

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

Catedrático: Prof. Dr. SANTOS OVEJERO

ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS

Por Guillermo Suárez Fernández

INTRODUCCION

La importancia transcendental que se ha concedido al género *Staphylococcus Rosenbach*, 1884, en las últimas décadas, como agentes capaces de producir infecciones graves en el hombre y animales domésticos e intoxicaciones alimentarias, en este caso producidas por toxinas preformadas en alimentos, ha dado lugar a la publicación de abundante literatura y autorizadas revisiones sobre el tema.

Son obras ya clásicas las de TANNER Y TANNER (1953), SMITH (1958), ELEK (1954), DEWBERRY (1959), WORMS (1960) y DACK (1962 a).

La editorial Academic Press prepara en estos momentos la publicación de un nuevo libro que revisa el tema *infecciones e intoxicaciones de origen alimentario* y cuyo capítulo sobre *Estafilococos enterotóxicos*, redactado por ANGELOTTI (1967) es amplio y documentado.

Por su parte, la editorial MIT Press se dispone a publicar otro libro sobre *Toxinas microbianas preformadas en los alimentos*, debiéndose a BERGDOLL (1967) el capítulo dedicado a *Enterotoxina estafilocócica*.

Las revistas *Journal of Applied Bacteriology* y *Annals New York Academy of Sciences* dedican por completo los volúmenes 25 (1962) y 128 (1965), respectivamente, a la publicación de artículos sobre el tema, presentados en respectivos simposios.

En este estudio vamos a ocuparnos de manera exclusiva de uno de los aspectos más sugestivos, cuyo exacto contenido científico se halla en plena formación actualmente, dentro del amplio campo de la investigación sobre el género *Staphylococcus*.

Nos referimos a las intoxicaciones alimentarias producidas por toxinas de origen estafilocócico y, de una manera especial, a las propias toxinas.

En la citada especialidad destacan actualmente sobre el resto, por su efectiva aportación y proyectos de estudio actuales, los siguientes Centros e investigadores:

a) División of Microbiology, Food and Drug Administration, Department of Health, Education and Welfare, Washington, D. C.

Investigadores: E. P. CASMAN, R. W. BENNETT Y R. F. KEPHART.

b) Food Research Institute,¹ University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.
Investigadores: E. M. FOSTER, M. S. BERGDOLL, H. SUGIYAMA, E. M. MAC KISSIC, K. F. WEISS Y J. M. MUSTER.

c) Milk and Food Research Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, U. S. Public Health Service Cincinnati, Ohio.

Investigadores: R. ANGELOTTI, R. B. READ, H. E. HALL, K. H. LEWIS, L. A. BLACK, J. BRADSHAW Y W. L. PRITCHARD

d) United States Army Biological Laboratories, Fort. Detrick, Frederick, Maryland.

Investigadores: E. J. SCHANTZ, L. SPERO, J. WAGMAN, D. A. DUNNERY, W. G. ROESLER Y S. I. SILVERMAN.

e) División of Microbiology, Research Laboratories of the Food and Drug Directorate, Department of National Health and Welfare, Ottawa, Ontario.

Investigadores: F. S. THATCHER, J. ROBINSON, I. ERDMAN Y W. SIMON.

El hecho que sea en Estados Unidos en donde se preste, en los momentos actuales, una mayor atención al problema que nos ocupa, en comparación con el resto de los países, halla su explicación, aparte del desarrollo económico alcanzado por aquella nación, en la frecuencia con que se diagnostican en el hombre casos de intoxicaciones alimentarias producidas por estafilococos.

INTOXICACIONES EN EL HOMBRE, DE ORIGEN ESTAFILOCOCICO

Esta enfermedad, de sintomatología aparatoso, resulta siempre una desagradable experiencia a que el hombre puede encontrarse sometido, aunque su terminación rápidamente es fatal.

La intoxicación tiene lugar cuando se consumen alimentos en los cuales han crecido ciertas cepas de *Staphylococcus aureus*, capaces de producir una sustancia conocida con el nombre de enterotoxina.

Los síntomas aparecen, generalmente, dos o tres horas después de la ingestión del alimento, con salivación seguida de náuseas, vómitos, calambres en la musculatura abdominal y diarrea.

En los casos graves puede haber postración. La mayor parte de los enfermos se recobran en un día o dos y no es frecuente que sobrevenga la muerte.

La duración de la enfermedad y gravedad de los síntomas depende de la cantidad de enterotoxina ingerida y de la susceptibilidad a la toxina (DACK, 1962 a).

No es raro encontrar individuos indemnes en casos de intoxicaciones masivas.

Las cifras estadísticas que recogen los casos comunicados a las autoridades sanitarias constituyen un índice al que no puede darse un valor cierto, ya que los casos aislados curan, la mayoría de las veces, sin intervención del médico, y solamente las explosiones tóxicas que afectan a gran número de personas merecen la debida atención por parte de profesionales y funcionarios encargados de velar por la salud pública.

En Estados Unidos, este tipo de intoxicación es considerado como el más frecuente dentro de los de origen alimentario. Según ANGELOTTI (1967), la frecuencia se

debe probablemente a la variedad y cantidad de platos preparados que se consumen en los establecimientos públicos de Norteamérica.

Sin olvidar las limitaciones anteriores citadas referentes a los datos estadísticos, cabe señalar que DAUER (1952 a 1961) menciona 250 brotes de intoxicación, con más de 10.000 personas afectadas, durante un período de nueve años, en Estados Unidos.

Aunque la intoxicación estafilocócica ha sido diagnosticada en innumerables países (Estados Unidos, Rusia, Inglaterra, Italia, Alemania, Países Nómadas, Francia y España, entre ellos) parece que la frecuencia con que se presentan los casos de intoxicación está determinada por una serie de factores entre los que debemos destacar el clima, los hábitos alimentarios y las condiciones higiénico-sanitarias en que se desenvuelve la colectividad humana de una determinada región.

En Inglaterra, por ejemplo, el 94 por 100 de las infecciones e intoxicaciones alimentarias ocurridas en los años 1961 al 1963 fueron producidas por gérmenes del género *Salmonella*, mientras que solamente el 3 por 100 se atribuyeron a estafilococos (*Rep. Publ. Health Lab. Serv.*, 1962 a 1964).

En España ha sido diagnosticada la enfermedad por SAIZ MORENO (1958 y 1963) y REJAS Y OVEJERO (1962), entre otros.

Probablemente algunas erupciones tóxicas graves como la producida en Vallecas (Madrid) en 1963 y debida al consumo de leche sin pasterizar, han tenido este origen (SUAREZ, 1966).

Aunque no pueda citarse aval numérico de garantía en apoyo de nuestra opinión, ésta es la de que la enfermedad es muy frecuente en nuestro país, y muchos de los incidentes de intoxicación que recoge la prensa diaria serían causados por la enterotoxina estafilocócica.

Las condiciones de temperatura del medio ambiente, deficiencias higiénicas en la producción y manipulación de los alimentos, ausencia de una adecuada cadena de frío y la facilidad con que se aíslan cepas de estafilococos capaces de producir sustancias eméticas en medios de cultivos idóneos de algunos alimentos, son circunstancias del todo favorables a la presentación de casos de intoxicación humana.

ENTEROTOXINA

1. Naturaleza y tipos

La enterotoxina, o más propiamente enterotoxinas, son proteínas puras de escaso poder antigenico.

El carácter antigénico había sido señalado por DOLMAN Y WILSON (1938) y DOLMAN (1944) y fue confirmado por SURGALLA *et al.* (1953) y CASMAN (1958 y 1960).

La condición de proteína se venía suponiendo desde el momento en que algunos investigadores descubrieron que la enterotoxina era dializable (DAVIDSON Y DACK, 1936; MINNET, 1938; HAMMON, 1941); pero no se tuvo la evidencia hasta que el grupo de investigadores pertenecientes al Food Research Institute de la Universidad de Chicago, capitaneados por G. M. DACK, logró producir enterotoxina en grandes cantidades, purificarla y estudiar sus propiedades físicoquímicas (SURGALLA y col., 1951 y 1954; BERGDOLL, 1956; BERGDOLL y col., 1951, 1952, 1959 a y b; HIBNICK Y BERGDOLL 1959).

¹ Este Centro radicó hasta 1965 en la Universidad de Chicago, Illinois, y fue dirigido por el prestigioso investigador G. M. DACK, cuya jubilación tuvo lugar en el año citado.

Hoy se consideran como proteínas puras de peso molecular que oscila entre 30.000 y 35.000 y con un contenido en aminoácidos similar desde el punto de vista cualitativo (BERGDOLL y col., 1965 b; SCHANTZ y colaboradores, 1965; SPERO y col., 1965).

SURGALLA y col. (1953) determinaron la existencia de más de un tipo inmunológico de enterotoxina. Estas investigaciones fueron confirmadas sucesivamente por THATCHER y MATHESON, 1955; CASMAN, 1958 y 1960; BERGDOLLY col., 1965 a).

En la actualidad se conocen cuatro tipos inmunológicos que se designan con las letras A, B, C, y D (CASMAN, 1960; CASMAN y col., 1963 a; BARGDOLL y col., 1965 a, CASMAN y col., 1966). Parece ser que existen otros tipos, pero todavía no han sido suficientemente caracterizados, para lo que sería necesario disponer de medios de diagnóstico inmunológico más perfeccionados (ANGELOTTI, 1967).

El *Staphylococcus aureus* 196E (ATCC 13565) es la cepa prototipo para la enterotoxina A. Para el tipo B lo es la 243 (ATCC 14458), la única capaz, por otra parte, de producir esta enterotoxina sin mezcla de A (CASMAN y col., 1963 a).

La cepa S-6, tan ampliamente usada por el equipo de G. M. DACK en la producción de toxina cruda tipo B, para los estudios de purificación físicoquímicos e inmunológicos, fue descartada por producir pequeñas cantidades de enteroxina A y a pesar de su rendimiento y potencia superior de la toxina producida (CASMAN y col., 1963 a).

No se ha designado hasta el momento la variedad patrón, dentro del género *Staphylococcus*, para la enterotoxina D, a pesar de que, según CASMAN (1966), sería la siguiente, en orden a frecuencias, a la enterotoxina A a la hora de producir intoxicaciones en el hombre. Los primeros microorganismos productores de este tipo se aislaron de alimentos inculpados de casos de intoxicación humana en Inglaterra y Estados Unidos (CASMAN y col., 1966).

