y número de bacterias por cc.)

1. Temperatura (X)
 - a. Media = 15,84
 - b. Desviación típica (Sx) = 4,79
2. Número de gérmenes (Y)
 - a. Media = 1.378.360
 - b. Desviación típica (Sy) = 1.750.632
3. Covarianza (Sxy):

$$Sxy = \frac{\sum XY}{N} - \frac{\sum X}{N} \cdot \frac{\sum Y}{N} \quad N = \text{Número de variables}$$

$$Sxy = 4.224.833$$
4. Correlación (r):

$$\frac{Sxy}{Sx Sy} = 0,5$$
5. Verificación de hipótesis
 ("t" de Student)

$$t = \frac{r \sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - r^2}} \quad n = \text{Número de variables}$$

$$t = 3,9 \quad P < 0,01 \quad (\text{Tabla de } t \text{ de Fisher})$$

Correlación significativa

CUADRO NUM. 10

Analisis de distribución bidimensional

(Sobre muestras de andén y variables temperatura y número de estafilococos por cc.)

1. Temperatura

(Datos cuadro núm. 9)

2. Número de estafilococos

- a. Media = 75.060
b. Sy = 184.817

3. Covarianza

Sxy = 626.624

4. Correlación

r = 0,5

5. Verificación de la hipótesis

("t" de Student)
t = 3,9 P < 0,001*Correlación altamente significativa*

CUADRO NUM. 11

Estudio comparativo de veintidós muestras de Andén en ocho medios de cultivo

(Número total de estafilococos: media de tres placas)

MUESTRAS	M E D I O S *							
	A**	B	C	D	E	F	G	H
N.º 1	171	210	221	10	7,5	75	200	150
" 2	21	22	31	12	4	22,1	23	25
" 3	21	19	21	7	5	14	32	20
" 4	99	91	100	4,7	13	49,5	90	95
" 5	147	210	215	3	4	23,5	210	200
" 6	30	27	21	3	4	17,4	27	30
" 7	40	31	51	1,7	1,5	3	39	35
" 8	55	42	59	2	0,4	22	51	50
" 9	90	71	95	6	4	8,5	87	85
" 10	610	750	800	19	23	110	550	450
" 11	93	141	131	11	11	15	143	150
" 12	17	14,5	16,1	7,5	2,5	7,1	13,1	15
" 13	49	62	61	3	1	5	61	55
" 14	64	63	79	6,1	4,4	7,8	49	40
" 15	12	9	9	3,1	2	4	11	10
" 16	7,5	9,5	7,5	0,6	0,4	2,1	14	10
" 17	15	8,1	6	0,2	0,2	0,7	7,1	5
" 18	10,5	13	11	2,1	3	4	11	9
" 19	41	17	35	10	9	11	38	40
" 20	1.414	1.300	1.230	51	42	231	1.900	1.200
" 21	21	12	15	7	4	14	51	45
" 22	75	42	50	9	7	8	110	80
TOTAL	3.103,0	3.164,1	3.264,6	179,0	152,9	654,7	3.717,2	2.799,0
MEDIA	141,0	143,8	148,3	8,1	6,9	29,7	168,9	127,2

* MEDIOS: A= Manitol-Sal-Agar; B= S-110; C= S-110-Yema de huevo; D= Telurito-Glicina; E= Vogel y Johnson; F= Baird-Parker; G= Finegold y Sweeney; H= Medio original del autor (MAF).

** Miles de estafilococos por cc.

CUADRO NUM. 12

Estudio comparativo de veintidós muestras de Anden en ocho medios de cultivo

(Número de estafilococos considerados coag. positivos: media de tres placas)

MUESTRAS	M E D I O S *								(1)
	A **	B	C	D	E	F	G	H	
N. ^o 1	12	75	93	2,1	—	—	112	—	—
" 2	15	14	17	7	3,1	8	19	10	1
" 3	16	11	14	4,5	1,1	7,5	14	10	1
" 4	83	41	50	4,7	4,2	4,3	72	40	1
" 5	147	172	181	2	2,3	17	201	20	1
" 6	21	27	22	3	2,2	7,5	9	12	1
" 7	30	14,1	20	—	—	1	23	—	—
" 8	15	13	40	1,3	—	—	41	—	—
" 9	44	31	33	5,1	3,5	7	30	6	1
" 10	191	200	121	16	11,0	72	351	80	1
" 11	95	31	41	—	—	1,2	141	—	—
" 12	9	13,1	14	5	2,1	7,5	11	15	—
" 13	13,1	11	13	—	—	—	40	—	—
" 14	21	14,1	17	2	1,1	3	33,1	4	1
" 15	10,1	9	9	3,1	2	4	7	6	2
" 16	5,1	4,1	6	—	—	1,1	2,2	—	—
" 17	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" 18	4,5	3,1	2,1	1	—	—	1	—	—
" 19	21	12	30	10	9	11	38	12	3
" 20	181	300	550	33,1	31	181	1.000	200	3
" 21	17	10	11	11	—	1	31	20	2
" 22	75	42	50	8	7	7	110	10	3
TOTAL	1.025,8	1.047,5	1.334,1	118,9	79,6	341,1	2.286,3	445	21
MEDIA	46,6	47,6	60,6	5,4	3,6	15,5	103,9	20,2	

* MEDIOS: A= Manitol-Sal-Agar; B= S-110; C= 110-Yema de huevo; D= Telurito-Glicina; E= Vogel y Johnson; F= Finegold y Sweeney; H= Medio original propio (MAF).

** Miles de estafilococos coagulasa positivos por cc.

(1) Número de cepas diferentes en el medio H confirmadas como coagulasa positivas.

CUADRO NUM. 13

Comportamiento de cuatro medios de cultivo frente a cepas de estafilococos coag. positivos aislados recientemente

CEPAS	M E D I O S				Agar—Sangre
	S-110	S-110—Yema de huevo	MAF	MAF—Yema de huevo	
N. ^o 1	51*	61	47	53	71
" 2	75	77	73	80	76
" 3	103	101	86	93	100
" 4	49	47	55	57	47
" 5	29	33	41	37	42
" 6	81	83	90	87	89
" 7	94	86	85	88	83
" 8	100	103	98	101	99
" 9	33	35	40	33	36
" 10	40	41	34	40	38
MEDIA	65,5	66,7	64,9	66,9	68,1
INHIBICION**	3,2 %	1,9 %	1,9 %	1,7 %	0

* Número de colonias por placa referido a la dilución 1:1×10⁴.

** Grado de inhibición de cada medio frente a cultivos puros.

CUADRO NUM. 14

Porcentaje de contaminaciones observadas en cada medio

MICROORGANISMOS	M E D I O S *							
	A	B	C	D	E	F	G	H
BACTERIAS:**								
1. Gram Negativas								
Proteus	2	3	3	—	—	1	7	2
Escherichia .	1	—	—	—	—	—	3	1
Aerobacter ..	2	3	4	—	—	2	8	1
Pseudomonas	1	1	2	—	—	1	4	1
2. Gram Positivas								
Bacillus	8	9	7	7	6	7	12	9
HONGOS ...	3	2	3	6	5	5	—	—
LEVAD.	1	1	2	3	2	2	—	—
TOTAL	18 %	19 %	21 %	16 %	13 %	18 %	34 %	14 %

* Medios: A = Manitol-Sal-Agar; B = S-110; C = S-110-Yema de huevo; D = Telurito-Glicina; E = Vogel y Johnson; F = Baird-Parker; G = Finegold y Sweeney; H = Medio original propio (MAF).

** Géneros según la clasificación bacteriana de BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1957).

CUADRO NUM. 15

Relación de las características fisiológicas y enzimáticas con la producción de estafilocoagulasa (1)

PROPIEDADES	EST. COAG. POSIT.	EST. COAG. NEG.
Pigmentación:		
1. Dorada	49 (84 %)	45 (30 %)
2. Blanca	9 (16 %)	70 (46 %)
3. Crema	0 (—)	35 (24 %)
Red. Telurito	51 (88 %)	50 (33 %)
Prod. Fosfatasa	58 (100 %)	25 (16 %)
Prod. Lipasa	7 (12 %)	40 (26 %)
Prod. Desoxirrib.	56 (96 %)	13 (8 %)
Lic. Gelatina*	35 (62 %)	26 (17 %)
Ferm. Manitol**	57 (98 %)	12 (8 %)

(1) Resumen del estudio bioquímico realizado sobre 208 estafilococos (150 coagulasa negativos y 58 coag. posit.)

* Método de Chapman-Stone.

** Fermentación anaerobia.

CUADRO NUM. 16

Patrones hemolíticos y sus frecuencias en estafilococos de origen lácteo (1)

TIPOS DE HEMOLISIS	EST. COAG. POSIT.	EST. COAG. NEG.
Alfa	2 (4 %)	1 (< 1 %)
Beta	17 (29 %)	39 (26 %)
Alfa-Beta	19 (33 %)	3 (2 %)
Alfa-Beta-Delta	5 (9 %)	1 (< 1 %)
Alfa-Delta*	0 (—)	0 (—)
Beta-Delta	12 (20 %)	31 (20 %)
Ninguna	3 (5 %)	75 (50 %)
RESUMEN		
1. Hemolisis**	55 (95 %)	75 (50 %)
2. No hemolisis	3 (5 %)	75 (50 %)

(1) Resumen de las determinaciones realizadas sobre la totalidad de gérmenes aislados.

* No incluimos, por ser dudosa su clasificación, 23 estafilococos que producían hemolisis tipo "viridans" en sangre humana y ligerísima lisis en sangre de conejo.

** Como norma general las reacciones de hemolisis en los estafilococos coagulasa negativos fueron menos intensas que las producidas por gérmenes positivos.

CUADRO NUM. 17

Distribución de frecuencias de los distintos fagotipos hallados en la tipificación de estafilococos (1)

BACTERIOFAGO	FRECUENCIA	BACTERIOFAGO	FRECUENCIA
79	2	47	7
52A	1	42E	22
52	2	80	3
29	2	80	3
55	2	6	7
3A	0	7	6
3B	2	42D	19
3C	2	71	0
83 A	15	S1	0
187	0	S2	50
75	1	S3	0
77	2	S4	0
53	0	S5	26
54	14	S6	3

(1) Experiencia efectuada sobre 58 estafilococos coagulasa positivos y referida a la R.T.D.

CUADRO NUM. 18

Sensibilidad-resistencia de los estafilococos a distintos antibióticos (1)

ANTIBIOTICO	EST. COAG. POSIT.	EST. COAG. NEG.
Aureomicina	ST	ST
Bacitracina	ST	ST
Cloromicetina	ST	ST
Dihidroestreptomicina	2R/1MR	ST
Dimetilclorotetraciclina	ST	ST
Dimetoxifénipenicilina	ST	ST
Eritromicina	ST	ST
Estreptomicina	2R/1MR	ST
Fenoxietilpenicilina	1MR	ST
Kanamicina	ST	ST
Neomicina	ST	ST
Novobiocina	ST	ST
Oleandomicina	ST	ST
Oxacilina	ST	ST
Penicilina	4R/2MR	ST
Polimixina B	ST	ST
Terramicina	ST	ST
Tetraciclina	ST	ST

(1) Investigación realizada sobre 58 estafilococos coagulasa positivos y 11 coagulasa negativos aislados de leche natural.

CLAVE: ST = Sensibles en su totalidad.

R = Resistentes en su totalidad.

RM = Medio resistentes.

2R/1MR = Dos resistentes y uno medio resistente.

V. — DISCUSIÓN

A. MUESTRAS

1. Técnica de recogida.

En la técnica de recogida de las muestras se siguieron las debidas precauciones de asepsia para evitar la contaminación de éstas por estafilococos de origen humano.

Por tanto, la flora estafilocócica aislada de la leche debe considerarse como normal de este producto, bien sea de origen bovino (intramamario o no) o de origen humano y adicionada a la leche durante las manipulaciones normales anteriores a su llegada a la plataforma de recepción.

En las muestras de establos en que no mediaron circunstancias de contaminación, la microflora tendría un origen bovino exclusivamente.

Con el fin de que los valores numéricos que se refieren a las características previas de las muestras fuesen representativos del momento en que éstas se tomaron, el análisis se realizó inmediatamente a su recogida (muestras de recepción) o previa conservación por el frío a temperaturas próximas a 0° C y dentro de un plazo no superior a veinticuatro horas (muestras de establos).

Se pretendió que las muestras fuesen de leche natural y los resultados obtenidos se refieren, por consiguiente, a este tipo de leche.

Con el fin de apreciar mejor las posibles variaciones estacionales de algunas de las características a estudiar, las muestras se recogieron con una determinada periodicidad.

2. Valores de pH, acidez, temperatura y número total de bacterias.

El pH fue determinado solamente en las muestras de andén y mostró una correlación estrecha con los valores de acidez total hallados por el método de Dornic (Cuadro núm. 7). En las muestras de establos se realizó únicamente esta última técnica.

La acidez no mostró una correlación definida con la temperatura, como se deduce de los datos del Cuadro número 7 y Tabla I, ni con el número total de gérmenes o estafilococos por cc. (Cuadros nú-

meros 7 y 8; Tabla I y II; Diagramas números 1, 2, 4, 5, 6 y 7) en las muestras de andén o de establo.

La ausencia de una correlación estrecha entre estas propiedades puede explicarse si consideramos que variaciones pequeñas de acidez ($\text{pH} \pm 0,04$; acidez total $\pm 0,4$ grados Dornic), dentro de una leche normal y fresca pueden deberse a múltiples causas, destacando las de tipo alimenticio y otras ligadas a la raza, período de lactación, gestación avanzada, etc.

Por otra parte es bien conocido el efecto bacteriostático de la leche recién ordeñada, así como su poder tampón.

Todos estos factores pueden enmascarar, durante algún tiempo, la correlación que más tarde, al sobreponerse la acidez los límites realmente normales, debe imponerse entre acidez, temperatura y flora microbiana.

Aparentemente los valores más llamativos dentro de la línea comentada corresponden a la relación entre los datos de temperatura, acidez y número de microorganismos, obtenidos el mes de julio de 1965 (Cuadro número 7 y Tabla I) pero esto se explica si aclaramos que en esa época se realizaron dos recogidas de leche al día y normalmente la leche llegaba a la planta a las pocas horas de su ordeño, muy frecuentemente con temperaturas superiores a la ambiental, como consecuencia de una falta de enfriamiento de la leche a continuación de ser ordeñada.

La correlación entre temperatura y número de bacterias o de estafilococos fue más definida y significativa (Cuadros números 7, 9 y 10; Tabla I; Diagramas números 3, 8 y 9), sin ser intensa.

En la investigación de correlación entre distintas variables hemos seguido las recomendaciones de FISHER (*loc. cit.*) tratando de hallar valores numéricos a partir de la orientación dada por los diagramas de dispersión y cuando éstos sugerían gráficamente una dependencia funcional entre las variables, con el fin de caracterizar la intensidad de la interdependencia.

En los casos mencionados últimamente los diagramas de dispersión y los coeficientes de correlación señalaron una correlación positiva y directa pero de intensidad media, aunque altamente significativa.

Las razones de este fenómeno entre dos variables, como número de bacterias o estafilococos y temperatura, en un medio de cultivo idó-

neo (leche), en que teóricamente debieran estar intensamente correlacionadas, dentro de los límites de temperatura observados, podría explicarse recordando las cualidades bacteriostáticas de la leche de reciente ordeño y señalando que la temperatura observada en la plataforma de recepción no siempre equivale a la del ambiente.

En ocasiones la leche puede haber sido enfriada al final del ordeño y ganado temperatura durante el transporte, en otras no enfriada, recogida y enviada rápidamente a la planta de transformación mostrando una temperatura que no se ha equilibrado con la ambiental en ningún momento por no transcurrir el tiempo necesario.

B. CULTIVO Y AISLAMIENTO

1. *Investigación comparativa.*

Diferentes autores han realizado estudios comparativos de los medios de cultivo de más amplio uso en el aislamiento de estafilococos, en orden a determinar su eficacia en los distintos alimentos (Mc DIVITT y HUSSEMAN, *loc. cit.*; CARTER *et al.*, 1960; INNES *loc. cit.*; COMINAZZINI, 1960; JAY, 1961 y 62; MOSEL, 1963; Mc DIVITT y TOPP, 1964; Mc DIVITT y JEROME, 1965).

Sin embargo, por lo que a la leche se refiere y aun considerando los estudios de Mc DIVITT y JEROME (*loc. cit.*) puede decirse que la literatura parecía estar aguardando por la publicación de datos comparativos sobre el aislamiento de estafilococos a partir de leche fresca, empleando varios medios de cultivo.

Los medios utilizados en este trabajo se seleccionaron entre los de más amplio uso y cuatro de ellos se encuentran en el mercado en forma deshidratada.

La elección del medio MAF (Fig. 1 al 3, incl.) para el aislamiento de colonias y estudio posterior de las cepas aisladas a partir de 22 muestras y del MAF-2 (Figs. 6 al 9, incl.) principalmente, para el resto de las muestras, se debió a que estos medios permiten sin duda alguna una perfecta diferenciación de colonias y por tanto el probable aislamiento de un mayor número de cepas diferentes.

Con el fin de evitar en lo posible aislar la misma cepa de estafilococo por duplicado, el aislamiento de colonias se realizó únicamente a partir de un solo medio.

2. *Análisis de los resultados obtenidos en los distintos medios empleados.*

a. *Manitol-Sal-Agar (Figs. 4 y 5).*

La media del número total de estafilococos (Cuadro número 11) es más elevado en este medio que en el MAF. La diferencia entre los porcentajes de inhibición (Cuadro número 13) de estos medios no justifica la diferencia de medias citada.

Pero si tenemos en cuenta que los medios CHAPMAN toleran el desarrollo de algunos micrococos y el tamaño alcanzado por las colonias permite confundirlos frecuentemente con estafilococos, podrían explicarse tales diferencias.

El medio tiene color rojo oscuro debido al indicador (rojo de fenol) y no facilita la diferenciación de colonias con la misma claridad que los MAF, incoloros. Por otra parte la fermentación aerobia del manitol es un dato de poco valor para la clasificación de los estafilococos ya que, en aerobiosis, es fermentado este azúcar por el 81 por 100 de los estafilococos coagulasa negativos (EVANS y NIVEN, *loc. cit.*).

En especial cuando las placas están bastante pobladas es frecuente un viraje total de la placa impidiendo observar esta característica fermentativa.

La diferencia con el medio MAF (Cuadro número 12) en cuanto a número de gérmenes coagulasa positivos va de acuerdo con los conceptos anteriormente expuestos.

El porcentaje de contaminaciones observadas (Cuadro número 14) es normal en este tipo de medios hipersalinos.

b. *S-110.*

Es quizá el medio más ampliamente usado en el estudio de estafilococos.

Las diferencias con los medios MAF y MAF-2 (Cuadros números 11 y 12 y Resultados B) tendrían una explicación semejante al caso anterior.

El porcentaje de inhibición encontrado (Cuadro número 13) va en contra de la afirmación taxativa de Mc DIVITT y HUSSEMAN (*loc. cit.*) para quienes el medio S-110 no inhibía el crecimiento de estafilococos en cultivo puro.

c. *S-110-Yema de huevo.*

Esta modificación del medio original de CHAPMAN (1946) fue introducida por HERMAN y MORELLI (*loc. cit.*) utilizando para descubrir portadores de gérmenes en pacientes hospitalizados.

Inmediatamente fue probado por CARTER (*loc. cit.*) con gérmenes de origen alimenticio. Según los autores citados la adición de yema de huevo estimulaba el crecimiento de los estafilococos patógenos, a la vez que servía de indicador al producir los estafilococos coagulasa positivos una opacidad alrededor de las colonias.

JAY (1963) encontró que este medio era el más efectivo, de seis medios comparados, en el aislamiento de colonias coagulasa positivas procedentes de carnes.

De los resultados obtenidos (Cuadros números 11 y 12) se deduce que favorece el crecimiento de micrococos. Las cifras de estafilococos probables coagulasa positivos son también las más elevadas, al añadir una nueva indicación (producción de opacidad) cuya correlación con la producción de coagulasa no existió en los estafilococos de origen bovino (Cuadro número 15).

Nuestra experiencia con este medio nos permite afirmar además que exalta la cromogénesis, acorta el tiempo de generación de los estafilococos con relación al medio S-110 y permite realizar las mismas pruebas que en éste (fermentación del manitol añadiendo púrpura de bromocresol sobre las colonias y licuación de gelatina por el método de Chapman Stone).

El porcentaje de contaminaciones ha sido el más elevado (Cuadro número 14) y su grado de inhibición para cultivos puros (Cuadro número 13) de los más bajos.

HERMAN (1964) (comunicación escrita) nos indicaba que con suficiente experiencia era éste un medio del que podía sacarse gran partido.

En nuestra opinión creemos que no es el más adecuado para emplear en aislamientos de origen lácteo, ya que la indicación de fermentación del manitol es engorrosa y de difícil interpretación. La pro-

ducción de opacidad no guarda correlación con la producción de coagulasa en estafilococos de este origen y la cromogenesia y licuación de gelatina no son las mejores pruebas para seleccionar estafilococos coagulasa positivos.

d. Telurito-glicina.

ZEBOVITZ, *et al.* (*loc. cit.*) pretendieron que este medio fuese específico para el aislamiento de estafilococos coagulasa positivos.

Varios autores, HOEPRICH *et al.* (*loc. cit.*), SEVEL y PLOMMET (*loc. cit.*) INNES (*loc. cit.*), MOORE y NELSON (*loc. cit.*), han manifestado que este medio inhibe muchas cepas de estafilococos en el primer aislamiento.

MOSSEL (1963) estima que este medio carece, además, de especificidad.

Los resultados obtenidos por nosotros (Cuadros números 11 y 12) confirman los de los autores mencionados y en especial los resultados de MOORE y NELSON (*loc. cit.*) quienes trabajaron con gérmenes de similar origen, demostrando que el medio telurito-glicina es totalmente inadecuado para usar en el aislamiento de estafilococos de leche natural.

Su elevado grado de toxicidad contrasta, por otra parte, con la facilidad con que crecen en él algunos microorganismos del género *Bacillus*, levaduras y hongos, estos últimos especialmente a temperatura ambiente.

e. Medio de Vogel y Johnson.

JAY (1963) encontró este medio totalmente insatisfactorio para el aislamiento de estafilococos de origen cárnico.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo (Cuadros números 11 y 12) lo definen como inaceptable para estafilococos de origen preferentemente bovino.

Sin embargo se trata de un medio usado por algunos investigadores y que se encuentra en el mercado en forma deshidratada.

Cabe pensar con sus autores y casas preparadoras que sea realmente útil en el aislamiento de estafilococos de portadores humanos en hospitales y clínicas.

f. Medio de Baird-Parker.

Fue ideado por su autor como específico para distinguir los estafilococos coagulasa positivos por medio de la reducción del telurito

y clareamiento de la opacidad de fondo del medio alrededor de las colonias.

