

31  
2 Gen



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**“CUAUTITLAN”**

**ESTUDIO SOBRE EL DESARROLLO  
DE COLONIAS ATIPICAS DE**

**Staphylococcus aureus**

**PROCEDENTES DE CARNES, EN EL  
MEDIO DE BAIRD-PARKER**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**LUZ SANDRA SANCHEZ DEL ANGEL**

**DIRECTOR DE LA TESIS**

**P. M. EN C,**

**CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE**

**1984**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Págs.
1. INTRODUCCION.	1
1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.	1
1.2. GENERALIDADES DE <u>Staphylococcus aureus</u> .	4
1.2.1. Habitat.	5
1.2.2. Resistencia a agentes físicos y químicos.	5
1.2.2.1. Agentes selectivos.	5
1.2.2.2. Flora antagonista.	6
1.2.2.3. Concentración de NaCl.	6
1.2.2.4. Concentración de azúcar.	7
1.2.2.5. Acidos.	7
1.2.2.6. Temperatura.	7
1.2.2.7. Deseccación.	8
1.2.3. Carnes procesadas.	8
1.2.4. Características de aislamiento.	11
1.2.5. Intoxicaciones alimentarias estafilococales debidas a cepas atípicas.	15
2. OBJETIVOS.	25
3. MATERIALES Y METODOS.	26
3.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS.	26
3.2. CUENTA DE <u>Staphylococcus aureus</u> .	26
3.3. METODOS PARA IDENTIFICACION DE <u>Staphylococcus aureus</u> .	27
3.3.1. Observación microscópica.	27
3.3.2. Prueba de catalasa.	27
3.3.3. Producción de pigmento.	28

	Págs.
3.3.4. Prueba de coagulasa.	28
3.3.5. Prueba de termonucleasa.	29
3.3.6. Fermentación de azúcares.	30
3.3.7. Actividad de lecitinasa.	30
3.3.8. Reducción de telurito.	31
3.3.9. Producción de enterotoxina.	31
3.4. IDENTIFICACION DE ENTEROTOXINAS.	32
4. RESULTADOS Y DISCUSION.	36
5. CONCLUSIONES.	79
6. RESUMEN.	81
7. BIBLIOGRAFIA.	84

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

La palabra estafilococo se deriva del nombre griego Stahylé que significa "racimo de uvas" y coccus que quiere decir "granos o bayas" (Minor y Marth 1971a).

Pasteur, en 1880, describió el germen como un "organismo - formado de pequeños puntos esféricos reunidos en parejas de dos - granos, pero frecuentemente asociados en pequeños acúmulos". Al año siguiente, Ogston observó, a su vez, el mismo microorganismo - en el pus de un absceso y le dió el nombre de estafilococo en razón de su aspecto microscópico. A partir de 1884, Rosenbach hizo un estudio detallado del mismo y describió las variedades de pigmentación como doradas, blancas y naranjas. De aquí los nombres aureus, albus y citreus.

Actualmente el grupo estafilococo comprende a los organismos anaerobios facultativos relativamente sensibles al calor y a los parasíticos; la especie patógena es llamada Staphylococcus aureus, aunque a veces en la literatura se le menciona como - - Micrococcus pyogenes var. aureus, Micrococcus pyogenes var. albus, Staphylococcus albus y Staphylococcus pyogenes (Bergey's 1974).

Desde 1884, en taxonomía, los estafilococos fueron puestos dentro de la familia Micrococcaceae y en 1965, mediante una prueba estándar de fermentación de azúcar, se distinguieron los -

géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* y se convino en que el género *Staphylococcus* podría contener la mayoría de los cocos gram positivos, parasíticos, anaerobios facultativos, que producen ácido de glucosa bajo condiciones anaeróbicas; y el género *Micrococcus* que comprendería la mayoría de los cocos gram positivos, saprofiticos, aeróbicos, que producen ácido de glucosa en aerobiosis, no así en anaerobiosis.

Baird-Parker, en 1966, dividió la familia *Micrococcaceae* en dos grupos. El grupo I posee al *Staphylococcus Rosenbach*, y el grupo II contiene al *Micrococcus Cohn*. Esos grupos fueron a su vez divididos en determinado número de subgrupos. Así el *Staphylococcus Rosenbach* tiene 6 subgrupos cuya clasificación se basó en la producción de pigmento, la reacción de coagulasa, la prueba de fosfatasa, la producción de acetofina y la utilización de azúcares (ver tabla No. 1, pág. 21).

