

# ESTUDIO DE UN BROTE TOXICO ORIGINADO POR ENTEROTOXINA ESTAFILOCOGICA DEL TIPO MIXTO «A» Y «C»

GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ

Catedrático de Microbiología, Facultad de Farmacia, Barcelona

ANTONIO RODRIGUEZ TORRES

Catedrático de Microbiología e Higiene, Facultad de Medicina, Valladolid

## I. INTRODUCCION

La intoxicación humana de origen estafilocócico debe considerarse como un proceso grave, en especial para niños, ancianos y personas de salud delicada y, en todo caso, resulta siempre una desagradable experiencia para el inadvertido consumidor.

Es, sin duda, la intoxicación alimentaria de origen bacteriano de más frecuente presentación en nuestro país en los momentos actuales.

Anteriormente, uno de nosotros ha tenido la oportunidad de estudiar una serie de estirpes de *Staphylococcus aureus* sospechosas de originar brotes amplios de intoxicación en colectividades humanas y ha podido caracterizar, como posible causa, estirpes de estafilococos productores de enterotoxinas tipos A y E independientes, según el caso.

Debe destacarse el hecho de que es muy poco frecuente el hallazgo del tipo E de enterotoxina como causa de intoxicación humana espontánea, por lo que el aislamiento de un estafilococo potente productor de este tipo de toxina a partir de un queso de cabra inculcado de originar casos de intoxicación humana en la provincia de Barcelona, en el mes de septiembre de 1974, revestía un especial interés (10).

Las enterotoxinas estafilocócicas son exoproteínas producidas por estafilococos en los alimentos, posiblemente en el tracto intestinal y en infecciones y sobre medios de cultivo en el laboratorio con una finalidad experimental.

En distintas épocas hemos publicado amplias revisiones sobre el tema (8) (9).

En la actualidad se conocen siete tipos diferentes de enterotoxinas A,

B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E y F, si bien la última no ha sido perfectamente aislada e identificada todavía a pesar de la certeza de su existencia desde hace varios años (9).

El diagnóstico de los procesos tóxicos de origen estafilocócico, su caracterización epidemiológica, se viene realizando por métodos indirectos, lo que requiere la enumeración y aislamiento de las cepas de estafilococo sospechosas con un posterior ensayo de enterotoxigenicidad y la comprobación de este carácter necesita a su vez, como mínimo, los siguientes pasos:

a) Ensayo de producción de toxina en medios de laboratorio.

b) Inoculación en animales sensibles y/o, con preferencia, practicar reacciones serológicas por precipitación en gel, usando como antígeno la toxina producida frente a sueros anti-enterotoxina polivalentes o monovalentes y en este último caso puede determinarse, incluso, el tipo de toxina.

Debemos tener presente, sin embargo, que el aislamiento de estafilococos coagulasa positivos de un alimento implicado en una intoxicación alimentaria constituye, únicamente, una evidencia circunstancial de que el verdadero agente etiológico ha sido encontrado.

En efecto, la determinación serológica o 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 ali-

mento aunque ciertamente exista una elevada probabilidad de que haya sido así en especial si el número de estafilococos por gramo sobrepasa la cifra de un millón.

En definitiva, únicamente la demostración de la enterotoxina en el propio alimento nos da la seguridad absoluta de que ha sido la causa de una intoxicación. Se requiere, naturalmente, realizar una extracción y purificación de la toxina antes de poner en práctica la prueba de diagnóstico elegida y ésta debe ser lo suficientemente sensible para detectar concentraciones aproximadas de un microgramo de enterotoxina por cien gramos de alimento, condición que cumplen las pruebas de precipitación por difusión en gel a escala de micrométodo, la inhibición de la hemaglutinación y el radioinmunoensayo.

Toda esta metodología es realmente compleja y no se ha aplicado, hasta el momento, en el estudio de brotes de intoxicación alimentaria de este origen en nuestro país y por esto debiera de constituir en estos momentos una aspiración urgente a satisfacer por los correspondientes Servicios Sanitarios Centrales, dependientes de la Escuela Nacional de Sanidad.

Esto nos lleva, por otra parte, a considerar la importancia de una valoración correcta de los resultados de una investigación epidemiológica de esta naturaleza cuando el estudio del brote tóxico se realiza por métodos indirectos.