La correlación entre estas propiedades y la producción de coagulasa era perfecta, según su autor, resultando superior a varios medios ensayados en el aislamiento de estafilococos de origen alimenticio.

Con la adición de piruvato sódico y huevo se conseguía estimular el crecimiento y anular los efectos inhibitorios del medio básico.

No conocemos por el momento otros comentarios ni resultados de estudios comparativos, acerca de este medio, que los de su autor y los nuestros.

Los obtenidos por nosotros (Cuadros números 11 y 12) revelan que para los estafilococos de origen lácteo (coagulasa positivos) tiene todavía un efecto inhibitor, comparado con el medio MAF, y su especificidad no es tan elevada como se indicó por su autor permitiendo el crecimiento de abundantes estafilococos coagulasa negativos.

En cinco muestras se detectaron estafilococos presumiblemente coagulasa positivos, evaluando los datos suministrados por este medio de cultivo, mientras que ninguno fermentaba claramente el manitol sobre el medio MAF. Sometidas a la prueba de coagulasa varias de estas colonias del medio de BAIRD éstas resultaron negativas.

Según nuestra opinión el aclaramiento de la opacidad del medio alrededor de las colonias, debida con toda probabilidad a la acción de la lipasa y la reducción del telurito, no son propiedades adecuadas en que basar una clasificación de estafilococos de origen bovino ya que estas propiedades no muestran la debida correlación con la producción de coagulasa (Cuadro número 15).

g. Medio de Finegold y Sweeney.

Los autores concluyen "el grado de selectividad es tal que el crecimiento de colonias con la morfología de estafilococos sobre este medio de polimixina sirve de excelente evidencia presuntiva de estafilococos coagulasa positivos".

Sin embargo BAIRD-PARKER (*loc. cit.*) y JAY (1963) no encontraron útil este medio cuando fue aplicado al control bacteriológico de alimentos.

Los resultados obtenidos por nosotros en este trabajo no pueden ser más desfavorables.

El poder selectivo fue muy limitado permitiendo el crecimiento de bacterias Gram negativas, cuyas colonias a las veinticuatro horas tomaban un aspecto parecido a las de estafilococos y en ocasiones se trataba de colonias mixtas.

Teniendo en cuenta la variedad de gérmenes que contiene la leche, este problema sería suficiente para desechar el medio de este uso de aislamiento en la flora láctica.

La cifra de gérmenes coagulasa positivos la hemos obtenido no considerando las colonias grises y planas de estafilococos, con toda seguridad saprofitas, en el momento del conteo. El número obtenido, sin embargo, no tiene valor alguno por las razones apuntadas.

Muy recientemente DAVIS y DAVIS (*loc. cit.*), modificaron ligeramente y de forma no substancial el medio de Finegold obteniendo resultados de gran éxito en el aislamiento de estafilococos a partir de "portadores" nasales.

Solamente el diferente origen de la flora microbiana y estafilocócica podría explicar estas notorias diferencias, a veces tan extremas como en el caso descrito.

h. Medios MAF (Figs. 1 al 3, incl. y 6 al 9, incl.)

La idea básica que nos llevó a concebir este tipo de medios fue la estrecha correlación existente entre la fermentación del manitol en medio anaerobio y la producción de coagulasa (EVANS, *loc. cit.*; EVANS y NIVEN, *loc. cit.*; MOSSEL, 1962).

Parece que esta idea no ha sido desarrollada previamente en el sentido de aplicarla a un medio selectivo, sólido, utilizado en un primer aislamiento a partir de una flora mixta.

Los medios con agar que utilizan un indicador de la fermentación del manitol (rojo de fenol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol) en medio aerobio, facilitan en muy poco la diferenciación de colonias por el carácter fermentativo ya que EVANS (1948) determinó que este polialcohol era fermentado en aerobiosis por un 81 por 100 de los estafilococos coagulasa negativos.

El propio color de estos medios supone un handicap para estudiar determinadas características sobre las colonias (tonalidad debida a pigmentación). La rápida difusión del ácido producido por fermentación del manitol es otro obstáculo que se suma a los anteriores.

Con el fin de armonizar la condición de anaerobiosis (o bajo potencial Redox) con un medio originalmente incoloro pero con capacidad indicativa de la reacción de las colonias, comenzamos utilizando como indicador la fuchina básica decolorada por bisulfito sódico. Los resultados fueron muy pobres ya que la mayoría de las colonias producían un color rosa pálido sobre el medio.

La utilización de la fuchina ácida fue el paso siguiente y definitivo en la búsqueda de un indicador adecuado a nuestro propósito.

Los estudios de MAITLAND y MARTIN (*loc. cit.*) señalaban que si bien el tioglicolato sódico no impide el crecimiento de estafilococos, el efecto del cloruro sódico era sin embargo mucho más inhibitorio en presencia de dicho compuesto, como si su acción inhibitoria aumentase a un bajo potencial de óxido-reducción.

Por otra parte CASTELLANI (citado por DACK, 1962a) consideró el ácido tioglicólico y cisteina como agentes bacteriostáticos para los estafilococos.

Más modernamente RAJ y LISTON (*loc. cit.*) describen un medio líquido anacróbico, para el aislamiento de estafilococos, con ácido tioglicólico y cistina.

JAY (1963), realizando un estudio comparativo de varios medios de cultivo, señaló que el medio líquido anterior seguía en eficacia, a la hora de descubrir estafilococos coagulasa positivos en carnes, al medio S-110-Yema de huevo.

El antibiótico cycloheximida (acti-diona) fue elegido para nuestro medio en lugar del bien conocido ácido sóblico y con el fin de evitar el crecimiento de mohos y levaduras sobre el medio selectivo. La ausencia de toxicidad, para los estafilococos, de este antibiótico a las dosis empleadas por FINEGOLD y SWEENEY (*loc. cit.*) habían sido confirmadas por WALKER *et al.* (*loc. cit.*), así como su eficacísima acción selectiva frente a hongos y levaduras.

El evitar el crecimiento de mohos sobre nuestros medios es particularmente conveniente con el fin de facilitar la diferenciación de distintos tipos de colonias de estafilococos, por su diferente coloración y morfología, prolongando la incubación de las placas a temperaturas de 20 a 30° C, óptimas para el desarrollo de levaduras y mohos.

La composición definitiva del medio fue fijada tras un breve e intenso tanteo experimental, utilizando varias cepas de estafilococos de

la ATCC y otras aisladas por nosotros en USA y en España, de origen lácteo.

El comienzo de este trabajo nos pareció un excelente motivo para someter a una prueba definitiva el medio de cultivo MAF.

La modificación MAF-2 se introdujo durante el curso de la investigación al considerar los trabajos de HERMAN y MORELLI (*loc. cit.*) y CARTER (*loc. cit.*) quienes obtuvieron excelentes resultados con la adición de yema de huevo al medio S-110, resultados que habían sido confirmados por otros autores (JAY, 1963).

INNES (*loc. cit.*) y BAIRD-PARKER (*loc. cit.*) habían utilizado también la yema de huevo para modificar el medio de ZEBOVITZ, *et. al.* (*loc. cit.*) alcanzando indudables éxitos.

Entre las ventajas que ofrece el empleo de nuestros medios (MAF y MAF-2), citaremos:

a) La posibilidad de estudiar los caracteres de una colonia no fermentadora como si se tratase de medios sin indicador de reacción.

b) Permiten el desarrollo de los estafilococos en superficie y su diferenciación en fermentadores y no fermentadores a bajo potencial de oxidorreducción.

c) En los fermentadores es posible comprobar una gama de colores de rosa pálido a rojo intenso (naranja oscuro en el medio MAF-2) en las colonias.

Normalmente todas las que producen un viraje intenso del medio, (colonias superficiales) con coagulasa positivas, pero no deben considerarse como tales las coloreadas muy débilmente.

Para lograr unas condiciones anaeróbicas más estrictas hemos utilizado frecuentemente uno de nuestros medios sembrando entre dos capas de agar (ver Materiales y Métodos B.3).

En el medio MAF-2 se ha podido comprobar que con este procedimiento, la difusión de los glicéridos del huevo procedentes del estrato inferior era suficiente para que las colonias que, al sembrar con la técnica en profundidad descrita, quedan accidentalmente sobre la superficie, produzcan "halos" de opacidad cuando son lipasa positivas (Figuras 6 al 9), de la misma forma que las sembradas en superficie.

Con este tipo de siembra entre dos capas de agar MAF o bien de MAF-2 y MAF cubriendo la primera, las colonias quedan aprisionadas en el seno del medio en condiciones de anaerobiosis y solamente

un pequeño porcentaje (10-20 por 100 según la pulcritud técnica empleada) asciende a la superficie al añadir el agar fundido.

Las colonias, en este caso, son puntiformes para las cepas de *Staphylococcus epidermidis* o *saprophyticus* y de tamaño superior a 1 mm. y color rosa pálido a rojo claro para las variedades de *Staphylococcus aureus*. Estas últimas pueden considerarse coagulasa positivas por la estrecha correlación entre las propiedades de fermentación aneróbica del manitol y producción de coagulasa.

Parece ser que con este tipo de medios utilizados en régimen de anaerobiosis o bajo potencial de oxidorreducción se elimina el crecimiento de muchos micrococos así como las reacciones oxidativas sobre el manitol, que en otros medios (Manitol-Sal-Agar) pueden enmascarar las verdaderas reacciones fermentativas.

La incubación de los medios descritos, se realizó siempre a 37° C durante 48 a 72 horas.

Los resultados obtenidos con estos medios en los estudios de aislamiento han sido realmente favorables y ya se han comentado al realizar la crítica de cada medio estudiado comparativamente.

El MAF-2 no ha mostrado apenas acción inhibitoria alguna (Cuadro número 13) y este medio pudiera ser por demás interesante en el aislamiento a partir de portadores y enfermos ya que parece existir una más alta correlación entre estafilococos productores de lipasa y coagulasa positivos en la microflora de origen humano (GUILLESPY y ALDER, *loc. cit.*; COLBECK *et al.*, *loc. cit.*; HERMAN y MORELLI, *loc. cit.*)

La adición de yema de huevo, por otra parte, acelera el desarrollo de las colonias, un poco lento en las primeras veinticuatro horas en el medio MAF, hecho que hemos podido comprobar repetidamente a lo largo de nuestro estudio.

En cambio no tuvo acción ninguna sobre las reacciones de fermentación de la manita por los estafilococos.

La inhibición de estafilococos coagulasa positivos en el medio MAF no pudo demostrarse a partir de ocho muestras que dieron resultados negativos en dicho medio (Cuadro número 12) y positivos en alguno de los restantes ya que las colonias supuestas coagulasa positivas no confirmaron esta propiedad al ser sometidas a pruebas específicas de coagulación de plasma.

Tampoco se comprobaron casos de inhibición de cepas coagulasa positivas en el medio MAF-2 con respecto al S-110 (ver Resultados B. 2).

C. DETERMINACION CUALITATIVA DE ENZIMAS Y OTRAS CARACTERISTICAS FISIOLOGICAS.

1. *Pigmentación.*

La primera indicación de esta propiedad fue recogida en los medios MAF, en el primer aislamiento, y se confirmó sobre placas S-110.

Según CHAPMAN (1945, 1946) este medio resulta muy apropiado para la investigación de este carácter y, posteriormente, ha sido utilizado con este fin por numerosísimos autores.

La tonalidad de la pigmentación en estos medios fue muy semejante y las pequeñas diferencias no eran suficientes para influir en la clasificación de los estafilococos por sus propiedades cromogénicas.

El 84 por 100 de los estafilococos dorados resultaron coagulasa positivos pero el 30 por 100 de los coagulasa negativos producían también un pigmento aureo y el 16 por 100 de los de color blanco eran coagulasa positivos (Cuadro número 15).

Estos resultados son más desfavorables a la correlación entre pigmentación dorada y producción de coagulasa que los obtenidos por EVANS y NIVEN (1950) con estafilococos de diferente origen (90 por 100 de los estafilococos dorados eran coagulasa positivos y solamente el 5 por 100 de los blancos poseían esta propiedad).

ZEMELMAN y LONGUERI (*loc. cit.*) han encontrado recientemente proporciones distintas a las nuestras a partir de leche fresca (el 96 por 100 de los estafilococos coagulasa positivos producían colonias de un color dorado muy acentuado).

Los pobres resultados obtenidos por MOSSEL (1962) con un 50 por 100 de estafilococos coagulasa positivos y negativos que producían un color amarillo pálido sobre el medio Manitol-Sal-Agar, pueden deberse en parte, a nuestro juicio, al uso de un medio que no es el más idóneo para el estudio de la pigmentación. (Figs. 4 y 5).

Por nuestra parte no hemos podido confirmar las opiniones de WILLIS y TURNER (*loc. cit.*) y SOMPOLINSKY (*loc. cit.*) hacia el valor

taxanómico de la pigmentación, cuando esta propiedad se estudia sobre cepas de estafilococos recientemente aisladas, puesto que resultó positiva en el 30 por 100 de los estafilococos coagulasa negativos.

2. *Reducción del telurito potásico.*

Los resultados alcanzados por nosotros (Cuadro número 15) difieren bastante de los de HOEPRICH, *et al.* (*loc. cit.*) y en especial de los de MOSSEL (1962) quien encontró que el 100 por 100 de las cepas de *S. aureus* reducían el telurito en tanto el 67 por 100 de las coagulasa negativas tenían el mismo tipo de crecimiento (colonias negras sobre el medio de ZEBOVITZ).

Nosotros hemos encontrado que todas las cepas coagulasa positivas capaces de crecer en el medio de telurito glicina producían un ennegrecimiento de la estria de siembra, pero siete de las cepas (12 por 100) no crecieron sobre este medio a pesar de la cantidad de "inoculum" empleada (Tabla III).

De los estafilococos coagulasa negativos solamente el 33 por 100 fueron capaces de reducir esta sal.

3. *Producción de fosfatasa.*

BARBER y KUPER (1951) encontraron una correlación casi perfecta entre la producción de esta enzima y de coagulasa. Ciento sesenta estafilococos de origen humano productores de fosfatasa resultaron ser coagulasa positivos a excepción de uno. De 58 fosfatasa negativos ninguno producía coagulasa.

Nuestros resultados difieren un tanto ya que el 16 por 100 de los coagulasa negativos dieron claramente la reacción de fosfatasa (Cuadro número 15) (Fig. 10).

4. *Opacidad en medios con yema de huevo.*

La correlación entre la producción de lipasa sobre el medio MAF-2 y de COLBECK *et al.* (*loc. cit.*) fue perfecta.

Los resultados obtenidos (Cuadro número 15) no concuerdan en absoluto con los de GUILLESPIE y ALDER (*loc. cit.*), ALDER *et al.* (*loc. cit.*), COLBECK *et al.* (*loc. cit.*) y HERMAN y MORELLI (*loc. cit.*), para

quienes la producción de lipasa era casi paralela con la de coagulasa, en los estafilococos estudiados.

La única explicación de estas diferencias sería el distinto origen de los estafilococos, humano en los casos citados y bovino en el nuestro.

Los resultados obtenidos por nosotros no revelan solamente una falta de concordancia de las dos propiedades citadas, sino la baja proporción de estafilococos productores de lipasa en los de origen lácteo (7 y 26 por 100 respectivamente de los grupos coagulasa positivo y negativo).

5. Producción de desoxirribonucleasa.

Nuestros resultados (Cuadro número 15) están en la línea de los de WEECKMAN y CATLIN (*loc. cit.*), DI SALVO (*loc. cit.*), JEFFRIES (*loc. cit.*) y JAY (1963).

La investigación de este enzima (Fig. 12) en los estafilococos de origen lácteo parece prometedora a la vista de los resultados obtenidos, en orden a determinar la propiedad de coagular el plasma.

6. Licuación de gelatina.

Los resultados alcanzados con esta técnica confirman los de EVANS y NIVEN (*loc. cit.*) y MOSSEL (1962) en el sentido de que la licuación de la gelatina no constituye un criterio afortunado en el estudio y clasificación de los estafilococos.

Recientemente ZEMELMAN y LONGUERI (*loc. cit.*) hallaron porcentajes del 75 por 100 de estafilococos coagulasa positivos, de origen lácteo, que licuaban la gelatina.

7. Fermentación del manitol.

La técnica de MOSSEL (1962) empleada por nosotros dio resultados concordantes con los obtenidos en los medios MAF.

Las únicas dificultades para interpretar estas técnicas pueden radicar en precisar a qué intensidad de viraje comienza a considerarse como fermentadora del manitol en anaerobiosis una colonia sobre los medios MAF, facilitándose la objetividad de esta observación cuando se siembra entre dos capas de agar.

Por lo que respecta a la técnica de MOSSEL (1962) el viraje debe ser total al final del período de incubación, es decir, debe llegar hasta el fondo del tubo.

Opinamos que una corta experiencia es suficiente para adquirir la necesaria seguridad en la interpretación correcta de ambas técnicas.

Los resultados que hemos obtenido con estafilococos de origen lácteo (Cuadro número 15) concuerdan perfectamente con los de EVANS y NIVEN (*loc. cit.*) y MOSSEL (*loc. cit.*) quienes sustentan el criterio mantenido en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1957) de considerar a la fermentación anaeróbica del manitol como prueba básica en la clasificación del género *Staphylococcus*.

Consideramos este punto realmente importante por cuanto esta línea no es compartida modernamente por algunos autores (COWAN y STEEL, *loc. cit.*)

El 8 por 100 de los estafilococos coagulasa negativos capaces de fermentar el manitol en anaerobiosis no puede considerarse significativo a la hora de valorar el número de estafilococos coagulasa positivos de una muestra, por lo que estimamos que la fermentación de este azúcar en anaerobiosis sobre placa de Petri es una de las pruebas más útiles cuando se trata de determinar el grado de patogeneidad de la microflora estafilocócica. Como prueba bioquímica individual es una de las más sobresalientes.

8. Fibrinolisis.

De los 58 estafilococos coagulasa positivos sometidos a esta prueba solamente tres mostraron propiedades fibrinolíticas para plasma humano (Resultados C).

De ellos únicamente el número 36 (Tabla V) reveló por su patrón lítico un probable origen humano.

BUTTIAUX (1962) y ELEK (*loc. cit.*) señalan la importancia de la investigación de este enzima en la diferenciación de estafilococos de origen animal y humano.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo parecen ser acordes con estas ideas.

9. Producción de coagulasa.

Fue una reacción extensamente practicada a lo largo de nuestro estudio.

En la investigación en serie de esta propiedad sobre los gérmenes aislados se utilizaron conjuntamente la técnica clásica, con la novedad de utilizar una placa de polivinilo alveolada, en lugar de tubos, con plasma de conejo y la siembra en placa de agar con plasma humano (ESBER y FAULKNER, DIFCO SUPPLEMENTARY LITERATURE).

En las verificaciones ocasionales de esta característica durante los trabajos de investigación fue utilizada solamente la segunda técnica (Fig. 11).

Los resultados obtenidos señalan que el número de vacas que albergaban estafilococos coagulasa positivos (muestras de establo) era del 33 por 100 (Cuadro número 5). Este porcentaje coincide con el encontrado por MILLER (*loc. cit.*) y es más bajo que el detectado por otros autores (HAUGE, *loc. cit.*; WALTERS, *loc. cit.*; MURRAY, *loc. cit.*)

Del número total de estafilococos aislados (208) el 28 por 100 (58) eran coagulasa positivos con distintos porcentajes en las muestras de establo (43 por 100 de cepas coagulasa positivos) y en las recogidas en la sección de recepción de la Industria lechera (25 por 100).

El número máximo de cepas diferentes de estafilococos coagulasa positivos, detectados por muestra, fue de tres en las muestras de andén (Cuadro número 2) y de una en las de establo.

Esta diferencia podría explicarse por el número no conocido de vacas de que procedían las muestras mixtas tomadas en la plataforma de recepción.

El mayor número de cepas de estafilococos saprofítos con relación a las de coagulasa positivos hallados en las muestras recogidas en la plataforma de recepción se explicaría por contaminaciones posteriores al ordeño, en establos de condiciones de higiene inferiores.

En las muestras de establo la transmisión de gérmenes coagulasa positivos por la máquina de ordeño, en relación con la predisposición anatómica a la infección del conducto del pezón, sería una posibilidad ya que se ha observado una mayor semejanza entre las características bioquímicas y fisiológicas de las cepas coagulasa positivas aisladas de cada establo.

D. CRECIMIENTO MICROBIANO.

Los resultados numéricos obtenidos del estudio previo de las muestras, especialmente por lo que al número de gérmenes por cc. se refiere, no pueden ser considerados como índices de crecimiento al considerar, por otra parte, de información sobre el número inicial de gérmenes de las muestras de andén.

Tomar como base comparativa los resultados hallados en las muestras de establo sería arriesgado ya que se trataba, en este caso, de establos de muy diferentes características higiénicas y de explotación, si se comparan con el tipo medio de establo rural que es más frecuente en la provincia de León.

Sin embargo, el hecho de existir una correlación positiva, directa y significativa entre el número de bacterias y de estafilococos por cc. y la temperatura de las muestras, nos lleva a pensar que el crecimiento de los distintos microorganismos haya influido en cierta medida en la distribución y características de la flora microbiana de la leche (Cuadro número 7, Tabla I).

Un aspecto muy interesante a este respecto sería la relación entre número total de bacterias y de estafilococos.

En la revisión bibliográfica se citan varios autores (HEINEMANN, TAKAHASHI y JOHNS, OBERHOFER y FRAZIER, TROLLER), para quienes el efecto de competición o antagonismo sobre el crecimiento de estafilococos por parte de otras bacterias puede dar lugar incluso a correlaciones negativas entre el número inicial de gérmenes y la multiplicación de estafilococos.

Los resultados obtenidos por nosotros (Indices del Cuadro número 7), si bien no son suficientes para negar la anterior doctrina, al no ser obtenidos en condiciones de experimentación controlada, no guardan relación alguna con ella ya que los índices 1 y 2 (Cuadro número 7) más elevados corresponden a los meses de enero a junio de 1965 en que el número total de bacterias fue más bajo.

El estudio detallado por muestra (Tabla I) de la relación número total de gérmenes y de estafilococos no añade nada nuevo al concepto expuesto.

El índice estafilococos: estafilococos coagulasa positivos se ha mantenido casi constante a lo largo de la experimentación.

E. DESTRUCCION POR EL CALOR.

Dejando a un lado las citas esporádicas de los casos de termo-resistencia anormal por parte de determinadas cepas de estafilococos, los estudios de HEINEMANN (*loc. cit.*), ANGELOTTI *et al.* (*loc. cit.*), WALTER y HARMON (*loc. cit.*) y principalmente de BHATT y BENNET (*loc. cit.*), nos han sugerido la posibilidad de que las relaciones de tiempo-temperatura que la legislación española autoriza como mínimo para la pasterización de la leche (Reglamento de 31 de julio de 1962) fuesen insuficientes para destruir la flora estafilocócica patógena de este producto.