El manual Bergey's 1974 describe el género *Staphylococcus* -- como aquel que comprende las especies de *Staphylococcus aureus* que fermentan el manitol y son coagulasa positivos, de *Staphylococcus epidermidis* y de *Staphylococcus saprophyticus* que no fermentan -- manitol y son coagulasa negativos (ver tabla No.2, pág.22 ).

El criterio más ampliamente usado para distinguir estafilococos patogénicos y toxigénicos de organismos saprofiticos ha sido la prueba de coagulasa (Chapman 1944, citado por Lachica 1969). Lachica (1969) en sus esfuerzos por buscar otras características -- fisiológicas que se relacionen con esta prueba, encontró correla--

ción de un 95% entre las exámenes de coagulasa y termonucleasa; también, correlación de un 93% entre enterotoxigenicidad y la prueba de coagulasa y de un 95% entre enterotoxigenicidad y la prueba de termonucleasa. Enfatizó, de esta manera, la importancia de estas características fisiológicas diferenciales para estafilococos y -- por eso la prueba de termonucleasa tiene amplia aceptación como -- uno de los principales exámenes diagnósticos. En 1973, Lachica -- perfeccionó las pruebas y las adaptó, en una determinación simul-- tánea, para la identificación de S. aureus contaminante de alimentos.

Estos exámenes, por la facilidad de manejo y la rapidez de resultados, se usan en forma rutinaria, incluso sin el apoyo de -- pruebas confirmativas complementarias. Por otra parte, Lotter y Genigeorgis, en 1975, debido a la poca reproducibilidad de la prueba de coagulasa y del escaso conocimiento de la existencia de cepas atípicas, recomendaron la realización de pruebas confirmativas -- complementarias en la identificación del germen. Por otra parte, Kloos en 1976, dió a conocer nuevas especies de estafilococos contaminantes de alimentos de origen animal; estas especies se encuentran resumidas en la tabla No. 3, pág. 23. En ella se puede ver que la determinación de coagulasa y termonucleasa ya no es tan con-- fiable debido a la existencia de otras especies que comparten sus características. Por esta razón se han recomendado, para la iden-- tificación de especies del género Staphylococcus, otras pruebas di-- ferenciales como la actividad de hialuronidasa y la producción de acetofina (Raus y Love 1983).

## 1.2. GENERALIDADES DE Staphylococcus aureus.

Actualmente, el S. aureus se define como cocos gram positivos, parasíticos, anaerobios facultativos, fuertemente catalasa positivos, no móviles, que no forman esporas y que algunas de cuyas cepas poseen cápsula o capa viscosa. Miden generalmente de 0.8 a 1.0 micra de diámetro (ocasionalmente exceden las 2 micras de diámetro).

El crecimiento sobre agar inclinado es abundante, opaco, -- liso, de apariencia húmeda y de color blanco, amarillo o naranja.

Los estafilococos pueden ser cultivados en medios que contengan 7.5% de sal. La mejor temperatura para su crecimiento es de 37°C. El número mínimo de grados centígrados en el que pueden desarrollarse es de 10°C. y el máximo de 45°C. El rango de pH para crecer está entre 4.2 y 9.3; el óptimo se halla entre 7.0 y 7.5.

La actividad mínima de agua ( $a_w$ ) que permite su desarrollo aeróbicamente es de 0.86.

Las características usadas que discriminan S. aureus de -- otras especies son: la habilidad de S. aureus a crecer en presencia de concentraciones específicas de tóxicos químicos selectivos, la forma y apariencia de colonias de S. aureus (morfología microscópica), la capacidad de productos metabólicos producidos por -- S. aureus a hidrolizar substratos tales como yema de huevo o DNA,

la producción de una sustancia que coagula el plasma (Minor y -- Marth 1971, Bergey's 1974).

#### 1.2.1. Habitat.

El estafilococo es un germen ampliamente diseminado en la naturaleza; es posible aislarlo del aire, de las aguas, del suelo, del pus, de las membranas nasales, de los folículos capilares, de la piel y del perineo de animales de sangre caliente. Puede formar parte de la flora normal de la piel y de las mucosas del hombre; en tanto que otros provocan supuraciones, abscesos, diversas infecciones piógenas y septicemias de elevado índice de mortalidad.

Por ser los estafilococos organismos de furúnculos y granos, no debe quizá sorprender que los casos de intoxicación alimentaria sean causados frecuentemente por ellos. Los alimentos más comúnmente responsables son aquellos cuya preparación requiere extensa manipulación (Bergey's 1974, Daguet 1977).

