

SIGNIFICADO HIGIENICO DE LA PRESENCIA DE ESTAFILOCOCOS, PATOGENOS O SUS TOXINAS EN LECHE EN POLVO

Por S. Ovejero del Agua
G. Suárez Fernández
A. Santos Gutiérrez

A medida que la variación del nivel de vida afecta a los hábitos culinarios se observa un incremento en la incidencia de intoxicaciones alimenticias de origen estafilocócico.

Esta enfermedad, por lo aparatoso de su sintomatología coincidente, por fortuna, con una baja letalidad, es siempre una desagradable experiencia a que el hombre puede hallarse sometido y, por tanto, viene a resultar un proceso de gran interés sanitario y social.

El papel de la leche en polvo como portador inerte de estafilococos y sus toxinas fue señalado independientemente, y con un intervalo de dos años, por ANDERSON y STONE,¹ y ARMijo y COL.² y a partir de entonces (1957) se han diagnosticado, en distintos países, brotes tóxicos debidos al género *Staphylococcus* y producidos por el consumo de leche en polvo.

Las erupciones tóxicas estudiadas, producidas por el consumo de este alimento, presentan como característica diferencial importante, la de afectar con preferencia a poblaciones infantiles en edad escolar.

En España ha venido funcionando, estimulado por la UNICEF, un programa escolar de alimentación infantil, establecido por el Ministerio de Educación y Ciencia y administrado por el Servicio Escolar de Alimentación de dicho Ministerio y Gerencia de Productos Lácteos. Este Servicio utiliza, en sus fines, muchos miles de toneladas de leche en polvo que le son suministradas por industrias lácteas nacionales.

La ausencia en nuestro país de investigaciones sobre el tema que nos ocupa y la posibilidad de que ciertos trastornos de naturaleza gastro-

entérica, en colectividades escolares, puedan ser de origen estafilocócico, han sido los motivos que nos impulsaron a la realización de este trabajo.¹

La importancia creciente que en la actualidad se está concediendo a la investigación en el campo de la Microbiología de los alimentos deseados, no hace sino confirmar la oportunidad de elección, en su día, de la materia en estudio.

MATERIALES Y METODOS

Se han estudiado un total de 168 muestras de leche en polvo, procedentes de distintas industrias de transformación láctea, ubicadas todas ellas en el territorio nacional. Las muestras pretenden ser representativas de la producción total de leche en polvo en España y se han obtenido de los distintos tipos y calidades elaborados por las diferentes industrias productoras.

El presente estudio se ha llevado a efecto por medio de las siguientes técnicas:

- a) Determinación del número de colonias de estafilococos.
- b) Estudio bioquímico, afectando a distintas propiedades enzimáticas.
- c) Tipos de enterotoxina.
- d) Curvas de crecimiento de los estafilococos coagulasa positivos.
- e) Lisotipia o tipificación por bacteriófagos.

Número de colonias.

En la determinación del número de colonias de estafilococos se siguió el método descrito por HARRIGAN y Mc. CANCE³, sembrando un c. c. de cada dilución, realizada a partir de leche en polvo en solución Ringer 1 : 4, en placas de Petri, mezclando, como es norma, con el medio fundido, S-110 en este caso y a la temperatura de 45°C.

El frasco, de cierre hermético, con el resto de la dilución de leche (10 grs. de leche en polvo y enrarse a 100 c. c.) se incubaba, en todos los casos, a 37°C. durante 48 horas, junto a las placas de Petri. Expresado en otros términos, se utilizaba la propia solución madre de leche en polvo, en la proporción aproximada en que se utiliza para la alimentación humana, como medio de enriquecimiento y con el fin de descubrir las muestras que por contener un pequeño número de estafilococos no crecieran sobre el medio sólido distribuido en placa, lo que significaba, probablemente, ausencia en 0,1 gramo de leche en polvo, en cuyo caso se utilizaba el medio líquido de leche en polvo diluida e incubado, para sembrar

¹ Subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia con cargo a los créditos destinados al fomento de la investigación en la Universidad.

a partir de él nuevas placas con medio selectivo capaz de poner de manifiesto, en su caso, la presencia de estafilococos.

Las colonias de estafilococos, de distinta apariencia sobre un medio de cultivo a base de cloruro sódico como agente selectivo, lactosado, con fucsina ácida como indicador y potencial de oxidorreducción restringido⁴ fueron aisladas y conservadas para su estudio posterior.

Elegimos este medio, cuya composición expresamos a continuación, porque suministra mayor número de indicaciones que ningún otro medio de los propuestos para el estudio y aislamiento de gérmenes pertenecientes al género *Staphylococcus* y que son: fermentación del manitol, con diferentes intensidades fácilmente apreciables, halo de opacidad y tonalidad de la colonia desde el color amarillo dorado al blanco porcelana.

Composición:

— Extracto de levadura (DIFCO)	4	g.
— Tripticasa (BBL)	12	g.
— d - Manitol (DIFCO)	10	g.
— Cloruro sódico (MERCK)	75	g.
— Bacto-Agar.....	15	g.
— Fucsina ácida (SCHERRING) al 5 por mil, decolorada con NaOH	10	c.c.
— L - Cistina (DIFCO)	0,25	g.
— Ácido thioglicólico (DIFCO)	0,3	c.c.
— Actidiona (UPJOHN)	0,4	g.
— Agua.....	1.000	c. c.

$$\text{pH} = 7,3 \pm 0,1$$

A este medio básico, después de esterilizado y enfriado a 45°C se le añadían 50 c. c., aproximadamente, de yema de huevo fresca y obtenida asépticamente, mezclando suavemente y repartiendo el medio en placas de Petri estériles. Solidificado el medio y seca la superficie se procedía a realizar una siembra por diseminación con varilla de vidrio acodada con el único fin de diferenciar el mayor número de colonias posibles, aspecto que siempre resulta difícil en las siembras en el espesor del agar debido a la aparición de colonias puntiformes.

Reducción del telurito potásico.

En la realización de esta prueba se utilizó el medio de BAIRD-PARKER⁵ distribuido en placas de Petri. La técnica propiamente dicha consistía en sembrar en estría sobre la superficie del medio, seca, sin película de

humedad, con un total de seis estrías por placa, correspondientes a otras tantas cepas. Se consideró positivo el resultado cuando se produjo un ennegrecimiento de la estría en un plazo de 24 horas, incubando a la temperatura de 37°C.

Determinación de fosfatasa.

Se empleó el medio de BARBER y KUPER,⁶ inexistente en forma deshidratada en el mercado y de la siguiente composición:

— Extracto de carne (LAB-LEMCO)	10 g.
— Peptona (OXOID)	10 g.
— Cloruro sódico (MERCK)	5 g.
— Agar.....	15 g.
— Agua	1.000 c.c.

pH = 7,4

Al agar fundido y enfriado a 45°C se añadía, con las debidas precauciones de asepsia, difosfato de fenolftaleína en la proporción de 0,01 g. por cien c. c. de agar.

Repartido el agar en placas de Petri, se procedía a la siembra en estría, como para la prueba anterior.