Esto tendría gran importancia ya que, en la leche pasterizada, los estafilococos enterotóxicos encontrarían una escasa acción competitiva o antagonista por parte de otros microorganismos.

La prueba se planteó intentando una rápida permutación de calor entre la leche y el agua a semejanza de lo que ocurre en un pasterizador de placas de un tiempo de retención de dieciséis segundos a la temperatura máxima.

No podemos afirmar, a la vista de nuestros resultados (apartado E), que la temperatura de calentamiento de 71,5º C durante dieciséis segundos no sea suficiente para destruir la totalidad de la flora patógena puesto que solamente en una muestra de las veinticuatro ensayadas se pudieron detectar estafilococos y éstos que parecían corresponder a una sola cepa no eran coagulasa positivos (patógenos).

Sin embargo la literatura no hace distinción entre la resistencia al calor de los estafilococos patógenos y banales y esto nos lleva a considerar de nuevo y con mayores probabilidades, la posibilidad que las investigaciones de los autores citados nos habían sugerido.

Creemos por tanto del máximo interés la realización de estudios más amplios de resistencia y destrucción térmicas, con el fin de precisar si el número y cepas de estafilococos que se encuentran corrientemente en la leche natural de nuestro país representan un peligro real para la eficacia de la pasterización, determinando a su vez los valores D, z y F de la flora estafilocócica de la leche natural en España.

F. HEMOLISINAS.

Los resultados que hemos alcanzado en este estudio no concuerdan muy exactamente con los estudios recientes realizados sobre estafilococos de origen similar (leche fresca, de vaca).

CLARK y NELSON (*loc. cit.*) estudiando una serie de estafilococos coagulasa positivos de origen lácteo obtienen los siguientes resultados: 59 por 100 de los estudiados producían el tipo de hemolisina alfa-beta, 38 por 100 beta y 4 por 100 alfa.

ZEMELMAN y LONGUERI (*loc. cit.*), utilizando el CAMP test como técnica simple y rápida para determinar la producción de hemolisina beta, encuentran que el 76 por 100 de los estafilococos coagulasa positivos de origen lácteo producían este tipo de hemolisina, mientras que ninguno de los coagulasa negativos poseían esta propiedad.

Nuestros resultados tienen un significado diferente ya que sumando las combinaciones hemolíticas en las que interviene el tipo beta (Cuadro número 16) obtenemos porcentajes de 91 para los coagulasa positivos y de 49 para los negativos.

Según esto la determinación de hemolisina beta como medio simple de valorar la patogenicidad en estafilococos de origen lácteo propuesta por ZEMELMAN y LONGUERI (*loc. cit.*) sería de grado de correlación inferior, con la prueba de coagulasa, a las pruebas de fermentación anaerobia del manitol producción de desoxirribonucleasa y de fosfatasa (Cuadro número 15).

Por otra parte nuestros trabajos coinciden con los de OBIGER (*loc. cit.*), CLARK y NELSON (*loc. cit.*), LOKEN y HOYT (*loc. cit.*), RITTMEYER (*loc. cit.*), MUNCH-PETERSEN (*loc. cit.*), ZEMELMAN y LONGUERI (*loc. cit.*), encontrando una gran predominancia del tipo beta de hemolisina (Fig. 14). y sus combinaciones en estafilococos de origen lácteo (bovino), mientras que el tipo alfa (Fig. 13) se encontró solamente en un 4 por 100 de estafilococos coagulasa positivos y el alfa-beta-delta en un 5 por 100 (Cuadro número 16).

C. ENTEROTOXINA.

1. *Tipo de enterotoxina investigado.*

Los estudios de CASMAN (1963) indicaban que solamente la enterotoxina A parecía estar relacionada con los casos de intoxicación alimenticia, desde el momento en que todas las cepas experimentadas, procedentes de alimentos considerados como causa de intoxicación alimenticia, producían solamente enterotoxina A.

En 1961 FUJIWARA (citado por BERGDOLL, *loc. cit.*) comunicó el aislamiento de cinco cepas de estafilococos de alimentos sospechosos de producir intoxicaciones enterotóxicas y que producían enterotoxina B.

Sometidas a tipificación por fagos, los resultados señalaban un origen único. Las cepas habían sido aisladas de alimentos procedentes del mismo almacén a lo largo de un período de varios meses y las cepas se comprobó por CASMAN que producían también enterotoxina A (BERGDOLL, *loc. cit.*)

La doctrina expuesta justifica nuestra decisión de producir un suero antienterotóxico tipo A para emplear en técnicas de gel difusión.

2. *Inoculación en gato.*

CASMAN (1958) cree que la administración parenteral de enterotoxina en gatos es un método más sensible y económico que el uso del *Macacus rhesus* (DACK *et al.*, citados por DACK 1962a) y recomienda el método de HAMMON (*loc. cit.*), intravenoso.

THATCHER y ROBINSON (1962) han utilizado ampliamente este animal en sus experiencias, con resultados aceptables.

Los resultados obtenidos por nosotros, empleando este método biológico en el diagnóstico de la enterotoxina, revelan la presencia de un elevado número de estafilococos enterotóxicos dentro del grupo de coagulasa positivos estudiado, puesto que de 18 ensayados cinco dieron resultados positivos.

La proporción de estafilococos coagulasa positivos con propiedades de enterotóxicos sería de 28 por 100 con una significación limitada por el escaso número de estafilococos probados.

3. *Precipitación en gel.*

De los cinco estafilococos coagulasa positivos que dieron una reacción positiva frente a suero antienterotóxico A por técnicas de difusión en gel solamente uno (número 20 de la Tabla IV) dio una línea de precipitación visible sobre la placa de agar utilizando como antígeno enterotoxina fresca, sin concentrar.

En una segunda prueba concentrando sucesivamente por vacío a baja temperatura (reducción a 1 : 4 del volumen inicial) los filtrados de cultivo de los nueve estafilococos ensayados (Fig. 16), se pudieron confirmar los resultados obtenidos en la prueba biológica de inoculación.

La Fig. 37 muestra el concentrador utilizado y diseñado por nosotros.

Debemos subrayar que las cepas control utilizadas (ATCC 13565 y 13566) producían niveles de enterotoxina relativamente elevados (10-12 dosis vomitivas por cc.) en el medio empleado (TSA, BBL) y concretamente la número 13565 producía sobre gel líneas de precipitación visibles, sin necesidad de ser concentrada y también diluida al 1 : 1 (Figura 15).

En dos de los estafilococos sometidos a esta prueba se observó la presencia de un antígeno probablemente distinto al considerado como enterotoxina y con una equivalencia diferente frente al antisuero (Figura 18).

Esto podría deberse a una deficiente adsorción del suero empleado o bien a otra substancia de carácter antigénico, cuyo anticuerpo no fue adsorbido, y presente en parte de los estafilococos enterotóxicos.

4. *Organo aislado (intestino de cobayo).*

Las investigaciones de índole farmacobiológica sobre enterotoxina no han sido objeto de especial atención por parte de los microbiólogos.

Por otra parte parece como si las realizadas en este campo pretendiesen más aclarar definitivamente el modo de acción de la enterotoxina que la aplicación de un nuevo test biológico.

DACK (1963) señala, al comparar los resultados obtenidos por SUGIYAMA *et al.* (*loc. cit.*) con los de CLARK (citado por BERGDOLL, *loc.*

cit.), que el modo de acción de la toxina pudiera ser diferente según la especie animal.

Las controversias existentes sobre el mecanismo de acción de la enterotoxina, el disponer de gérmenes enterotoxigénicos y de reciente aislamiento junto con el material adecuado a estas investigaciones, nos llevó a estudiar los efectos de la enterotoxina sobre el intestino aislado y sobre la presión sanguínea.

Los resultados obtenidos son negativos en cuanto a la aplicación diagnóstica del método ya que, las toxinas o productos de metabolismo de todos los gérmenes coagulasa positivos ensayados, enterotóxicos o no, parecían tener alguna acción sobre el intestino de cobayo. En cambio las de los coagulasa negativos, de escasa complejidad enzimática carecían de acción sobre este órgano.

Los intentos de utilizar intestino de gato joven (3-4 semanas de edad) en esta prueba no fueron seguidos de éxito debido a la irregularidad en las contracciones en el medio nutricio empleado (descrito por PHARMACOPEE FRANCAISE, 1965). La Fig. 19 muestra una gráfica obtenida con intestino de gato.

El empleo de intestino (iléon) de cobayo dio resultados más regulares a pesar de las variaciones individuales observadas en cuanto a sensibilidad del órgano.

Todos los cultivos de estafilococos coagulasa positivos mostraron alguna acción sobre iléon de cobayo, bien disminuyendo la capacidad futura del órgano a una nueva contracción frente a la histamina (Figura 20, 21 y 22) o afectando la intensidad de contracción del intestino a la histamina cuando ambas substancias actuaban conjuntamente sobre el órgano (Fig. 23 al 28, incl.)

En este caso se utilizaba como término de comparación el medio de cultivo básico con histamina, añadida en la misma proporción que al cultivo de estafilococo a ensayar, siendo la diferencia en contracción la que indicaba la existencia o no de acción sobre el órgano aislado.

La única conclusión a que nos permite llegar por el momento el desarrollo de esta prueba es la de que en los filtrados de cultivos realizados a partir de estafilococos coagulasa positivos sobre medio TSA (BBL) semisólido, se produce una substancia de tipo metabólico con una acción antihistamínica para el intestino de cobayo.

El hecho de que el suero específico no inhibía esta acción "in vitro" nos lleva a pensar que no se trata de una enterotoxina tipo A (Fig. 28).

Esta acción antihistamínica no existe en cultivos de *Micrococcus caseolyticus* ni pudo apreciarse en los estafilococos coagulasa negativos ensayados.

5. Presión sanguínea de gato.

No se observó acción alguna de los cultivos enterotóxicos ensayados sobre la presión sanguínea de gato anestesiado. El hecho de que no se produjese tampoco ningún trastorno gastro-intestinal, a pesar de que en dos casos se prolongó la prueba con este fin de observación, parece apoyar la idea de que es absolutamente necesario al gato su mecanismo nervioso íntegro para que la toxina produzca sus efectos eméticos.

H. TIPIFICACION POR SERIES DE BACTERIOFAGOS.

Este estudio se llevó a efecto con las series INTERNACIONALES y de SETO-WILSON, esta última específica para los estafilococos de origen bovino.

SETO *et al.* (*loc. cit.*) y SETO y WILSON (*loc. cit.*) habían propuesto una nueva serie de fagos, adaptados a estafilococos de origen bovino, con el fin de incrementar el índice de tipificación bacteriofágica en estos microorganismos.

Otros autores (NAKAGAWA, 1960abc; COLES y EISENTARK, 1959) han aconsejado el empleo de nuevas series de fagos para la tipificación de estafilococos de origen bovino en sus respectivos países.

NAKAGAWA (1960) había concluido que la serie INTERNACIONAL de fagos no era adecuada para la tipificación de estafilococos aislados de la leche en Japón y en consecuencia propuso nuevos tipos de bacteriófagos aislados de cepas de estafilococos, procedentes de ganado vacuno de aquel país.

Por lo que respecta a nuestros resultados hemos podido comprobar que la serie INTERNACIONAL de fagos fue eficaz, en la tipificación de

estafilococos coagulasa positivos, en un 77 por 100 puesto que de 58 gérmenes ensayados 41 resultaron tipificables (Tabla V). Utilizando la dilución 1.000 x RTD solamente tres no mostraron reacción alguna de lisis frente a los fagos de esta serie.

Con la serie de SETO-WILSON el porcentaje de lisis fue un 10 por 100 superior (Tabla V) ya que pudieron ser tipificados 50 estafilococos (87 por 100) con la dilución RTD.

Las frecuencias de susceptibilidad de los estafilococos frente a los distintos tipos de fagos (Cuadro número 17) señalan un predominio de los fagos 42A, 42D, 83A (accesorio) y 81, con frecuencias de 22 a 14.

En la serie SETO-WILSON predominaron, de forma casi absoluta, los fagos S2 (50) y S5 (26).

Es de destacar, no obstante, el hallazgo del modelo 80/81 (Figuras 30 y 31) que se considera de origen típicamente humano, con frecuencia asociado a cepas muy virulentas aisladas de infecciones humanas (SMITH, 1958).

Este tipo ha sido identificado en vacas de ordeño clínicamente normales (WALLACE *et al.*, 1960) pero investigaciones posteriores establecieron la presencia del mismo patrón lítico en estafilococos aislados de un vaquero que habitualmente atendía el ganado y en miembros de su familia padeciendo de diversas estafilococias.

Por otra parte el fago 81, no asociado al 80, merece una especial consideración ya que incluido en diferentes patrones líticos su hallazgo ha sido un hecho corriente en infecciones estafilocócicas en hospitales (SMITH 1958; LIBERTE, 1959); y, la frecuencia con que las cepas de estafilococos estudiadas reaccionaron frente a este tipo de fago es una de las más altas obtenidas a partir de la microflora de leche natural (24 por 100 de los estafilococos coagulasa positivos estudiados).

El porcentaje de estafilococos coagulasa positivos que resultaron susceptibles a la dosis RTD frente a algún patrón lítico de la serie INTERNACIONAL (77 por 100) ha resultado superior a los obtenidos con anterioridad por otros autores (COLES y EISENTARK, *loc. cit.*; NAKAGAWA, 1960c; SLANETZ y BARTLEY, *loc. cit.*)

Con la serie SETO-WILSON (*loc. cit.*) los resultados fueron semejantes a los alcanzados por SETO y WILSON (*loc. cit.*), SALOMON *et al.* (*loc. cit.*) y SLANETZ y BARTLEY (*loc. cit.*)

No podemos sacar conclusiones de las relaciones entre el patrón lítico y la propiedad de producir enterotoxina, debido al corto número de gérmenes enterotóxicos ensayados. Sin embargo debemos subrayar que los modelos o patrones de las cepas enterotóxicas fueron respectivamente: 42D, 54, 42E, 81; 6, 7, 47, 54, 75 y 83A; 54, 42E; 54, 42E, 81; repitiéndose el patrón 54, 42E en tres de los estafilococos enterotóxicos y el 81 en dos de ellos.

I. RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS.

Los resultados que se reflejan en el Cuadro número 18 y las proporciones de resistencia a los distintos antibióticos utilizados (Figura 35 y 36) revelan la existencia de un peligro real por parte de la microflora estafilocócica de la leche fresca, normal, de vaca.

Las proporciones de estafilococos resistentes a los antibióticos son muy superiores en los de origen humano (hasta 30 por 100 de resistentes a la penicilina) según BAILEY y SCOTT (*loc. cit.*), y en países en que los antibióticos son de uso más amplio se han encontrado porcentajes más elevados que los nuestros en estafilococos de idéntico origen (bovino) (WILSON, 1956; HOGH, 1960).

Sin embargo, habida cuenta del empleo, cada día más frecuente, de antibióticos en la clínica bovina, no es aventurado suponer que estas cifras obtenidas por nosotros (22,2 por 100 de estafilococos coagulasa positivos que mostraron alguna resistencia frente a antibióticos) y que son ya realmente significativas, se vean incrementadas progresivamente.

No hemos podido observar casos de resistencia cruzada al estilo de los descritos por GRAVENKEMPER *et al.* (*loc. cit.*) ya que la totalidad de las cepas de estafilococos sometidas a las pruebas de sensibilidad antibiótica fueron sensibles a la meticilina (dimetoxifénol penicilina).

El caso de la resistencia mixta a la penicilina y estreptomicina puede deberse a un tratamiento antibiótico incluyendo ambas drogas y el de resistencia a la penicilina y fenoxietil penicilina (Fig. 36) debiera considerarse como debido a la acción de la penicilinasa sobre un antibiótico del grupo de la penicilina, excluida la meticilina.

VI. — CONCLUSIONES

1.^a Las características bacteriológicas estudiadas inicialmente en las muestras de leche natural (acidez total, temperatura, número de gérmenes por cc., número de estafilococos y de estafilococos coagulasa positivos por ml), no guardan entre sí la intensidad de correlación que cabía esperar de la interdependencia de estos caracteres.

Los factores de tiempo, temperatura, naturaleza y número de la flora inicial de la leche serían fundamentales para el establecimiento de un mayor grado de correlación entre las citadas propiedades.

2.^a Se propone un nuevo medio de cultivo selectivo para el aislamiento de estafilococos de origen lácteo, basado en la creación de un ambiente con bajo potencial de oxidorreducción, fermentación del manitol y diferenciación de colonias por su tonalidad (cromogénesis) e intensidad con que fermentan el citado carbohidrato (color rosa pálido a rojo vivo en las colonias superficiales y rosa pálido con desarrollo superior a 1 mm., en profundidad.)

La variante MAF-2 se mostró superior, acortando el tiempo de generación de los estafilococos y con un menor grado de inhibición frente a cultivos puros, al medio original MAF, sin yema de huevo.

3.^a Se ha realizado una caracterización fisiológica y enzimática de los estafilococos aislados de leche natural resultando que, entre las pruebas seleccionadas, la fermentación anaeróbica del manitol, producción de fosfatasa y desoxirribonucleasa fueron las más adecuadas para detectar la calidad de patógenos (coagulasa positivos) en los estafilococos estudiados.

4.^a No se han podido confirmar los resultados recientes de otros autores que señalan una estrecha correlación entre la producción de hemolisina beta y coagulasa, en estafilococos aislados de leche natural.

5.^a En una de las veinticuatro muestras sometidas a la acción de una temperatura de 71,5° C durante dieciséis segundos (condiciones mínimas permitidas por la legislación española para la pasterización de la leche) se detectaron estafilococos coagulasa negativos, confirmándose este hecho la conveniencia de realizar estudios de resistencia térmica más amplios sobre la leche natural y su microflora.

6.^a Cinco de diez y ocho estafilococos coagulasa positivos de origen lácteo dieron resultados positivos a la prueba de enterotoxina

cuando se inoculó un filtrado de cultivo en gatos, por vía intravenosa. Los resultados fueron confirmados por técnicas de precipitación por difusión en gel (gel difusión), empleando un suero específico y siendo necesario concentrar la enterotoxina producida por cuatro de las cinco cepas estudiadas, para que apareciesen líneas visibles de precipitación en el gel.

7.^a En los cultivos de estafilococos coagulasa positivos se origina una substancia de tipo metabólico y con una acción antihistámica detectable sobre intestino (ileón) de cobayo en baño nutriente.

8.^a En armonía con la conclusión anterior creemos que sería del mayor interés determinar hasta qué punto los productos del metabolismo bacteriano del género *Staphylococcus*, carentes por sí mismos de una acción enterotóxica suficiente para provocar un cuadro clínico natural o experimental, podrían cooperar con la acción específica de la enterotoxina en el establecimiento de una sintomatología gastrointestinal típica.

9.^a La enterotoxina estafilocócica no manifestó acción alguna sobre la presión sanguínea de gato anestesiado.

10.^a Se sometieron a la tipificación por bacteriófagos (Series INTERNACIONAL y SETO-WILSON) la totalidad de estafilococos coagulasa positivos aislados, detectándose el patrón lítico 80/81, considerado de origen humano, así como otros patrones de origen animal que incluían el fago 81. Las cepas sensibles a este fago se catalogan como probables cepas virulentas, capaces de determinar infecciones en el hombre.

11.^a Los porcentajes de estafilococos coagulasa positivos sensibles a la acción lítica de los fagos de las series INTERNACIONAL y SETO-WILSON han sido de 77 y 87 por 100 respectivamente, situándose entre los más altos comunicados hasta la fecha.

12.^a La proporción de estafilococos de origen lácteo (bovino) resistentes a los diez y ocho antibióticos empleados en este estudio equivale a 22,2 por 100, dentro del grupo de los coagulasa positivos. No se ha estimado valor alguno de correlación entre la antibiorresistencia y otras propiedades estudiadas ya que el total de gérmenes resistentes encontrados no se consideró suficiente a este fin.

VII. — RESUMEN

Se han sometido a estudio 86 muestras de leche natural, 50 recogidas en la plataforma de recepción de una Industria lechera y el resto en tres establecimientos de la provincia de León.

Después de un estudio previo de las propiedades de cada muestra (pH, acidez total, temperatura, número total de gérmenes, de estafilococos, de estafilococos probables coagulasa positivos y determinación en 24 muestras de estafilococos supervivientes a la temperatura de 71,5° C durante diecisésis segundos) se procedió al aislamiento de las cepas diferenciables por los caracteres de las colonias.

Se aislaron un total de 208 estafilococos de los cuales 58 resultaron ser coagulasa positivos.

Los gérmenes aislados han sido ampliamente caracterizados desde los puntos de vista fisiológico, bioquímico y tóxico (determinación de hemolisinas y de enterotoxina, pero esta última solamente en diez y ocho estafilococos coagulasa positivos).

Así mismo los gérmenes coagulasa positivos fueron sometidos a la tipificación por fagos (Series INTERNACIONAL y SETO-WILSON) y a la acción de antibióticos con el fin de determinar la proporción de estafilococos resistentes a estas drogas en los de origen lácteo.

Con ocasión del presente estudio se probó un nuevo medio de cultivo selectivo (MAF) basado en el crecimiento de los estafilococos en condiciones de anaerobiosis o semianaerobiosis y utilización del manitol como fuente de carbono en estas circunstancias.

En armonía con los favorables resultados obtenidos con este medio, así como con su variante MAF-2, con yema de huevo, se propone su empleo como nueva técnica de aislamiento de estafilococos de origen lácteo.

De los resultados obtenidos del estudio inicial de las muestras (todas ellas con variaciones mínimas de acidez) se deduce que la intensidad de correlación entre algunos caracteres de éstas no es tan elevada como era de esperar, si se consideran los principios de que dependen estas propiedades (incremento de acidez debido a la fermentación de la lactosa producida por los gérmenes lácticos, y en relación a su vez con la temperatura, número de gérmenes, etc.), destacando así el papel de otras cualidades de la leche consideradas como secundarias (poder

bacteriostático inicial, efecto tampón, influencia de la alimentación en la acidez, etc.)

La caracterización enzimática ha dado lugar a una comparación de las pruebas utilizadas destacando la fermentación del manitol, producción de fosfatasa y desoxirribonucleasa como las más sobresalientes a la hora de determinar la capacidad patógena de los estafilococos, deducida en este caso de su aptitud para coagular los plasmas de conejo y humano.

La producción de enterotoxina se comprobó por inoculación al gato y se confirmó por técnicas de gel-difusión en los cinco casos positivos de los dieciocho probados.

Los intentos realizados de utilizar la técnica de valoración de histamina sobre órgano aislado (ileón de cobayo) y presión sanguínea de gato, en el diagnóstico de la enterotoxina, no dieron resultado práctico, pero se observó, en todos los gérmenes ensayados de equipo enzimático complejo, una ligera pero persistente acción en los filtrados de cultivo sobre ileón de cobayo perfundido en un líquido nutritivo.

Esta acción era de naturaleza antihistamínica.