#### 1.2.2. Resistencia a agentes físicos y químicos

##### 1.2.2.1. Agentes selectivos.

S. aureus tiene un elevado grado de tolerancia con respecto a compuestos tales como telurito, cloruro mercurico, neomicina, -- polimixina, azida de sodio, ac. sórbico. Por tal motivo estas -- sustancias se usan como base en medios selectivos. Por otra parte, el clorafenicol inhibe la producción de enterotoxina B.

Los nitratos y nitritos usados en carnes curadas no tienen efecto sobre la producción de enterotoxina y son escasamente potentes como antimicrobianos a la concentración usual de 100 ppm - (partes por millón) (Jay 1978).

#### 1.2.2.2. Flora antagonista.

El desarrollo de S. aureus en su temperatura óptima disminuye cuando tiene que competir con la flora normal del alimento - porque ésta ofrece protección contra crecimiento estafilococal y produce un efecto antagónico por la competencia de nutrientes y - modificación del medio ambiente.

Las bacterias antagónicas a S. aureus incluyen Enterobacterias, Lactobacillus, Pseudomonas, S. epidermidis (Jay 1978).

#### 1.2.2.3. Concentración de NaCl.

El S. aureus muestra diferentes grados de sensibilidad a la sal. Nunheimer y Fabian, citados por Minor y Marth 1971, observaron que a concentraciones de sal de 15 a 20% y a 37°C., se - - inhibía el crecimiento de S. aureus, mientras que a concentraciones de 20 a 25% eran germicidas. El efecto de la concentración de sal en el crecimiento de S. aureus se vió influido por el pH. - Genigeorgis y Sadler, citados por Minor y Marth 1971, notaron - - buen crecimiento de S. aureus a pH 6.9 y 16% de sal en caldo a 37°C.; pero a pH 5.1 y 16% de sal, las células no sobrevivieron.

landolo, citado por Minor y Marth 1971, demostró que a --

37°C y a 4% de sal, el desarrollo de S. aureus se incrementaba, y que, a concentraciones de 8%, había todavía crecimiento pero un poco más bajo.

#### 1.2.2.4. Concentración de azúcar.

El estafilococo es resistente a elevadas concentraciones de azúcar. Hucker y Haynes, citados por Minor y Marth 1971, notaron crecimiento vigoroso en una solución de azúcar, por arriba del 50% durante las primeras 24 horas de crecimiento y Nunheimer y Fabian, citados por Minor y Marth 1971, reportaron que concentraciones de sucrosa de 60 a 70% y de dextrosa de 40 a 60% tenían acción germicida.

#### 1.2.2.5. Acidos.

Los estafilococos se manifestaron sensibles a la presencia de ácidos, según Nunheimer y Fabian (citado por Minor y Marth 1971). Ellos los reportaron en orden decreciente de efectividad: acético, láctico, tartárico, clorhídrico. Jay, citado por Minor y Marth 1971, encontró que el 95% de 235 estafilococos coagulasa positivos, fué parcial o completamente inhibido por ácido bórico o su sal.

#### 1.2.2.6. Temperatura.

Aunque el S. aureus es de naturaleza mesofílica, se han -- reportado cepas capaces de crecer aun a una temperatura tan baja como de 6.7°C (Jay 1978). Los estafilococos son relativamente sensibles al calor, puesto que no sobreviven normalmente ante el

tratamiento térmico empleado en la pasteurización de la leche. Allowood y Russell, citados por Minor y Marth 1971, reportaron escape de constituyentes intracelulares cuando se almacenó S. aureus en baño María a temperatura mayor de 50°C, lo que implicó un daño a nivel de membrana celular; a 60°C el perjuicio aumentaba. Sin embargo, sustancias tales como la solución de sucrosa 1M, el aligato de sodio, los granos o harinas protegen al estafilococo, permiten su calentamiento hasta de 50°C y favorecen su almacenamiento en frío a -11, -21 y -31°C (Minor y Marth 1971). La sal también puede resguardar al estafilococo contra tratamiento térmico y le permite resistir elevadas temperaturas (El-banna y Hurst 1983).

#### 1.2.2.7. Desecación.

Los estafilococos, cuando están sobre papel o telas, pueden sobrevivir muchas semanas. Debido a que son organismos resistentes a la desecación, es frecuente encontrarlos sobreviviendo en el polvo y en objetos que están en cuartos deshabitados.