Después de incubadas las placas y comprobado el crecimiento de los gérmenes en las estrías de siembra, se colocaban en posición invertida sobre un frasco de amoníaco. En caso positivo, a consecuencia de la acción de la enzima fosfatasa, queda libre fenolftaleína que en medio alcalino produce color rojo. El enrojecimiento de la estría se consideró, por tanto, como caso positivo.

Lipólisis en yema de huevo.

En el caso de que una estirpe del género *Staphylococcus* posea la enzima lipasa se produce una opacidad alrededor de la colonia o la estría de siembra en cualquier medio sólido con yema de huevo. Sin embargo, anotado este carácter, al tiempo que la reducción del telurito sobre el medio de BAIRD-PARKER⁵, se repitió la prueba en el medio líquido de GUILLESPIE y ALDER⁷, cuya composición, por no figurar en los catálogos de las casas comerciales especializadas en la fabricación de medios de cultivo desecados, reseñamos en los términos en que se utilizó en nuestro estudio:

— Extracto de carne (LAB-LEMCO)	10 g.
— Peptona (OXOID)	10 g.
— Cloruro sódico (MERCK)	25 g.

— Glucosa (DIFCO)	10 g.
— Yema de huevo	50 g.
— Agua.....	1.000 c. c.

pH = 7,2

El medio bastante transparente, debido a la presencia de ClNa, se esterilizó directamente, sin clarificación previa, por filtración a través de discos Seitz, distribuyéndolo en tubos de ensayo estériles, almacenando a 0°C., cuando la utilización no era inmediata.

Se consideró como resultado positivo todo signo de opacidad o en turbiamiento en los tubos sembrados e incubados por espacio de 48 horas a 37°C.

Producción de desoxirribonucleasa.

Se investigó sobre el medio de WEECKMAN y CATLIN⁸, preparado por DIFCO LABORATORIES y en cuya utilización se siguió la técnica recomendada por dicha casa, sembrando en estría, superficialmente, incubando por espacio de 48 horas a 37°C, después de lo cual se efectuó un revelado añadiendo ClNa normal que al actuar sobre el DNA, despolimerizado por acción de la enzima específica, origina transparencia y, en caso contrario, opacidad. Es decir, cuando se trata de estirpes de estafilococos productores de desoxirribonucleasa se produce una zona transparente en los márgenes de las colonias sobre un fondo opaco.

Fermentación anaeróbica del manitol.

A fin de comprobar esta importante característica que, juntamente con la producción de coagulasa, ha servido de base para la clasificación del género *Staphylococcus* en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, seleccionamos el medio propuesto por MOSSEL⁹, integrado por los siguientes componentes:

— Tripticasa (BBL)	10 g.
— Extracto de levadura (DIFCO)	1,5 g.
— Cloruro sódico (MERCK)	5 g.
— D-manitol (DIFCO)	10 g.
— Púrpura de bromocresol (MERCK)	0,015 g.
— Agar.....	15 g.
— Agua	1.000 c.c.

pH = 7,1

La técnica consistió en sembrar por picadura las distintas cepas sobre el medio citado distribuido en tubos de 15 cm. por 15 mm., hasta una altura de 8 cm, como mínimo.

La incubación se continuó durante 4 días a 37°C y el resultado positivo requería que todo el tubo, incluido el fondo, virase al amarillo.

Reacción de coagulasa.

En la práctica de esta reacción se empleó plasma de conejo liofilizado (DIFCO). La marcha de la prueba fue realizada con la mayor meticulosidad ya que nos había de servir para clasificar los estafilococos en dos grupos: saprofitos y patógenos. Se siguió la pauta de THATCHER y CLARK¹⁰ modificada en el sentido de utilizar, para comprobar la coagulación, una placa de polivinilo alveolada, en lugar de tubos de pequeño tamaño, lo que simplifica la técnica y da gran precisión a la lectura de resultados.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Cultivo de las cepas almacenadas en la nevera en caldo de cerebro y corazón (BHI, DIFCO) a 37°C. durante 24 horas.
2. Reconstitución del plasma de conejo liofilizado con 3 c.c. de agua destilada estéril para cada vial.
3. Distribución del plasma en porciones de 0,3 c.c. en los alvéolos de la placa de polivinilo.
4. Añadir 0,1 c.c. de cada cepa cultivada sobre la correspondiente porción de plasma mezclando por agitación suave.
- 5.⁶ Incubar a la temperatura de 37°C y en ambiente húmedo para evitar una excesiva concentración del plasma.
6. Examinar la placa en busca de los alveolos en que se haya producido coagulación a las 4 horas, repitiendo el examen a las 24 horas.

Se consideró positiva la reacción cuando se evidenciaron signos de coagulación, aunque ésta no afectase a toda la masa, extremo de fácil apreciación introduciendo en cada alveolo un asa de platino. Cuando existe únicamente un pequeño coágulo se adhiere al asa de platino y ello permite una clara observación.

Estudio de los distintos tipos de enterotoxina.

Se utilizó la técnica de microinmunodifusión de WADSWORTH¹¹ adaptada por CASMAN y Col.¹² al estudio y caracterización de las enterotoxinas estafilococicas. En la producción de enterotoxina se empleó el medio propuesto por CASMAN³:

— Caldo de corazón y cerebro (DIFCO)	37 g.
— Fosfato disódico (MERCK)	5 g.
— Agar.....	7 g.
— Agua.....	1.000 c.c.
pH = 5,5	

El medio repartido en placas de Petri de 15 cm. en cantidad de 25 c.c. semisólido, se sembró en superficie, extendiendo cuatro gotas de cultivo, en el medio BHI (DIFCO), después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C., mediante una varilla de vidrio acodada. La incubación se realizó en atmósfera normal durante 72 horas. Cada contenido de una placa se llevaba a un tubo de centrifuga decantando la parte sobrenadante después de sufrir una centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 15 minutos. La parte decantada se filtró por placa Seitz. Este era el antígeno empleado en las pruebas de difusión en gel.

Las cepas que no produjeron cultivo abundante a pH 5,5 se cultivaron sobre el mismo medio a un pH de 6,8, procediendo de idéntica manera a la descrita.

Los sueros antitóxicos (frente a los tipos A. B. C y D de enterotoxina) nos fueron suministrados por los Drs. CASMAN (Department of Health, Education and Welfare, Washington) y BERGDOLL (Food Research Institute, Madison, Winsconsin).

Práctica de la reacción de precipitación por difusión en gel.

Elegimos el micrométodo de WADSWORTH¹¹, aconsejado por CASMAN y Col.,¹² por exigir pequeñas cantidades de suero, por su rapidez y claridad de las reacciones.

El método de difusión en agar sobre portaobjetos fue descrito en detalle por CROWLE¹⁴ y hemos adoptado en nuestro estudio aquella técnica, ligeramente modificada por CASMAN y Col.¹² en el sentido de incorporar 0,8 por cien de barbital sódico (pH = 7,4) y 0,01 por cien de mertiolato en gel de agar y utilizar plantillas de plástico en las que la distancia entre los centros de los pocillos, central y periféricos, es de 4,5 en lugar de 4,0 m.m.

La técnica requiere una preparación minuciosa de todos los elementos que en ella intervienen y su ejecución exige cierta pericia y un conocimiento detallado de la propia técnica que, en atención a estos factores, describimos a continuación:

a) Preparación de los portaobjetos.