Los fagos que más frecuentemente lisaron las cepas de estafilococos sometidos a prueba fueron los 42E, 42D, 83A, 54 y 81 de la serie INTERNACIONAL y el S2 y S5 de la serie SETO-WILSON.

Los índices de resistencia a los antibióticos en estafilococos de origen bovino son sorprendentemente elevados (22,2 por 100 de los gérmenes coagulasa positivos) en un país en que el empleo de antibióticos en la clínica bovina no está todavía masivamente difundido.

RESUME

A l'étude ont été soumis 86 échantillons de lait naturel dont 50 furent ramassés sur la plateforme d'une industrie laitière et les autres dans trois établissements de la province de Léon.

Après avoir étudié les propriétés de chaque échantillon (pH, acidité totale, température, nombre total de germes, de staphylocoques probablement coagulase positifs et la détermination chez 24 échantillons de staphylocoques survivants à la température de 71,5° C pendant 16 secondes), on a procédé à l'isolation des souches qui pouvaient être différenciées selon les caractères des colonies.

En total 208 staphylocoques ont été isolés, dont 58 se sont montrés coagulase positifs.

Les germes isolés ont été amplement caractérisées quant à la physiologie, la biochimie et la toxique (détermination de hemolysins et d'entérotoxine, mais la dernière chez 18 staphylocoques coagulase positifs seulement).

De même, les germes coagulase positives furent soumises à la lysotipie selon phages (série INTERNATIONALE et SETO-WILSON) et à l'action d'antibiotiques à fin de déterminer la proportion de staphylocoques qui peuvent résister à ces drogues entre ceux d'origine lactée.

A l'occasion de cette étude, on a essayé une nouvelle méthode de culture sélective (MAF), basée sur l'accroissement des staphylocoques dans des conditions d'anaérobiose ou bien de semi-anaérobiose et l'emploi de mannite comme source de carbonisation dans ces circonstances. En harmonie avec les résultats favorables, obtenus de cette nouvelle méthode, également qu'avec sa variante —MAF—2 avec jaune d'oeuf— on propose son emploi comme une nouvelle technique d'isolation de staphylocoques d'origine lactée.

Il se fait déduire des résultats obtenus de l'étude primaire des échantillons (tous avec une différence minime d'acidité) que l'intensité de corrélation entre quelques caractères de ceux-ci n'est pas aussi élevé qu'on pourrait le supposer, si l'on considère les principes desquels ces propriétés dépendent (renforcement d'acidité dû à la fermentation de la lactose produite par les germes lactiques, qui dépendent à leur tour de la température, du nombre de germes, etc.), tout en détachant ainsi le rôle d'autres qualités du lait, considérées secondaires (force bactériostatique initiale, effet buffer, influence d'alimentation dans l'acidité, etc.)

La caractérisation enzymathique a donné lieu à la comparaison des épreuves effectuées en détachant la fermentation de la mannite, production de desoxyribonuclease et de phosphatase comme les plus distinguées au moment où il fallait déterminer la capacité pathogène des staphylocoques, en ce cas déduite de son aptitude de coaguler le plasma de lapin ou le plasma humain.

La production d'entérotoxine a été prouvée par moyen d'inoculation chez un chat et elle a été ratifiée par des techniques de gel-diffusion dans tous les cinq cas positifs des 18 examinés.

Les épreuves réalisées sur l'emploi de la technique d'évaluation d'histamine sur un organe isolé (iléon de cobaye) et sur la pression sanguine du chat, n'ont pas donné de résultat pratique, mais on a remarqué chez toutes les germes examinées du type enzymathique complexe une action légère, mais insistante, dans les filtrations de culture sur l'iléon de cobaye baigné dans une liquide nutritive.

Cette action était d'aspect antihistaminique.

Les phages qui ont affecté le plus fréquemment les souches de staphylocoques soumises à l'épreuve, furent les 42E, 42D, 83A, 54 et 81 de la série Internationale et les S2 et S5 de la série SETO-WILSON.

Les indices de résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine bovine furent extraordinairement élevés (22,2 % des germes coagulase positives) dans un pays où l'emploi d'antibiotiques n'est pas encore amplement répandu.

SUMMARY

Studies have been carried out on 86 samples of raw milk, 50 taken from the reception department of a dairy Industry and the rest from three milking-sheds in the province of León.

After a preliminary study of the properties of each sample (pH, total acidity, temperature, total number of microorganisms, staphylococci, probable positive coagulase staphylococci, and the verification, in 24 samples, of some staphylococci which survived a temperature of 71,5° C for a period of 16 seconds) the isolation of the distinguishable strains was carried out according to the different morphologies of the colonies.

A total of 208 staphylococci were isolated of which 58 proved to be coagulase positive.

The isolated microorganisms have been amply characterized from the point of view of physiology, biochemistry and toxicity (verification of hemolysins and enterotoxin, but the latter in only 18 coagulase positive staphylococci).

At the same time the coagulase positive microorganisms were submitted to phage typing (INTERNATIONAL SERIES and SETO-WILSON) and to antibiotic action in order to establish the proportion of staphylococci of milk origin resistant to these drugs.

For the purpose of this study a new medium of selective culture (MAF) was used, based on the growth of staphylococci in anaerobic and semiaerobic conditions and the use of mannitol as a source of carbon in these circumstances. Due to the favourable results obtained with this medium, and also with the variation MAF-2, using egg-yolk, we propose its use as a new technique for the isolation of staphylococci of milk origin.

From the results obtained in the preliminary study of the samples (all with minimum differences in acidity) it is deduced that the correlation intensity between some qualities of the samples is not as high as was to be expected if the principles on which these properties depend are taken into consideration (increase in acidity due to the fermentation of the lactose produced by lactic bacteria, and at the same time in relation with the temperature number of microorganisms, etc.) underlining in this way the role of other milk qualities which are normally considered secondary (initial bacteriostatic power buffer effect, fodder influence in its acidity, etc.)

Enzymatic characterization has enabled a comparison of the test used underlining the fermentation of mannitol, phosphatase and desoxyribonuclease production as the most outstanding to determine the pathogenic capacity of staphylococci deduced in this case from its ability to coagulate rabbit and human plasma.

Enterotoxin production was checked by inoculation in cats and was confirmed by gel-diffusion techniques in the 5 positive cases of the 18 tested.

Experiments using the histamine valuation technique on an isolated organ (guinea pig ileum) and on cats' blood pressure, to diagnose enterotoxin, gave no practical result, but it was noticed, in all the microorganisms of complex enzymatic qualities tested, a light but persistent action, in the culture filtrates, on the guinea pig ileum submerged in a nutritious liquid.

This action was of an antihistaminic nature.

The phages which most frequently affected staphylococcus strains which were submitted to test were the 42E, 42D, 83A, 54 and 81 of the INTERNATIONAL SERIES and the S2 S5 of the SETO-WILSON SERIES.

The signs of resistance to antibiotics in staphylococci of bovine origin are surprisingly high (22,2 % of the coagulase positive microorganisms) in a country in which the use of antibiotics in bovine medical treatment is not yet widely extended.

ZUSAMMENFASSUNG

86 Muster normaler Milch wurden untersucht, davon 50 bei der Annahme einer Molkerei und der Rest in 3 Milchviehställen der Provinz León.

Nach einer vorbereitenden Untersuchung der Eigenschaften jedes einzelnen Musters (pH, Gessamtsäure, Temperatur, Gessamtzahl an Keimen, Staphylokokken, von Staphylokokken die auf Koagulase positiv reagieren, der Bestimmung von Staphylokokken bei 24 Mustern, die überlebten bei einer Temperatur von 71,5° C. während der Zeit von 16 Sekunden), wurden die unterscheidbaren Stämme isoliert, die sich durch die besonderen Eigenschaften der Kolonien unterschieden.

Es wurden insgesamt 208 Staphylokokken isoliert, von denen 58 Koagulasepositiv erkannt wurden.

Die so isolierten Keime unterschieden sich deutlich in physiologischer, biochemischer und toxischer Hinsicht (Bestimmung der Hämolyse und der Enterotoxine, die letztere aber nur bei 18 Koagulasepositiven Staphylokokken.)

Gleichzeitig wurden die Koagulase-positiven Keime einer Typisierung durch Pragen unterworfen (INTERNATIONALE und SETO-WILSON SERIEN), ebenso der Wirkung von Antibiotics, was zum Ziele hatte, das Verhältnis der Staphylokokken zu bestimmen, die solchen Drogen aus Milchprodukten gegenüber sich als widerstandsfähig erwiesen.

Bei der Gelegenheit der vorliegenden Studie untersuchten wir ein neues selektives Nährsubstrat (MAF), das sich auf dem Wachstum der Staphylokokken unter anaeroben oder halb-anaeroben Bedingungen und unter Benutzung von Mannitol als C-Quelle unter diesen Bedingungen aufbaute. Auf Grund der günstigen Ergebnisse mit diesem Mittel und

mit seiner Variante MAF-2, mit Eigelb, schlagen wir die Verwendung dieses Verfahrens als neue Technik für die Isolierung von Staphylokokken vor, die aus Milch isoliert wurden.

Nach den Ergebnissen zu urteilen, die wir aus dem vorläufigen Studium der Muster erhielten (alle zeigten minimale Unterschiede im Säuregehalt), kann gefolgert werden, dass die Intensität der Korrelation zwischen einzelnen Eigenschaften nicht so gross ist, wie man hätte erwarten dürfen, wenn man die Fundamente in Betracht zieht, von denen diese Eigenschaften abhängen (Erhöhung des Säuregehalts verursacht durch die Fermentation der Laktose, die von den in der Milch vorhandenen Keimen erzeugt wird, im Zusammenhang mit der Temperatur, der Anzahl der Keime usw.) Hierbei fällt auf, welche Rolle andese Eigenschaften der Milch spielen, die man sonst als zweitrangig betrachtet (die Fähigkeit Bakterien abzutöten, Puffereigenschaft, Einfluss der Ernährung auf den Säuregehalt, usw.)

Die enzymatischen Eigenschaften haben uns veranlasst, einen Vergleich unter den einzelnen Mustern anzustellen, bei denen die Manitolfermentation besondrs hervortrat, die Erzeugung von Phosphatase und Desoxyribonuclease als die drei wichtigsten, wenn man die pathogenen Eigenschaften der Staphylokokken bestimmt, die in diesem Falle aus ihrer Fähigkeit, das Plasma des Kaninchens und des Menschen zu fällen, gefolgert werden konnte.

Unsere Versuche, die Technik der Valoration des Histamins auf isoliertem Organ zu benutzen (Dünndarm des Meerschweinchens) und den Blutdruck bei der Katze bei der Diagnostik des Enterotoxins, haben uns keine praktischen Erfolge gebracht, trotzdem konnten wir aber beobachten, dass bei allen untersuchten Keimen der kompletten Enzymgruppe eine leichte aber andauernde Wirkung auf die Filtrate der Kulturen eintrat auf Dünndarm von Meerschweinchen, der mit einer Nährlösung getränkt war. Diese Wirkung hatte antihistaminischen Charakter.

Die Phagen, die am häufigsten die verschiedenen Stämme der Staphylokokken auflösten, die wir untersuchten, waren die Nummern 42E, 42D, 83A, 54, und 81 der INTERNATIONALEN SERIE und die Nummern S2 und S5 der SERIE SETO-WILSON.

Der Widerstandsindex gegenüber den Antibiotika von Staphylokokken von Rindern war auffallend hoch (22,2 % der Koagulase-positiven Keime) und das in einem Land, in dem die Verwendung von Antibiotika in der Rindermedizin noch nicht sehr häufig verbreitet ist.

VIII.—BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M. H. 1959.—*Bacteriophages*. New York: Interscience Publishers, Inc.
- ALDER, V. G., GILLESPIE, W. A. y HERDAN, G. (1953).—Production of opacity in egg-yolk broth by staphylococci from various sources *J. Path. Bacteriol.* 64: 205-210.
- ALLEN, V. D. y STOVAL, W. D. (1960).—Laboratory aspects of staphylococcal food poisoning from Colby cheese. *Am. J. Pub. Hlth.* 50: 880-885.
- ALLISON, V. D. (1949).—Discussion on food poisoning. *Proc. Roy Soc. Med.* 42: 216-220.
- ANDERSON, P. H. R. y STONE, D. M. (1955).—Staphylococcal food poisoning associate with spray-dried milk. *J. Hyg.* 53: 387.
- ANGELOTTI, R. (1963).—Detection of microbial pathogens in foods. *Microbiological quality of foods*. New York and London: Academic Press.
- ANGELOTTI, R. FOTER, N. J. y LEWIS, K. H. (1961).—Time temperature effects on salmonella and staphylococci in foods. III Thermal death times studies. *Appl. Microbiol.* 9: 308-315.
- ARMIJO, R., HENDERSON, D. A., TIMOTHEE, R., y ROBINSON, H. B. (1957).—Food poisoning outbreaks associated with spray dried milk. An epidemiologic study. *Am. J. Pub. Hlth.* 47: 1.093-1.097.
- BAILEY, W. R. y SCOTT, E. G. (1962).—*Diagnostic microbiologic*. Saint Louis: The C. V. Mosby Company.
- BAIRD-PARKER, A. C. (1962).—An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. Appl. Bact.* 25: 12-19.
- BARBER, M. A. (1914).—Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. *Philippine J. Science.* 9: 515-519.
- BARBER, M. y KUPER, J. W. A. (1951).—Identification of *Staphylococcus pyogenes* by phosphatase reaction. *J. Pathol. Bacteriol.* 63: 65-68.
- BAYLISS, M. (1940).—Studies on the mechanism of vomiting produced by staphylococcus enterotoxin. *J. Exper. Med.* 72: 669.
- BERGDOLL, M. S., SURGALLA, M. J. y DACK, G. M. (1959).—Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. *J. Immunol.* 83: 344-348.

BERGDOLL, M. S., SUGIYAMA, H. y DACK, G. M. (1959).—Staphylococcal enterotoxin I. Purification. *Arch. Biochem Biophysics*. 85: 62-69.

BERGDOLL, M. S. (1963).—Discussion of the nature and detection of staphylococcal enterotoxin. *Microbiological quality of foods*. New York and London: Academic Press.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1957). Baltimore: The Williams Wilkins Company.

BHATT, U. A. y BENNET, F. W. (1964).—Thermal death time studies of staphylococci in milk. *Program 59 th annual meeting. American Diary Science Association*. The University of Arizona, Tucson, Arizona.

BLAIR, J. E. y CARR, M. (1953).—The bacteriophage typing of staphylococci. *J. Infect. Dis.* 93: 1.

BLAIR, J. E. y WILLIAMS, R. E. O. (1961).—Phage typing of staphylococci. *Bull. World Health Org.* 24: 771-784.

BREED, R. S. (1956).—*Staphylococcus pyogenes* Rosenbach. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.* 6: 35-42.

BROWN, R. L. y EVANS, J. B. (1963).—Comparative physiology of antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 85: 1.409-1.412.

BUSTA, F. F. y JEZESKI, J. J. (1963).—Effect of sodium chloride concentration in an agar medium on growth of heat-shocked staphylococcus aureus. *Appl. Microbiol.* 11: 404-407.

BUTIAUX, R. (1957).—Donnes recents sur la microbiologie des enterocolites a staphylococci et a clostridia. *Inst. Pasteur Lille*. (Una monografia).

BUTIAUX, R. (1962).—Les cocci a Gram positif des aliments. Interpretation de leur présence au point de vue de l'higiène. *Ann. Inst. Pasteur Lille*. 13: 179-185.

BUTIAUX, R. y GAGNON, P. (1959).—Au sujet de la clasification des Pseudomonas et des Achromobacter. *Ann. Inst. Pasteur Lille*. 10: 121-149.

CAMPBELL, D. H., GARVEY, J. S., CREMER, N. E. y SUSSDORF, D. H. (1963).—*Methods in Immunology*. New York: W. A. Benjamin, Inc.

CARTER, CH. H. (1960).—Egg yolk agar for isolation of coagulase positive staphylococci. *J. Bacteriol.* 79: 753-754.

CARTER, CH., H., LEININGER, N. V. and SURKIEWICZ, B. F. (1960).—The use of staphylococcus medium 110 fortified with egg-yolk for isolating coagulase positive staphylococci. *Bact. Proc. Soc. Am. Bacteriologists*. p. 46.

CASMAN, E. P. (1958).—Serologic studies of, staphylococcal enterotoxin. *Publ. Hlth. Rep.* 73: 599-609.

CASMAN, E. P. (1960).—Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.* 85: 715-716.

CASMAN, E. P. (1963).—The nature and detection of staphylococcal enterotoxin. *Microbiological quality of foods*. New York: Academic Press.

CASMAN, E. P. y BENNET, R. W. (1961).—Simplified procedure for producing small amounts of potent staphylococcal enterotoxin. *Bact. Proc. Soc. Am. Bacteriologists*. p. 41.

CASMAN, E. P., BERGDOLL, M. S. y ROBINSON, J. (1963).—Designation of staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.* 85: 715-716.

CASMAN, E. P. y BENNET, R. W. (1963).—Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A. *J. Bacteriol.* 86: 18-23.

CIOFI, C. (1954).—Un notovole episodio di tossinfezione alimentare da formaggio pecorino inquinato da staphylococco enterotossico. *Igiene San. Publ.* 10: 495-504.

CLAPPER, W. E. y WOOD, D. C. (1954).—Comparison of three methods for the determination of coagulase activity in staphylococci. *J. Bacteriol.* 67: 545.

CLARK, W. S., Jr., MOORE, T. D. y NELSON, F. E. (1961).—Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from raw milk. *Appl. Microbiol.* 9: 195-199.

CLARK, W. S., Jr. y NELSON, F. S. (1961).—Multiplication of coagulase positive staphylococci in grade A raw milk samples. *J. Dairy Sci.* 44: 232-236.

CLARK, W. S., Jr. (1964).—Staphylococci in dairy products. Iowa State University of Science and Technology. *Grant N.º RG-5502 (c2)*. Final report.

COLBECK, J. C., WROHAN, H., GOUGH, R. A. y ALLMAN, B. A. (1956).—The importance of fomites in the spread of staphylococcal infections with particular reference to mattresses and washing facilities. *Can. Services Med. J.* 12: 563-580.

COLBECK, J. C. y SUTHERLAND, W. H. (1957).—Staphylococcal infections in surgical units: The need for comprehensive control. *Can. J. Surgery*. 1: 8-15.

COLES, E. H. y EISENTARK, A. (1959).—Staphylococcal Phages. III. Typing of *Staphylococcus aureus* cultures from the bovine udder. *Am. J. Vet. Res.* 20: 838-840.

COMINAZZINI, C. (1961).—Studio comparativo sull'efficacia del terreno di Zebowitz, Evans and Niven (1955)-agar-tellurito-glycina (A. T. G.) o del terreno di Chapman (1945)-agar-sale-manita (A. S. M.) nell'isolamento degli staphylococci coagulasi-positivi da prodotti vari. *Boll. Ist. Sieroter. Milano.* 40: 369-376.

COOPER, L. Z., MADOFF, M. A. y WEINSTEIN, L. (1963).—Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha-toxin. *J. Bacteriol.* 87: 27-135.

COWAN, S. T. y STEEL, K. J. (1964).—Comparison of differentiating criteria for staphylococci and micrococci. *J. Bacteriol.* 88: 804-805.

CROWLE, A. J. (1961).—*Immunodiffusion*. New York: Academic Press.

CRUICKSHANK, R. (1937).—Staphylocoagulase. *J. Path. Bacteriol.* 45: 295-303.

CHAPMAN, G. H. (1945).—The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.* 50: 201-203.

CHAPMAN, G. H. (1946).—A single culture medium for selective isolation of plasma coagulating staphylococci and improved testing of chromogenesis, plasma coagulation, manitol fermentation, and Stone reaction. *J. Bacteriol.* 51: 409-410.

CHAPMAN, G. H. (1949).—Comparison of Ludlam's medium with staphylococcus medium 110 for the isolation of staphylococci that clot blood. *J. Bacteriol.* 58: 823.

CHAPMAN, G. H., BERENS, C., CONRAD, C., PETERS, A. y CURCIO, L. (1934).—Coagulase and hemolisin tests as measures of pathogenicity of staphylococci. *J. Bacteriol.* 28: 343-363.

CHAPMAN, G. H. y BERENS, C. (1935).—Cristal violet agar as differential medium for staphylococci. *J. Bacteriol.* 29: 437.

CHAPMAN, G. H., LIEB, C. W. y CURCIO, L. G. (1937).—Isolation and cultural differentiation of food-poisoning staphylococci. *Food Research.* 2: 349-367.

CHRISTIE, R. y KEOGH, E. V. (1940).—Physiological and serological characteristics of staphylococci of human origin. *J. Path. Bacteriol.* 51: 189-197.

DACK, G. M. (1962a).—*Food Poisoning*. Chicago: The University Chicago Press.

DACK, G. M. (1962b).—Staphylococcal enterotoxin. *Chemical and biological hazards in food*. Ames: Iowa State University Press.

DACK, G. M. (1963).—Staphylococcus enterotoxin: a review. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 16: 1-12.

DAVIDSON, I. (1961).—Observations on the pathogenic staphylococci in a dairy herd during a period of six years. *Rest. Vet. Sci.* 2: 22-40.

DAVIS, N. A. y DAVIS, G. H. G. (1965).—Ecology of nasal staphylococci. *J. Bacteriol.* 89: 1.163-1.168.

DEWBERRY, E. B. (1959).—*Food poisoning, its nature, history and causation. Measures for its prevention and control*. London: Leonard Hill.

DI SALVO, J. (1958).—Desoxyribonuclease and coagulase activity of microcilli. *Med. Technicians Bull.* 9: 191-196.

DENEKE, A. y BLOBEL, H. (1962).—Fibrinogen media for studies on staphylococci. *J. Bacteriol.* 83: 533-537.

DOLMAN, C. E. (1939).—Staphylococcus enterotoxin. *Proc. 6th Pacific Science Congress* 5: 363-368.

DOLMAN, C. E. (1944).—Antigenic properties of staphylococcus enterotoxin. *Can. J. Publ. Hlth.* 337-351.

DOLMAN, C. E. y WILSON, R. J. (1940).—The Kitten test for staphylococcus enterotoxin. *Can. J. Publ. Hlth.* 31: 68-71.

DUTHIE, E. S. y LORNEZ, L. L. (1952).—Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity. *J. Gen. Microbiol.* 6: 95-107.

ELEK, S. D. y LEVI, E. (1950).—Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J. Path. Bacteriol.* 62:

ELEK, S. D. (1959).—*Staphylococcus pyogenes and its relation to disease*. London: E and S. Livingstone.

EVANS, J. B. (1947).—Anaerobic fermentation of manitol by staphylococci. *J. Bacteriol.* 54: 266.

EVANS, J. B. (1948).—Studies of staphylococci with special reference to the coagulase-positive types. *J. Bacteriol.* 55: 793-800.

EVANS, J. B. y NIVEN, C. F., Jr. (1950).—A comparative study of known food-poisoning staphylococci and related varieties. *J. Bacteriol.* 59: 545-550.