#### 1.2.3. Carnes procesadas.

Los alimentos sujetos a contaminación postproceso con cepas de S. aureus enterotoxigénico representan un peligro significativo por la ausencia de organismos competitivos que normalmente restringen el crecimiento de S. aureus. Si el alimento contiene un elevado número de estafilococos no por eso quiere decir que sea responsable de intoxicación alimentaria sino que se debe demostrar la presencia de enterotoxina. Tampoco la ausencia o la

presencia de un pequeño número de estafilococos aseguran completamente que el alimento sospechoso es inofensivo, ya que puede haber enterotoxina resistente a el calor previamente producida por el microorganismo cuando se encontraba en elevado número.

Factores tales como el calor, congelación, desecación y almacenamiento comunes en un alimento procesado afectan adversamente el crecimiento de S. aureus provocando células alteradas dependiendo del tipo y severidad del tratamiento. Células metabólicamente deterioradas sobreviviendo a la acción tóxica de medios selectivos pueden fallar a mostrar apariencia típica.

Es importante conocer las siguientes características en productos cárnicos. La carne deshidratada libre de grasa contiene un 15% de agua. El  $a_w$  mínimo en salchichas fermentadas va de 0.83 a 0.87, y en jamones de 0.80 a 0.94. El  $a_w$  mínimo para crecimiento de S. aureus en estos productos es de 0.80. Sin embargo, a  $a_w$  de 0.86 no se produce enterotoxina.

El  $a_w$  está influenciado por factores intrínsecos de la carne como el pH y contenido en preservativos, y por factores extrínsecos como los gases ambientales y la temperatura. La humedad puede ser incorporada en los productos alimentarios por medio del cocinado ó por añadidura de un humectante como un ingrediente en la preparación de un alimento (Jay 1978).

Otra característica en los alimentos es su contenido en

sal (NaCl). Salchichas y jamones tienen de 2 a 3.5% y en el tocino generalmente se usa una concentración mínima de 5 a 7% y la máxima concentración de sal está entre 8 a 12%.

En estos productos no existe máxima tolerancia en contenido de sal, azúcar o agua como para otras sustancias aditivas.

Cuando la sal es empleada como control del  $a_w$ , se necesita una elevada cantidad de ella (22%) para alcanzar valores de  $a_w$  -- tan bajos como 0.86. Una cantidad mínima de sal (0.9%) sirve -- para alcanzar un  $a_w$  de 0.9. Por lo tanto la sal ejerce un efecto secante sobre el alimento. Además, al bajar el  $a_w$ , por la -- acción de NaCl, el S. aureus incrementa la resistencia a el calor; mientras que otras sales como las de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  incrementan el  $a_w$ .

El rango en pH de algunos productos cárnicos se enlistan a continuación: en carne bovina va de 5.1 a 6.2, en jamón de 5.9 a 6.1, en productos madurados de 5.2 a 5.4, en pollo de 6.2 a 6.4 y en camarón de 6.8 a 7.0. A pH óptimo el S. aureus generalmente es más resistente a el calor y a medida que va disminuyendo el pH, va aumentando su sensibilidad a el calor.

Como se puede ver anteriormente los productos madurados -- son productos acidificados que contienen 1.5% de NaCl y 100 ppm de nitritos. Esta concentración no muestra efectos inhibitorios a S. aureus (Jay 1978).

Un embutido a base de carne de res y de puerco que suele madurarse con su propia flora o con cultivos lácticos añadidos, y posteriormente desecado, puede ser un importante riesgo si el número inicial de estafilococos es grande. Por otra parte, el tratamiento térmico a 60°C en la masa interna de la carne, que se aplica para inactivar a la triquina, es suficiente para destruir también microorganismos (Fernández 1976).

#### 1.2.4. Características de aislamiento.

Los primeros estudios sobre el diagnóstico y/o medios selectivos para aislamiento y enumeración del estafilococo en alimentos se han realizado desde 1936 por Chapman y en 1942 por Koch, F.E. que condujeron al desarrollo del primer medio diferencial de sal en 1945, al aprovechar las características halofílicas del germen. En 1946, Chapman desarrolló el medio No. 110 y el medio Chapman's Stone; ambos contenían sal e incorporaban la reacción gelatinolítica, "reacción de Stone".

En 1949, Ludlam reportó el uso de telurito de potasio como un agente diagnóstico y selectivo para estafilococos.

Zebovitz y Evans, en 1955, desarrollaron el agar telurito glicina que resultó de la adición de LiCl y glicina al medio de Ludlam's. Y, en 1960, el agar Vogel-Johnson apareció como resultado de la adición de LiCl y el telurito de potasio al agar sal-mañitol.