## II. EPIDEMIOLOGIA

1. *Datos clínicos.* — La intoxicación ocurrió el viernes día 11 de julio de 1975 y afectó a 16 productores de la empresa Safem-Michelin, en Valladolid. La comida se sirvió entre las 13 y 14 horas y el primer caso apareció a las 17.30 horas con un cuadro de vómitos, diarreas líquidas, sudoración fría y malestar general. A lo largo de la tarde aparecieron 4 casos similares al anterior y otros 11 que presentaron un cuadro más benigno con plenitud gástrica, sudoración fría, dolores cólicos y deposiciones líquidas pero en escaso número. En el plazo de 48 horas, como máximo, se habían recuperado la totalidad aun sin haber sido sometidos a tratamiento.

2. *Datos de inspección.* — Ante la denuncia de la posible intoxicación hecha a la Jefatura Provincial de Sanidad de Valladolid fueron realizadas dos inspecciones a los locales, cocinas y comedor de la citada empresa los días 11 y 12 en el curso de las cuales se tomaron muestras de alimentos del menú del día, consistentes en: lentejas con chorizo, ensaladilla rusa, bonito con mahonesa y cordero estofado. Se realizó también un estudio en el personal de esas dependencias y que consistió en: escobillonaje rectal, toma de exudado nasal, frotis ungueal y extracción de sangre. Se pudo analizar una muestra de heces de uno de los afectados.

3. *Datos iniciales de laboratorio.* Con las muestras obtenidas procedimos al estudio inmediato, que consistió en lo siguiente:

1.º Las muestras de heces, escobillonaje rectal y alimentos se sembraron en medios de SS, Levine (EMB), TCBS, Manitol sal agar y dos tubos de enriquecimiento de agua de peptona y caldo selenito que se sembraron en placa de TCBS y SS respectivamente.

2.º Los frotis ungueales y nasales se sembraron en medio de Manitol sal agar y con las colonias sospechosas se practicó la prueba de la coagulasa.

3.º En los sueros se realizaron aglutinaciones frente a los antígenos somáticos y flagelar de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi A* y *B*.

4. *Resultados previos.* — Se aislaron 5 cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de:

- a) Toma nasal de un pinche de cocina.
- b) Heces de uno de los afectados.
- c) Salsa mahonesa.
- d) y e) Dos muestras de ensaladilla rusa.

La investigación de enterobacterias patógenas dio resultado negativo.

Los gérmenes se clasifican, de manera convencional, como *S. aureus* en atención a ser, todas las estirpes, cocáceas típicamente agrupadas, catalasa y Gram positivas fermentado-

ras del manitol en anaerobiosis, productoras de coagulasa, desoxirribonucleasa, hemólisis, licuación de gelatina, acción reductora sobre nitratos y telurito potásico y pigmentación dorada.

Las características bioquímicas y fisiológicas estudiadas conducen a pensar que se trata de un único microorganismo, pero este extremo resulta del máximo interés desde el punto de vista epidemiológico y, por tanto, requería una comprobación más amplia incluyendo la tipificación por bacteriófagos y la demostración de enterotoxigenicidad y tipo de toxina producida por cada microorganismo de diferente origen.

En otro orden de ideas cabe señalar que la sintomatología, período de incubación y evolución epidemiológica del brote en estudio es típica de una intoxicación alimentaria producida por la ingestión de enterotoxina estafilocócica formada en el propio alimento.

5. *Medidas de urgencia adoptadas.* — Retirar provisionalmente de su trabajo al pinche de cocina y portador y someterlo a tratamiento con oxacilina.

Extremar el control higiénico de todo el personal que manipule alimentos, exigiendo un lavado y desinfección frecuente de las manos.

Evitar en la época de verano los alimentos potencialmente más peligrosos desde el punto de vista que nos ocupa (mahonesa, cremas, natas, etc.).

Impedir el acceso a las dependencias de cocina de toda persona ajena al servicio.

### III. ESTUDIO DE LAS ESTIRPES SOSPECHOSAS

1. *Características de crecimiento en medio selectivo sólido.* — Se utilizan el medio de Baird-Parker y un medio propio (Suárez) descrito ya anteriormente de la siguiente composición (7):

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 (Schering-Khalbaum) al 0,5 por cien decolorada con NaOH . . . . .	10 ml
L-Cistina (Difco) . . . . .	0,25 g
Acido tioglicólico (Difco) . . . . .	0,3 ml
Actidiona (Upjohn) . . . . .	400 mg
Agua . . . . .	1000 ml
pH = 7'3 ± 0'1	

En ambos medios se adicionó un 2 por cien de yema de huevo.