EVANS, J. B., BUETTNER, L. G. y NIVEN, C. F., Jr. (1950).—Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. *J. Bacteriol.* 60: 481-484.

EVANS, J. B., BRADFORD, W. L., Jr. and NIVEN, C. F. (1955).—Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.* 5: 61-66.

FINEGOLD, S. M. y SWEENEY, E. E. (1961).—New selective and differential medium for coagulase-positive staphylococci allowing rapid growth and strain differentiation. *J. Bacteriol.* 81: 363-641.

FISHER, R. A. (1946).—*Métodos estadísticos para investigadores*. Traducido de la 10.^a ed. inglesa. Madrid: Aguilar, S. A.

FISHER, R. A. y YATES, F. (1947).—*Tablas estadísticas para investigadores científicos*. Traducida de la 3.^a ed. inglesa. Madrid: Aguilar, S. A.

FISK, R. T. (1942).—Studies en staphylococci. I. Ocurrence of bacteriophage carriers among strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 71: 153-160.

FOLTZ, V. D., MICKELSEN, R., MARTIN, W. H. y HUNTER, C. A. (1960).—The incidence of potentially pathogenic staphylococci in dairy products at the consumer level. I. Fluid milk and fluid milk by-products. *J. Milk Food Technol.* 23: 280-283.

FRAZIER, W. C. (1958).—*Food Microbiology*. New York: Mc. Graw-Hill Book Company, Inc.

FRIEDMAN, M. y WHITE, J. D. (1964).—Immuno fluorescent demonstration of cell associated staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.* 89: 1.155.

FULTON, F. (1943).—Staphylococcal enterotoxin with especial reference to the kitten test. *Brit. J. Exp. Path.* 24: 65-69.

GALTON, M. M., NAHMIAS, A. J., SULZER, C. R., DELLI QUADRI, C. A., SMITH, P. B. y UPDYKE, E. L. (1963).—A comparative evaluation of methods from the isolation of coagulase-positive staphylococci from bovine milk. *XVII Welt-tierärstskongress*: Hannover 7/5/190.

GASTALDI, C. (1954).—Carica batterica e produzione di enterotoxina in un alimento artificialmente inquinato con staphylococchi enterotossici. *Riv. Ital. Ig.* 14: 616-623.

GEORGE, E., Jr., OLSON, J. C., Jr., JEZESKI, J. J. y COULTER, S. T. (1959).—The growth of staphylococci in condensed skinmilk. *J. Dairy Sci.* 42: 823-826.

GEORGE, CH., RUSSELL, K. E. y WILSON, J. B. (1962).—Characteristics of staphylococci from bovine milk. *J. Infect. Disease.* 110: 75-79.

GIBSON, T. y ABD-EL-MALEK, Y. (1957).—The development of bacterial populations in milk. *Can. J. Microbiol.* 3: 203-213.

GRABER, C. D., LATTA, R., FAIRCHILD, J. P. y VOGEL, E. H. (1958).—Production of opalescence by staphylococci in egg yolk medium, as an index to bacteriophage typability. *Am. J. Clin. Pathol.* 30: 314-317.

GRAVENKEMPER, CH. F., BRODIE, J. L. y KIRBY, W. M. M. (1965).—Resistance of coagulase-positive staphylococci to methicillin and oxacillin. *J. Bacteriol.* 89: 1.005-1.010.

GRETTLER, A. C., MUCCIOLO, P., EVANS, J. B. y NIVEN, C. F. Jr. (1955).—Vitamin nutrition of the staphylococci with special reference to their biotin requirements. *J. Bacteriol.* 10: 44-49.

GRIFFITH, L. J. y OSTRANDER, W. E. (1959).—A capillary tube method for determination of the coagulase reaction. *J. Lab. Clin. Med.* 53: 804-806.

GRISWOLD, D. M. (1950).—Food poisoning: a review of thirty-four outbreaks. *Am. J. Publ. Hlth.* 40: 1.398-1.401.

GUILLESPIE, W. A. y ALDER, V. A. (1952).—Production of opacity in egg-yolk media by coagulase positive staphylococci. *J. Pathol. Bacteriol.* 64: 187-199.

HALL, H. E., ANGELOTTI, R. y LEWIS, K. H. (1963).—Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in foods by gel-diffusion methods. *Publ. Hlth. Rep.* 12: 1.089-1.098.

HAMMON, W. Mc. D. (1941).—Staphylococcus enterotoxin: an improved cat test, chemical and immunological studies. *Am. J. Public. Health.* 31: 1191-1198.

HAUGE, S. (1951).—Staphylococcus food poisoning caused by enterotoxic staphylococci in milk. *Nord. vet. med.* 3: 931-956.

HAUGE, S. (1952).—Et utbrudd af stafylokokk forgifruing fra kalt av stafylokokker fra ku. *Nord. Hyg. Tidskr.* 3: 113-121.

HAUSLER, W. J., BYERS, E. J., SCARBOROUGH, L. C. Jr. y HENDRICKS, S. L. (1960).—Staphylococcal food intoxication due to cheddar cheese. II. Laboratory evaluation. *J. Milk and Food Tech.* 23: 1.

HEINEMANN, B. (1957).—Growth and thermal destruction of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* in heated and raw milk. *J. Dairy Sci.* 40: 1.585-1.589.

HENDRICKS, S. L., BELKNAP, R. A. y HAUSLER, W. J. (1959).—Staphylococcal food intoxication due to cheddar cheese. I. Epidemiology. *J. Milk Food Tech.* 22: 313-317.

HERMAN, LL. G. y MORELLI, F. A. (1960).—The growth and isolation of coagulase-positive staphylococci on medium. N.^o 110 fortified with egg-yolk. *Bacteriol. Proc.* p. 102.

HIBNICK, H. S. y BERGDOLL, M. S. (1959).—Staphylococcal enterotoxin, II. Chemistry. *Arch. Biochem. and Biophys.* 85: 70-73.

HILL, L. R. (1959).—The Adansonian classification of the staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* 20: 277-283.

HILL, L. G., SILVESTRI, P. I., FARCHI, G. y LANCIANI, P. (1965).—Automatic classification of staphylococci by a principal component analysis and a gradient method. *J. Bacteriol.* 89: 1.393-1.401.

HOEPRICH, F. D., CROFT, C. F. y WEST, L. M. (1960).—Tellurite reduction as an indicator of potentially pathogenic staphylococci. *J. Lab. Clin. Med.* 55: 120.

HOPTON, J. (1961).—A selective medium for the isolation and enumeration of coagulase positive staphylococci. *J. Appl. Bact.* 24: 121-124.

INNES, A. G. (1960).—Tellurite-egg agar, a selective differential medium for the isolation of coagulase-positive staphylococci. *J. Appl. Bact.* 23: 108-113.

JAROLMEN, H., BONDI, A. y CROWEL, R. L. (1965).—Transduction of *Staphylococcus aureus* to tetracycline resistance in vivo. *J. Bacteriol.* 89: 1.286-1.290.

JAY, J. M. (1961).—Incidence and properties of coagulase-positive staphylococci in certain market meats as determined on three selective media. *Appl. Microbiol.* 9: 228-232.

JAY, J. M. (1962).—Further studies on staphylococci in meats III. Occurrence and characteristics of coagulase-positive strains from a variety of nonfrozen market cuts. *Appl. Microbiol.* 10: 247-251.

JAY, J. M. (1963).—The relative efficacy of six selective media in isolating coagulase positive staphylococci from meats. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 69-74.

JEFFRIES, CH. D. (1961).—Comparison of six physiologic characteristics of staphylococci from laboratory specimens. *Am. J. Clin. Path.* 30: 114-118.

JEFFRIES, CH. D., HOLTMAN, D. F. y GUSE, D. G. (1957).—Rapid method for determining the activity of microorganisms on nuclei acids. *J. Bacteriol.* 76: 590-591.

JONES, A. C., KING, G. J. G., FENNEL, H. y STONE, D. (1957).—The growth of *Staphylococcus aureus* in milk with especial reference to food poisoning. *Month. Bull. Min. Hlth. Lab. Serv.* 16: 109.

JONES, D., DEIBEL, R. H. y NIVEN, C. F., JR. (1963a).—Identity of staphylococcus epidermidis. *J. Bacteriol.* 85: 62-67.

JONES, R. H., BENNET, F. W., SHEURING, J. J. y HENDERSON, H. B. (1963b).—Phage types and antibiograms of staphylococci from milk. *J. Dairy Sci.* 46: 609.

KADAN, R. S., MARTIN, W. H. y MICKELSEN, R. (1963).—Effects of ingredients used in condensed and frozen dairy products on thermal resistance of potentially pathogenic staphylococci. *Appl. Microbiol.* 11: 45-49.

KENNEDY, E. R., y BARBARA, J. F. (1952).—The inhibitory effect of triphenyl-tetrazolium on some strains of micrococci. *J. Bacteriol.* 63: 297.

KNIGHT, B. C. J. G. (1937).—The nutrition of staphylococcus aureus; nicotinic acid and vitamin B₁. *Biochem. J.* 31: 731-737.

KLASTRUP, O. (1955).—Krystalviolet agar til differentiering af stafilocokker isolerede fra aseptisk udtagne mælkprøver. Foreløbig meddelelse. *Nord. Vet. Med.* 7: 315-320.

KLASTRUP, O. (1958).—Om stafylokokmastitis. Polymixin blodagar til paviusning af koagulase positive haemolytiske staphylocokker i spandemaesl prøver. *Med. Vet. serumlab. Kbh.* 334.

KLEMPERER, R. y HAUGHTON, G. (1957).—A medium for the rapid recognition of penicillin-resistant coagulase positive staphylococci. *J. Clin. Path.* 10: 96.

KOCH, F. E. (1942).—Electivinährboden für staphylocokken. *Zentr. Bakt. Parasitenk.* 149: 122-124.

KRANSNITSKAYA, E. S. (1960).—K voprosu o stafilocokkowych intoksikatsiyakh V RSFSR. *Gigiena in sanit.* 25: 74-77.

KUMAR, S. y LINDORFER, R. K. (1962).—The characterization of staphylococcal toxins. I. The electrophoretic migration of the alpha haemolitic, dermonecrotic, lethal and leucocidal activities of crude toxin. *J. Exper. Med.* 115: 1.095-1.106.

KUMAR, S., LOKEN, K. I., KENYON, A. J. I. y LINDORFER, R. K. (1962).—The characterization of staphylococcal toxins. II The isolation and characterization of a homogeneous staphylococcal protein possessing alpha haemolitic, dermonecrotic, lethal and leucocidal activities. *J. Exper. Med.* 115: 1.107-1.115.

LIBERTE, J. A. (1959).—Staphylococcal disease - a challenge to the Hospital. *J. Pub. Hlth.* 49: 1.181.

LOKEN, K. I. y HOYT, H. H. (1961).—Studies on bovine staphylococci mastitis. I. Characterization of staphylococci. *Am. J. Veter. Res.* 23: 534-540.

LUDLAM, G. B. (1949).—A selective medium for the isolation of staphylococcus aureus from heavily contaminated material. *Monthly Bull. Min. Health.* 8: 15-20.

MAITLAND, H. B. y MARTYN, G. (1948).—A selective medium for isolating staphylococcus based on the differential inhibiting effect on increased concentrations of sodium chloride. *J. Path. Bacteriol.* 60: 553-561.

MASUROVSKY, E. B., y JORDAN, W. K. (1960).—Studies on the removal of *Staphylococcus aureus* from milk-contact surfaces by ultrasonic cleaning methods. *J. Dairy Sci.* 43: 1.545-1.559.

MC DIVITT, M. E. y HUSSEMAN, D. L. (1954).—Comparison of three media for the isolation of enterotoxigenic micrococci. *Am. J. Publ. Hlth.* 44: 1.455-1.459.

MC DIVITT, M. E. y TOPP, E. B. (1964).—Comparison of several selective media for isolation and differentiation of coagulase-positive strains of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 12: 169-172.

MC DIVITT, M. E. y JEROME, N. W. (1965).—Limitations of fibrinogen-polymixin medium in detecting coagulase positive staphylococci in raw milk. *Appl. Microbiol.* 13: 157-159.

MC FARLANE, R. G., OAKLEY, C. L. y ANDERSON, C. G. (1941).—Haemolysis and the production of opalescence in serum and lecithovitellin by the alfa toxin of Clostridium Welchii. *J. Path. Bacteriol.* 52: 99-103.

MEDILL-BROWN, M. y BRYSON, V. (1964).—Defined medium specific for coagulase-positive staphylococci. *Bact. Proc.* p. 62.

MICKELSEN, R., FOLTZ, V. D., MARTIN, W. A. y HUNTER, C. A. (1961).—The incidence of potentially pathogenic staphylococci in dairy products at the consumer level. II Cheese. *J. Milk Food Tech.* 24: 342-345.

MILLER, W. T. (1943).—Staphylococci in the bovine udder. *J. Bacteriol.* 45: 307.

MONDINI, S. y DOVADOLA, E. (1959).—Tpizzazione fagica di ceppi di staphylococco isolati da polli da farina di carne e di pesce e da mastiti actinogranulomatose bovine. *Zooprofilassi.* 14: 755-764.

MONDINI, S. y GASPARINI, U. (1960).—Studio di stafilococci isolati da mammella bovine sane. *Nuova vet.* 36: 84-94.

MOORE, T. D. y NELSON, F. E. (1960).—Ennumeration of staphylococcus on several tellurite-glycine media. *J. Milk Food Tech.* 25: 124-127.

MOSSEL, D. A. (1962).—Attempt in clasification of catalase positive staphylococci and micrococci. *J. Bacteriol.* 84: 1.140-1.147.

MOSSEL, D. A. (196).—The enumeration and identification of *Staphylococcus aureus* and some related catalasa positive cocci in foods. *Leeuwenhoek ned. Tijdschr.* 29: 213-214.

MUNCH-PETERSEN, E. y GARDINER, M. R. (1965).—Staphylococci in secretions from the bovine udder in Western Australia. *Aust. vet. J.* 41: 5-13.

MURRAY, J. G. (1960).—The incidence and possible significance of *Staphylococcus aureus* in milk. *Res. Exp. Rec. Minist. Agric. N. Ire.* 10: 167-174.

NAKAGAWA, M. (1960a).—Studies on bacteriophage typing of staphylococci isolated from bovine milk. I Typing by means of 20 phages of the International series. *Jap. J. vet. Res.* 2: 191-207.

NAKAGAWA, M. (1960b).—Studies on bacteriophage typing of staphylococci isolated from bovine milk. II Some observations on the lysogenic strains *Jap. J. Vet. Res.* 8: 279-284.

NAKAGAWA, M. (1960c).—Studies on bacteriophage typing of staphylococci isolated from bovine milk. III Typing by means of a new phage set. *Jap. J. Vet. Res.* 4: 331-342.

NANI, S., VALLEJO, L. C., TRIGUERIO, M. J. y NOTA, N. R. (1961).—Tipizzazione batteriofagica di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati in Argentina da casi di mastite movina. *Arch. Vet. Ital.* 12: 19-22.

NEWMAN, R. W. (1950).—Laboratory detection of food poisoning attributable to Dairy products. *J. Milk Food Tech.* 13: 226-246.

NIVEN, C. F., JR. (1962).—Microbial toxins: Cometary and discussion. *Chemical and biological hazards in food.* Ames, Iowa: Iowa State University Press.

OBERHOFER, T. R. y FRAZIER, W. C. (1960).—Competition of *Staphylococcus aureus* with other organisms. *J. Milk Food Tech.* 24: 172-175.

OBIGER, G. (1960).—Bewertung von *Staphylokokken* in Milch. *Milchwissenschaft.* 15: 107-113.

PARGAONKER, V. N. COLES, E. H. y EISENTARK, A. (1962).—Phage typing of *Staphylococcus aureus* associated with cases of bovine mastitis. *Amer. J. Vet. Res.* 23: 1.205-1.212.

PETERSON, A. C. BLACK, J. J. y GUNDERSON, M. F. (1962).—Staphylococci in competition. I Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrost. *Appl. Microbiol.* 10: 16-22.

PETERSON, A. C., BLACK, J. J. y GUNDERSON, M. F. (1962).—Staphylococci in competition. II Effect of total numbers and proportion of staphylococci in mixed cultures on growth in artificial culture medium. *Appl. Microbiol.* 10: 23-30.

PETERSON, A. C., BLACK, J. J. y GUNDERSON, M. F. (1964).—Staphylococci in competition. III Influence of pH and salt on staphylococcal growth in mixed populations. *Appl. Microbiol.* 12: 76-76.

PETERSON, A. C., BLACK, J. J. y GUNDERSON, M. F. (1964).—Staphylococci in competition. IV Effect of starch and kind and concentration of sugar on staphylococcal growth in mixed populations. *Appl. Microbiol.* 12: 77-82.

PETERSON, A. C., BLACK, J. J. y GUNDERSON, M. F. (1964).—Staphylococci in competition. V Effect of eggs, eggs plus carbohydrates and lipids on staphylococcal growth. *Appl. Microbiol.* 12: 83-86.

POST, F. J. (1959).—Reevaluation of the principles of food poisoning. *The Sanitarian. Jan-Feb.* 203.

POST, F. G., BLISS, A. H. y O'KEEFE, W. B. (1961).—Studies on the ecology of selected food poisoning organisms in foods. I Growth of *staphylococcus aureus* in cream and in a cream product. *J. Food Sci.* 26: 436-441.

PRICE, P., NEAVE, F. K., RIPPON, J. E. y WILLIAMS, R. E. O. (1954).—The use of phage typing and penicillin sensitivity test in studies of staphylococci from bovine mastitis. *J. Dairy. Res.* 21: 342-353.

RAJ, H. y LISTON, J. (1961).—Detection and enumeration of coagulase positive staphylococci. *Bacteriol. Proc.* p. 68.

READ, R. B., JR., BRADSHAW, J. y BLACK, L. A. (1965).—Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin. *Bacteriol. Proc.* p. 31.

REJAS, F. y OVEJERO, J. I. (1962).—Contribución al estudio de las intoxicaciones alimenticias provocadas por estafilococos enterotxi- cos. *An. Fac. Vet. León.* 8: 141-160.

RENSHAW, E. C. y SAN CLEMENTE, C. L. (1964).—Studies on li- pase prepared from *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol. Proc.* p. 61.

RIAZUL, H. y BALDWIN, J. N. (1964).—Purification and properties of staphylococcal beta-hemolisin. I Production of beta-hemolisin. *J. Bacteriol.* 88: 1.304-1.309.

RITTMAYER, H. (1964).—Breve aportación sobre la presencia de estafilococos en la leche embotellada. Traducido de la revista Archiv fur Lebensmittel-hygiene. *Subdirección General de Sanidad Veterinaria* (serie de traducciones remitidas por el servicio bibliográficos. Núm. 23).

ROBINSON, J., THATCHER, F. S. y GAGNON, J. (1958).—Studies with staphylococcal toxins. IV The purification and metallic requirements of specific hemolisins. *Can. J. Microbiol.* 4: 345-361.

ROBINSON, J. y THATCHER, F. S. (1963).—Studies with staphylococcal toxins. VII Separation of a proteolitic enzyme from alpha hemolisin. *Can. J. Microbiol.* 9: 697-702.

ROBINSON, J. y THATCHER, F. S. (1965).—Determination of staphylococcal enterotoxin by an indirect hemagglutination inhibition pro- cedure. *Bacteriol. Proc.* p. 72.

SAHA, A. L. y GANGULI, N. C. (1957).—An outbreak of staphylococcal food poisoning from consumption of Dahi. *Indian J. Publ. Hlth.* 1: 22-26.

SAIZ MORENO, L. (1958).—Aportación al estudio de las intoxica- ciones alimenticias por la endotoxina estafilocócica. *Rev. San. e Hig. Publ.* 32: 139-164.

SAIZ MORENO, L. (1963).—Estafilococos e intoxicaciones alimen- ticias. *Rev. Veter.* 28: 539-548.

SAN CLEMENTE, C. L. y ZOLLI, Z., JR. (1963).—Separation and characterization of extremely purified stafilocoagulase. *Bact. Proc.* p. 39.

SANDVIK, O. y BROWN, R. W. (1965).—Spectrophotometric cha- racterization of pigments produced by *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from bovine udders. *J. Bacteriol.* 89: 1.201-1.208.

SCHALM, O. W. y LASMANIS, J. (1957).—Distribution of micro- cocci and other bacteria in milk samples from a single dairy herd after twelve years of mastitis control. *Am. J. Vet. Res.* 69: 778-784.

SETO, J. T., KAESBERG, P. y WILSON, J. B. (1956).—Electron mi- croscopy and serology of staphylococcus phages. *J. Bacteriol.* 72: 847-850.

SETO, J. T. y WILSON, J. B. (1958).—Bacteriophage typing of micrococci of bovine origin. *Am. J. Veter. Res.* 19: 214-246.

SEVEL, B. y PLLOMET, M. (1960).—Adaptation d'un milieu se- lectif à l'isolation des staphylocoques de mammite. Application an diag- nostic d'étable. *Le Lait.* 40: 2.

SHAH, D. B. y WILSON, J. B. (1963).—Egg yolk factor of staphy- lococcus aureus. I. Nature of the and enzyme involved in the egg yolk opacity reaction. *J. Bacteriol.* 85: 516-521.

SHAH, D. B., RUSSELL, K. E., y WILSON, J. B. (1963).—Compa- rison of two media for the detection of the egg yolk factor of staphylo- coccus aureus. *J. Bacteriol.* 85: 1.181-1.182.

SHAH, D. B. and WILSON, J. B. (1965).—Egg yolk factor of *Staphylococcus aureus*. II Characterization of the lipase activity. *J. Bacteriol.* 89: 949-953.

SHAW, C., STITT, J. M. y COWAN, S. T. (1951).—Staphylococci and their classification. *J. Gen. Microbiol.* 5: 1.010-1.023.

SLANETZ, L. W. y BARTLEY, C. H. (1962).—Bacteriophage and serological typing of staphylococci from bovine mastitis. *J. Infect. Dis.* 110: 238-245.

SMITH, J. (1956).—Pathogenic organisms in dairy products. *Dairy Sci. Abs.* 6: art. 49.

SMITH, I. M. (1958).—*Staphylococcal Infections*. Chicago: The Year Book Publishers, Inc.

SMITH, P. B., MC COY, E. y WILSON, J. B. (1962).—Identification of staphylococci in nonfat dry milk by the fluorescent antibody technique. *J. Dairy Sci.* 6: 729-734.

SMITH, D. C., FOLTZ, V. D. y LORD, T. H. (1963).—Demonstration of induced synergetic hemolysis by "non hemolytic" *Staphylococcus* species. *J. Bacteriol.* 87: 188-195.

SNEDECOR, G. W. (1956).—*Statistical methods*. 5th ed. Ames: Iowa State University Press.

SOMPOLINSKY, D. (1962).—Chromogenesis by *Staphylococcus aureus* and typing according to pigmentation. *J. Lab. Clin. Med.* 60: 439-450.