2. Producción

2.1 En alimentos.—Según DACK (1962 a), las condiciones necesarias previas a la presentación de una intoxicación producida por enterotoxina, son: a), la presencia de una variedad de estafilococo capaz de producir dicha toxina; b), el alimento en el cual puede crecer el germen, y c), la temperatura y tiempo adecuados para un crecimiento abundante.

Son muchos los alimentos que han sido calificados como causa de intoxicación. Entre ellos cabe destacar la leche, el queso, la leche en polvo, el jamón cocido, distintos preparados de carnes, natillas y pasteles rellenos con crema, embutidos, ensaladillas, etc. (DACK, 1962 b).

Utilizando estos alimentos como substrato se ha logrado producir enterotoxina en diversos laboratorios (CASMAN y col., 1963 b; HALL y colaboradores, 1963 y 1965); pero la producción reglada y controlada, en especial la destinada a estudios de purificación y físicoquímicos, ha requerido siempre la utilización de medios de cultivo especiales.

2.2 Experimental.—La producción de toxina en pequeñas cantidades para inoculación en animales sensibles, producción de suero anti en conejo y pruebas de precipitación por difusión en gel, se realiza con facilidad en el laboratorio utilizando medios semisólidos a base de infusión de corazón y cerebro de ternera o bien con tripticasa y proteína de soja (CASMAN y BENNETT, 1963; HALL y col., 1963). El haber des-

crito ya estos métodos en publicaciones anteriores (SUAREZ, 1966) nos hace innecesario el insistir sobre este aspecto del tema.

Para la producción en gran escala de enterotoxina B se utiliza un medio (SURGALLA y col., 1951) que contiene 15 gramos de caseína hidrolizada por digestión pancreática, 1,23 miligramos de ácido nicotínico, 50 microgramos de clorhidrato de tiamina y 2,25 gramos de glucosa anhidria, por litro.

El medio se ajusta a pH 7,6 antes de esterilizar en autoclave.

Los mejores rendimientos se obtienen en frascos de Roux, en cultivo poco profundo, o bien por agitación continua de recipientes con mayor volumen, en atmósfera con un 20 por 100 de dióxido de carbono e incubación a 37 °C. por espacio de dos a cinco días.

Otro medio al mismo fin es el descrito por FREY y col., (1963) a base de hidrolizado de caseína, 20 gramos; extracto de levadura, 3 gramos, ácido nicotínico, 1,2 miligramos; pantotenato cálcico, 0,5 miligramos, y clorhidrato de tiamina, 40 microgramos, cantidades todas para un volumen de 1.000 ml.

Para la producción de enterotoxina A, CASMAN y BENNETT (1964) han propuesto un medio cuya composición por mil es de citrato de hierro, 25 miligramos; fosfato monopotásico, 1 gramo; fosfato dipotásico, 1 gramo; sulfato de magnesio, 0,2 gramos; L-cistina, 25 miligramos; acetato sódico, 7 gramos; L-triptofano, 75 miligramos; N-Z amina A, 20 gramos; pantotenato cálcico, 0,5 miligramos; clorhidrato de tiamina, 40 microgramos, y ácido nicotínico, 1,2 miligramos. El pH debe ajustarse a 7,2-7,4.

No se requiere cultivo en atmósfera especial y la forma de aireación viene determinada por el volumen de cultivo que se utilice.

Cuando se trata de producir únicamente pequeñas cantidades de toxina concentrada para estudios inmunológicos existe una técnica de cultivo (cultivo en saco) muy difundida a partir de los estudios de CASMAN y BENNETT (1963) y con la que se obtiene una toxina concentrada por diálisis, y este concentrado se halla libre de sustancias precipitables por el sulfato amónico.

El fundamento de este método consiste en producir el desarrollo de la cepa toxigénica en el interior de un saquito de celofán de 2 cm³ que flota en la superficie de un medio cultivo líquido. Cualquiera de los medios descritos pueden ser empleados con esta técnica expuesta con todo detalle por los autores citados.

La enterotoxina C debe producirse (BERGDOLL y col., 1965 a) en un medio compuesto de 30 gramos de N-Z amina NAK, 30 gramos de hidrolizado de proteína en polvo, 10 miligramos de niacina y 5 miligramos de tiamina para 1.000 ml de agua destilada. El medio a pH 7,6 se distribuye en cantidades de 400 ml en matraces Erlenmeyer de dos litros.

El medio inoculado se incuba a 37 °C. durante veinticuatro horas en frascos colocados en un agitador rotatorio de 275 r. p. m. aproximadamente.

La producción de toxina D a gran escala no se ha realizado ni comparado el rendimiento de los diferentes medios, por lo que su conocimiento físico-químico e inmunológico es bastante incompleto en el momento actual.

3. Propiedades físico-químicas

El estudio y conocimiento de estas propiedades es relativamente reciente y está ligado a la obtención de una enterotoxina con el suficiente grado de pureza por BERGDOLL y col. (1959 b).

Indudablemente, el hecho de que la primera enterotoxina obtenida en estado puro haya sido la B, retrasó considerablemente el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la investigación de la toxina en alimentos, ya que la enterotoxina B es precisamente la que se encuentra con menos frecuencia en casos de intoxicación humana (CASMAN, 1965 y 1966).

La estructura de la enterotoxina B parece ser la de una cadena única polipeptídica. Los aminoácidos predominantes son el ácido aspártido y la lisina (HIBNICK y BERGDOLL, 1959; SPERO y col., 1965).

La enterotoxina A, la más importante y que produce mayor número de intoxicaciones, fue parcialmente purificada por CASMAN (1958 y 1960) y parece ser que recientemente ha sido aislada y obtenida en estado puro por SCHANTZ y BERGDOLL independientemente, quienes continúan sus estudios sobre la molécula de toxina, sin que hasta el momento hayan publicado referencias detalladas de sus procedimientos y resultados (ANGELOTTI, 1967).

No existe información adecuada acerca de las propiedades físicoquímicas de las enterotoxinas C y D, hasta el momento presente.

Algunas propiedades físicas de la enterotoxina B, como el tamaño molecular, densidad, homogeneidad, viscosidad, coeficiente de difusión, etcétera, han sido estudiadas por WAGMAN y col. (1965) y confirmadas por BERGDOLL y col. (1965 b), quienes encontraron valores similares. Según los autores precitados, el punto isoiónico de la enterotoxina B requiere un pH de 8,55 y el punto isoeléctrico pH de 8,6.

La toxina es homogénea con respecto al peso molecular y densidad. Los coeficientes de sedimentación y de migración electroforética revelan también que se trata de un solo componente. El análisis espectrofotométrico de la toxina indica una absorción máxima a 277 milímicras. El coeficiente de difusión por cm^2 y segundo se aproxima a $8 \cdot 10^{-7}$.

Respecto al peso molecular, BERGDOLL y col. (1965 b) señalan un valor de 30.000, obtenido por análisis químico (peso molecular de los aminoácidos) y confirmado el cálculo por métodos físicos (deducción a partir de las cifras de viscosidad, sedimentación y difusión). Sin embargo, para SCHANTZ y col. (1965) y SPERO y col. (1965), el peso molecular sería respectivamente de 35.300 y 35.380.

4. Purificación

La purificación de este tipo de toxinas, siquiera sea parcial, data de épocas relativamente recientes, especialmente si tenemos en cuenta que el estudio de las intoxicaciones alimentarias por estafilococos entra ya en terreno científico cuando DACK y col. (1930) logran producir una gastroenteritis en personas que se presentaron a ingerir voluntariamente porciones de un filtrado de cultivo de un estafilococo aislado de pasteles rellenos de crema, cuyo consumo había determinado una sintomatología análoga en un grupo de comensales.

BERGDOLL y col. (1951) dan cuenta de haber obtenido una toxina parcialmente pura, pero realmente no se obtiene un producto altamente purificado hasta pasados ocho años (BERGDOLL y col., 1959 b).

El material utilizado en los estudios de purificación era el producido por cultivo, en medios especiales, de una cepa de estafilococo (S-6) aislada por EVANS (1948) de gambas congeladas, sin implicación en casos de intoxicaciones humanas, y el tipo de enterotoxina correspondía al hoy denominado B.

Una de las consecuencias más importantes de la purificación de la toxina fue la preparación de un suero (antitoxina) con propiedades neutralizantes para aquélla (BERGDOLL y col., 1959 a).

Antes de describir algunos métodos de purificación podemos decir de una manera general que los procedimientos de extracción han progresado con los avances de las técnicas de fraccionamiento de mezclas complejas de proteínas y, en este sentido, independientemente o combinados, se han utilizado métodos como el uso de disolventes específicos a bajas temperaturas; sales de metales pesados (zinc), sulfato amónico, ácidos (fosfórico, clorhídrico), etanol, como precipitantes; electroforesis (papel, almidón), cromatografía (papel, carboximetil celulosa, Sephadex) y diálisis.

BERGDOLL y col. (1959 b) realizaron sucesivamente una precipitación ácida de cultivos líquidos, adsorción con hidróxido de aluminio, precipitación por alcohol, cromatografía sobre resina amberlita IRC-50 y electroforesis sobre almidón.

Posteriormente suprimieron los tiempos de precipitación y adsorción pasando directamente el líquido sobre la resina. De esta manera, el cultivo, previamente centrifugado y separado el sedimento, se diluía en el mismo volumen de agua destilada; el pH se ajustaba a 6 y la toxina se extraía haciendo pasar el líquido a través de un gramo de amberlita tratada con una solución de fosfato sódico a pH 6,2. La elución se efectuaba con la misma solución de fosfato y se precipitaba con alcohol etílico a -10°C , pudiéndose conservar la toxina largo tiempo liofilizada.

FREA y col. (1963) modificaron el método anterior empleando la filtración por gel sobre columna Sephadex y, a continuación, electroforesis Sephadex.

Según SCHANTZ y col. (1965), este método da un mayor porcentaje de impurezas comparado con el anterior.

Los autores últimamente citados han puesto a punto un método de purificación en gran escala obviando el inconveniente del escaso rendimiento de los métodos anteriores que proporcionan únicamente miligramos de toxina, lo que hacía difícil el estudio físico-químico detallado de ésta. El fundamento es similar (método cromatográfico) al descrito por BERGDOLL y col. (1959 b), utilizando al final carboximetilcelulosa con el fin de eliminar impurezas.