Estos métodos difieren principalmente en el tipo de agentes selectivos utilizados en el medio de aislamiento, como son NaCl, el telurito de potasio, el LiCl, la glicina, la azida de sodio, - las polimixinas, entre otros.

El más reciente avance en el desarrollo de medios selectivos para estafilococos coagulasa positivos fué la adición de yema de huevo como un agente diagnóstico.

Colbeck, en 1956, desarrolló el primer medio yema de huevo considerando que S. aureus utiliza la lipovitelina del huevo y -- ocasiona la transparencia del medio opaco debajo y alrededor de las colonias (Stiles y Clark 1974). Posteriormente, Richou, en 1960, confirmó esta propiedad al demostrar dos actividades sobre el agar opaco de yema de huevo:

- 1) Transparencia del medio yema de huevo por proteólisis o lipó-- lisis.
- 2) Desarrollo de zonas opacas dentro de las zonas transparentes, es decir, aparición de un precipitado blanco o amarillento por la formación de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados.

Ambas características constituyen la denominada "reacción de yema de huevo" (Baird-Parker 1962).

Muchos medios yema de huevo fueron propuestos, como el --- agar azida yema de huevo, por Hopton en 1961; el agar yema de - -

huevo telurito, basado en el medio Ludlam's y en 1962, el medio de Baird-Parker, el cual es una modificación del agar glicina-telurito ocasionada por la adición de yema de huevo y piruvato de sodio, que estimula el crecimiento de S. aureus (Stiles y Clark -- 1974).

Minor y Marth, en 1971, concluyeron que, virtualmente, todos los medios selectivos y diferenciales usados para aislar el estafilococo son algunas veces inhibitorios para su crecimiento cuando el estafilococo se encuentra en estado débil o alterado, y que el medio de Baird-Parker era específico para la detección y enumeración de S. aureus en los alimentos.

Este medio ha sido propuesto como medio estándar para el aislamiento del germen, por comisiones internacionales tales como: International Commission on Microbiological Specifications (ICMSF) 1978, International Organization for Standardization (ISO) 1979. Además, es particularmente útil en la recuperación de S. aureus de alimentos procesados en los cuales los organismos han sido alterados por efectos físicos o por efectos químicos (Baird-Parker y col. 1965, Stiles y Clark 1974, Hurst 1977).

La principal desventaja del medio de Baird-Parker radica en tener que adicionar al medio de cultivo sustancias tanto estimulantes del crecimiento de S. aureus, como inhibitorias de germen contaminantes, una vez que el medio base ha sido preparado y esterilizado, ya que, después de servido en las cajas de petri, no puede ser almacenado satisfactoriamente porque el medio debe -

descartarse si no se usa dentro de las 24 a 48 horas después de su preparación. Pero estas desventajas son compensadas por la gran especificidad del medio, que detecta niveles entre  $10^1$  y  $10^2$  colonias/gramo de alimento (Baird-Parker 1962).

Existe una forma estable del medio que se prepara de acuerdo a la fórmula original (Baird-Parker 1962), solamente que, en este caso, el piruvato de sodio se extiende por encima de la superficie del agar y las cajas de petri se secan a  $50^{\circ}\text{C}$ .

Este medio puede guardarse aproximadamente durante un mes a temperatura de refrigeración ( $5-8^{\circ}\text{C}$ ) (Holbrook y col. 1969).

Cuando el S.aureus crece en el medio de Baird- Barker, lo hace en forma de colonias negras, brillantes, convexas, de 1 a -- 1.5 mm de diámetro, viscosas y rodeadas por halos transparentes -- de 2 a 5 mm de diámetro; además, son fuertemente positivas a la -- prueba de coagulasa (Baird-Parker 1962 , ICMSF 1978). A la morfología colonial antes mencionada se le conoce como descripción -- típica del germen.

Sin embargo, a continuación se describen los pocos reportes existentes en los que se ha publicado patogenicidad de cepas de S. aureus que no responden a las características morfológicas antes vistas o al comportamiento bioquímico típico ante alguna de las dos pruebas fundamentales de identificación del germen.

### 1.2.5. Intoxicaciones alimentarias estafilococales debidas a cepas atípicas.

Desde 1884 se empezaron a conocer las intoxicaciones alimentarias ocasionadas por S. aureus y sólo hasta 1974, en E.U.A., se hizo una clasificación y se encontró que los alimentos más frecuentemente involucrados estaban en el siguiente orden: 1) productos lácteos, 2) productos cárnicos y 3) productos de panadería.