STEEDE, F. D. F. and SMITH, H. W. (1954).—Staphylococcal food poisonning due to infected cow's milk. *Brit. med. J.* 4.887: 576-578.

STOLMAKOWA, A. N. (1954).—Obrazovanie stafilokokkovo enterotoksina V pishchevykh kh productakh V usloviyah eksperimenta. *Gigiene i Sanit.* 7: 28-31.

STONE, R. V. (1943).—Staphylococcus food poisoning and dairy products. *J. Milk Tech.* 6: 7-16.

SUGIYAMA, H., BERGDOLL, M. S. y DACK, G. M. (1958).—Staphylococcal enterotoxin: increased vomiting incidence in monkeys following subemetic doses of dihydroergotamine. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 97: 900-903.

SUGIYAMA, H., BERGDOLL, M. S. y DACK, G. M. (1960).—In vitro studies on staphylococcal enterotoxin production. *J. Bacteriol.* 80: 265-270.

SUGIYAMA, H., BERGDOLL, M. S. y DACK, G. M. (1962).—Early development of a temporary resistance to the emetic action of staphylococcal enterotoxin. *J. Infect. Dis.* 111: 233-238.

SUGIYAMA, H., CHOW, K. L. y DRAGSTEDT, L. R. (1961).—Study of emetic receptor sites for staphylococcal enterotoxin in monkeys. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* (Separata sin otras referencias).

SUGIYAMA, H., MC KISSIC, E. M., JR., y BERGDOLL, M. S. (1963).—Sensitivity of thorotrast-treated monkeys to staphylococcal enterotoxin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 113: 468-470.

SURGALLA, M. J., BERGDOLL, M. S. y DACK, G. M. (1953).—Staphylococcal enterotoxin: neutralization by rabbit antiserum. *J. Immunol.* 72: 398-403.

SWANSTROM, M. y ADAMS, M. H. (1951).—Agar layer method for production of high titre phage stocks. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* 78: 372.

TAKAGAKI, Y. (1960).—Studies on bacteriophage typing of staphylococci isolated from bovine milk. *Jap. J. Vet. Res.* 8: 218-219.

TAKAGI, S., BITO, J., HIRONAO, T. y BABA, T. (1961).—On the characters especially pathogenicity of *micrococaceae* isolated from milk. *Bull. Univ. Osaka.* 11: 51-58.

TAKAHASHI, I. y JOHNS, C. K. (1959).—*Staphylococcus aureus* in Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 42: 1.032-1.037.

TANNER, F. W. y TANNER, L. F. (1953).—*Food-borne infections and intoxications*. Champaign, Illinois: The Gerrard Press, Publishers.

THATCHER, F. S., y MATHESON, B. H. (1955).—Studies with staphylococcal toxins. II The specificity of enterotoxin. *Can. J. Microbiol.* 1: 382-400.

THATCHER, F. S. y SIMON, W. (1956).—A comparative appraisal of the properties of staphylococci isolated from clinical sites and from dairy products. *Cn. J. Microbiol.* 2: 703-714.

THATCHER, F. S. y SIMON, W. (1957).—Some physiological and toxicogenic properties of members of the genus *Micrococcus* in relation to taxonomy. *Intern. Bull. Bacteriol. Taxon.* 7: 1-36.

THATCHER, F. S. y ROBINSON, J. (1962).—Food poisoning: an analysis of staphylococcal toxins. *J. App. Bacteriol.* 25: 378-388.

TROLLER, J. A. (1962).—Suppression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria. *Diss. Abstr.* 23: 1.168-1.169.

VOGEL, R. A. y JOHNSON, M. (1960).—A modification of the tellurite-glycine medium for use in the identification of *Staphylococcus aureus*. *Publ. Hlth. Lab.* 18: 131-133.

WALKER, G. C., HARMON, L. G. y STINE, C. M. (1961).—Staphylococci in Colby cheese. *J. Dairy Sci.* 44: 1.272-1.282.

WALKER, G. C. y HARMON, L. G. (1962).—Thermal resistance of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 46: 601.

WALTERS, A. H. (1959).—The isolation of coagulase positive staphylococci from routine composite milk samples. *J. App. Bact.* 22: 248-252.

WARING, J. F. (1952).—Outbreak of food poisoning due to school milk *Rep. Chief. Med. Off. Minst. Educ.* p. 20.

WEECKMAN, B. y CATLIN, B. W. (1957).—Desoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J. Bacteriol.* 73: 747-763.

WILSON, G. S. y MILES, A. A. (1955).—*Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*. London: Edward Arnold (Publishers) Ltd.

WILLIAMS, R. E. O. y HARPER, G. J. (1947).—Staphylococcal haemolisins on sheep-blood agar with evidence for a fourth haemolisin. *J. Path. Bacteriol.* 59: 69-78.

WILLIAMS, R. E. O. y RIPPON, J. E. (1962).—Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Hyg.* 50: 320-353.

WILLIS, A. T. y TURNER, G. C. (1962).—Staphylococcal lipolysis and pigmentation. *J. Path. Bacteriol.* 84: 337-347.

WORMS, R. (1960).—*L'Infection staphylococcique*. París: Editions Médicales Flammarion.

WORSECK, M. (1956).—Ein Beitrag sur Bakteriologie der Staphylokokken mastitis. Berlin. *U. Münch. Wochschr.* 69: 146-149.

WORSECK, M., GÜRLICH, J. e INGEBORC, H. (1960).—Enterotoxic staphylococci in raw milk of Berlin dairy farms. *J. Hyg. Microbiol.* (Ref. tomada del *Dairy Sci. Abstr.* 1963).

WORSECK, M. (1960).—Enterotoxische Staphylokokken in Rohmilch. *Milchwissenschaft* 15: 525.

ZEBOVITZ, E., EVANS, J. B. y NIVEN, C. F. (1955).—Tellurito-glycine agar: a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive staphylococci. *J. Bacteriol.* 70: 686-690.

ZEMELMAN, R. y LONGUERI, L. (1965).—Characterization of staphylococci isolated from raw milk. *Appl. Microbiol.* 13: 167-170.



Fig. 1: Medio MAF. Colonias fermentadoras (color rosa) y no fermentadoras del manitol. Distintas tonalidades de pigmentación.

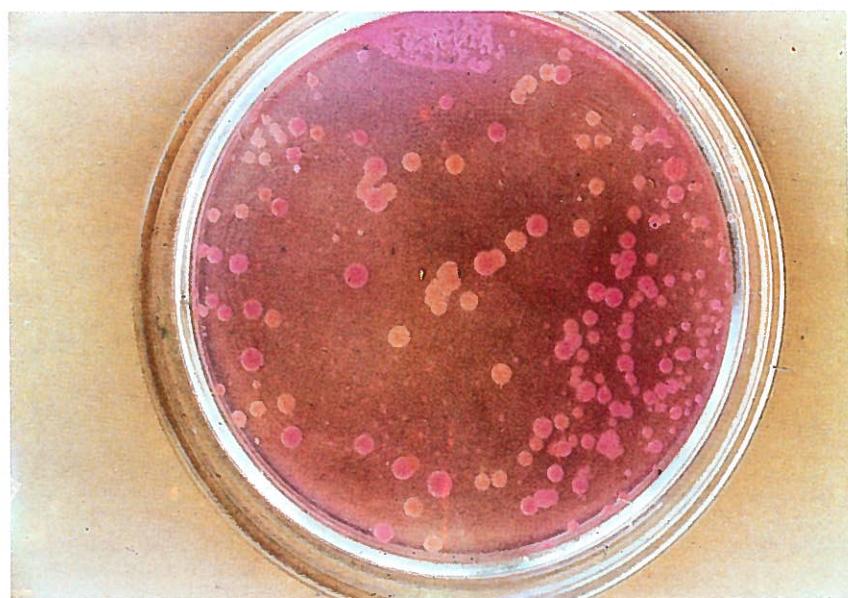


Fig. 2: Medio MAF. Distinto grado de desarrollo e intensidad de color entre los tipos de colonia superficial y profundo (colonias puntiformes).

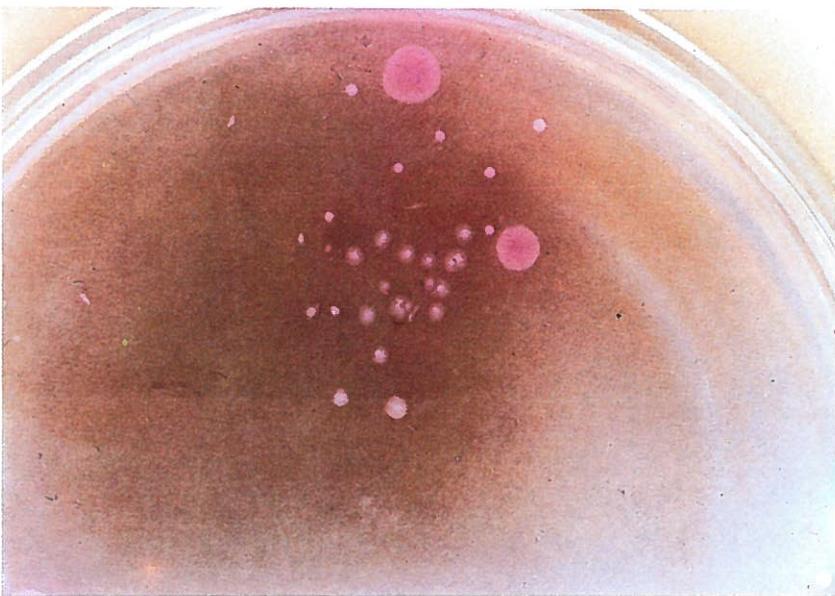


Fig. 3: Medio MAF. Colonias superficiales y sub-superficiales o profundas (puntiformes).

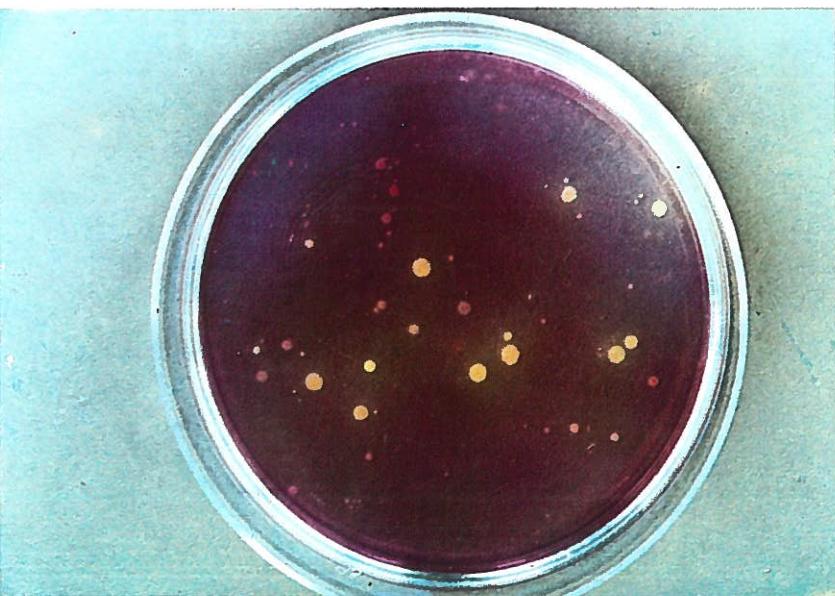


Fig. 4: Manitol-Sal-Agar (CHAPMAN). El color propio del medio enmascara la coloración debida a la pigmentación de las colonias.

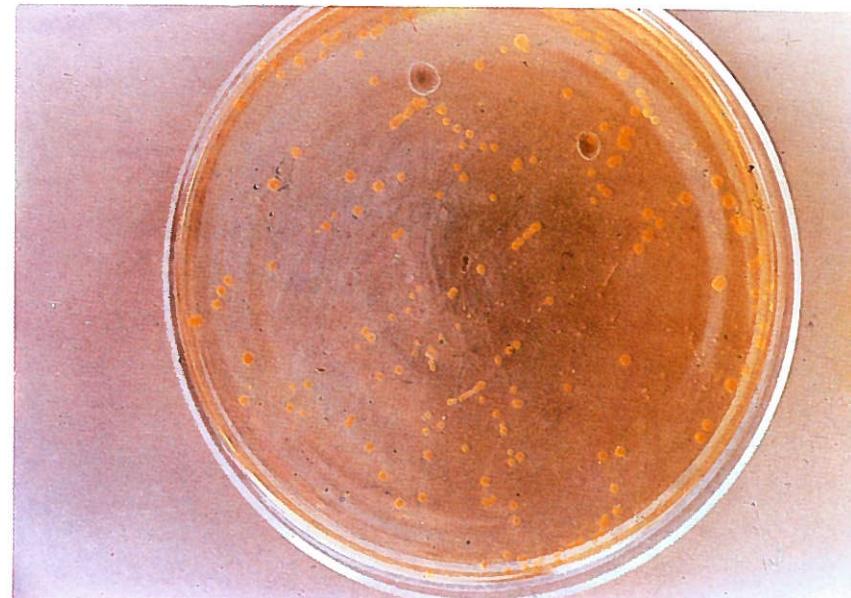


Fig. 5: Manitol-Sal-Agar. El viraje total del medio de cultivo impide precisar la tonalidad de las colonias.

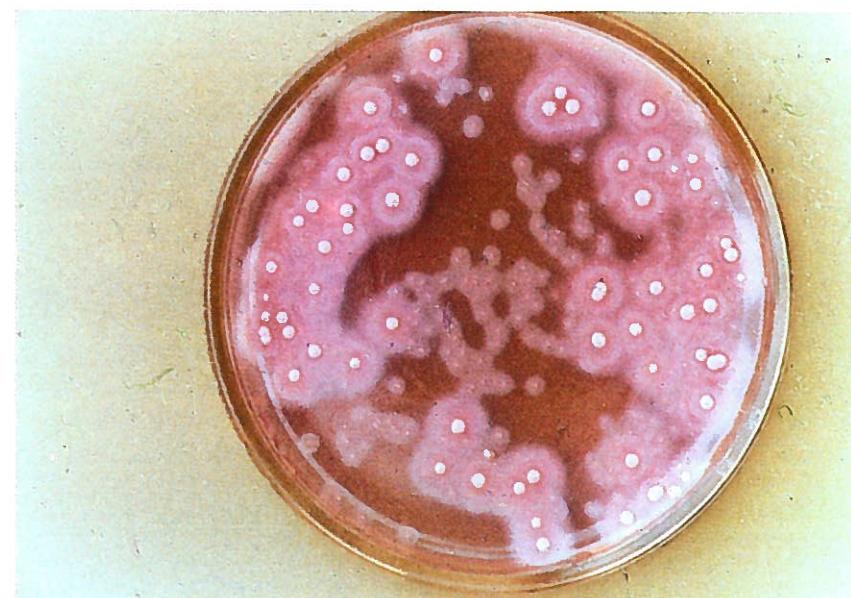


Fig. 6: Medio MAF2. Colonias superficiales y profundas.

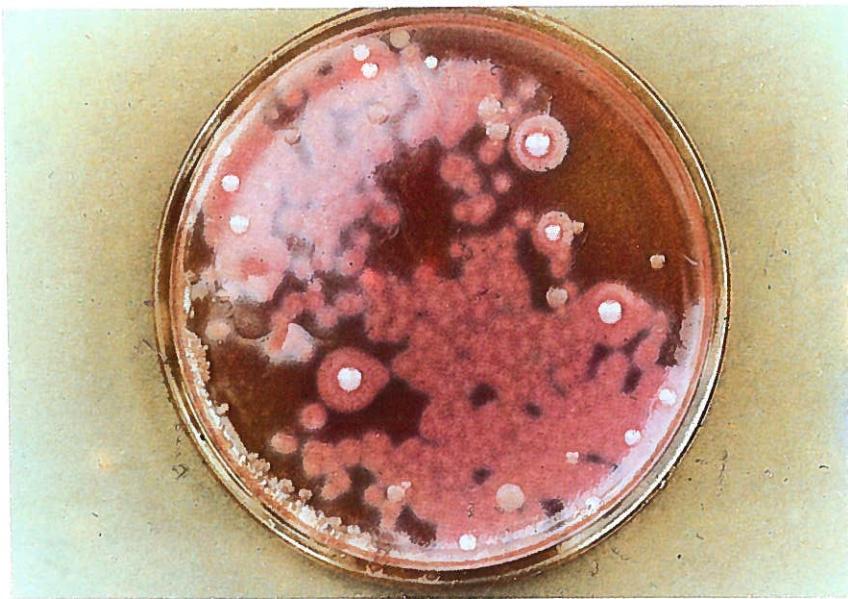


Fig. 7: Medio MAF-2. Colonias de estafilococos de distintas características enzimáticas.



Fig. 8: Medio MAF-2. Distintas clases de colonias de estafilococos y tipos de reacción.

— 140 —



Fig. 9: Medio MAF-2. Siembra en profundidad. Fermentación y producción de lipasa.

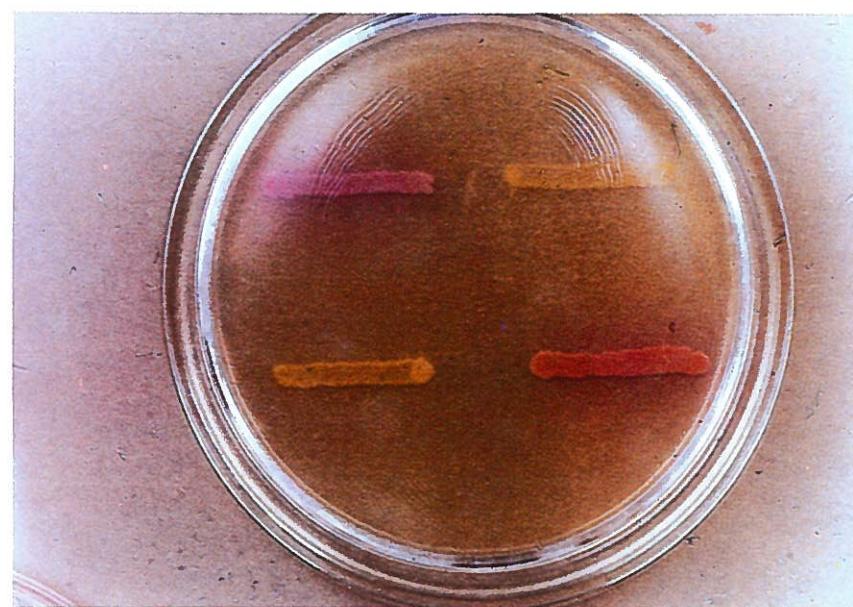


Fig. 10: Reacción de fosfatasa (Método de Barber y Kuper).

— 141 —



Fig. 11: Determinación de coagulasa en placa (Método de Esber y Faulkner).

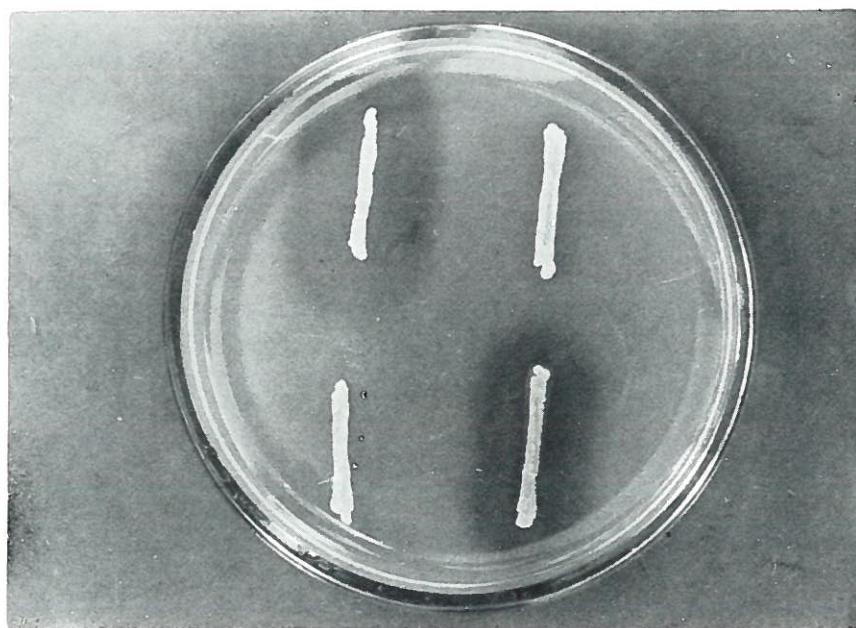


Fig. 12: Reacción de desoxirribonucleasa (técnica de Di Salvo).

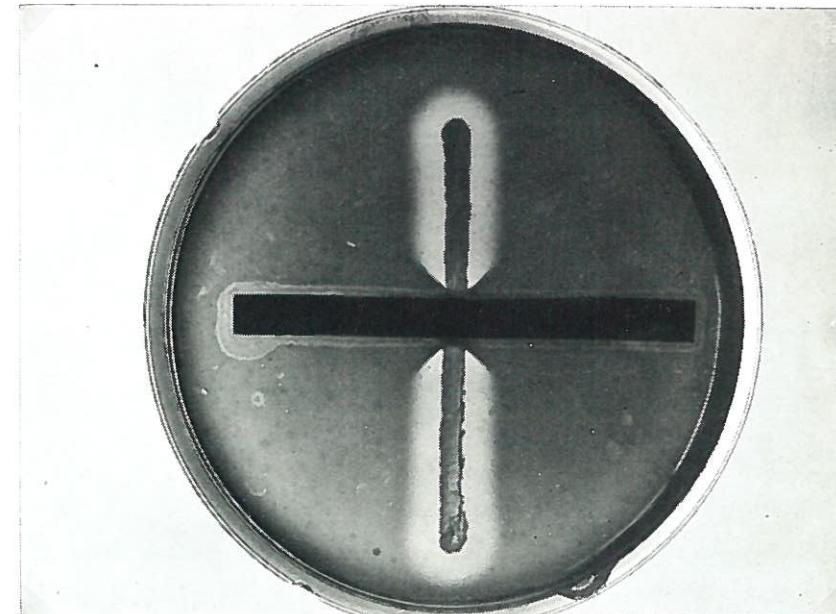


Fig. 13: Hemólisis tipo alfa inhibida parcialmente por suero específico antihemolítico (técnica de Elek y Levi).