En primer lugar se debe disponer de portaobjetos perfectamente limpios y secos lo que requiere sucesivamente: hervir en solución detergente débil, lavar varias veces en agua destilada, inmersión en alcohol o acetona, secar en ambiente exento de polvo y almacenar en un recipiente de cierre hermético.

Sobre los portaobjetos limpios se coloca una cinta de plástico de las utilizadas en operaciones de aislamiento eléctrico, a ambos lados del centro, dejando un espacio de 2,54 cm. o ligeramente superior. Para ello se corta un trozo de cinta de 9,5 cm. de largo, se enrolla a la distancia de

0,5 cm. del borde extremo del portaobjetos, dando dos vueltas. El espacio comprendido entre los trozos de plástico, debe lavarse con alcohol y secar con un lienzo fino si durante la operación anterior se han manchado con polvo.

Se hace preciso también recubrir la superficie de portaobjetos, situada entre las zonas de plástico, con 0,2 por cien de agar en agua destilada, previa fusión del agar por ebullición. Fundido el agar se completa el volumen de agua y se enfriá a 55°C., temperatura a que se vierte, por medio de una pipeta, sobre los portaobjetos, en su parte central. Los portaobjetos van colocados sobre una bandeja de la estufa y en la misma posición se colocan a secar. La atmósfera debe hallarse exenta de polvo.

b) Preparación de la película de agar y colocación de la plantilla.

Se vierten 0,35 c.c. de agar especial, fundido y enfriado a 55°C, en el espacio central del portaobjetos, limitado por las cintas de plástico.

La composición del agar es la siguiente:

— Cloruro sódico (MERCK)	8,5 g.
— Mertiolato (ELI LILLY)	0,1 g.
— Barbital sódico (MERCK)	8 g.
— Agar (Noble de DIFCO)	12 g.

pH = 7,4

El agar, vertido sobre los portaobjetos, se deja enfriar, en atmósfera libre de polvo, y cuando alcanza estado sólido, en breves minutos, se colocan las plantillas de plástico extendiendo previamente grasa de silicona en la cara inferior de la plantilla, que va a contactar precisamente con el agar.

c) Adición del suero y antígenos.

Es muy conveniente dibujar en el cuaderno de resultados el diagrama del modelo de plantilla utilizado, indicando el contenido de cada pocillo.

La antitoxina, diluida al 1:10 en suero fisiológico con un 10 por cien de BHI (DIFCO) se deposita en el orificio central y en los orificios periféricos la toxina de referencia y toxinas problema, a ambos lados de aquélla. Esta es la prueba de orientación y es necesario, en especial cuando se trata de indagar la presencia de enterotoxina estafilocócica, realizar diluciones y emplear cuatro de ellas, al menos, sobre la misma plantilla. Se trata de buscar la relación óptima del antígeno frente al antisuero, que se ha de traducir en la aparición de una línea de precipitación de gran nitidez, a la mitad de distancia entre los pocillos respectivos.

Las fuentes o pocillos se llenan, de acuerdo con el esquema anotado, y por medio de pipetas Pasteur. Muy frecuentemente resulta necesario expulsar del fondo de los pocillos burbujas de aire. Para ello debe disponerse de capilares finos de vidrio, cerrados en ambos extremos a la llama.

Los capilares se introducen, uno en cada pocillo, de forma rutinaria, para asegurar la expulsión de burbujas, a veces no visibles.

La incubación de los portaobjetos, así dispuestos, debe hacerse en atmósfera húmeda, utilizándose a tal fin placas de Petri conteniendo algodón húmedo, por espacio de 3 días a temperatura ambiente y de 24 horas si se incuban a la temperatura de 37°C.

d) Lectura de la reacción.

Para realizar la lectura se comienza por desplazar la plantilla lateralmente. A continuación se examina el portaobjetos por transparencia y sobre un fondo oscuro.

En caso positivo debe aparecer una sola línea de precipitación entre la fuente central de suero y la lateral del antígeno correspondiente.

A veces es posible identificar las líneas de precipitación por su forma de unión con la producida por una toxina de referencia, distinta en caso de una identidad total, parcial o inidentidad.

En especial para el sistema en que interviene la enterotoxina D se hace preciso introducir los portaobjetos en acetato de cadmio al 1 por cien por espacio de 15 minutos y con el fin de aumentar la visibilidad de las líneas de precipitado.

También pueden colorearse las preparaciones con negro de amido, azocarmín o, de preferencia, con rojo de tiazina.

Los resultados, deben anotarse, a fin de evitar confusiones, sobre el dibujo previo en el cuaderno de resultados, en donde se señala la posición de los elementos reaccionantes.

Crecimiento de los estafilococos coagulasa positivos, aislados de leche en polvo, en leche concentrada.

Se comprobó el crecimiento de las cepas de estafilococos coagulasa positivos, aislados de leche en polvo, en leche concentradas de 35, 40 y 45 por cien de extracto seco total, previa incubación a temperaturas de 35, 40, 45 y 50 grados centígrados y por espacio de 2 y 4 horas. Los lotes de leche concentrada se hallaban exentos, prácticamente, de gérmenes del género *Staphylococcus*. Se partió de una inoculación aproximada a 10^4 estafilococos por c.c. La población microbiana integrante de la suspensión patrón inoculada se obtuvo mezclando cultivos incubados en caldo de cerebro y corazón de ternera (BHI de DIFCO) a la temperatura de 35°C durante 18 horas. Las cepas utilizadas en dichos cultivos fueron precisamente las coagulasa positivas aisladas de leche en polvo durante el desarrollo del presente trabajo.

Titulada la suspensión madre de gérmenes por contejo de colonias en placa de Petri con agar nutritivo hipersalino (S-110), utilizando dilu-

ciones de 100 en 100, y colocada aquélla en la nevera a 0°C, se extraía para tomar 10 c.c. y diluir a una concentración aproximada a 10^6 estafilococos por c.c. empleando solución Ringer 1 : 4.

Para utilizar a la leche concentrada como medio de crecimiento se distribuía, a la concentración apropiada, en frascos PIREX estériles, tronco-cónicos, aforados, de 100 c.c. de capacidad, a cuya cantidad se añadía 1 c.c. de la suspensión microbiana anterior.

La temperatura inicial de la leche era la de incubación propiamente dicha, cuya temperatura correspondiente se logró colocando en baño de María los frascos por espacio de 30 minutos.

Con cada lote de leche concentrada, de diferente porcentaje de sólidos lácteos, se realizaron 4 pruebas, introduciendo en el experimento, por tanto, una sola variable: la temperatura.

El grado de crecimiento se comprobó, por el mismo método de enumeración de colonias mencionado anteriormente, después de 2 y 4 horas de incubación.

Crecimiento en leche en polvo reconstituida.

Se investigó asimismo la característica de crecimiento en leche en polvo desnatada, reconstituida en la proporción de 10 gramos de leche por 100 de agua potable. Las muestras de leche en polvo, seleccionadas a este fin, se hallaban, según los resultados del análisis de control industrial, exentas de estafilococos. Las temperaturas de crecimiento ensayadas fueron de 15, 20, 25, 30 y 35 grados centígrados y los tiempos de incubación de 2, 4, 8, 16, 24 y 48 horas.