La purificación parcial de la enterotoxina A se había conseguido con un 70 por 100 de pureza, aproximadamente, por BERGDOLL y colaboradores (1959 b) y CASMAN (1958 y 1960). Una purificación mayor del tipo A parece que ha sido lograda, insistimos, por SCHANTZ y BERGDOLL, independientemente, quienes así lo han manifestado en comunicaciones personales y es de esperar que en un futuro próximo publiquen el resultado de sus investigaciones.

5. Estabilidad

5.1 *Formalina*.—El estudio de la acción del formaldehído sobre la enterotoxina reviste un interés especial desde los puntos de vista inmunoquímico y biológico.

En el momento actual es universalmente aceptado el carácter de pluralidad antigenica de la enterotoxina, pero hasta épocas relativamente recientes existían autores que no aceptaban esta propiedad de antígeno en la enterotoxina, basándose en la pérdida de poder inmunizante de la toxina modificada por la

acción del formol al 3 por 1.000 durante diez días a 37° C., según demostró MINNET (1938). Este criterio era influído, sin duda, por el concepto clásico de toxina al estilo de la tetánica, diftérica o botulínica.

Hoy se conoce perfectamente, sin embargo, que la enterotoxina o enterotoxinas, más propiamente, estafilocócicas provocan una respuesta inmunizante pequeña en los animales sensibles, debido a su escaso poder antigenético.

La acción de la formalina sobre este producto ha sido reconsiderada e investigada más ampliamente por SILVERMAN y col. (1966).

Los citados autores señalan que la toxina tratada con formalina 0,15 al 0,3 por 100 durante ocho horas pierde parcialmente la propiedad de precipitar el anticuerpo correspondiente. Comparado el toxoide con la toxina en pruebas de precipitación por doble difusión en gel daba una reacción de identidad parcial.

Por electroforesis se obtenían coeficientes de migración distintos para el producto modificado y sin modificar.

La toxina tratada durante cuarenta y ocho horas, con la misma proporción de formol, mantuvo sus propiedades eméticas para el mono (*M. rhesus*) por vía intravenosa, mientras que la dosis mortal mínima aumentó treinta veces.

La actividad vomitiva del toxoide decreció a partir de las cuarenta y ocho horas de tratamiento por el formol y desapareció totalmente a los nueve días.

También se perdió la actividad pirogénica para el conejo.

5.2—pH.—Existen algunas discrepancias respecto a la influencia del pH sobre la enterotoxina. MINNET (1938) refiere un caso de inactivación a pH 5, después de siete días a temperatura ambiente. HAMMON (1941) encontró activa la toxina acidificada a pH 4,5 después de una incubación a 37° C durante veinticuatro horas.

Según BERGDOLL y col. (1951), la enterotoxina mantiene cierta estabilidad a pH comprendido entre 3,5 y 10. SCHANTZ y col. (1965) han confirmado que la conservación del producto a pH 10 por espacio de varios días no causa pérdida alguna en su actividad.

5.3 Acción del frío.—Los filtrados de cultivo de estafilococos enterotóxicos no se inactivan a temperaturas próximas a 0° C., durante dos meses, según demostraron JORDAN y col. (1931) utilizando personas voluntarias para comprobar las propiedades enterotóxicas del producto antes y después del almacenamiento.

Según BERGDOLL y col. (1951), la enterotoxina parcialmente pura puede conservarse a la temperatura ambiente durante ocho meses sin pérdida aparente de potencia siempre que se deseque previamente y se mantenga en este estado.

La técnica de liofilización es la más adecuada para conservar la toxina purificada, pudiéndose mantener estable durante un año a la temperatura de 4° C., mientras que a la temperatura ambiente pierde actividad durante el mismo período (SCHANTZ y col., 1965).

5.4 Enzimas.—MINNET (1938) encontró que la enterotoxina era resistente a la acción del fermento lab, pero era destruida por la tripsina. HAMMON (1941) señaló que era resistente a la tripsina y pepsina.

BERGDOLL y col. (1951) obtuvieron resultados diferentes empleando tripsina cruda y purificada (cristalina) en el sentido de provocar la primera inactividad de la enterotoxina, mientras que la segunda carecía de esta acción.

Según SCHANTZ y col. (1965), las propiedades biológicas de la enterotoxina no resultan afectadas por la acción de la tripsina, renina o papaína.

La pepsina destruye su actividad a pH 2, pero no a pH superior. La proteasa la inactiva.

5.5 Resistencia al calor.—La literatura concerniente a la inactividad térmica de la enterotoxina ha sido revisada por DACK (1962 a). La enterotoxina, según esta doctrina, no se inactiva por la ebullición ni por temperaturas superiores (120° C.), y se citan varios casos de intoxicación originados por alimentos previamente calentados y sin microflora viable en el momento de consumo.

El mismo autor señala en otra publicación (DACK, 1962 b) la necesidad de una investigación más precisa para determinar exactamente el efecto del calor sobre la enterotoxina.

READ y col. (1965 c) estudian la inactivación térmica de la toxina B utilizando la técnica de difusión en gel para su detección.

Con buffer veronal a pH 7,2 como diluyente obtienen valores D diferentes para la enterotoxina cruda y purificada, siendo éstos de 64,5 y 52,3, 40,5 y 34,4, 29,7 y 23,5, 18,8 y 16,6, 11,4 y 9,9 minutos para temperaturas respectivas de 210, 220, 230, 240 y 250° F. El valor z para la enterotoxina purificada fue de 58,3.

Estos resultados son confirmados por READ y BRADSHAW (1966) utilizando leche como diluyente en lugar de buffer veronal.

Una completa inactividad de 30 microgramos de enterotoxina B requeriría dieciséis minutos a 121° C., siendo también la enterotoxina cruda ligeramente más resistente que el material purificado.

Según FOSTER y BERGDOLL (1967), la enterotoxina A es mucho más sensible al calor que la enterotoxina B, siendo la C de una sensibilidad media.

6. Enterotoxina y bacteriófagos

ALLISON (1949) y WILLIAMS y RIPPON (1962) señalaron que la mayor parte de los estafilococos productores de enterotoxina pertenecían al grupo III de la serie de bacteriófagos para la tipificación de estafilococos. Según el primer autor, los porcentajes hallados eran de 64 por 100 pertenecientes al grupo III y 17 por 100 al grupo IV (fagotipo 42 D).

Para WILLIAMS y RIPPON, citados anteriormente, la proporción sería del 82,8 correspondiente al grupo III, siendo el resto difícilmente tipificables con la dosis de rutina (RTD).

Otros autores han sustentado criterios semejantes respecto a los mencionados grupos III y IV y enterotoxigenésis (WORSECH, 1960; THATCHER y ROBINSON, 1962; PARKER, 1962, y MUNCH-PETERSEN, 1963).

Nosotros mismos (SUAREZ, 1966) hemos encontrado los siguientes patrones en cinco cepas enterotóxicas aisladas de leche natural: 42D; 54,42E, 81; 6, 7, 47, 54, 75; 54,42E y 54,42E, 81. Naturalmente que, el escaso número de gérmenes enterotóxicos ensayados, nos impidió establecer conclusión alguna referente a este punto.

CASMAN (1966) no encuentra relación entre la producción de enterotoxina y un determinado modelo o grupo de bacteriófagos.

El mismo autor CASMAN (1965) había demostrado la posibilidad de transmitir las propiedades enterotoxigénicas mediante la lisogénesis de cepas no enterotóxicas con fagos atemperados aislados de cultivo enterotoxigénicos tipo A.

En el momento presente la tipificación de estafilococos por medio de bacteriófagos se considera indicada únicamente en los casos de identificación de una determinada cepa, investigación de su origen humano o animal, determinación del origen de un brote infeccioso o tóxico, pero no puede establecerse una correlación entre enterotoxigenésis y fagos, ya que se han descrito con bastante frecuencia gérmenes implicados en casos de intoxicación humana cuyo fagotipo no encuadra en el grupo III (ANGELOTTI, 1965).

7. Modo de acción

La acción farmacológica de la enterotoxina no es bien conocida por el momento (FOSTER y BERGDOLL, 1967).

BAYLIS (1940), utilizando en sus experimentos toxinas no purificadas, concluyó que la enterotoxina provoca el vómito mediante el estímulo periférico conducido a través del nervio vago.

BORISON y BANG (1953) discuten las investigaciones anteriores y expresan el concepto de que «todas las respuestas eméticas siguen un arco reflejo que pasa a través del centro vomitivo».

El modo de acción de la enterotoxina total o parcialmente purificada ha sido estudiado extensamente por SUGIYAMA y col. 1958, 1961 y 1963; SUGIYAMA y MC KISSIC, 1966, y SUGIYAMA, 1966.

Uno de los estudios más significativos de estos autores (1961) demostró que la enterotoxina B actúa en el mono periféricamente, vía nervio vago, estando situado el centro vomitivo en la médula oblongada.

Posteriormente, CLARK y col. (1962) demostraron que esta vía no se sigue en el gato, ya que la ablación de la zona correspondiente de la médula oblongada no afectó a la respuesta a la enterotoxina B administrada intravenosamente.

Ultimamente, SUGIYAMA y MC KISSIC (1966) han demostrado una similitud entre la respuesta de los animales a la enterotoxina y las endotoxinas de las bacterias gram-negativas.

Nosotros mismos (SUAREZ, 1966) hemos podido comprobar en cultivos de 18 cepas de estafilococos coagulasa-positivo de origen lácteo, cinco de las cuales eran enterotoxinas, una cierta acción antihistamínica detectable sobre intestino (ileon) de cobayo en baño nutricio. Esta acción no existía en cultivos de estafilococos coagulasa-negativos del mismo origen y se debía a sustancias metabólicas distintas de la enterotoxina, producidas por los estafilococos de mayor actividad enzimática.

En consecuencia con lo expuesto creemos sería interesante 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.

8. Susceptibilidad humana

DACK (1962 a) subraya que la sensibilidad del hombre frente a la toxina estafilocócica varía entre grandes límites, hecho comprobado tanto en casos de intoxicación espontánea como en experiencias con voluntarios.

Por otra parte, es difícil determinar esta propiedad en los casos de intoxicación humana, ya que, si bien puede llegar a conocerse la concentración de la toxina en un alimento, es imposible precisar la cantidad de alimento ingerido por cada persona afectada.

De los estudios de HALL y col. (1965) y READ y col. (1965 a y b) se deduce que las cantidades mínimas de antígeno enterotóxico que pueden detectarse por medio de la técnica de precipitación por doble difusión en gel se hallan comprendidas entre 0,02 a 0,05 microgramos por gramo de alimento.