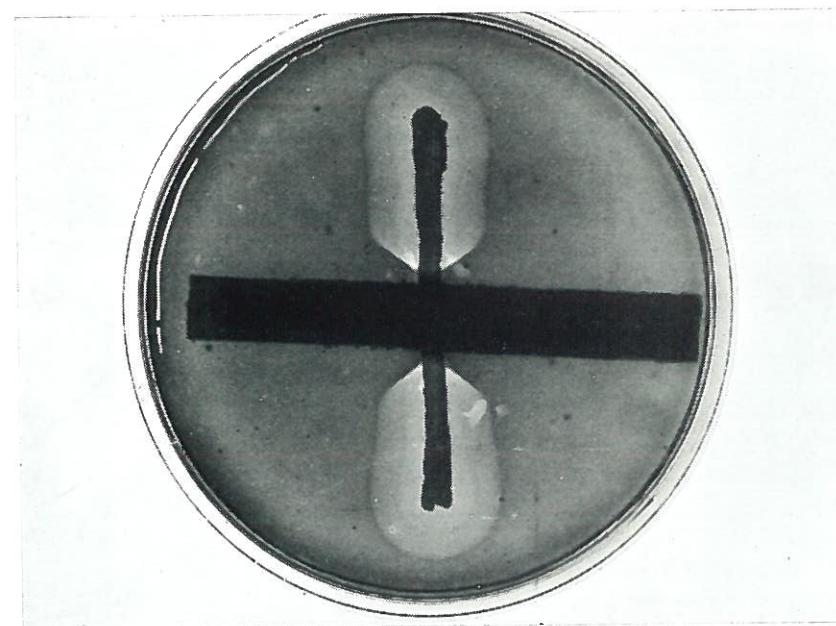


Fig. 14: Hemólisis tipo beta parcialmente inhibida por suero antihemolítico (técnica de Elek y Levi).

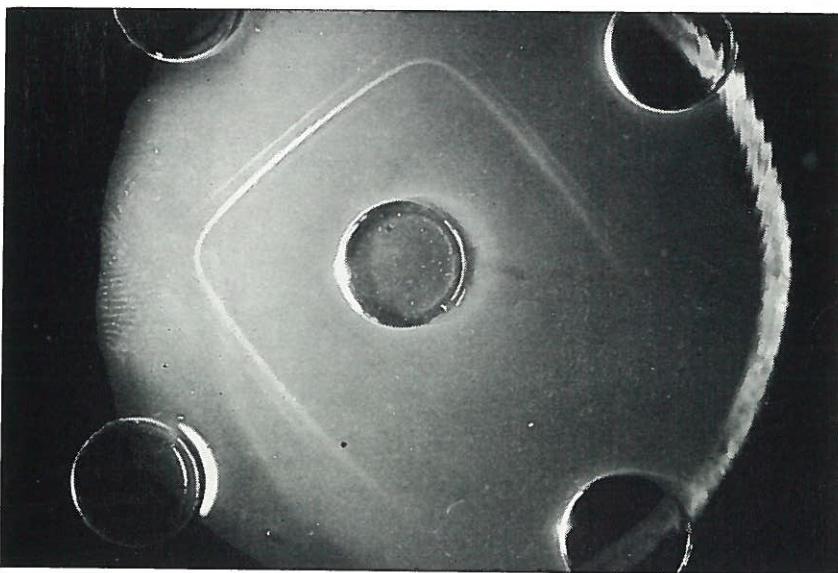


Fig. 15: Líneas de precipitación correspondiente a la enterotoxina fresca de la cepa testigo ATCC 13565.

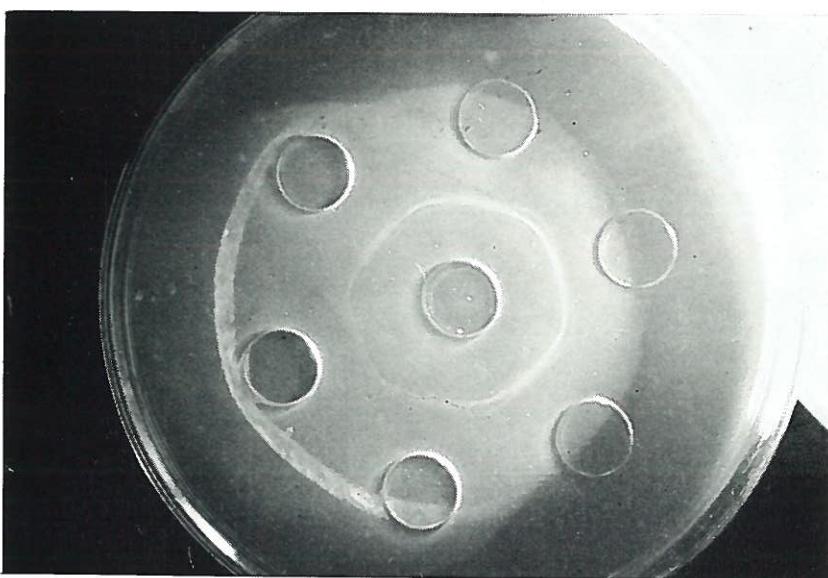


Fig. 16: Precipitación del antígeno (toxina) concentrado, por suero anti-A.

— 144 —

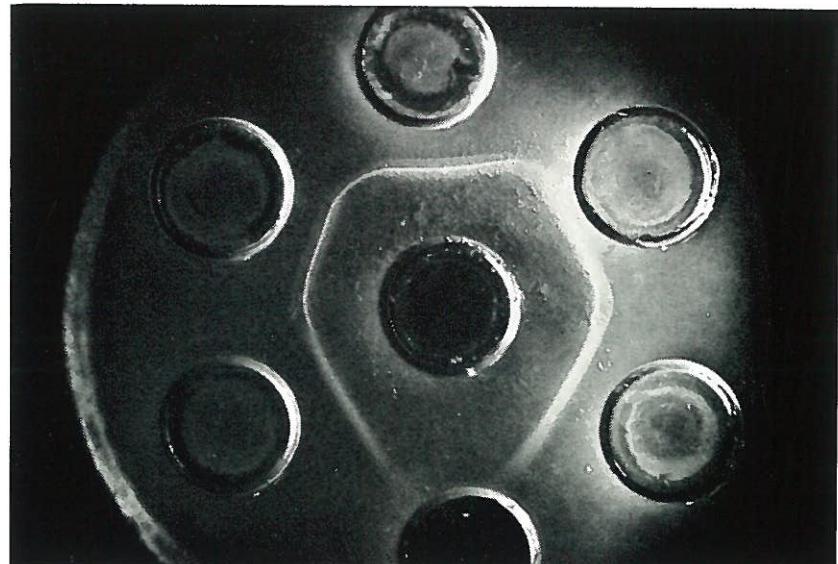


Fig. 17: Precipitación más intensa y menos definida obtenida con distancias menores (1 cm.) entre los pocillos de suero y antígeno.

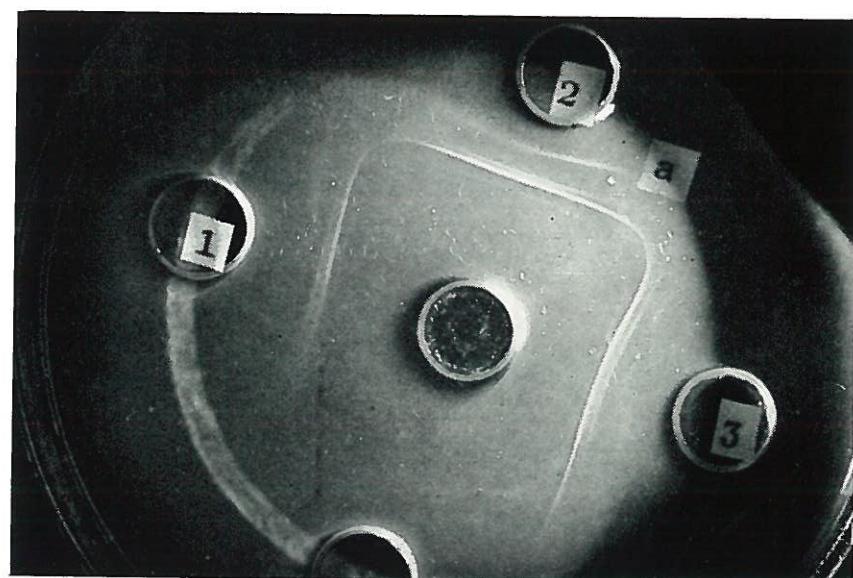


Fig. 18: En la posición a se observa una segunda línea de precipitación que no aparece a diluciones menores de antígeno (1 y 3).

— 145 —

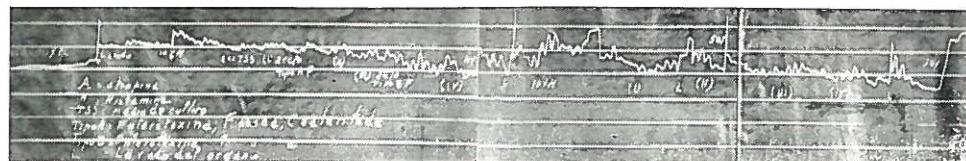


Fig. 19: Comportamiento del intestino de gato ante distintas concentraciones de enterotoxina tipos A y B.



Fig. 20: A partir de la quinta contracción la respuesta del órgano a la histamina se va debilitando por la acción de los cultivos de estafilococos ensayados. Sin embargo, ante la acción continuada de 5 gammas de histamina, se inicia una recuperación.



Fig. 21: Ante sucesivas aplicaciones de cultivos de estafilococos enterotóxicos, utilizados como control, el órgano pierde capacidad de contracción frente a la histamina pero no definitivamente (recuperación total).

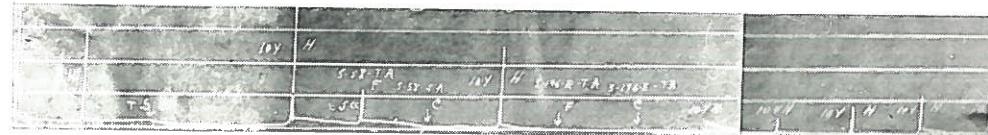


Fig. 22: Tanto el gérmen S-58TA como el S-196E producen una disminución en la amplitud de contracción del intestino ante la histamina aun lavando el órgano antes de la aplicación de esta última.

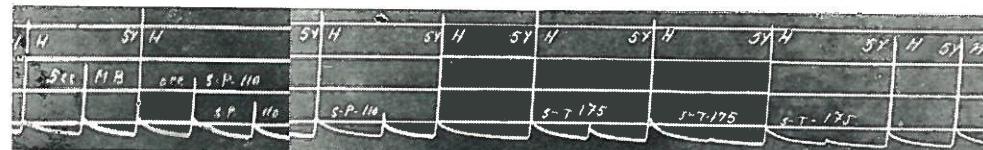


Fig. 23: Cultivos de estafilococos coagulasa negativos con equipo enzimático simple carecen de acción sobre sucesivas contracciones histámicas intestinales.

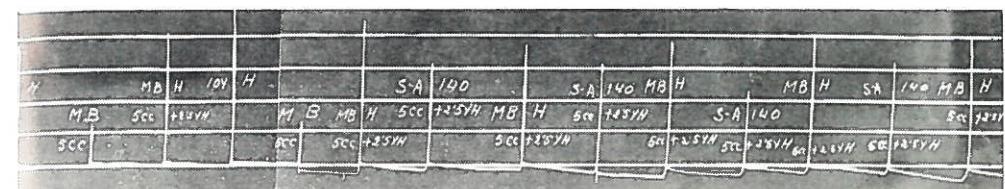


Fig. 24: Todas las contracciones del cultivo SA-140 más histamina son menos intensas que las del medio base histaminado.

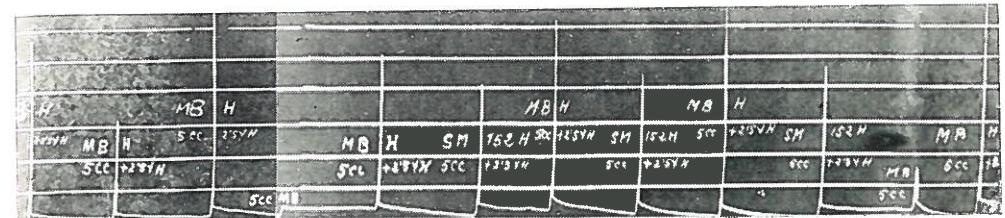


Fig. 25: A pesar de la irregularidad que presentan en sus comienzos las contracciones intestinales el cultivo SM-152 manifiesta una repetida acción, opuesta a la de la histamina, si se compara con el medio base histaminado.

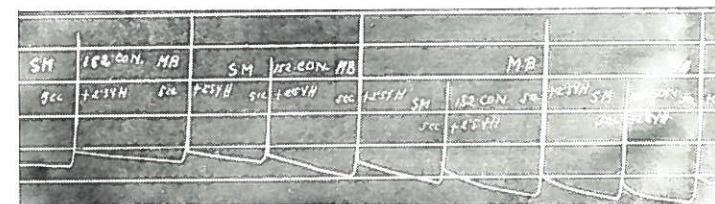


Fig. 26: El cultivo SM-152 concentrado al 1 : 4 no produce una disminución proporcional en la amplitud de las contracciones del intestino.

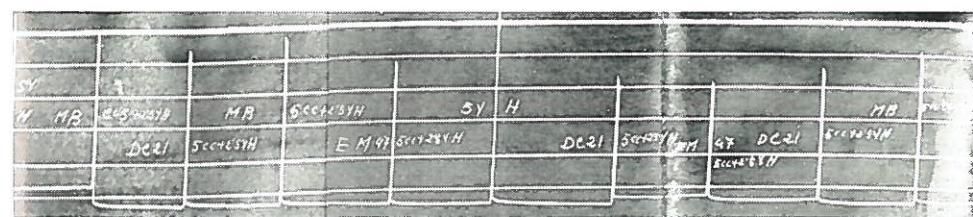


Fig. 27: Los cultivos DC-21 y EM-47 muestran una débil pero continuada acción negativa en las contracciones provocadas por dichos cultivos con histamina. Como contracción testigo se empleó la producida por el medio de cultivo básico más histamina.

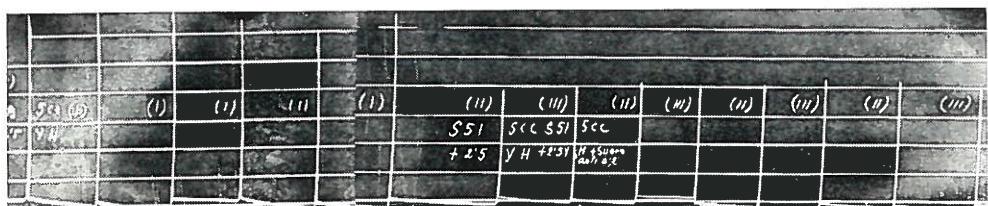


Fig. 28: Verificada la contracción regular del intestino de cobayo frente al medio de cultivo básico histaminado se comprueba la acción del cultivo S-51 con y sin adición de suero antienterotóxico. El grado de contracción es idéntico en los dos casos.

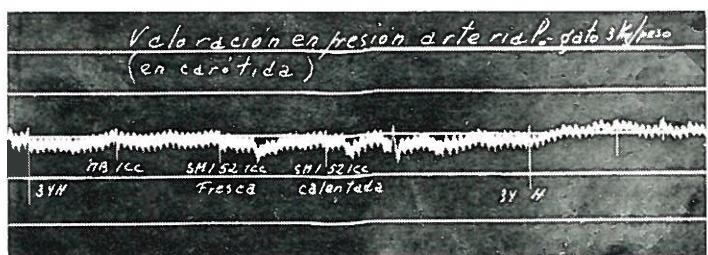


Fig. 29: El cultivo SM-152 enterotóxico no presenta acción alguna sobre la presión sanguínea de gato.

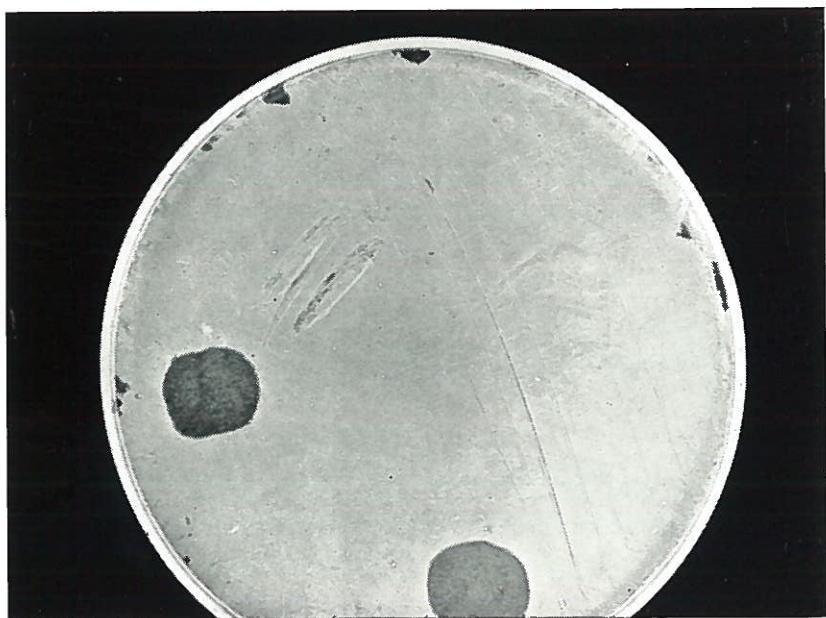


Fig. 30: Patrón lítico 80/81 (RTD).

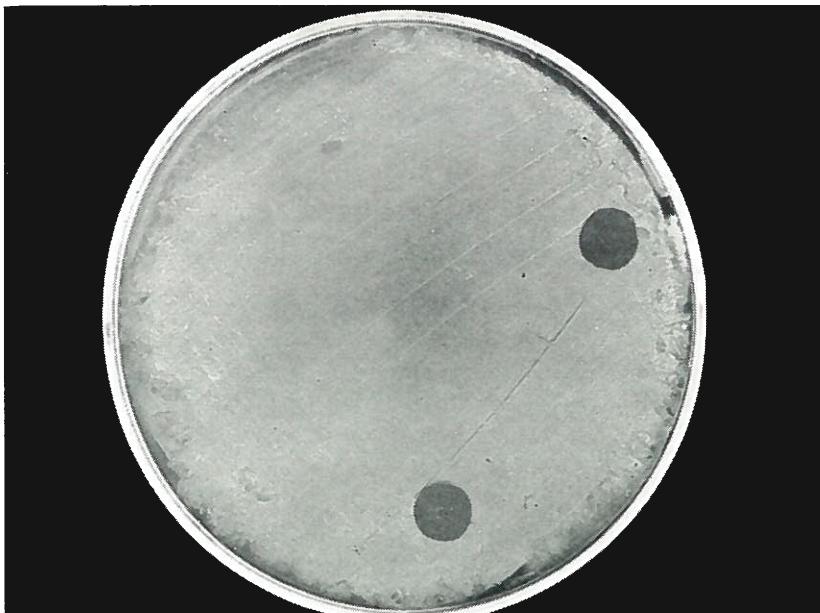


Fig. 31: Patrón 80/81. Confirmación de la reacción anterior en la misma cepa (Núm. 36, Tabla IV).

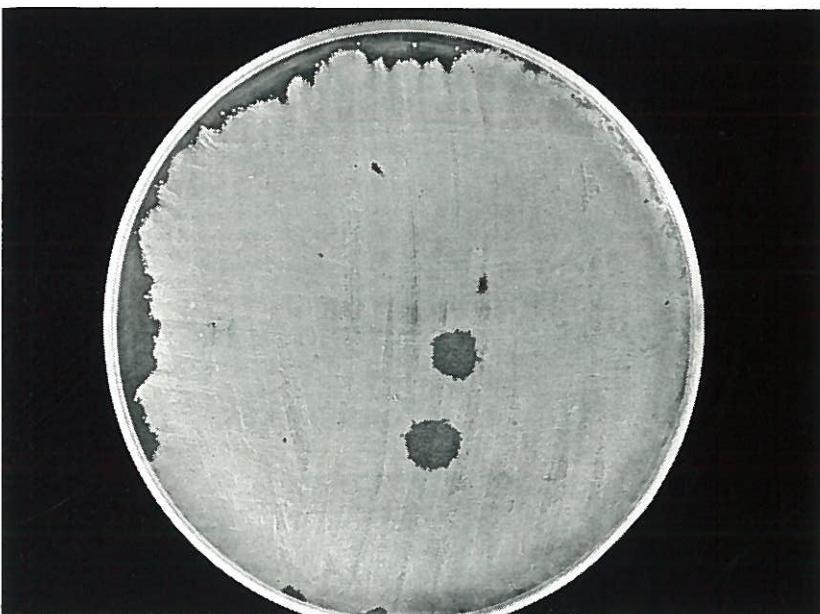


Fig. 32: Patrón 42E, 42D. Confirmación correspondiente a la cepa Núm. 30 (Tabla V), sin utilizar el fago secundario 83A.

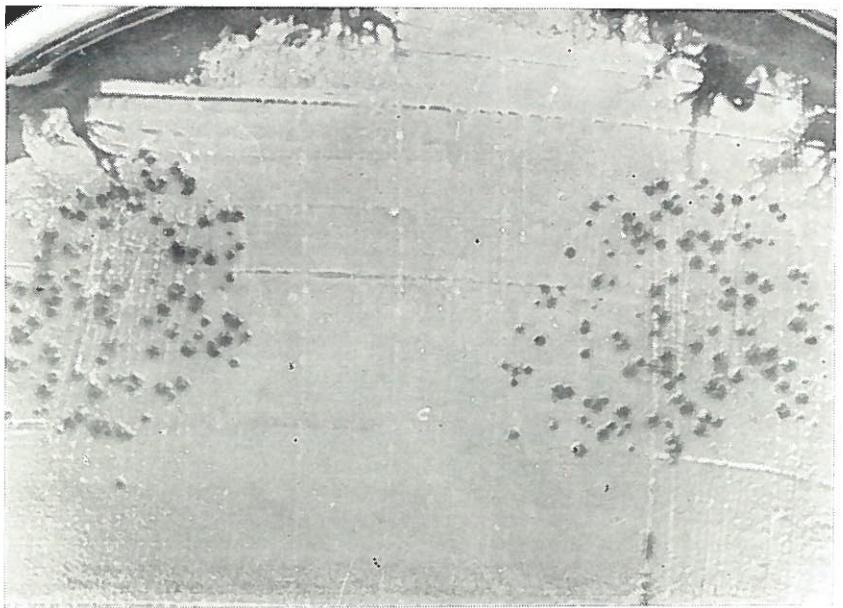


Fig. 33. Placas de bacteriolisis no confluente producida por fagos.