La técnica seguida en la inoculación inicial, la propia concentración microbiana de partida, la incubación y contajes, se realizaron con arreglo a la técnica ya descrita anteriormente para el control de crecimiento en leche concentrada.

Tipificación por bacteriófagos.

El total de cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados, fueron sometidas a la acción de la serie de fagos básicos de uso recomendado por el *Comité Internacional de Tipificación Bacteriofágica de Estafilococos*. Esta serie de bacteriófagos nos fue remitida en su día por el *Cross-Infection Reference Laboratory* en Londres.

Las técnicas seguidas han sido descritas por BLAIR y WILLIAMS¹⁵ quienes recomiendan para la propagación de los fagos la técnica de SWANSTROM y ADAMS¹⁶ cultivando la cepa de estafilococo propagadora y el virus huésped sobre agar nutritivo semisólido.

La dilución de rutina (RTD), que es la dilución más alta que produce lisis confluente en la cepa de propagación fue determinada diluyendo el filtrado del medio de SWANSTROM y ADAMS, citado anteriormente, incubado durante 18 horas a 37°C., en una escala de diluciones de 1:10 a 1 : 10 y cada dilución comprobada con arreglo a la siguiente técnica:

a) A partir de un cultivo de 6 horas de la cepa propagadora en caldo soja y tripticasa (BBL) se sembró una placa del mismo medio, solidificado por la adición de agar en proporción de 1,5 g. por cien, por medio de una torunda de algodón estéril humedecida en el medio líquido.

b) Las placas de Petri con dicho medio se secaban en la estufa a 37°C y una vez seco el «inoculum» se colocaba una gota de cada dilución, empleando un asa de platino con un bucle de 4 m.m. y separando unos 2 cm. las gotas para evitar su confluencia.

c) Despues de una incubación, de 12 a 18 horas, se consideró como título o dosis de rutina la dilución más alta que producía una lisis confluente.

Las diluciones de uso normal se mantuvieron a una temperatura de 20°C. en nevera.

Para la tipificación propiamente dicha, cada una de las cepas de estafilococo coagulasa positivo se sembró sobre placas de Petri de 15 cm., con el medio de agar soja tripticasa (BBL), por medio de torundas de algodón estériles, empapadas en un cultivo del germen de 6 horas a la temperatura de 37°C. Las placas, con el fin de secar la superficie del medio se llevaban a 37°C. durante una hora, antes de colocar las series de bacteriófagos.

Bajo cada placa se colocaba un patrón con la situación en que debía depositarse cada fago. Para la distribución de los fagos se utilizaron pipetas de Pasteur estériles y distintas para cada número de la serie.

Distribuidos los fagos se dejaban secar las gotas depositadas en la superficie del medio por espacio de 30 minutos en la estufa a 37°C. y a continuación se invertían las placas de Petri continuando la incubación durante 18 a 24 horas.

La interpretación de la lisotipia se hizo en los siguientes términos:

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

Unicamente las reacciones ++ han sido consideradas a la hora de determinar el modelo lítico de cada germen.

RESULTADOS

Número de colonias.

La determinación del número de gérmenes vivos del género *Staphylococcus* en 168 muestras de leche en polvo arrojó una media de 370 por muestra y gramo de producto.

La cifra más elevada de las obtenidas fue de 9.400. De 45 muestras no se aislaron estafilococos y 30 contenían, probablemente, menos de 10 por gramo (ausencia en 0,1 gr.).

Pruebas bioquímicas.

Se aislaron 104 cepas del género *Staphylococcus*, Rosenbach 1884, del total de 168 muestras de leche en polvo estudiadas. De las 104 cepas solamente 24 resultaron coagulasa positivas, lo que significa que únicamente el 14 por ciento de las muestras contenían estafilococos coagulasa positivos.

De las cepas coagulasa positivas la totalidad mostró su capacidad para reducir el telurito, así como 30 de 80 coagulasa negativas.

Resultaron positivas a la prueba de fosfatasa un total de 35 cepas de las cuales 15 eran coagulasa positivas y 20 negativas.

La producción de desoxirribonucleasa se pudo precisar en un total de 42 cepas, de cuyos gérmenes eran coagulasa positivas únicamente 16.

En medio con yema de huevo mostraron un halo de opacidad debida a lipólisis, 6 cepas de las que 5 eran coagulasa positivas.

Se catalogaron como positivas a la reacción del manitol (fermentación anaeróbica) un conjunto de 26 cepas, siendo 24 de ellas coagulasa positivas y 2 negativas.

El resumen de estas propiedades enzimáticas se tabula a continuación:

TABLA I

Características bioquímicas de las diferentes estirpes de estafilococos aisladas.¹

PROPIEDADES	EST. COAG. POSIT.	EST. COAG. NEGAT.
Red. telurito	24 (100 %)	30 (37, 5 %)
Prod. fosfatasa	15 (62,5 %)	20 (25 %)
Prod. lipasa	5 (20,8 %)	1 (1,25 %)
Prod. desoxirribonucleasa .	16 (66,6 %)	26 (32, 5 %)
Ferm. manitol	24 (100 %)	2 (2, 5 %)

¹ Resumen del estudio enzimático realizado sobre 104 cepas del género *Staphylococcus* (80 coagulasa negativa y 24 coagulasa positiva).

Tipos de enterotoxina.

De las 24 cepas coagulasa positivas sometidas a prueba únicamente 6 han mostrado reacción positiva frente al antisuero tipo A y una de ellas, además, al tipo D, previa inmersión durante 15 minutos en acetato de cadmio al 1 % (Fig. 1 a 4 incl.).

Crecimiento en leche concentrada.

Los valores y características de crecimiento en leche concentrada con distintos porcentajes de sólidos lácteos se expresan en la siguiente tabla, cuya representación gráfica comprende las Fig. 5 a 7. incl.:

TABLA II

Concentración inicial de gérmenes: 10^4 por c.c. de leche concentrada.
Incubación: 2 y 4 horas.

Extracto seco por cien	TEMPERATURAS							
	35° C.	40° C.	45° C.	50° C.				
35	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^7$	10^6	$5 \cdot 10^6$	10^5	10^6	10^4	$3 \cdot 10^2$
40	10^5	10^7	$5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^4$	10^6	$5 \cdot 10^3$	10^2
45	$7 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^6$	10^5	10^6	$2 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^5$	10^3	8×10



Fig. 1.— Enterotoxina tipo A. Reacción de identidad con concentraciones óptimas de antígeno y suero (aumentada X 3,3 sobre preparación original sin colorear).