Considerando estas cantidades mínimas detectables por gramo y un consumo de 100 g. de alimento tóxico, puede calcularse que la dosis necesaria para producir la enfermedad en el hombre sea de uno a cinco microgramos de toxina pura (ANGELOTTI, 1966).

GASMAN y BENNETT (1965) estimando una correlación directa entre el número de estafilococos y cantidad de enterotoxina producida, sin considerar las diferencias de producción debidas al medio, calcularon que la concentración de enterotoxina en alimentos responsables de casos de intoxicación humana (jamón y pasteles con 50 a 200 millones de estafilococos por gramo) sería de 0,01 a 0,04 microgramos por gramo.

Indudablemente, las cifras resultan un tanto especulativas y basadas en técnicas de una sensibilidad limitada, probablemente son altas; sin embargo, revelan que la cantidad de enterotoxina capaz de causar intoxicación en el hombre es muy baja.

Hasta el momento en que puedan realizarse estudios en personas voluntarias, con preparados de toxina altamente purificada, no podrá saberse con certeza cuál es la dosis mínima con efectos améticos para el hombre (ANGELOTTI, 1967).

La dosis vomitiva está en cambio perfectamente determinada en el *M. rhesus* y, según BERGDOLL (1967), es de 5 microgramos por vía oral para las enterotoxinas A, B y C.

SCHANTZ y col. (1965) habían determinado que esta dosis para la enterotoxina B aplicada al mono era aproximadamente de 0,1 microgramos por kilogramo de peso, por vía intravenosa, y 0,9 microgramos por kilogramo por vía intrágastrica.

INVESTIGACION DE LA ENTEROTOXINA EN ALIMENTOS

1. Métodos indirectos de diagnóstico

1.1 Determinación del número de estafilococos.—Es, sin duda, el método más simple de los utilizados en el diagnóstico de intoxicaciones alimentarias por estafilococos, y por este solo hecho merece la pena de que su rigor científico sea discutido ampliamente, puesto que es el único método realizable en la mayoría de los laboratorios españoles dependientes de los organismos que tienen encomendada la misión de velar por la salud pública.

Es lógico, por otra parte, si tenemos en cuenta el coste que supondría el mantenimiento de colonias de gatos o monos, no pretender dotar de estos medios o de otros que requieran una alta especialización del personal, a los laboratorios de control, sino únicamente a aquellos de investigación que por la naturaleza del trabajo que realizan los necesiten.

La técnica de determinación del número de estafilococos por gramo de alimento precisa de la utilización de medios de cultivo selectivos. De éstos existe un número muy elevado en la actualidad y, a pesar de la frecuencia con que se describen nuevos medios, no se dispone de uno enteramente satisfactorio para ser empleado en la calificación higiénica de los alimentos.

La necesidad de unas propiedades selectivas es evidente con el fin de evitar el crecimiento de una microflora mixta las más de las veces variadísima y con una pequeña proporción de estafilococos. Pero lo realmente difícil es graduar la selectividad al punto conveniente, bien sea por medio del cloruro sódico, telurito potásico, polimixina, neomicina, etcétera. Siendo que cuando aquélla es reducida crecen gérmenes de otros géneros en número apreciable (*Proteus*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) e incluso mohos y levaduras, y cuando se incrementa se inhibe el crecimiento de los propios estafilococos en determinado grado.

Por otra parte, hasta el momento presente no se ha ideado el medio que permita el crecimiento exclusivo de los estafilococos coagulasa-positivos (ANGELOTTI, 1967).

El recuento de la especie *Staphylococcus aureus* ha de hacerse, por tanto, diferenciando las colonias de probables coagulasa-positivos y negativos, lo que requiere experiencia y habilidad, así como la necesidad de realizar una prueba de coagulasa con las colonias dudosas.

Nosotros (SUAREZ, 1966) hemos recomendado un medio hiperclorurado con fucsina ácida decolorada, como indicador de la fermentación del manitol en un ambiente cuyo potencial de oxidoreducción se halla estabilizado por la presencia de ácido tioglicólico y cistina. La adición del antibiótico actidiona a este medio en proporción de 40 p. p. m. evita el crecimiento de mohos y levaduras, sin afectar al desarrollo microbiano.

Mientras que en la calificación higiénico-sanitaria de un alimento interesa conocer también el número total de estafilococos, como índice del grado de conservabilidad o contaminación, cuando se trata de precisar la naturaleza de un brote tóxico debe determinarse con toda exactitud posible el número de estafilococos coagulasa-positivos por gramo de producto sospechoso.

Esto requiere la diferenciación de tipos de colonias sobre la placa de medio y practicar la reacción de coagulasa con una o varias colonias de cada clase.

Este punto es muy importante puesto que, a partir de los estudios de EVANS y col. (1950), se considera a los estafilococos enterotóxicos incluidos entre los coagulasa-positivos.

Algunos autores han citado casos de estafilococos coagulasas-negativos capaces de producir enterotoxina (THATCHER y SIMON, 1957; BIRZU y col., y BERGDOLL y col., 1967), pero las citas han sido realmente escasas en número y no han modificado el concepto clásico expuesto por EVANS y col. (1950) y confirmado por innumerables investigadores.

Si bien se acepta, de manera general, que solamente los estafilococos coagulasa-positivos son enterotoxicénicos, no se ha precisado con suficiente exacti-

tud el porcentaje de estos últimos dentro de aquel grupo. DOLMAN (1934) dio a beber a voluntarios humanos filtrados de cultivo de 110 cepas, concluyendo que solamente un pequeño porcentaje de estafilococos coagulasa-positivos son capaces de originar intoxicaciones alimentarias.

EVANS, BUETTNER y NIVEN (1950), utilizando monos como animales de prueba demostraron propiedades tóxicas en nueve de doce cepas de estafilococos coagulasa-positivos, cinco aislados de alimentos normales en apariencia y siete de origen humano.

CASMAN (1965) establece por medio del empleo de sueros específicos anti-A y anti-B y técnicas de gel-difusión, grandes diferencias de porcentaje de enterotóxicos, según el origen de los estafilococos coagulasa-positivos, siendo el más elevado de 32,6 por 100 para los de origen humano.

Nosotros (SUAREZ, 1966) encontramos cinco estafilococos enterotóxicos de 18 ensayados de origen lácteo, empleando conjuntamente la inoculación al gato y pruebas serológicas de precipitación en gel.

Si admitimos, y no debemos olvidar el rigor científico de los estudios de DOLMAN (1934) utilizando voluntarios humanos en el diagnóstico de la enterotoxina, que el porcentaje de estafilococos enterotóxicos dentro del grupo de coagulasa-positivos no debe ser muy alto, debemos reflexionar sobre el verdadero valor del recuento de estafilococos en alimentos incriminados de casos de intoxicación alimentaria, como medio de diagnóstico de la enfermedad.

Si se trata de un brote de intoxicación en el que han resultado afectadas varias personas, el estudio epidemiológico, período de incubación y sintomatología de la enfermedad son de un valor inapreciable, especialmente cuando se valoren conjuntamente con la enumeración de estafilococos coagulasa-positivos por gramo de alimento inculpado como causa de intoxicación.

Hay que tener presente, sin embargo, que el hecho de no encontrar estafilococos coagulasa-positivos no excluye la posibilidad de que se halle presente la enterotoxina, habiendo desaparecido los gérmenes que la originaron (destrucción térmica, lisis). Pero esto no puede demostrarse más que con la obtención, concentración y purificación de la toxina presente en el alimento, habida cuenta de que la inoculación de extractos de alimentos no purificados es totalmente inespecífica, conceptos éstos en los que insistiremos más adelante.

Por tanto, el caso más favorable que permite diagnosticar con gran probabilidad este tipo de intoxicación es el hallazgo de gran número de gérmenes de la especie *Staphylococcus aureus*, coagulasa-positivos, por gramo de alimento sospechoso de causar una intoxicación cuyos caracteres epidemiológicos y clínicos resultan los típicos de la enterointoxicación de origen estafilocócico.

Respecto al número de microorganismos necesarios para producir niveles peligrosos de toxina, si bien no se conoce exactamente y probablemente varía con la clase de alimento, pH, temperatura, etc., existen en la literatura algunos datos orientadores con relación a este punto, cuyo comentario no debemos pasar por alto.

DACK (1962 a) señala que entre las cepas toxicigeras de estafilococos la producción de enterotoxina es una función del crecimiento y que los alimentos considerados como causa de intoxicación contiene cientos de millones de estafilococos por gramo.

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

TANNER y TANNER (1953) mencionan números que oscilan entre 30 y 1.000 millones por gramo de alimentos que originaron, bajo condiciones de experimentación, síntomas de intoxicación en voluntarios que ingirieron cantidades de 20 a 60 gramos.

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

ELEK (1959) destaca que se requiere una abundante proliferación de estafilococos para convertir un alimento en peligroso desde el punto de vista que nos ocupa. POST (1959) y POST y col. (1961) confirman la opinión anterior.

CASMAN y BENNETT (1965) comunicaron que habían encontrado cifras comprendidas entre 50 y 200 millones de estafilococos por gramo en jamón y pasteles responsables de incidentes tóxicos de esta clase.

De todo lo expuesto anteriormente se infiere que el medio de diagnóstico más sencillo sería el basado en la existencia de una sintomatología típica de los individuos afectados y de varios millones de estafilococos coagulasa-positivos en el alimento sospechoso, sin olvidar las limitaciones ya comentadas.

1.2 *Aislamiento y estudio de los distintos tipos de «Staphylococcus aureus»*.—La obtención de cultivos puros a partir de las distintas clases de colonias sospechosas y el estudio bioquímico de las cepas aisladas se ha comprobado respectivamente que no es la vía más adecuada para el diagnóstico de las propiedades enterotóxicas.

De las numerosas pruebas utilizadas en la caracterización bioquímica y fisiológica del género *Staphylococcus* (pigmentación, reducción del telurito potásico, producción de fosfatasa, de lipasa, de desoxirribonucleasa, de coagulasa, licuación de gelatina, fermentación del manitol y propiedades hemolíticas, entre otras) las de mayor valor serían la producción de coagulasa (EVANS y col., 1950), fermentación del manitol (EVANS, 1947 y 1948; EVANS y NIVEN, 1950, y MOSSEL, 1962) y formación de desoxirribonucleasa (WEECKMAN y CATLIN, 1967; DI SALVO, 1958; JEFFRIES, 1961, y JAY, 1962).