Los productos cárnicos mostraron tener un segundo lugar en el predominio respecto a la contaminación con S. aureus enterotoxigénico. No existe una tabla de incidencia que reporte alimentos incriminados en intoxicaciones alimentarias debidas a cepas atípicas de S. aureus. Desde 1944, la característica fisiológica más ampliamente usada como índice de enterotoxigenicidad ha sido la prueba de coagulasa, y aun publicaciones como Bergey's, Daguét 1977, apoyan este criterio considerando que el S. aureus enteropatógeno debe ser coagulasa positivo. Evans, en 1950, publicó que las cepas coagulasa negativas no son enterotoxigénicas y que, por esto, no deben ser tomadas en cuenta cuando se aíslan de los alimentos. Sin embargo, en 1959, Omori y Kato reportaron un brote de intoxicación alimentaria causado por estafilococos coagulasa negativos entre estudiantes japoneses universitarios. Por su parte, Bergdoll et. al. 1967 encontró cocos coagulasa negativos enterotoxigénicos que fueron recuperados de alimentos normales y de alimentos sospechosos de un caso fatal de enteritis humana y de casos de gastroenteritis. Todas estas cepas produjeron niveles bajos de enterotoxina que sólo podían ser detectados cuando se doblaba la concentración de ellas de 30 a 50 veces y servían de -

alimento a monos, o cuando se probaba por la técnica de doble --- inmunodifusión en gel (Casman y Bennett 1969).

Esto explica porqué Evans no detectó enterotoxina entre - sus estafilococos coagulasa negativos.

H.E. Hall, en 1968, estudió 806 cepas aisladas de alimen-- tos en buen estado y de alimentos que causaron intoxicación, de - las cuales encontró 294 cepas coagulasa positivo y 31 coagulasa - negativo enterotoxigénicas. Posteriormente, Lachica, en 1969, analizó 232 cepas coagulasa positivas enterotoxigénicas de las -- cuales 4 no produjeron la termonucleasa. Así mismo, analizó 306 cultivos de S. aureus provenientes de fuentes clínicas y alimenta-- rias de los que encontró 41 cepas coagulasa negativo, de las cua-- les 10 poseían termonucleasa y 9 producían enterotoxina. Lachica concluyó que esas cepas probablemente representen mutantes que -- han perdido la habilidad de producción de la coagulasa o la termo-- nucleasa.

En 1975, Rayman y col. encontraron que de 52 cepas aisla-- das de alimentos, una fué termonucleasa negativo coagulasa positi-- vo enterotoxigénica. En el mismo año, Lotter y Genigeorgis ais-- laron, de diferentes fuentes, 8 cepas coagulasa negativo y una - débilmente coagulasa positivo enterotoxigénicas que evaluadas so-- bre la base de sus propiedades bioquímicas, podrían considerarse como variantes de ese microorganismo, ya que ninguno de los germe-- nes aislados exhibieron características típicas de S. aureus, - -

S. epidermidis o S. saprophyticus (ver tabla No. 1, pág. ).

En 1976, Dornbusch, en un estudio de estafilococos coagulasa negativos termonucleasa positivos de fuentes humanas, concluyó que estos pertenecían a un grupo intermediario heterogéneo que -- compartían características de S. aureus y S. epidermidis (Lachica y col. 1969, Lotter y Genigeorgis 1975).

En 1978, Gramoli y Wilkinson identificaron dos S. aureus -- como "S. aureus atípico" porque no produjeron la enzima coagulasa a partir de 13 cepas coagulasa negativas aisladas de fuentes humanas, alimentarias y animales.

Estos reportes despiertan extensivo interés en Salud Pública por la importancia de la existencia de cepas enterotoxigénicas de S. aureus coagulasa negativo.

Las tentativas para demostrar coagulasa en este tipo de estafilococos a través de estudios de fibrinolisisina y por medio de la inducción de liberación de coagulasa por el uso de albúmina -- sérica bovina no tuvieron éxito (Orth y Weiss et. al., citados -- por Lotter y Genigeorgis 1977).