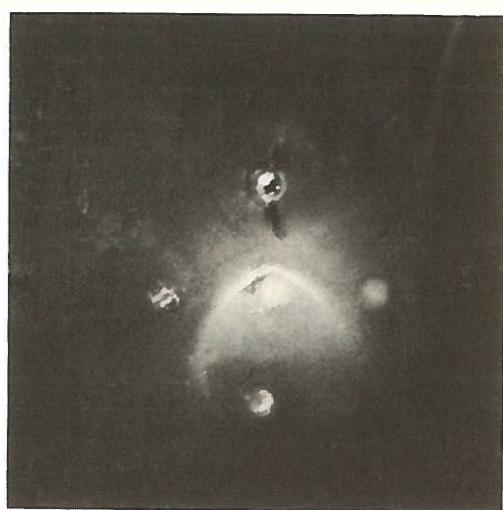


Fig. 2.— Enterotoxina tipo A. Reacción de identidad con antígeno sin diluir excesivamente concentrado (aumentada X 3,3 sobre preparación original sin colorear).

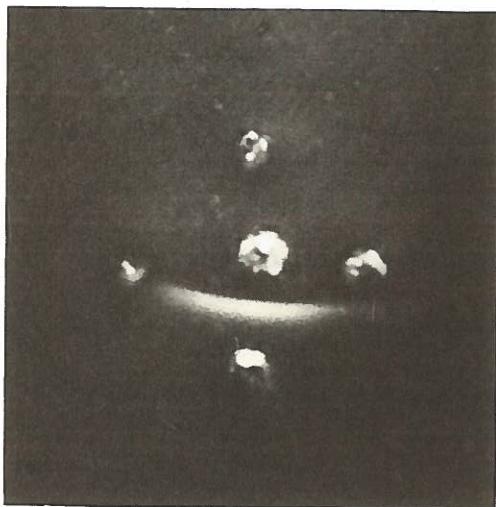


Fig. 3.— Enterotoxina tipo D. Previa inmersión en acetato de cadmio al 1 por cien (aumentada X 3,3 sobre preparación ariginal no coloreada).

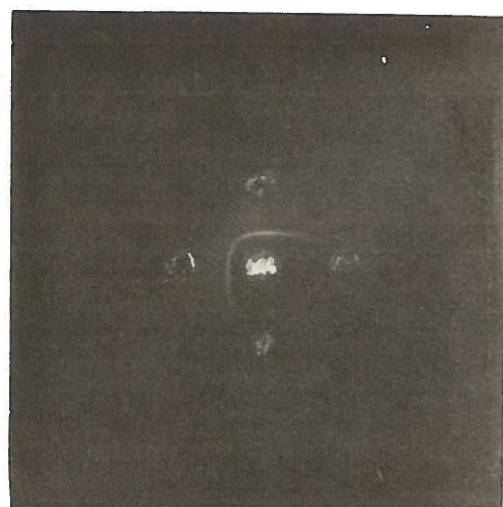


Fig. 4.— Enterotoxina tipo D. Confirmación por reacción de identidad sin resaltar con acetato de cadmio (aumentada X 2,2 sobre preparación original no coloreada).

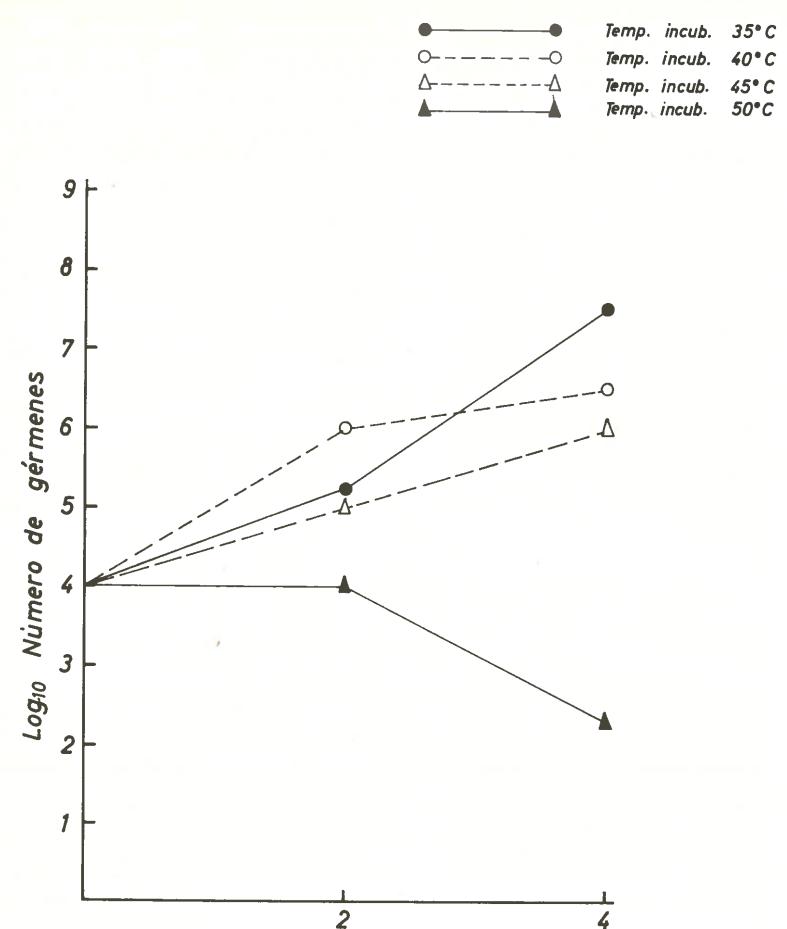


Fig. 5.— Curvas de crecimiento de Staphylococcus aureus (mezcla de 24 estíples coagulasa positivas) en leche concentrada de 35 por cien de extracto seco.

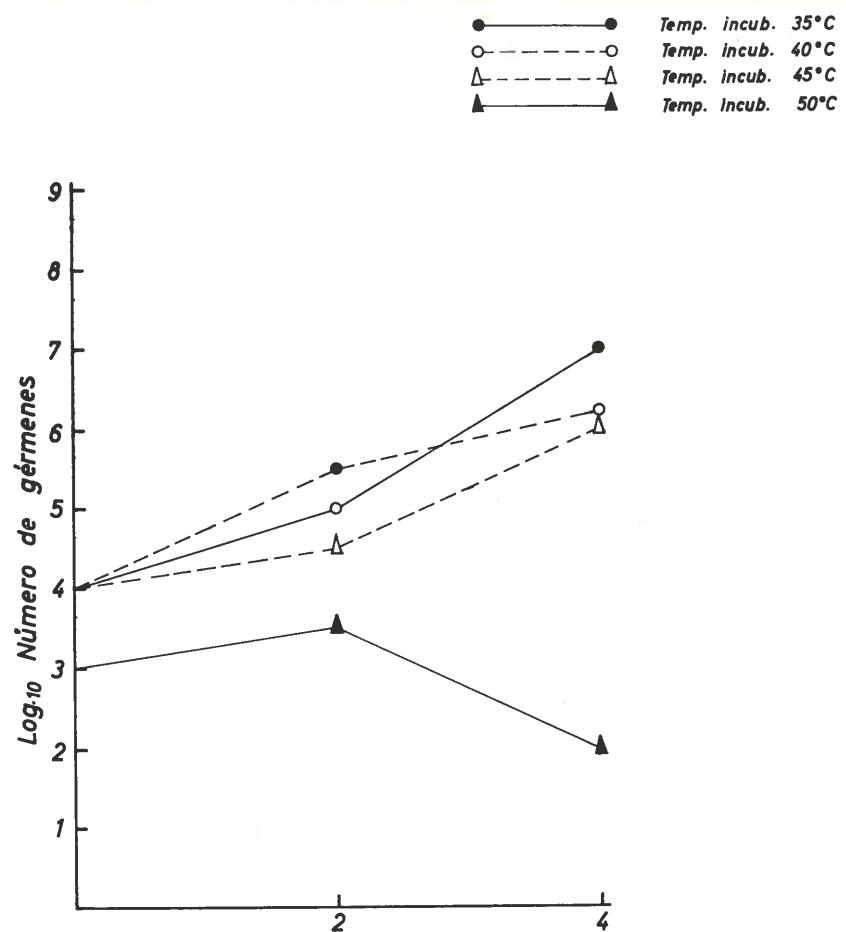


Fig. 6.- Curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (mezcla de 24 estirpes coagulasa positivas) en leche concentrada de 40 por cien de extracto seco.