Sin embargo, ninguna de las técnicas citadas empleadas aisladamente o en conjunto es de un valor superior a la determinación de coagulasa para el diagnóstico que se persigue, y ello nos evita de discutir este aspecto con una mayor amplitud.

1.3 *Caracterización de las enzimas de origen bacteriano presentes en el alimento*.—CHESBRO y AUBORN (1967) proponen la investigación enzimática como medio de detectar la presencia de estafilococos en alimentos sometidos a tratamientos térmicos, variaciones de pH o contaminaciones masivas por otros gérmenes, que haría difícil la tarea de aislar los estafilococos supervivientes, en caso de existir.

El enzima a investigar propuesto por estos autores es la desoxirribonucleasa, el más resistente a los agentes físicos y biológicos y poco común en el resto de las especies bacterianas capaces de competir con los estafilococos y producir un desarrollo abundante en los alimentos.

La sensibilidad del método es semejante a la de las pruebas serológicas de enterotoxina y de gran sencillez en su ejecución.

El fundamento de la técnica consiste en separar las sustancias precipitables por el sulfato amónico y valorar cualitativa o cuantitativamente la cantidad de desoxirribonucleasa existente en el precipitado, por la capacidad de ésta para hidrolizar el DNA.

El único inconveniente para aplicarlo al diagnóstico de la enterotoxina, caso de confirmarse los estudios citados, es la falta de una auténtica especialidad, pero podría aplicarse cuando se aprecie una sintomatología típica en los enfermos, sobre alimentos sospechosos en los que la microflora estafilocócica haya desaparecido, para intentar descubrir la presencia anterior de dicha microflora, permitiendo, además, su cuantificación referida a fases previas de elaboración y almacenamiento.

1.4 *Ensayo de producción de toxina en medios artificiales*.—El estudio de los distintos tipos de colonias de estafilococos sospechosos de ser causa de una intoxicación se dirige, siempre que es posible, hacia un ensayo de producción de toxina en medios artificiales de laboratorio, como etapa previa y necesaria para poner de manifiesto la toxina misma, si es que existe, mediante pruebas serológicas de precipitación por sueros específicos, o bien únicamente las propiedades enterotóxicas por medio de inoculaciones en animales de experimentación sensibles.

La producción de enterotoxina en pequeñas cantidades con estos fines se alcanzan con facilidad en el laboratorio; pero a partir de los estudios de CASMAN y BENNETT (1961 y 1963) es obligado recomendar, en especial para la obtención de la enterotoxina tipo A, el empleo del medio BHI (caldo-infusión de corazón y cerebro de ternera), con un pH inicial de 5,3 convertido en semisólido por la adición de 0,7 por 100 de agar o bien a utilizar con la técnica, ya descrita, de cultivo en saco de celofán sobre un medio líquido depositado en un frasco de Roux.

El medio BHI, a pH de 5,3, es muy superior al clásico de DOLMAN y WILSON (1940) en la producción de enterotoxina A (CASMAN y BENNETT, 1963).

La incubación se realiza durante cuarenta y ocho a setenta y dos horas, a temperaturas comprendidas entre 30 ° y 37 ° C. en la atmósfera normal.

1.5 *Inoculaciones*.—La prueba biológica más eficaz al fin citado es la ingestión de los filtrados de cultivo de estafilococos por personas voluntarias en las que la toxina provoca un cuadro típico semejante al que se produce en la enfermedad natural. Este método ha sido utilizado con relativa frecuencia en las décadas próximas pasadas (DACK, 1962 a), pero su uso se ha abandonado prácticamente en la actualidad por ser peligroso e inhumano.

Son pocas las especies animales con una sensibilidad acusada frente a la enterotoxina.

El primer animal empleado con fines experimentales fue el *Macacus rhesus* (DACK y col., 1930), siendo administrada la toxina por vía oral.

Posteriormente, DOLMAN y col. (1936) y DOLMAN y WILSON (1940) proponen el uso del gato en el diagnóstico de la enterotoxina, aconsejando la utilización de gatitos (*kitten-test*) y la inoculación por vía intraperitoneal.

HAMMON (1941) comunica haber hallado reacciones inespecíficas en el gato, siguiendo la técnica original de los autores citados, y recomienda la inoculación de gatos adultos por vía intravenosa como medio de diagnóstico más seguro.

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

Según SURGALLA y col. (1953) y DACK (1962 a), el *Macacus rhesus* es el animal más adecuado para la experimentación de enterotoxina. La especificidad de la prueba se incrementa administrando la toxina mediante inoculación intrágastrica en lugar de utilizar la vía oral.

No obstante, el coste y mantenimiento de colonias de monos resultan prohibitivos para la mayoría de los laboratorios.

El gato resulta bajo este aspecto mucho más asequible y es el animal de experimentación que más se ha utilizado en el diagnóstico de la intoxicación por enterotoxina.

CASMAN (1958) estima que es un animal muy sensible, aunque con variaciones en la susceptibilidad individual frente a dicho fármaco, y aun a pesar de ello considera que la inoculación al gato es un método tan aconsejable como el uso del *Macacus rhesus*, recomendando el método de Hammon (1941), intravenoso.

THATCHER y ROBINSON (1962) han utilizado dicho animal en sus experiencias con resultados aceptables. También ha sido empleado extensivamente por ANGELOTTI y colaboradores (1967), antes de conocerse las técnicas de precipitación en gel y aun después para confirmar algunos resultados serológicos. Estos autores han seguido la técnica de Hammon (1941).

La inoculación del filtrado de cultivo de la cepa problema requiere previamente una preparación con el fin de eliminar posibles reacciones inespecíficas que incluye una filtración por presión a través de una tela tupida, estéril, en caso de que el medio sea semisólido y con el fin de separar el agar. El líquido obtenido presenta una coloración propia que varía del amarillo dorado a blanco porcelana, según el tipo de pigmento producido.

Los gérmenes se separan por centrifugación a 5.000 r. p. m. durante diez minutos, decantando la parte sobrenadante, que se debe pasar a través de un filtro de Seitz estéril.

El filtrado obtenido puede contener hemolisinas capaces de provocar en el animal una reacción orgánica, por tanto, es preciso destruirlas por la acción del calor, de la digestión pancreática o bien neutralizarlas con sueros específicos hemolíticos (CASMAN, 1958).

Al determinar la dosis a inocular conviene tener en cuenta la edad y peso del animal, así como la vía de inoculación, pudiendo oscilar la cantidad de 2 a 10 ml.

Debe inocularse siempre un animal testigo, al menos, con una dosis superior del medio base usado en el ensayo de producción de la enterotoxina.

La aparición de vómitos o diarrea a partir de los veinte minutos y antes de una hora de la inoculación se considera como testimonio de la existencia de enterotoxina en el producto inoculado.

Las inoculaciones se limitan únicamente a los filtrados de cultivo, ya que la inoculación de extractos de alimentos es inespecífica (DACK, 1962 a), siendo este un hecho bien conocido.

1.6 Reacciones serológicas.—La purificación de las enterotoxinas ha hecho posible la obtención de antitoxinas y la aplicación de métodos serológicos en la identificación y valoración de las toxinas.

En especial, la adaptación de las técnicas generales de difusión en gel ha reducido la necesidad de animales de experimentación y, a su vez, ha constituido la base de pruebas específicas para descubrir la enterotoxina de los propios alimentos (HALL y col., 1965; CASMAN y BENNETT, 1965; READ y col., 1965 a y b).

Siendo este último un aspecto de gran interés y actualidad, será discutido a continuación al estudiar los métodos directos de diagnóstico que tienen por objeto la investigación de la enterotoxina en el propio alimento.

2. Aislamiento e identificación de la toxina presente en el propio alimento

Ninguno de los métodos de diagnóstico indirectos descritos anteriormente posee las condiciones de exactitud necesarias para ser considerado como prueba irrefutable de la existencia de una enterotoxina estafilocócica, preformada en un alimento sospechoso de ser la causa de una intoxicación alimentaria.

Este concepto es generalmente aceptado y puede sintetizarse en los términos expresados por HALL y colaboradores (1963): «El aislamiento de estafilococos coagulasa-positivos de un alimento implicado en un caso de intoxicación alimentaria constituye únicamente una evidencia circunstancial de que el verdadero agente etiológico ha sido encontrado. La determinación por medio de animales de experimentación, de que una cepa aislada es capaz de producir enterotoxina en los medios artificiales, no prueba que hizo lo mismo en el alimento.

«La prueba positiva depende de la demostración de la enterotoxina en el mismo alimento. Tal prueba puede obtenerse alimentando monos o voluntarios humanos, pero los resultados están sujetos a variaciones en susceptibilidad, hecho bien conocido en ambos casos.»

La inoculación al gato, joven o adulto, por vía intraperitoneal o intravenosa de soluciones o extractos no purificados de alimentos es inespecífica. En algunos alimentos existen factores eméticos, no bien conocidos, para el gato (ANGELOTTI, 1967).

La comprobación por SURGALLA y col. (1954) de que la enterotoxina era una proteína antigenicamente activa, la purificación parcial de la enterotoxina A (CASMAN, 1958) y purificación de la enterotoxina B (BERGDOLL y col., 1959 a) abrieron las vías de investigación que han conducido a la utilización de los métodos serológicos, muy principalmente las técnicas de precipitación en gel, en la detección de la propia enterotoxina en los alimentos.

2.1 Extracción.—La obtención y purificación de la enterotoxina presente siempre en cantidades mínimas en alimentos capaces de originar intoxicaciones, ha sido el primer paso hacia la identificación por medios serológicos.

HALL y col. (1963) utilizaron un método de extracción simple a base de suero fisiológico tamponado con fosfatos y a pH de 7,2. El líquido se añadía a partes iguales a una papilla del alimento problema, se repartía en tubos de centrífuga que se calentaban a 50° C. durante quince minutos y, una vez enfriados a temperatura ambiente, se centrifugaban a 10.000 r. p. m. por espacio de veinte minutos.

La parte sobrenadante, transparente, clara, se utilizaba como antígeno en pruebas de gel-difusión.

HALL y col. (1965) modifican el método de extracción anterior, y dicha modificación consiste, en esencia, en pasar la parte sobrenadante por una columna de amberlita CG50 tratada por buffer fosfato y a pH de 6,2 a 6,4. La elución se verifica con el mismo buffer a pH 6,4 a 6,8, y el líquido obtenido se concentra hasta la veinteauna parte por medio de diáfragma a través de 30 por 100 de polivinilpirrolidona.