Los cultivos se observan a las 48 horas de incubación a 37°C, apreciando sobre el medio de Baird-Parker las propiedades de reducción del telurito potásico y producción de halo en torno a las colonias y en el medio salino con manitol y fucsina la coloración de las colonias por for-

mación de pigmento, la fermentación del manitol en las especiales condiciones del medio y la producción de halos de opacidad debido a la producción de las enzimas lipasa y esterasa al actuar sobre los lípidos aportados con la yema de huevo.

2. *Extensión de la caracterización bioquímica.* — Además de repetir las pruebas bioquímicas iniciales, se introduce el estudio de las siguientes características diferenciales: formación de ácido a partir del manitol en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, producción de toxina alfa, de endonucleasas termorresistentes, de fosfatasa y pruebas de sensibilidad a la novobiocina.

Los métodos seguidos han sido descritos en publicaciones anteriores (6) (7) y básicamente son los de Mossel (5) para la fermentación del manitol, de Elek y Levi (3) para la hemolisina alfa, de Lachica y Deibel (4) para endonucleasas termorresistentes, de Barber y Kupper (1) para la fosfatasa y normas de manual (Difco) para las pruebas de sensibilidad a la novobiocina y coagulasa.

3. *Capacidad de producción de enterotoxina en medios de cultivo.* — El método seguido a fin de comprobar esta propiedad es el clásico de Casman y Bennet (2) a base de agar BHI semisólido a pH 5.5 sembrando en superficie cuatro gotas de un cultivo de 24 horas en BHI de la cepa en estudio y extendiendo por

diseminación con varilla de vidrio acodada. Las placas se incubaron por espacio de 48 horas a 37°C. El contenido de cada placa se centrifugó en tubos de 50 ml. a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos y la parte sobrenadante fue utilizada como antígeno en reacciones de precipitación por difusión en gel.

El medio de agar BHI semisólido se eligió frente a los más precisos de cultivo en saquito de celofán en medio líquido o sobre celofán en placa de agar nutritivo, porque resulta suficiente en la mayoría de los casos sin necesidad siquiera de proceder a la concentración de la enterotoxina.

4. *Investigación de la enterotoxina.* — La detección de la enterotoxina a partir del sobrenadante se realizó por medio de una modificación del método de Ouchterlony con un óptimo de sensibilidad (6).

Se utilizaron en este caso placas de Petri (Falcon Plastics) de 50 x 100 mm preparadas ya para pruebas de difusión en gel conteniendo una capa fina de agar tamponado y con una fuente central de 3 mm Ø y seis laterales equidistantes entre sí y con el pocillo central, con separación de 3 mm.

El antisuero se depositó en la depresión central, la enterotoxina control en dos laterales contiguas y la enterotoxina problema en los orificios laterales.

Las enterotoxinas patrón y los sueros anticorrespondientes procedían del Instituto de Investigación Ali-

mentaria de la Universidad de Wisconsin y se utilizaron en las diluciones y cantidades especificadas por dicho Centro para las toxinas A, B, C, D y E y sus correspondientes antisueros.

El desarrollo de la reacción de precipitación por difusión en gel se realizó incubando las placas de Petri en cámara húmeda a 37°C por espacio de 18 horas.

#### 5. Tipificación por bacteriófagos.

Se realizó en el laboratorio de referencia para estafilococos dependiente del Laboratorio Central de Salud Pública en Colindale (Londres), utilizando las series de fagos números: 29, 52, 52A, 79, 80, 3A, 3C, 55, 71, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 81, 83A, 84, 85, 94, 95 y 96. El cultivo de los bacteriófagos por propagación sobre estirpes determinadas de *S. aureus* se realizó de acuerdo con el método de Swanstrom y Adams (11).

La titulación de bacteriófagos y la determinación de la RTD (dosis de rutina) se verificó también sobre las propias cepas propagadoras de *S. aureus* de acuerdo con las normas del mencionado Laboratorio de Referencia y a las que nos hemos referido ya en publicaciones anteriores (6) (7).

### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

1. *Identificación previa y comparativa.* — Las características de crecimiento en medio sólido especial-

mente sobre agar-cloruro sódico-fucsina ácida, estabilizado, sugieren la existencia de dos tipos de colonia, únicamente.

Una que correspondería a la estirpe procedente de la toma nasal efectuada al pinche de cocina, y otra, semejante, aislada de las muestras de heces, salsa mahonesa y ensaladilla rusa. En este segundo tipo la tonalidad dorada resultaba más marcada, así como los anillos de opacidad en torno de las colonias debido a la acción lipolítica.

2. *Estudio fisiológico y bioquímico.* — Las cinco cepas estudiadas dieron resultado positivo a todas y cada una de las siguientes características diferenciales del género *Staphylococcus*:

Pigmentación.