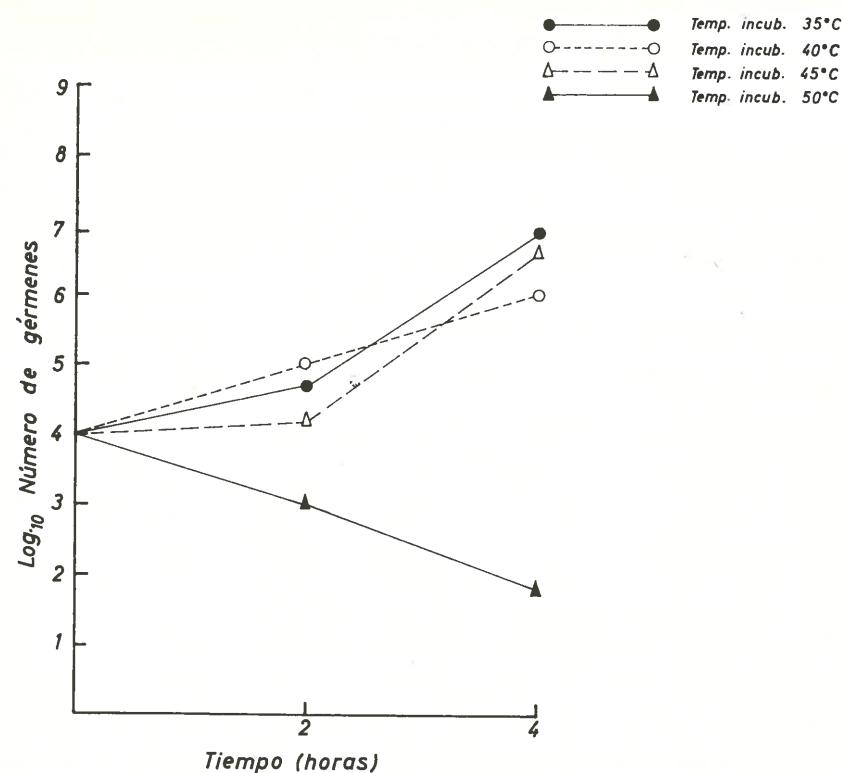


Fig. 7.- Curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (mezcla de 24 estirpes coagulasa positivas) en leche concentrada de 45 por cien de extracto seco.

Crecimiento en leche en polvo reconstituida.

La proporción de crecimiento resultó, en las condiciones de nuestro estudio, utilizando el mismo «inoculum» que para la leche concentrada, la siguiente:

TABLA III

Cifra inicial de gérmenes: 10⁴ por c.c. de leche reconstituida.
Concentración del producto en extracto seco total: 10 gramos por cien.

Horas	TEMPERATURAS				
	15° C.	20° C.	25° C.	30° C.	35° C.
2	2.10 ⁴	10 ⁵	3.10 ⁵	5.10 ⁵	8.10 ⁵
4	8.10 ⁴	5.10 ⁵	10 ⁶	7.10 ⁶	10 ⁷
8	10 ⁶	10 ⁷	4.10 ⁷	10 ⁷	5.10 ⁷
16	2.10 ⁸	8.10 ⁸	10 ⁹	5.10 ⁹	9.10 ⁹
24	10 ⁹	5.10 ⁹	8.10 ⁹	2.10 ¹⁰	5.10 ¹⁰
48	2.10 ⁹	7.10 ⁹	1.10 ¹⁰	2.10 ¹⁰	4.10 ¹⁰

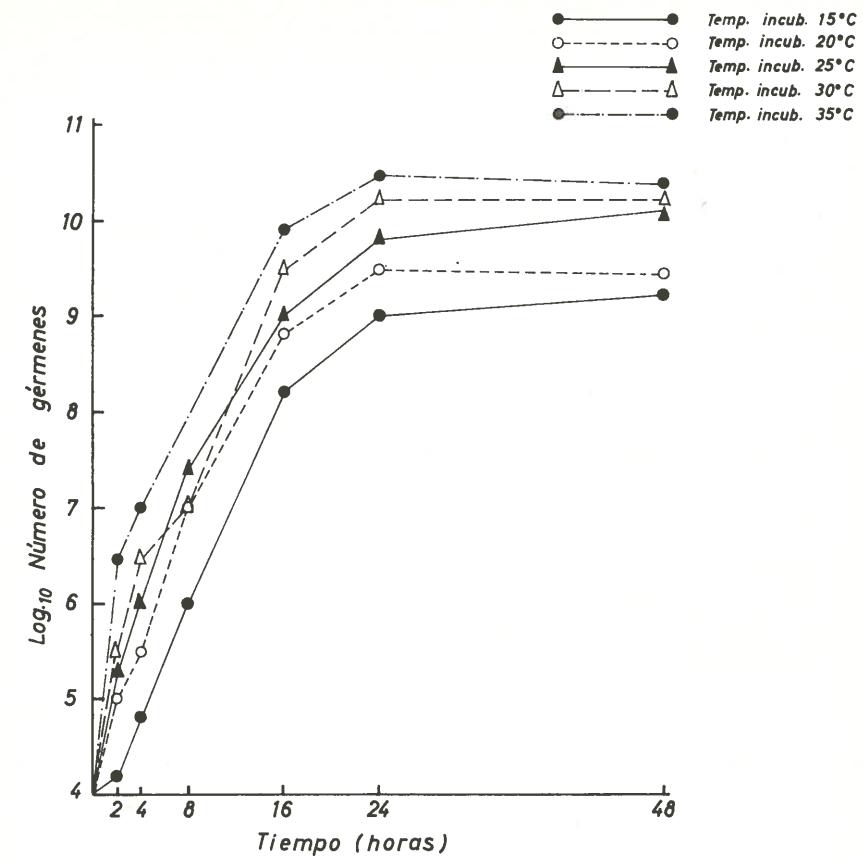


Fig. 8.— Curvas de crecimiento de un cultivo mixto de *Staphylococcus aur.* coagulasa positivos aislados de leche en polvo, utilizando como substrato de cultivo leche en polvo diluida al 10 por cien.

Tipificación por fagos.

Al lado de modelos líticos que parecen indicar un origen humano, con sensibilidad a varios de los tipos 80/6/47/53/75/81, aparecen, con mayor frecuencia aún, otros que son más propios de estirpes de *St. aureus* de origen animal, con cuadros de lisis en los que predominan claramente los tipos 42 E y 42 D.