Este concentrado se usa como antígeno en pruebas de gel-difusión (métodos de OUDIN, 1952, y OAKLEY y FULTHROPE, 1953).

CASMAN y BENNET¹ (1965) describen un método de extracción separando las toxinas de los extractos salinos de alimentos previamente concentrados por diálisis, por adsorción con carboximetilcelulosa o filtración a través de columnas Sephadex G-100, elución en buffer fosfato, concentración por liofilización y dilución previa a la identificación por difusión y precipitación en gel (micrométodos de precipitación de WADSWORTH, 1957, y CROWLE, 1958).

READ y col., (1965 a y b) proponen métodos de extracción específicamente adaptados al queso y leche, ya que en estos alimentos se produce una interferencia cuando se utiliza la técnica de HALL y colaboradores (1965), debida a la migración de sustancias opacas presentes en los derivados lácteos y que afectan de esta forma a los resultados de las pruebas de gel-difusión.

La preparación previa de la leche requiere, según los autores citados, las siguientes etapas: acidificación, filtración, neutralización, calentamiento y centrifugación, para utilizar el líquido sobrenadante.

El queso debe mezclarse con buffer veronal y sufrir nuevamente centrifugación, filtración de la parte sobrenadante, acidificación, nueva centrifugación, neutralización, calentamiento y centrifugación final utilizando la parte clara en las pruebas de difusión en gel.

2.2 Preparación de un suero específico.—El descubrimiento del carácter antigenico de la enterotoxina se debe a DOLMAN y WILSON (1938) y DOLMAN (1944), siendo SURGALLA y col., (1953) quienes confirmaron por vez primera aquellos estudios, y posteriormente CASMAN (1958, 1959 y 1965) realizó amplias investigaciones sobre la producción de un suero específico y aspectos aplicativos relativos al diagnóstico serológico de las intoxicaciones alimentarias producidas por estafilococos.

Para realizar las reacciones de precipitación en gel es preciso disponer de un suero específico de suficiente potencia y para conseguir éste se necesita, a su vez, una toxina altamente purificada.

Nosotros mismos (SUAREZ, 1966) hemos conseguido, siguiendo la técnica propuesta por CASMAN (1958, 1960), un suero utilizando como antígeno enterotoxina tipo A parcialmente purificada que contenía también antígenos comunes a estafilococos no enterotóxicos, los cuales producen anticuerpos que deben ser adsorbidos por estafilococos coagulasa-positivos incapaces de formar enterotoxina, con el fin de convertir al suero obtenido en monovalente y específico para la entertoxina estafilocócica.

La adsorción de anticuerpos no específicos es, sin embargo, una técnica engorrosa y no puede considerarse como idónea en la preparación de un suero monovalente. Dichos inconvenientes podrán obviarse en el futuro, puesto que se ha logrado ya purificar la enterotoxina A, precisamente la que produce con más frecuencia casos de intoxicación alimentaria.

Utilizando la enterotoxina como antígeno se ha conseguido producir anticuerpos con varias especies animales: monos, gatos, perros, caballos, asnos y conejos (DACK, 1962 a).

(1) El doctor E. P. CASMAN recibió el premio de servicios distinguidos del Departamento de Salud, Educación y Bienestar de Washington, en 1966. Dicho premio es el más alto honor que concede aquel Departamento y en este caso fue otorgado «por la destacada contribución a la concepción y desarrollo de un método sencillo y sensible para el descubrimiento de enterotoxina, en alimentos sospechosos de causar intoxicaciones». (Comentario de la revista *News* de la Sociedad Americana de Microbiología, 32, 45, 1966.)

En nuestro caso (SUAREZ, 1966) hemos usado el conejo, animal que presenta una fuerte reacción orgánica ante la inoculación de este antígeno tóxico, con una pérdida de peso que es necesario vigilar para, con arreglo a ella, graduar la inoculación de la toxina, empleando, además, sustancias coadyuvantes que retarden su absorción o bien disminuir la dosis prolongando la inoculación durante tres meses.

No debemos olvidar que la enterotoxina ejerce una acción antigénica débil y que, especialmente en los compuestos no purificados totalmente, puede existir una acción letal capaz de provocar caquexia en el conejo.

Las cepas que deben utilizarse por su adecuado rendimiento y especificidad en la producción de enterotoxina para este fin son las cepas tipo 196E, 243 y 137, que corresponden a las entertoxinas A, B y C, respectivamente.

2.3. Pruebas de precipitación en gel.—Puede decirse que en el diagnóstico serológico de estas toxinas se han empleado las distintas técnicas generales de precipitación en gel (métodos de Ouchterlony, 1948; OUDIN, 1952; Oakley y Fulthrope, 1953; Wadsworth, 1957, y Crowle, 1958), las cuales han sido ensayadas por diferentes autores: CASMAN (1958, 1960), CASMAN y BENNETT (1965), HALL y col., (1965) y READ y colaboradores 1965 a y b, entre otros.

Las reacciones antígeno-precipitina por difusión en gel son delicadas y resultan afectadas por una serie de factores que describe CROWLE (1961) con detalle.

En general, la técnica de difusión única en tubo de ensayo (OUDIN, 1952) no permite detectar el antígeno en concentraciones inferiores a un microgramo por mililitro. Como esta cantidad difícilmente se observa en los extractos de alimentos inculpados de ocasionar intoxicaciones, éstos deben ser concentrados.

La difusión única no permite diferenciar sistemas múltiples de antígeno-anticuerpo; pero, por otra parte, la reacción es rápida (menos de veinticuatro horas) y puede utilizarse con un suero monovalente (HALL y col., 1965; ANGELOTTI, 1967).

Para descubrir concentraciones de enterotoxina por debajo de un microgramo puede utilizarse la doble difusión en gel, en tubo de ensayo (método Oakley y Fulthrope, 1953), usada por HALL y col., (1965), o bien el método Ouchterlony (1948), en placa de Petri, seguido por CASMAN (1958), o el de Wadsworth (1957), modificado por CASMAN (1960) y CASMAN y BENNETT (1965).

En los métodos de Ouchterlony y Wadsworth, las líneas de precipitación tienen lugar entre las depresiones circulares o pocillos de antígeno o suero situados en el agar con arreglo a un modelo determinado.

Estas líneas permiten una identificación precisa del antígeno-problema, ya que en caso de ser originadas por el mismo antígeno se fusionan en el punto de conjunción formando una sola línea continua o línea de identidad, mientras que si los antígenos no son idénticos las líneas se cruzan en sus extremos y la continuidad no se establece.

Naturalmente que, cuando se utiliza esta vía de diagnóstico, es necesario verificar pruebas con el extracto de alimento y sueros para cada una de las enterotoxinas antes de confirmar o excluir la intoxicación alimentaria de origen estafilococónico (FOSTER y BERGDOLL, 1967).

Teniendo en cuenta la posible existencia de otros tipos inmunológicos de enterotoxina, aparte de los ya descritos, parece lógico pensar que no ha llegado todavía el momento de reemplazar de una manera total las pruebas de inoculación en animales sensibles por las reacciones serológicas, sin que esto signifique menoscabo para estos métodos dotados de gran especificidad.

3. Otros métodos

A parte del gato y mono han sido utilizados otros animales en la investigación biológica de la enterotoxina: ratón blanco, ratón salvaje, rata blanca, cobayo, conejo, perro, cerdo, rana y canario. La mayoría de estos animales carecen del reflejo vomitorio, valorándose la diarrea como síntoma específico (DACK, 1962 a).

RAJ (1962) propuso la utilización de peces tropicales, incluso se han empleado a este fin arácnidos (araña negra y roja) por JORDAN y MAC BROOK (1931) y nematodos (DEL VALLE, 1960).

Otros métodos incluyen el ensayo sobre cultivo de órganos (MILONE, 1961) y embrío de pollo (KLENITZ, 1962).

LUVI y col., (1956) y THATCHER (1966) han realizado estudios sobre la enterotoxina B por medio de la espectrofotometría con infrarrojos.

FRIEDMAN y WILLE (1964 y 1965) y GENIGEORGIS y SADLER (1966 a y b) han aplicado las técnicas de inmunofluorescencia en la detección de la toxina.

ROBINSON y THATCHER (1965) y JOHNSON y col. (1967) han investigado sobre las posibilidades de la prueba de hemoaglutinación en el diagnóstico serológico de este producto.

De todas las pruebas últimamente citadas es esta última la que se presenta como más prometedora. Según THATCHER (1966), se encuentra todavía en las primeras etapas y requiere el uso de una toxina altamente purificada como patrón y término de comparación.

JOHNSON y col. (1957) han apreciado en esta técnica tanta o mayor sensibilidad que en las de gel-difusión y es mucho más rápida a la hora de obtener los resultados, siendo suficiente algunas horas en la hemoaglutinación en lugar de días para la precipitación en gel.

4. Frecuencia de cada tipo de toxina

Existe una absoluta unanimidad en considerar el tipo A de enterotoxina como el más comúnmente implicado en casos de intoxicación alimentaria en el hombre, siguiéndole en orden de frecuencia el tipo D (CASMAN 1966).

En una investigación sobre estafilococos aislados de 75 incidentes de intoxicación ocurridos en distintas regiones, CASMAN (1966) encontró que el 49 por 100 de los estafilococos producían enterotoxina A, y 29 por 100 producían una mezcla de enterotoxina A y otro tipo, generalmente D. Un 10 por 100 de los cultivos producían el tipo D únicamente, y solamente el 4 por 100 producían el B y un número similar al C.

FORSTER y BERGDOLL (1967), como resultado de los estudios efectuados por el segundo autor, indican que los casos de intoxicación por el tipo C pueden ser más frecuentes de lo que señalan las cifras de CASMAN (1966).

Este último autor (CASMAN, 1966) estableció que el gato, muy sensible a los otros tipos de enterotoxina, lo es muy poco frente al tipo C.

5. Profilaxis de la enfermedad

Las condiciones necesarias a la presentación de casos de intoxicación alimentaria de origen estafilocócico en el hombre son bien conocidas y pueden resumirse en cuatro puntos:

- a. Presencia de cepas de estafilococos enterotoxicogénicas.
- b. Alimento sobre el que pueda crecer el germen y producir enterotoxina.
- c. Temperatura adecuada para el crecimiento del germen.
- d. Tiempo suficiente para un desarrollo microbiano abundante.