Fermentación anaeróbica del manitol.

Fermentación aeróbica del manitol.

Producción de fosfatasa.

Formación de endonucleasas termorresistentes.

Licuefacción de gelatina.

Reducción del telurito potásico.

Reducción de los nitratos.

Producción de coagulasa.

Sensibilidad a la novobiocina.

3. *Investigación de la enterotoxina.* — Resultó ser una prueba diferencial entre las dos estirpes siendo positivas, para los tipos A y C de enterotoxina, las cuatro cepas aisladas de heces y de alimentos inculcados

de originar el brote tóxico que nos ocupa y negativa la aislada del pinche de cocina.

Debemos hacer un énfasis especial en que es esta la primera vez que se aísla e identifica en España una cepa de *Staphylococcus aureus* productora del tipo C de enterotoxina, habiéndolo hecho anteriormente con los tipos A (7), D (6) y E (10).

4. *Tipificación por bacteriófagos.* La cepa aislada del portador sospechoso muestra un fagotipo 29/42E. El resto tiene un comportamiento semejante frente al grupo de fagos no resultando posible la tipificación, excepto en la estirpe aislada de las heces del paciente, que ofrece reacciones muy débiles a RTD  $\times$  100 frente a los fagos 42E/77, lo cual más afirma que niega una posible identidad con las cepas aisladas de los alimentos sospechosos.

Por otra parte, no queda duda ninguna de que la estirpe aislada del portador sospechoso (pinche) es diferente al resto y no productora de enterotoxina, como queda expuesto, y este hecho viene a resultar un importante dato para el análisis epide-

miológico del brote tóxico en cuestión.

## V. RESUMEN

Se estudia desde los puntos de vista epidemiológico y microbiológico un brote tóxico alimentario acaecido en los comedores de la Empresa Sa-fem-Michelin en Valladolid en el mes de julio de 1975.

El análisis microbiológico y de potencialidad toxigénica de cinco estirpes del género *Staphylococcus* aisladas de alimentos inculpados y de un portador sospechoso, permiten descartar el papel de este último en la presentación del caso de intoxicación alimentaria que nos ocupa.

El ensayo de producción de enterotoxina en medios artificiales resultó positivo, en cambio, para los tipos de enterotoxina A y C en las cepas aisladas de los alimentos sospechosos y de las heces de un enfermo, tratándose, muy probablemente, de una estirpe única.

Por último, debemos resaltar el hecho que se produce por vez primera de la identificación del tipo C de enterotoxina estafilocócica en nuestro país.

## BIBLIOGRAFIA

1. BARBER, M. y J. W. A. KUPPER: 1951. Identification of *Staphylococcus pyogenes* by phosphatase reaction. *J. Pathol. Bacteriol.* 63:65-68.
2. CASMAN, E. P. y R. W. BENNET: 1963. Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin. *A. J. Bacteriol.* 86:18-23.
3. Elek, S. D. y E. Levy: 1950. Distribution of haemolysins in pathogenic and nonpathogenic staphylococci. *J. Path. Bacteriol.* 62:541-554.

4. LACHICA, R. V. F. y R. H. DEIBEL: 1969. Detection of nuclease activity in semisolid and broth cultures. *Appl. Microbiol.* 18:174-176.
5. MOSSEL, D. A.: 1962. Attempt in clasification of catalase positive staphylococci and micrococci. *J. Bacteriol.* 84:1.140-1.147.
6. OVEJERO DEL AGUA, S., G. SUÁREZ y A. SANTOS: 1971. Significado higiénico de la presencia de estafilococos patógenos o sus toxinas en leche en polvo. *Microbiol. Españ.* 24:287-302.
7. SUÁREZ FERNÁNDEZ, G.: 1966. Microflora estafilocócica de leche natural. *An. Fac. Vet. León.* 12:11-166.
8. SUÁREZ FERNÁNDEZ, G.: 1968. Enterotoxinas estafilocócicas. *Rev. San. Hig. Publ.* 1-2:47-81.
9. SUÁREZ FERNÁNDEZ, G. y S. OVEJERO DEL AGUA: 1974. Intoxicación estafilocócica. Ponencia presentada a la II Reunión Científica de la Sociedad Española de Microbiología (Sección Noroeste).
10. SUÁREZ FERNÁNDEZ, G.: 1975. Estudio de estirpes de *S. aureus* implicadas en casos de intoxicación humana. Comunicación presentada en el V Congreso Nacional de Microbiología.
11. SWANSTROM, M. y M. H. ADAMS: 1951. Agar layer method for production of high titre phage stocks. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.* 78:372.