Las reacciones de lisotipia obtenidas de las 24 cepas de estafilococos coagulasa positivos han sido las siguientes:

Cepa número	1	42 D.
»	2	83 A, 54, 47, 42 E, 6, 7, 81.
»	3	80, 6, 42 E, 47, 53, 54, 75, 83 A, 85, 81.
»	4	54, 42 E, 81.
»	5	42 D.
»	6	83 A, 42 E, 42 D.
»	7	29, 52 A, 52, 79.
»	8	No tipable.
»	9	79, 52 A, 52, 29, 55, 83 A, 54, 47, 42 E, 18, 80, 6, 7, 42, 81.
»	10	29, 52, 52 A, 79, 80, 81.
»	11	42 D.
»	12	83 A, 6, 47, 75, 80.
»	13	54, 42 E.
»	14	42 D.
»	15	6, 42 E, 47, 53, 54, 75, 83 A, 85, 81.
»	16	29, 52, 52 A, 79, 80, 42 E.
»	17	42 D, 42 E.
»	18	42 E, 81.
»	19	52, 52 A, 79.
»	20	42 E, 77, 83 A, 42 D.
»	21	42 D.
»	22	6, 47, 75, 80, 81.
»	23	No tipable.
»	24	29, 52, 52 A, 80, 6, 7, 42 E.

Las cepas números 3, 10, 12, 15, 20 y 22 resultaron ser productoras de enterotoxina A y la número 3, además, originó una ligera reacción frente al antisuero tipo D.

Las frecuencias de los distintos fagotipos encontrados en este grupo de gérmenes sería, por tanto, la que se expresa en la tabla siguiente:

TABLA IV

Distribución de frecuencias de los distintos fagotipos en 24 estirpes de *Staphylococcus aureus* procedentes de la leche en polvo.

Bacteriófago	Frecuencia	Bacteriófago	Frecuencia
79	5	53	2
52 A	4	54	6
52	4	47	6
29	5	42 E	10
55	1	80	7
3 A	0	6	6
3 B	0	7	1
3 C	0	42 D	7
83 A	7	71	0
187	0	81	8
75	4	85	2
77	1		

DISCUSION

Comprobada la posibilidad de que la leche en polvo originase intoxicaciones en el hombre, debidas a la presencia de enterotoxina estafilocócica en dicho producto, por ANDERSON y STONE¹ y ARMIJO y Col², algunos autores señalan que la leche concentrada favorece el crecimiento de estafilococos y probablemente la producción de enterotoxina (HOBBS,¹⁷ HEINEMANN⁸, CROSSLEY y CAMPING¹⁹).

Considerado el problema a la luz de los conocimientos actuales sobre las propiedades de los distintos tipos de enterotoxina estafilocócica, así como del proceso de elaboración de leche en polvo, la mayor probabilidad de contaminación peligrosa del producto puede radicar en los siguientes puntos:

- Pasteurización defectuosa de la leche a concentrar, seguida de una excesiva retención de la leche concentrada antes de la desecación.
- Contaminación en el propio tanque de retención.
- Contaminación de la leche en polvo durante el envasado.

En los casos a y b no es de esperar que sobrevivan gérmenes del género *Staphylococcus* ya que la leche concentrada ha de sufrir un calentamiento previo a la pulverización, suficiente en todo caso para destruir dichos gérmenes y además no debemos olvidar el propio efecto de la desecación con una temperatura del aire a la entrada de la torre de deseca-

ción de 180°C y salida a 90°C, aproximadamente. En cambio la enterotoxina estafilocócica, parcialmente termorresistente, puede hallarse presente en el producto final.

En el supuesto c no puede existir enterotoxina preformada en el alimento y el único peligro, en este caso, es que, al reconstituir la leche en polvo ésta contenga cepas de estafilococos enterotóxicos en cantidad suficiente para lograr un abundante crecimiento en el medio líquido creado, cuando se mantenga a una temperatura óptima para el desarrollo microbiano. Este peligro ha de ser mayor, naturalmente, en la reconstitución masiva en vacas mecánicas y climas cálidos.

En consecuencia con estas ideas hemos planteado nuestro trabajo realizando una amplia investigación sobre el contenido en gérmenes viables del género *Staphylococcus*, de diversas suertes comerciales de leche en polvo, un estudio bioquímico y de tipificación por fagos, en orden a lograr una caracterización de la microflora estafilocócica de este origen, la detección de los diferentes tipos de enterotoxina de los gérmenes coagulasa positivos y las posibilidades de crecimiento en leche concentrada descremada, con las proporciones de extracto seco total usuales en el proceso de desecación y también en leche en polvo reconstituida.

De los resultados del estudio bioquímico y de lisotopia se deduce que la microflora estafilocócica presenta en su conjunto caracteres diferenciales con la de la leche natural, estudiada anteriormente por uno de nosotros,⁴ con lo que parece lógico pensar que el tipo de microflora contaminante de origen lácteo, que ha de resultar destruida durante los procesos de calentamiento, se substituye por otro de origen humano, adicionado en ciertos momentos de la transformación industrial. Si esto es así, el hecho de encontrar un elevado porcentaje de fagotipos que revelan un posible origen animal de los estafilococos indicaría, probablemente, la contaminación de los operarios que manejan en la plataforma de recepción leche natural y éstos a su vez podrían contaminar de alguna manera a sus compañeros de la sección de transformación en leche en polvo, lo que explicaría la presencia de estafilococos de distinto origen en el producto final.

DACK²⁰ señalaba que, entre las cepas toxigénicas de estafilococos, la producción de enterotoxina es función del crecimiento y ante las dificultades técnicas que en este caso supone la prueba objetiva de extracción, purificación y valoración de la propia enterotoxina, hemos elegido la característica de crecimiento microbiano como índice de probabilidad de formación de toxina. El mismo autor (DACK) añadía que los alimentos considerados como causa de intoxicación de este tipo contienen centenares de millones de estafilococos por gramo.

Diferentes autores se han manifestado en parecidos términos. ALLISON²¹ sugiere que el número mínimo de estafilococos coagulasa positivos

que se requiere para juzgar a un alimento como causa de intoxicación es de 500.000 por gramo.

TANNER y TANNER²² 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.

FRAZIER²³ indica que niveles de enterotoxina necesarios para producir este tipo de envenenamiento son posibles únicamente con cifras de varios millones de estafilococos por gramo.

CASMAN y BENNETT¹² 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 acuerdo con la doctrina anterior y los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento microbiano podemos afirmar que, dado el pequeño porcentaje de cepas enterotoxigénicas que parecen existir en la población estudiada y la baja proporción en el número de estafilococos por gramo, el único peligro radicaría en mantener a temperatura ambiente, por espacio de varias horas, la leche reconstituida.

Unicamente en casos de retención de la leche concentrada, antes de su desecación, a temperaturas comprendidas entre 35 y 45°C y durante más de 4 horas, lo que no es posible en un proceso de fabricación normal, cabría hablar de posible presencia de enterotoxina estafilocócica en el producto final.