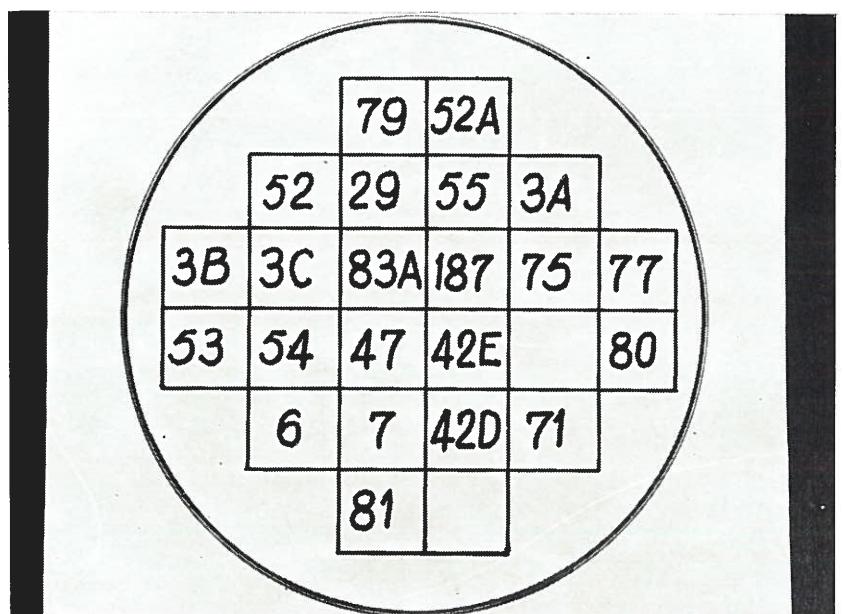


Fig. 34: Plantilla utilizada para distribuir los fagos de la serie Internacional sobre un agar nutritivo, en placas de petri de 15 cm. Ø

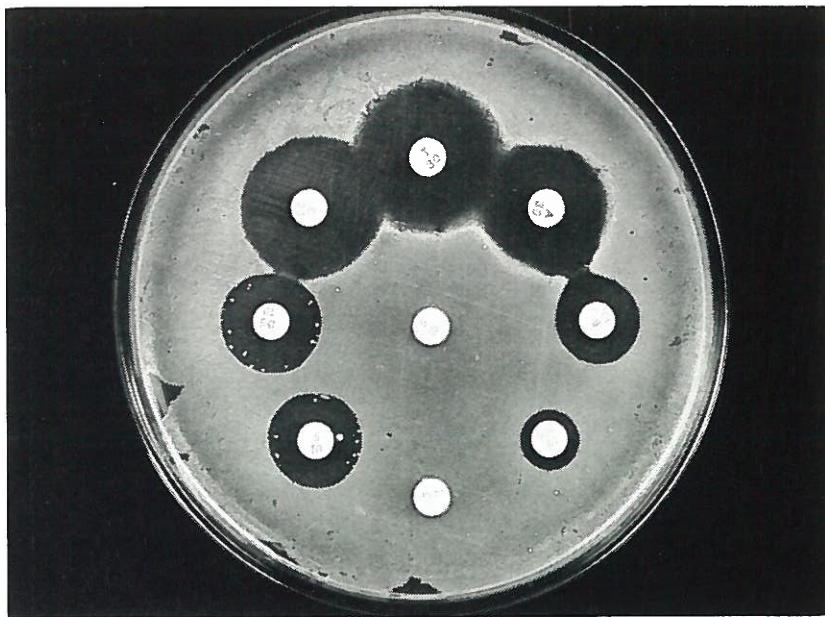


Fig. 35: Cepa resistente a la penicilina (Núm. 36 de las Tablas III, IV y V).

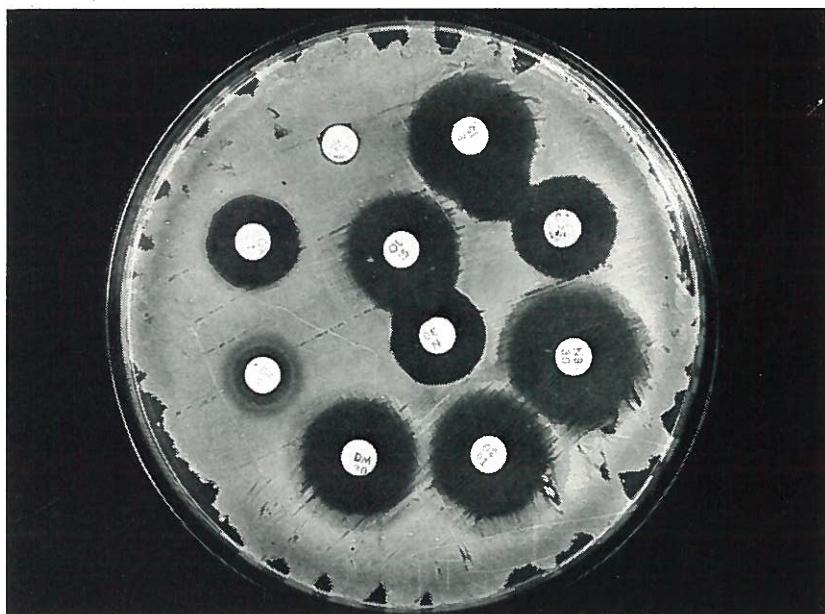


Fig. 36: Cepa resistente a la fenoxietil penicilina (Cepa Núm. 36 resistente también a la penicilina).

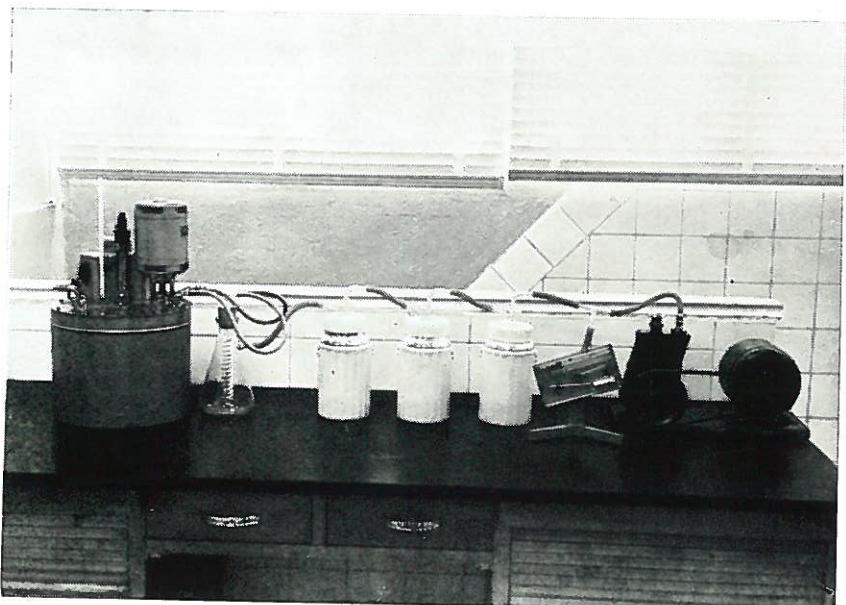


Fig. 37: Concentrador por evaporación de pequeñas cantidades de líquido a baja temperatura (diseñado por el autor).

TABLA I

Características de cincuenta muestras de leche natural (1)

Mes	Año	pH	Acidez (Dornic)	Temp. ^o	Número total de gérmenes (Logaritmo)*	Estafilococos (Log.)	Estafilococos coag. posit. (Log.)
Julio	1964 .	6,6	16,5	24 ^o	6,079	5,176	—
"	" .	6,55	17	21 ^o	6,342	4,397	4,000
Agosto	1964 .	6,55	17	19 ^o	6,238	4,301	4,000
"	" .	6,7	15,5	20 ^o	6,294	4,977	4,602
"	" .	6,65	16	14 ^o	6,331	5,301	4,301
"	" .	6,65	17	22 ^o	5,999	4,477	4,079
Septiembre	1964 .	6,4	18	15 ^o	6,130	4,544	—
"	" .	6,5	17,5	21 ^o	5,954	4,698	—
"	" .	6,6	16,5	18 ^o	6,278	4,929	3,778
"	" .	6,3	19	20 ^o	6,267	5,653	4,903
Octubre	1964 .	6,5	17	17 ^o	6,096	5,176	—
"	" .	6,4	18,5	16 ^o	6,041	4,176	4,176
"	" .	6,6	16,5	15 ^o	5,929	4,740	—
"	" .	6,4	18	17 ^o	5,989	4,602	3,602
Noviembre	1964 .	6,7	15,5	13 ^o	5,653	4,000	3,778
"	" .	6,8	14,5	17 ^o	5,942	4,000	—
"	" .	6,5	17	17 ^o	6,602	3,698	—
"	" .	6,45	18	9 ^o	5,877	3,954	—
Diciembre	1964 .	6,4	18	14 ^o	6,348	4,602	4,079
"	" .	6,8	15	14 ^o	6,531	6,079	5,301
"	" .	6,6	16,5	8 ^o	5,397	4,653	4,301
"	" .	6,7	15,5	7 ^o	5,740	4,903	4,000
Enero	1965 .	6,6	16,5	10 ^o	5,999	4,301	3,602
"	" .	6,6	16	14 ^o	5,877	3,903	3,000
"	" .	6,7	15,5	7 ^o	5,653	3,903	3,176
"	" .	6,8	14,5	11 ^o	6,090	4,477	3,602
Febrero	1965 .	6,7	15,5	8 ^o	5,875	4,000	3,301
"	" .	6,7	15,5	10 ^o	5,991	3,875	—
"	" .	6,45	18	9 ^o	5,740	3,460	—
"	" .	6,6	16,5	14 ^o	5,653	4,000	3,301

(1) Recogidas en la plataforma de recepción de una industria lechera.

* Logaritmo del número total de gérmenes por cc.

Mes	Año	pH	Acidez (Dornic)	Temp. ^o	Número total de gérmenes (Logaritmo)	Estafilococos (Log.)	Estafilococos coag. posit. (Log.)
Marzo	1965	6,65	16,5	18 ^o	5,531	3,380	—
"	"	6,65	16,0	14 ^o	5,929	3,903	3,778
"	"	6,5	17,5	10 ^o	5,863	4,397	—
"	"	6,5	17,5	11 ^o	5,361	3,875	—
Abril	1965	6,4	18	12 ^o	6,090	4,530	—
"	"	6,6	16	10 ^o	5,602	3,903	—
"	"	6,7	15,5	14 ^o	5,977	3,875	—
"	"	6,3	19	20 ^o	6,041	4,113	—
Mayo	1965	6,7	15,5	20 ^o	5,968	4,146	3,602
"	"	6,8	15	15 ^o	5,477	4,322	3,954
"	"	6,4	18	22 ^o	6,511	5,000	4,000
"	"	6,5	17	21 ^o	6,158	4,954	3,301
Junio	1965	6,3	19	20 ^o	6,037	4,079	2,778
"	"	6,4	18	20 ^o	5,635	4,602	4,176
"	"	6,6	16,5	15 ^o	5,653	3,380	—
"	"	6,7	15,5	22 ^o	6,380	4,113	2,301
Julio	1965	6,7	15,5	19 ^o	6,113	4,176	—
"	"	6,7	15	21 ^o	5,991	4,000	—
"	"	6,5	17,5	24 ^o	7,079	5,653	—
"	"	6,4	18	23 ^o	6,342	4,903	3,903

TABLA II
Características de treinta y seis muestras de leche natural (1).

LOCALIDAD - FECHA	Acidez (Dornic)	Número total de gérmenes (Logaritmo)*	Estafilococos (Log.)	Estafilococos coag. posit. (Log.)
Villamañán Agosto, 1964	14,5	4,397	4,000	—
	15,0	4,875	4,322	3,698
	16,0	4,301	—	—
	16	3,439	—	—
	14,5	5,176	4,602	3,653
	15	3,602	3,301	3,000
	16	3,397	—	—
	16,5	3,653	2,301	—
	16	4,591	4,255	3,845
	16	3,602	—	—
Toral de los Guzmanes Enero, 1965	16,5	5,230	4,397	—
	16	5,511	4,602	3,778
	15	3,875	—	—
	15,5	4,397	3,778	2,698
	16	3,954	—	—
	16	3,903	3,301	—
	15	3,301	—	—
	16	4,176	3,000	—
	15,5	4,079	—	—
	14,5	4,176	4,176	3,045
Vegamagaz Mayo, 1965	14,5	5,414	3,079	—
	15	3,880	—	—
	15,5	3,903	2,903	—
	15,5	5,301	4,397	4,00
	16,5	3,544	3,301	2,301
	16	3,875	3,397	—
	15,5	4,397	4,301	3,875
	16	3,397	—	—
	16	3,380	—	—
	16	5,414	5,301	5,243

(1) Muestras individuales de estable. Cada muestra se compone de partes alícuotas de los cuatro cuarterones.

* Logaritmo del número total de gérmenes por cc.

TABLA III

Características fisiológicas y bioquímicas de cincuenta y ocho estafilococos coagulasa positivos (1)

CEPAS	P	R	F	L	D	G	M	C
N.º 1	a	+	2+	—	2+	2+	2+	3+
" 2	a	2+	2+	—	2+	—	2+	3+
" 3	b	3+	2+	—	2+	2+	2+	2+
" 4	a	2+	2+	—	—	—	2+	+
" 5	a	2+	2+	—	2+	—	2+	+
" 6	a	2+	2+	—	2+	+	2+	+
" 7	b	S.C.	2+	—	2+	—	2+	2+
" 8	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 9	b	2+	2+	—	3+	—	2+	2+
" 10	a	+	2+	—	2+	+	2+	3+
" 11	a	2+	2+	—	2+	—	2+	+
" 12	a	+	2+	3+	2+	2+	2+	+
" 13	a	2+	2+	—	2+	2+	2+	2+
" 14	a	+	2+	—	2+	—	2+	+
" 15	a	3+	2+	—	2+	+	2+	+
" 16	b	2+	2+	3+	2+	—	2+	2+
" 17	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 18	a	2+	2+	—	2+	—	2+	3+
" 19	a	+	2+	—	2+	2+	2+	2+
" 20	a	3+	2+	—	2+	—	2+	+
" 21	b	S.C.	2+	3+	2+	+	2+	2+
" 22	a	2+	2+	—	2+	—	+	+

(1) *Explicación de la Clave:* P = Producción de pigmento, a = dorado; b = blanco; R = Reducción del telurito, 3+ reacción intensa, 2+ media, + moderada, S.C. sin crecimiento; F = Producción de fosfatasa; L = Lipolisis en yema de huevo, 3+ reacción muy marcada sobresaliendo la opacidad 3 mm del borde de la estria de siembra, 2+ reacción media, + reacción moderada, debajo de la colonia solamente; D = Desoxirribonucleasa; G = Licuación de gelatina (método de Chapman-Stone); M = Fermentación anaerobia del manitol, 2+ fermentación en 48 horas, + fermentación en 96 horas; C = Producción de coagulasa, 3+ coagulación del plasma en una hora, 2+ coagulación en dos horas + coagulación en tres horas.

CEPAS	P	R	F	L	D	G	M	C
" 23	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 24	a	2+	2+	—	2+	—	2+	2+
" 25	a	+	2+	+	2+	2+	2+	2+
" 26	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 27	a	2+	2+	—	2+	2+	2+	2+
" 28	a	+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 29	a	2+	2+	—	2+	2+	2+	2+
" 30	b	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 31	a	3+	2+	—	2+	—	2+	2+
" 32	a	+	2+	—	2+	+	2+	+
" 33	a	S.C.	2+	—	2+	—	2+	2+
" 34	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 35	a	2+	2+	—	2+	—	2+	2+
" 36	a	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+
" 37	a	2+	2+	—	2+	+	2+	3+
" 38	b	S.C.	2+	—	2+	2+	2+	2+
" 39	a	+	2+	—	2+	—	2+	3+
" 40	b	3+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 41	a	2+	2+	+	2+	—	2+	3+
" 42	a	S.C.	2+	—	2+	+	2+	+
" 43	a	+	2+	—	—	+	2+	2+
" 44	a	2+	2+	—	2+	2+	—	2+
" 45	a	2+	2+	—	2+	—	2+	2+
" 46	a	2+	2+	—	2+	—	2+	2+
" 47	a	S.C.	2+	—	2+	2+	2+	+
" 48	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 49	a	2+	2+	—	2+	—	2+	3+
" 50	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 51	a	2+	2+	—	2+	2+	2+	2+
" 52	b	S.C.	2+	+	2+	2+	2+	2+
" 53	a	2+	2+	—	2+	—	2+	2+
" 54	a	2+	2+	—	2+	2+	+	2+
" 55	a	2+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 56	a	+	2+	—	2+	+	2+	2+
" 57	a	2+	2+	—	2+	—	2+	+
" 58	a	2+	2+	—	2+	—	2+	2+

TABLA IV

Propiedades tóxicas de los estafilococos coagulasa positivos (1).

CEPAS	TIPO HEMOLISIS	ENTEROTOXINA		
		Inoc. Gato	Gel-Difusión	Organo aislado
N.º 1	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 2	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 3	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 4	N. H.	NEG.	NEG.	POSIT.
" 5	Beta	POSIT.	POSIT.	POSIT.
" 6	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 7	Alfa-Beta-Delta	N.I.	N.E.	N.E.
" 8	Beta-Delta ...	NEG.	N.E.	POSIT.
" 9	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 10	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 11	Alfa-Beta-Delta ...	POSIT.	POSIT.	POSIT.
" 12	Alfa-Beta	NEG.	NEG.	POSIT.
" 13	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 14	N. H.	N.I.	N.E.	N.E.
" 15	Beta	NEG.	N.E.	POSIT.
" 16	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 17	Alfa-Beta	NEG.	N.E.	POSIT.
" 18	Beta-Delta	N.I.	N.E.	N.E.
" 19	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 20	Alfa-Beta	POSIT.	POSIT.	POSIT.
" 21	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 22	Beta-Delta ...	N.I.	N.E.	N.E.
" 23	Alfa-Beta	NEG.	N.E.	POSIT.
" 24	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 25	Alfa-Beta	NEG.	N.E.	POSIT.
" 26	Alfa-Beta-Delta ...	N.I.	N.E.	N.E.

(1) El tipo de hemolisis se comprobó sobre la totalidad de los gérmenes coagulasa positivos. La enterotoxina sobre 18 de este grupo y su producción se confirmó por técnicas de gel-difusión en nueve de las cepas utilizadas en la inoculación de la toxina.

CLAVE: N.H. = No hemolisis; POSIT. = Prueba positiva; NEG. = Prueba negativa; N.I. = No inoculado; N.E. = No ensayado.

CEPAS	TIPO HEMOLISIS	ENTEROTOXINA		
		Inoc. Gato	Gel-Difusión	Organo aislado
" 27	Beta-Delta ...	N.I.	N.E.	N.E.
" 28	Beta-Delta ..	N.I.	N.E.	N.E.
" 29	Alfa	N.I.	N.E.	N.E.
" 30	Alfa-Beta	NEG.	N.E.	POSIT.
" 31	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 32	Alfa-Beta	NEG.	N.E.	POSIT.
" 33	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 34	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 35	Alfa-Beta	NEG.	NEG.	POSIT.
" 36	Alfa	N.I.	N.E.	N.E.
" 37	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 38	Beta-Delta ...	NEG.	N.E.	POSIT.
" 39	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 40	Alfa-Beta-Delta ...	NEG.	NEG.	POSIT.
" 41	Beta-Delta ...	N.I.	N.E.	N.E.
" 42	N. H.	NEG.	N.E.	POSIT.
" 43	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 44	Beta	POSIT.	POSIT.	POSIT.
" 45	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 46	Beta	POSIT.	POSIT.	POSIT.
" 47	Alfa-Beta-Delta ...	N.I.	N.E.	N.E.
" 48	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 49	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 50	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 51	Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 52	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.
" 53	Beta-Delta ..	N.I.	N.E.	N.E.
" 54	Beta-Delta ..	N.I.	N.E.	N.E.
" 55	Beta-Delta ...	N.I.	N.E.	N.E.
" 56	Beta-Delta ..	N.I.	N.E.	N.E.
" 57	Beta-Delta ..	N.I.	N.E.	N.E.
" 58	Alfa-Beta	N.I.	N.E.	N.E.

TABLA V

Tipificación por bacteriófagos. Patrón lítico de las cepas estudiadas.

CEPAS	CUADRO DE LISIS (1)	
	1. Serie Internacional	2. Serie Seto-Wilson
N.º 1	N.T. (RTD×1000:42E)	S2, S5w
" 2	N.T. (RTD×1000:42Ew)	N.T.
" 3	54w	S2
" 4	42D	S2
" 5	54, 42E, 81	S2
" 6	42D	S2, S5w
" 7	42D	S2, S5w
" 8	83A, 54, 47, 42E, 7, 81	S2, S5w
" 9	42D	S2, S5w
" 10	83A, 54, 47, 42E, 6, 7	S2
" 11	54, 42E	S2
" 12	42D	S2, S5w
" 13	29w	S2
" 14	83A, 42E, 81	S2, S5, S6w
" 15	54, 42E, 81	S2, S5w
" 16	42D	S2, S5w
" 17	29, 42E, 42D	S2, S5w
" 18	N.T. (RTD×1000:N.T.)	N.T.
" 19	83A, 54, 42E, 6	S2, S5w
" 20	6, 7, 47, 54, 75, 83A	S2, S5w
" 21	N.T. (RTD×1000:N.T.)	S2, S5w
" 22	79, 52A, 52, 29, 55, 3B, 3C, 83A, 54, 47, 42E, 18, 80, 6, 7, 42D, 81	S2
" 23	42D	S2
" 24	54, 42E	S2, S5w
" 25	42D	S2, S5w
" 26	83A, 54, 47, 42E, 6, 7, 42D, 81	S2
" 27	N.T. (RTD×1000:42D, 81)	S2

(1) RTD = Dilución de rutina.

N.T. = No tipificable.

w = Reacción débil.

CEPAS	CUADRO DE LISIS (1)	
	1. Serie Internacional	2. Serie Seto-Wilson
" 28	N.T. (RTD×1000:N.T.)	N.T.
" 29	N.T. (RTD×1000:42E, 77)	S2
" 30	83A, 42E, 42D	S2
" 31	83A, 42D	S2, S5w
" 32	N.T. (RTD×1000:83A, 42E, 77)	N.T.
" 33	42D	S2
" 34	42D	S2
" 35	N.T. (RTD×1000:53, 77, 42D)	S2, S5w
" 36	80, 81	S2, S5, S6w
" 37	N.T. (RTD×1000:42E, 83A)	N.T.
" 38	42D	S2
" 39	54, 42E, 81	S2, S5w
" 40	42E, 77, 83A, 42D	S2, S5w
" 41	N.T. (RTD×1000:42E, 42D)	N.T.
" 42	42D	S2
" 43	83A, 54, 47, 42E, 81	S2, S5w
" 44	54, 42E, 81	S2, S5w
" 45	N.T. (RTD×1000:42Ew)	S2
" 46	42D	S2
" 47	83A, 54, 47, 42E, 42D, 81	S2
" 48	83A, 42E, 81	S2, S5w
" 49	N.T. (RTD×1000:29, 42E, 77, 42D)	N.T.
" 50	79, 52, 55, 3B, 3C, 83A, 42E, 18, 80, 6, 7, 42D, 81	S2, S5
" 51	N.T. (RTD×1000:54, 42E)	S2, S5, S6w
" 52	N.T. (RTD×1000:83A, 42D)	S2
" 53	83A, 54, 42E, 6	S2
" 54	N.T. (RTD×1000, 42E)	N.T.
" 55	N.T. (RTD×1000 42Ew)	S2, S5
" 56	42D, 81	S2
" 57	42E, 77	S2
" 58	42E	S2