Un análisis de estas condiciones nos ha de conducir, por tanto, al conocimiento de la profilaxis de este tipo de intoxicaciones.

5.1. *Contaminación con estafilococos enterotoxigénicos.*—El origen más frecuente de las contaminaciones radica en las personas que manipulan alimentos y muy especialmente si padecen infecciones supuradas como acné o forúnculos. La tos y el estornudo pueden determinar también contaminaciones.

La leche de ubres con mamitis puede contener estafilococos enterotóxicos e incluso la leche natural procedente de vacas sanas (SUAREZ, 1966).

El control de las contaminaciones se logra extremando las medidas de higiene y es de especial importancia en alimentos cocidos o pasterizados, ya que al no existir una microflora mixta abundante ni sus efectos competitivos sobre los estafilococos, estos últimos podrán desarrollarse sin impedimento alguno.

5.2 *Composición del alimento.*—Son muchos los alimentos en los que puede crecer y producir enterotoxina el *Staphylococcus aureus*, y su enumeración resultaría prolífica. Los preparados que incluyen yema de huevo, leche y nata, como son las natillas, pasteles rellenos, diversos tipos de salsas, han dado lugar a numerosas intoxicaciones de este tipo.

El queso, la leche natural y jamón pueden ser, en determinadas condiciones, excelentes substratos para la producción de toxina.

No resultan adecuados al desarrollo de estafilococos los alimentos con un pH inferior a 5 o baja humedad relativa, ni tampoco los producidos por fermentación, debido en este último caso a un efecto competitivo por parte del agente específico de la fermentación (FOSTER y BERGDOLL, 1967).

Hay que tener en cuenta que el *Staphylococcus aureus* no es un germen competidor y su crecimiento es suprimido por otros organismos con facilidad, no solamente en alimentos fermentados, sino en alimentos frescos con una microflora mixta.

Como ejemplo podemos citar que la enterotoxina solamente se forma en que-
so si el cultivo *Starter* es inhibido por bacteriófagos o agentes bacteriostáticos (FOS-
TER y BERGDOLL, 1967), y en la carne puede detectarse crecimiento de estafilococos
y producción de enterotoxina solamente si el producto se recoge con asepsia y se
halla exento de gérmenes o si se somete a la cocción antes de realizar la inoculación
de estafilococos (CASMAN y col., 1963).

Debe mencionarse que, aunque la producción de enterotoxina es función del crecimiento de una cepa de estafilococo enterotoxigénica (DACK, 1962 a), no siempre existe una correlación obligada entre ambos factores. MC COY y FABER (1966) encontraron microorganismos en la carne que inhibían la formación de enterotoxina sin afectar sensiblemente al crecimiento del *Staphylococcus aureus*. Otros investigadores (FRIEDMAN, 1966; ROSENWALD y LINCOLN, 1966) han podido demostrar que la estreptomicina inhibe la síntesis de la enterotoxina B permitiendo al microorganismo crecer con normalidad.

5.3 *Temperatura y tiempos de crecimiento.*—Los límites de temperatura para el desarrollo del *Staphylococcus aureus* son aproximadamente 5° C., y 45° C., con un crecimiento óptimo a 35-37° C.

La velocidad de multiplicación declina a medida que la temperatura se aproxima al mínimo. WALKER y HARMON (1966) determinaron los tiempos de generación de los estafilococos, utilizando la leche como medio de cultivo, siendo éstos de 0.5 a 1 hora, a 30-37° C.; de 1.7 a 2 horas, a 21° C., y de 18 a 28 horas, a 10° C.

El tiempo que se requiere para la producción de enterotoxina en alimentos es función de la cuantía de la contaminación, de la composición del alimento, de la temperatura de incubación y, posiblemente, de otros factores (FOSTER y BERGDOLL, 1967).

Aunque no se han realizado experimentos encaminados a establecer una correlación entre el tiempo de incubación y producción de enterotoxina en alimentos, ésta puede deducirse del estudio de casos de intoxicaciones alimentarias espontáneas, siendo en algunas de ellas el período de incubación solamente de cuatro horas (DACK, 1962 a).

5.4 Destrucción térmica y preservación del alimento por el frío.—Las temperaturas de pasterización destruyen los estafilococos patógenos (ZOTTOLA y col., 1965, y WALKER y HARMON, 1966). Pero, a su vez, repetimos, los alimentos pasteurizados constituyen un substrato idóneo, sin competición microbiana, para los estafilococos. Deben evitarse, por tanto, las contaminaciones posteriores a la pasteurización.

Las temperaturas inferiores a 4° C. no permiten el desarrollo de estafilococos en los alimentos; por tanto, una cadena de frío ininterrumpida de la producción al consumo, utilizando simplemente temperaturas de refrigeración, es suficiente para evitar este tipo de intoxicación.

La enfermedad cuyo estudio nos ha ocupado este trabajo es producida por presencia de una toxina preformada en el alimento mismo y la acción del frío impide esta formación.

No ocurre lo mismo con las infecciones de tipo alimentario producidas por gérmenes del género *Salmonella*, pongamos por ejemplo, en las que la acción patógena no se ejerce por una sustancia tóxica determinada, sino en virtud de una virulencia suficiente para provocar una infección en el hombre.

En este caso la acción del frío, sin afectar a la vitalidad del microorganismo de una manera definitiva, no resultaría útil.

5.5 Control bacteriológico.—Un control bacteriológico sistemático de los alimentos, encaminado a descubrir la enterotoxina, parece irrealizable por ahora.

En Norteamérica, hasta el momento presente solamente se ha utilizado esta investigación a gran escala en casos de una evidencia epidemiológica de la enfermedad. En 1966 se examinaron 2.100 lotes de queso procedentes de distintas fabricaciones, deteniendo la venta de dos millones de kilogramos de producto sospechoso hasta la identificación de los lotes tóxicos. Todas las partidas negativas, que representaban el 97 por 100 del total, se destinaron al consumo (CASMAN, 1966).

El método empleado fue el de la extracción de la enterotoxina e identificación por la técnica de precipitación en gel a que ya nos hemos referido.

La producción masiva de los elementos que intervienen en estas pruebas requiere gran riqueza de medios, sólo al alcance de unos pocos laboratorios.

En el momento actual puede afirmarse que la necesidad de un control bacteriológico con fines diagnósticos queda limitado al estudio de las causas de las intoxicaciones alimentarias, una vez que estas intoxicaciones han afectado a un grupo de personas produciendo una sintomatología específica.

El control bacteriológico con fines preventivos no es aplicable, a nuestro juicio, en tanto no se disponga de una técnica de diagnóstico sencilla y segura, utilizable como método de rutina en la investigación de la enterotoxina.

Un método de este tipo no se vislumbra a la luz de las investigaciones actuales en un futuro próximo.

RESUMEN

En el amplio campo de la investigación sobre el género *Staphylococcus* existe un aspecto, el de las enterotoxinas estafilococicas, cuyo contenido científico se halla en plena formación y ha sido objeto de numerosas publicaciones en los últimos años.

En el presente trabajo se ha pretendido realizar una revisión y puesta al dia de tan interesante tema, poniendo especial énfasis en el estudio de la naturaleza y tipos de enterotoxina, propiedades físico-químicas, purificación, modo de acción y métodos de investigación de la toxina en los alimentos de consumo humano, con un estudio crítico sobre las distintas técnicas de diagnóstico más en uso, análisis de las posibilidades de empleo de nuevas técnicas en la detección de estas sustancias tóxicas y descripción de las bases biológicas en que deben asentarse las normas de profilaxis de esta intoxicación alimentaria.

RESUME

Le genre *Staphylococcus* a été largement étudié. Pendant les derniers ans des travaux sur les enterotoxines staphylococciques ont été très abondants.

Dans ce rapport on mentionne les enterotoxines, sa constitution, types et propriétés physico-chimiques, purification et mode d'agir. On signale les procédures pour le dépistage de la toxine dans les produits alimentaires et on fait aussi l'étude critique des techniques de diagnostic habituel.

On mentionne les bases physiologiques de la prophylaxie de l'intoxication alimentaire à enterotoxine staphylococcique.

SUMMARY

The genus *Staphylococcus* has been largely studied. During the past years frequent researchs on staphylococcal enterotoxin have been carried out.

In this paper enterotoxins, their chemical constitution, types and physic-chemical properties, purification technics and way of action are mentioned. The detection procedures of toxin in human food are also mentioned, as well as a critical study of enterotoxin routine diagnostic technics.

The physiological basis of enterotoxin food poisoning prophylactics are described.

BIBLIOGRAFIA

ALLISON (V. D.): Proc. Soc. Med., 42: 216-220 (1949).

ANGELOTTI (R.): «Enterotoxicogenic staphylococci», Capítulo del libro *Foodborne infections and intoxications*. Editado por H. Reiman. Próxima publicación por Academic Press, New York (1957).

BAYLIS (M.): J. Exper. Med., 72: 669 (1940).

BERGDOLL (M. S.): Ann N. Y. Acad. Sci., 139-143 (1956).

«The Staphylococcal enterotoxins.» Capítulo del libro *Some Foodborne Microbial Toxins*. Editado por G. N. Wogan y R. I. Mateles. Próxima publicación por MIT Press, Cambridge, Massachusetts (1957).

— y KADAVY (J. L.), SURGALLA (M. J.) y DACK (G. M.): Arch. Biochem., Biophys., 33: 259-262 (1951).

— y LAVIN (B.), SURGALLA (M. J.) y DACK (G. M.): Science, 116: 633-634 (1952).