Se cree que el retraso o la falta de una reacción coagulasa positiva por cepas de S. aureus pueden ser debidos a: a) una pequeña cantidad de coagulasa durante la prueba causada por condiciones impropias de cultivo, por variación en la producción de --

coagulasa, por destrucción ocasionada debido a proteinasas de los estafilococos o a las encontradas en el plasma animal empleado en la prueba; b) una inestabilidad del plasma provocada por la pérdida de un factor accesorio de la coagulasa debido a la presencia de inhibidores no específicos o al hecho de albergar anticuerpos contra la enzima; c) una destrucción de la fibrina (causada por la fibrinolisisina o debido a las proteasas del plasma) antes de que los resultados positivos fuesen observados (Lotter y Genigeorgis 1977).

Todo lo descrito anteriormente se refiere a variantes de tipo bioquímico que pueden ser enterotoxigénicos. En cuanto a variantes de tipo morfológico sobre el medio de Baird-Parker existen los reportes de De Waart 1968, Devoyod 1976, Devriese 1981 y Stiles y col. 1981. Ellos publican fallo en la manifestación de los dos principales marcadores diagnósticos presentes en el medio, es decir, en la transparencia de la yema de huevo por falta parcial o total de un halo transparente alrededor de la colonia (falta de actividad de lecitinasa) y en la reducción del telurito por falta parcial de pigmentación de las colonias. Muth (citado por Minor y Marth 1971) estudió una cepa de S. aureus que produjo grandes cantidades de coagulasa y descubrió que formaba colonias de pigmento blanco, pequeñas, rugosas y viscosas. Estas variaciones sólo se reportan existentes y no se tiene información en cuanto a su patogenicidad.

Considerando la importancia que tiene la existencia de enterotoxinas producidas por cualquier tipo de cepas de S. aureus,

se han ideado métodos para su determinación. Estos métodos pueden ser: la administración oral a humanos y animales o la serología: éste último es el más usado.

Existen algunos tipos de enterotoxinas antigénicamente distintos (A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E, F); cada una tiene propiedades físico-químicas diferentes (ver tabla No. 4 pág. 24 ).

En 1954, Surgalla usó el primer método serológico para -- enumerar antígenos presentes en preparaciones enterotoxigénicas; resultó ser un método muy sensible y tuvo mucha aceptación.

En 1958, Ouchterlony desarrolló la técnica de difusión en gel para la detección de antígenos solubles. Actualmente, el método de microplaca para la identificación de enterotoxina adoptado por Casman y Bennett en 1969, es el que se recomienda para uso rutinario porque ofrece ventajas ya que además de usar pocos reactivos, puede detectar cantidades muy pequeñas (0.1 ug) de enterotoxina A y B por mililitro. El fundamento del método anterior es que los reaccionantes en pozos separados difunden uno hacia el otro; esto crea un gradiente de concentración en el gel y donde la concentración antígeno-anticuerpo sea óptima para la inmunoprecipitación se observará una línea opaca en el agar (Clausen 1975).

Existen otros métodos para la identificación de enterotoxinas que son mucho más sensibles: el Radioinmunoensayo, ELISA, y la Hemaglutinación. Estos métodos requieren poco tiempo para su

realización, pero necesitan de sustancias más complejas y más cuidado en su ejecución.

Entre las múltiples funciones del Laboratorio Nacional de Salud Pública está la de contribuir a la disminución de la tasa de morbi-mortalidad de la población a nivel Nacional, controlando los germenos patógenos contaminantes de los alimentos que generalmente causan problemas gastrointestinales; los cuales tienen un lugar preponderante entre los padecimientos más importantes en -- nuestro país (En la actualidad, las gastroenteritis ocupan el segundo lugar entre las causas de muerte (Kúmate y Gutiérrez 1983). Uno de estos germenos es el S. aureus productor de intoxicaciones alimentarias que rara vez se dan a conocer, a menos que la población intoxicada sea muy grande.

TABLA No. 1

ESQUEMA DIAGNOSTICO PARA CLASIFICAR ESTAFILOCOCOS Y MICROCOCCOS

	GRUPO I						GRUPO II							
	ESTAFILOCOCCOS ROSENBACH						MICROCOCCOS COHN							
	SUBGRUPOS I	II	III	IV	V	VI	1	2	3	4	5	6	7	8
PIGMENTO ROSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ACIDO DE GLUCOSA														
1) AEROBIO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	
2) ANAEROBIO	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
COAGULASA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FOSFATASA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ACETOINA	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ACIDOS DE:														
1) ARABINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	+	-	-
2) LACTOSA	+	+	V	-	+	V	-	+	V	+	+	+	-	-
3) MANITOL	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
4) MALTOSA	+	+	-	V	+	V	V	+	+	+	+	+	-	±