Por último, encuadrado este trabajo en el campo de la Microbiología de los alimentos, y más concretamente de los alimentos desecados, no queremos dejar de citar, aun sin entrar en discusión, los trabajos de BUTTIAUX y BEERENS²⁴, BERGDOLL²⁵ y GALESLOOT y STADHOUDERS²⁶, presentados al simposio de Microbiología de los Alimentos, celebrado en Bilthoven (Holanda) el pasado año y que versan sobre aspectos del tema que nos ocupa, si bien son tratados de manera general.

RESUMEN

Se han estudiado 168 muestras de leche en polvo procedentes de industrias nacionales con el fin de precisar el alcance del problema de las intoxicaciones por enterotoxina estafilocócica de este origen.

Las determinaciones realizadas al fin propuesto fueron:

Enumeración de colonias, caracterización bioquímica de las cepas aisladas (pruebas de coagulasa, fosfatasa, desoxirribonucleasa, fermentación del manitol, lipolisis, reducción del telurito), tipificación por bacteriófagos, estudio de los distintos tipos de enterotoxina, crecimiento de las cepas coagulasa positivas en leche concentrada y polvo reconstituida.

De los resultados obtenidos se infiere que, aun considerando el pequeño porcentaje de cepas enterotoxigénicas que parece existir en la población estudiada y la baja proporción en el número de estafilococos por gramo, con una media de 370, el mayor peligro radicaría en mantener a temperatura ambiente, por espacio de varias horas, la leche reconstituida.

En un proceso normal de fabricación, con una retención de la leche concentrada antes de su desecación inferior a una hora, no existiría posibilidad, cualquiera que sea la temperatura de la leche retenida, de formar enterotoxina que por su parcial termorresistencia se hallaría presente en el producto final.

RESUME

On a fait une étude sur 168 échantillons de lait en poudre provenant d'industries nationales à fin de préciser l'effet du problème des intoxications par l'entérotoxine staphylococcique de cette origine.

Les déterminations réalisées dans le but proposé furent: énumération de colonies, caractérisation biochimique des souches isolées (essais de coagulase, phosphatase, desoxyribonucléase, fermentation du mannitol, lipolyse, réduction du tellurite), typification par des bactériophages. étude des différents types d'entérotoxine, croissance des souches de coagulase positives dans du lait en poudre concentré et reconstitué.

D'après les résultats obtenus, on déduit que, même en considérant le petit pourcentage de souches entérotoxigéniques qui semblent se trouver dans la population étudiée et la petite proportion du nombre de staphylocoques par gramme, avec une moyenne de 370, le plus grand danger serait de maintenir le lait reconstitué à une température ambiante pendant plusieurs heures.

Dans un procédé normal de fabrication, avec une rétention de moins d'une heure du lait concentré avant sa dessication, il ne serait pas possible, à n'importe quelle température du lait retenu, de former de l'entérotoxine, laquelle se trouverait dans le produit final à cause de sa thermorésistance.

SUMMARY

168 spray dried milk samples have been studied from Spanish dairies in order to establish the scope in the problem of food poisoning outbreaks due to staphylococcal enterotoxin of this origin.

The preformed tests to follow this line were: staphylococcal colony counts, biochemical characteristics of the isolated strains (coagulase, fosfatase, desoxyribonuclease, manitol fermentation, lipolitic activity, potas-

tium tellurite reduction), phage typing, detection of the types of enterotoxin, growth of the coagulase positive strains in evaporated milk and in reconstituted powdered milk.

From the results obtained it has been deduced that despite the small percentage of enterotoxigenic strains among the studied microflora, and the low proportion in the number of staphylococci per gram, with an average of 370, it would be dangerous to maintain, at room temperature, for several hours, the reconstituted milk.

In a normal spray dried milk process, with a holding period of the concentrated milk, before drying, less than one hour, it would not be possible, whatever the temperature might be, to cause enterotoxin to be produced, which avoids its presence in the final product.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, P. H. R., y STONE, D. M. (1955).—*J. Hygiene*, **53**, 387.
2. ARMIJO, R., HENDERSON, D. A., TOMOTHEE, R., y ROBINSON, H. B. (1957).—*Am. J. Public Health*, **47**, 1093.
3. HARRIGAN, W. F. y Mc. CANCE, M. (1968).—*Métodos de laboratorio en Microbiología*. Edit. Academia: León (España).
4. SUÁREZ, G. (1966).—*An. Fac. Vet. León*, **8**, 141.
5. BAIRD-PARKER, A. C. (1962).—*J. Appl. Bact.*, **25**, 12.
6. BARBER, M., y KUPER, J. W. A. (1951).—*J. Path. Bact.*, **63**, 65.
7. GUILLESPIE, W. A. y ALDER, V. G. (1952).—*J. Path. Bact.*, **64**, 187.
8. WEECKMAN, B., y CATLIN, B. W. (1957).—*J. Bact.*, **73**, 747.
9. MOSEL, D. A. (1962).—*J. Bact.*, **84**, 1,140.
10. THATCHER, F. S. y CLARK, D. S. (1968).—*Microorganisms in foods*. University of Toronto Press: Toronto (Canadá).
11. WADSWORTH, C. (1957).—*Int. Arch. Allergy Appl. Immunology*, **10**, 355.
12. CASMAN, E. P., BENNETT, R. W., DORSEY, A. E. y STONE, J. E. (1969).—*Health. Lab. Sci.*, **6**, 185.
13. CASMAN, E. P. y BENNETT, R. W., (1963).—*J. Bact.*, **86**, 18.
14. CROWLE, A. J. (1958).—*J. Lab. Clin. Med.*, **52**, 784.
15. BLAIR, J. E. y WILLIAMS, R. E. O. (1961).—*Bull. World Health Org.*, **24**, 771.
16. SWANSTROM, M. y ADAMS, M. H. (1951).—*Proc. Soc. exp. Biol.*, **78**, 372.
17. HOBBS, B. C. (1955).—*J. Appl. Bact.*, **18**, 484.
18. HEINEMANN, B. (1957).—*J. Dairy Sci.*, **40**, 1585.
19. CROSSLEY, E. M. y CAMPING, M. (1957).—*J. Appl. Bact.*, **20**, 65.
20. DACK, G. M. (1962).—En AYRES, J. C. et al. «*Chemical and Biological Hazards in Food*». Ames: Iowa State University Press.
21. ALLISON, V. D. (1949).—*Proc. Soc. Med.*, **42**, 216.
22. TANGER, F. W. y TANNER, L. F. (1953).—*Food-borne infections and intoxications*. The Garrard Press Publ: Champaign, Illinois.
23. FRAZIER, W. C. (1958).—*Food Microbiology*. Mc. Graw-Hill Book Comp.: New-York.
24. BUTTIAUX, R. y BEERENS, H. (1969).—En KAMPELMACHER, E. H. et al. «*The Microbiology of dried foods*». Nat. Inst. of Public Health: Utrecht.
25. BERGDOLL, M. S., (1969).—En KAMPELMACHER, E. H., et al. (cita anterior).
26. GALESLOOT, T. E. y STADHOUDERS, J. (1969).—En KAMPELMACHER, E. H. et al. (Corresponde a la cita 24).