- y SURGALLA (M. J.) y DACK (G. M.): *J. Immunol.*, 83: 334-338 (1959 a).
- y SUGIYAMA (H.) y DACK (G. M.): *Arch. Biochem. Biophys.*, 85: 62-69 (1959 b).
- BERGDOLL (M. S.), BORJA (C. R.) y AVENA (R. M.): *J. Bacteriol.*, 90: 1481-1485 (1965 a).
- y CHU (F. S.), HUANG (I. Y.), ROWE (C.) y SHIH (T.): *Arch. Biochem. and Biophys.*, 112: 104-110 (1965 b).
- y WEISS (K. F.) y MUSTER (M. J.): *Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, página 12 (1967).
- BIRZU (S.), SCHERZER (P.), GHEORGHIU (M.) y SMU OVICI (M.): *Ietena*, 10: 121 (1961).
- BORISON (H. L.) y WANG (S. C.): *Pharmacol. Rev.*, 5: 193 (1953).
- CASMAN (E. P.): *Publ. Health. Rep.*, 73: 599-609 (1958).
- J. Bacteriol.*, 85: 715-716 (1960).
- Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 128: 124-131 (1965).
- Recent advances in the microbiology of foodborne diseases. Staphylococcal food poisoning. Comunicación presentada a la reunión anual de la Am. Pub. Health. Assoc. San Francisco, California (1966).
- y BERGDOLL (M. S.) y ROBINSON (J.): *J. Bacteriol.*, 85: 715-716 (1963).
- y MCCOY (D. W.) y BRANDLY (F. J.): *Appl. Microbiol.*, 11: 498-499 (1963 b).
- y BENNETT (R. W.): *J. Bacteriol.*, 86: 18-23 (1963).
- Appl. Microbiol.*, 12: 363-367 (1964).
- Appl. Microbiol.*, 12: 363-367 (1965).
- y KEPHART (R. E.): *Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, pág. 13 (1966).
- CHIESBRO (W.) y AUBORN (K.): *Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, pág. 12 (1967).
- CLARCK (W. G.), WANDERHOFF (G. E.) y BORISON (H. L.): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111: 205 (1962).
- Immunodiffusion Academic Press*. New York (1961).
- DACK (G. M.): *Food poisonning. The University Chicago Press, Chicago* (1962 a).
- «Staphylococcal enterotoxin.» *Chemical and biological hazards in food*. Ames: Iowa State University Press (1962 b).
- y CARY (W. E.), WOOLPERT (O.) y WILGERS (H.): *J. Prevent. Med.*, 4: 167-175 (1930).
- DAUER (C. C.): «Summary of disease outbreaks.» *Public Health Reports de 1952 a 1961*.
- DAVISON (E.) y DACK (G. M.): *J. Infect. Dis.*, 62: 219-223 (1936).
- DEL VALLE (M. R.): M. S. Thesis. Univ. of Wisconsin (1960).
- DEWBERRY (E. B.): *Food poisonning*. Leonard Hill, London (1959).
- DI SALVO (J.): *Med. Technicians Bull.*, 9: 191-196 (1958).
- DOLMAN (C. E.): *J. Infect. Dis.*, 55: 172-183 (1934).
- Can. J. Publ. Health*, 35: 337-351 (1944).
- y WILSON (R. J.) y CROCKFORD (W. H.): *Can. J. Publ. Health*, 27: 489-493 (1936).
- J. Immunol.*, 35: 13-30 (1938).
- Can. J. Publ. Health*, 31: 68-71 (1940).
- ELEN (S. D.): *Staphylococcus pyogenes and its relation to disease*. E. and S. Livingstone. London (1959).
- EVANS (J. B.): *J. Bacteriol.*, 54: 266 (1947).
- J. Bacteriol.*, 55: 793-800 (1948).
- y NIVEN (C. F.): *J. Bacteriol.*, 59: 545-550 (1950).
- y BUETTNER (L. G.) y NIVEN (C. F.): *J. Bacteriol.*, 60: 481-484 (1950).
- FOSTER (F. M.) y BERGDOLL (M. S.): «Staphylococcal food poisoning.» Comunicación presentada a la *Hemispheric Conference on Safety and Importance of Foods*. Mayaguez, Puerto Rico (1967).
- FRAZIER (W. C.): *Food Microbiology*. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York (1958).
- FREA (J. I.), MC COY (E.) y STRONG (F. M.): *J. Bacteriol.*, 86: 1308-1313 (1963).
- FRIDMAN (M.): *J. Bacteriol.*, 92: 277-278 (1966).
- y WHITE (J. D.): *J. Bacteriol.*, 89: 1155 (1964).
- Appl. Microbiol.*, 89: 1155 (1965).
- FULTON (F.): *Brit. J. Exp. Path.*, 24: 65-69 (1943).
- GENIGEORGIS (G.) y SADLER (W. W.): *J. Food Sci.*, 31: 441-449 (1966 a).
- J. Food Sci.*, 31: 605-609 (1966 b).
- HALL (H. E.), ANGELOTTI (R.) y LEWIS (K. H.): *Publ. Health Rep.*, 12: 1089-1098 (1963).
- Health Lab. Sci.*, 2: 179-191 (1965).
- HAMMON (W. M.): *Am. J. Publ. Health*, 31: 1191-1198 (1941).
- HIBNICK (H. S.) y BERGDOLL (M. S.): *Arch. Biochem. Biophys.*, 85: 70-73 (1959).
- JAY (J. M.): *Appl. Microbiol.*, 10: 247-251 (1962).
- JEFFRIES (Ch. D.): *Am. J. Clin. Path.*, 30: 114-118 (1961).
- JOHNSON (H. M.), HALL (H. E.) y SIMONS (M.): Copia remitida por los autores al tiempo del envío a la revista *Appl. Microbiol.* (1957).
- JORDAN (E. O.) y MC BROOME (J.): *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 29: 161-162 (1931).
- y DACK (G. M.) y WOOLPERT (O.): *J. Prevent. Med.*, 5: 383-386 (1931).
- KIENITZ (M.): *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig.*, 184: 87 (1962).
- MCCOY (D. W.) y FABER (J. E.): *Appl. Microbiol.*, 14: 372-377 (1966).
- MILONE (A. N.): *Am. Publ. Health Assoc.*, 89th Annual Meeting. Detroit. Michigan (1961).
- MINNET (F. C.): *J. Hyg.*, 33: 623-637 (1938).
- MOSSEL (D. A.): *J. Bacteriol.*, 84: 1140-1147 (1962).
- MUNCH-PETERSEN (E.): *J. Food Sci.*, 28: 692-710 (1963).
- LEVI (L.), MATHESON (B. H.) y TRATCHER (F. S.): *Science*, 123: 64 (1956).
- OAKLEY (G. L.) y FULTHROPE (A. J.): *J. Pathol. Bacteriol.*, 65: 49-60 (1953).
- OUCITERLONY (O.): *Arkiv. Kemi. Mineral. Geol.*, 26B: 1-9 (1948).
- ODIN (J.): *Methods Med. Res.*, 5: 335-378 (1952).
- PARKER (M. T.): *J. Appl. Bacteriol.*, 25: 389-402 (1962).
- POST (F. J.): *The Sanitarium*. Jan-Feb.: 203 (1959).
- y BLISS (A. H.) y O'KEEFE (W. B.): *J. Food. Sci.*, 26: 436-441 (1961).
- RAJ (H.): *Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, pág. 65 (1962).
- READ (R. B.), BRADSHAW (J.), PRITCHARD (W. L.) y BLACK (L. A.): *J. Dairy Sci.*, 48: 1-10 (1965).
- J. Dairy Sci.*, 48: 420-424 (1965 b).
- Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, pág. 31 (1965 c).
- J. Dairy Sci.*, 49: 202-203 (1966).
- REJAS (F.) y OVEJERO (J. I.): *An. Fac. Vet. León*, 8: 141-160 (1962).
- ROBINSON (J.): *Thatcher (F. S.): Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, pág. 72 (1965).
- ROSENVALD (A. J.): *Lincoln (R. E.): J. Bacteriol.*, 92: 279-280 (1966).
- SAIZ MORENO (L.): *Rev. San. Hig. PUBL.*, 32: 139-164 (1958).
- Rev. Veter.*, 28: 539-548 (1963).
- SCHANTZ (E. J.), ROESSLER (W. G.), WAGMAN (J.), SPERO (L.), DUNNEY (D. A.) y BERGDOLL (M. S.): *Biochem.*, 4: 1011-1016 (1965).
- SILVERMAN (S. J.), SCHANTZ (E. J.), ESPESETH (D. A.) y ROSSLER (W. G.): *Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, pág. 43 (1966).
- SMITH (I. M.): *Staphylococcal infection*. The Year Book Publishers, Inc., Chicago (1958).
- SPERO (L.), STEFANYE (D. J.), BRECKER (P. I.), JACOBY (H. M.), DALIWICZ (J. E.) y SCHANTZ (E. J.): *Biochem.*, 4: 1029-1030 (1965).
- SUAREZ (G.): *An. Fac. Vet. León*, 12: 11-166 (1966).
- SUGIYAMA (H.), BERGDOLL (M. S.) y DACK (G. M.): *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 97: 900-903 (1958).
- y CHOW (K. L.) y DRAGSTEDT (L. R.): *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 108: 92 (1961).
- y BERGDOLL (M. S.) y DACK (G. M.): *J. Infect. Dis.*, 111: 233-238 (1962).
- y McKISSIG (E. M.) y BERGDOLL (M. S.): *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 113: 468-470 (1963).
- J. Bacteriol.*, 92: 349-352 (1966).
- SURGALLA (M. J.), KADAVY (J. L.), BERGDOLL (M. S.) y DACK (G. M.): *J. Infect. Dis.*, 89: 180-184 (1951).
- J. Immunol.*, 72: 398-403 (1953).
- J. Immunol.*, 72: 398-403 (1954).
- TANNER (F. W.): *Food-borne infections and intoxications*. The Garrad Press, Publishers. Champaign, Illinois (1953).
- THATCHER (F. S.) y SIMON (W.): *Intern. Bull. Bacteriol. Taxon.*, 7: 1-36 (1957).
- Can. Med. Assoc. J.*, 94: 582-590 (1966).
- y MATHESON (B. H.): *Can. J. Microbiol.*, 1: 382-400 (1955).
- y ROBINSON (J.): *J. Appl. Bacteriol.*, 25: 378-388 (1962).
- WAGMAN (J.), EDWARDS (R. C.) y SCHANTZ (E. J.): *Biochem.*, 4: 1017-1023 (1965).
- WALKER (G. C.): *Harmon (L. G.): Appl. Microbiol.*, 14: 584-590 (1966).
- WEECKMAN (B.): *Catlin (B. W.): J. Bacteriol.*, 73: 747-763 (1957).
- WILLIAMS (R. E. O.): *Rippon (J. E.): J. Hyg.*, 50: 320-353 (1962).
- WORMS (R.): *L'infection staphylococcique*. Editions Médicales Flammarion, Paris (1960).
- WORSECK (M.): *Milchwissenschaft*, 15: 525 (1960).
- ZOTTOLA (E. A.), AL-DULAIMI (A. N.) y JEZESKI (J. J.): *J. Dairy Sci.*, 48: 774 (1965).