SUBGRUPO I CORRESPONDE A : S. aureus  
 SUBGRUPO II CORRESPONDE A : S. epidermidis  
 SUBGRUPO 7 CORRESPONDE A : M. luteus  
 SUBGRUPO 8 CORRESPONDE A : M. roseus

\* ± DEBIL O NEGATIVO  
 \* V= VARIABLE

TABLA No. 2

## CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE ESPECIES DEL GENERO STAFILOCOCCO

	<u>S. aureus</u>	<u>S. epidermidis</u>	<u>S. saprophyticus</u>
COAGULASA	+	-	-
MANITOL			
ACIDO AEROBICAMENTE	+	d	d
ACIDO ANAEROBICAMENTE	+	-	-
ALFA TOXINA	+	-	-
ENDONUCLEASA RESISTENTE AL CALOR	+	-	-
BIOTINA	-	+	NT
PARED CELULAR:			
RIBITOL	+	-	+
GLICEROL	-	+	d
PROTEINA A	+	-	-
SENSIBILIDAD A LA NOBO- VICINA	S	S	R

+ = MAS DEL 90% DE CEPAS POSITIVAS

- = MAS DEL 90% DE LAS CEPAS NEGATIVAS

d = MENOS DEL 90% DE LAS CEPAS POSITIVAS (ALGUNAS POSITIVAS, ALGUNAS NEGATIVAS)

NT = NO PRBADAS

TABLA No. 3

CARACTERISTICAS DISTINTIVAS ENTRE ESPECIES DE ESTAFILOCOCO Y MICROCOCO SPP.

ESPECIES	CARACTERISTICAS MAYORES					CARACTERISTICAS ADICIONALES			
	PIGMENTACION	EFFECTO HEMOLITICO	REACCION FUERTE DN <sub>666</sub>	FACTOR COAGULANTE	PRUEBA OPCIONAL COAGULASA EN TUBO C/PLASMA DE CONEJO	TIPIFICACION DE FAGOS	ACETOINA	HIALURONIDA SA	MANITOL ANAEROBIO
<u>Staphylococcus aureus</u>	*+	+	**+	+	+	D	**+	+	+
<u>intermedius</u>	-	+	D	D	+	-	-	-	-
<u>hyicus subsp. hyicus</u>	-	-	+	-	D	-	-	+	-
<u>hyicus subsp. chromogenes y otros Staphylococcus y Micrococcus spp.</u>	D	D	-	-	-	-	D	-	D

\* POR ARRIBA DEL 90% DE LAS CEPAS SON POSITIVAS

D=DIFERENTES RESULTADOS

\*\* CEPAS DE Staphylococcus aureus PROVENIENTES DE POLLO PUEDEN SER DN<sub>666</sub> Y ACETOINA NEGATIVO O SOLO DAR UNA REACCION DEBILMENTE POSITIVO (DEVRIESE & OEDING 1976, CITADO POR DEVRIESE Y HAJEK 1980 ).

TABLA No. 4

## PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS

PROPIEDADES	A	B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	E
PESO MOLECULAR	27 800	28 366	34 100	34 000	29 600
PUNTO ISOELECTRICO	7.3	8.6	8.6	7.0	7.0
CONTENIDO DE NITRO- GENO	16.2	16.1	16.2	16.0	----
DO SIS EMETICA ED <sub>50</sub>					
µg / mono	5	5	5	5-10	5-10
ABSORCION MAXIMA	277	277	277	277	277
EXTINCION ( E <sub>1</sub> %CM )	14.6	14.6	12.1	12.1	12.5
COEFICIENTE DE SEDIMEN- TACION ( S <sub>20</sub> <sup>0</sup> W ) S	3.03	2.78	3.00	2.90	2.60
COEFICIENTE DE DIFUSION ( D <sub>20</sub> <sup>0</sup> W X 10 <sup>-7</sup> Cm <sup>2</sup> / Seg	9.80	8.22	8.10	8.10	----
VISCOSIDAD REDUCIDA ml/g	4.07	3.81	3.40	3.70	----
VOLUMEN PARCIAL ESPECTI - FICO 1	0.726	0.726	0.728	0.725	----

## 2. O B J E T I V O S

2.1. Conocer las variaciones en morfología colonial que presenta Staphylococcus aureus procedente de carne en el medio de - - Baird-Parker.

2.1.1. Relacionar las dos principales pruebas confirmativas existentes para este microorganismo como son la coagulasa y - la termonucleasa; así como otras pruebas bioquímicas complementarias.

2.2. Determinar la frecuencia de Staphylococcus aureus atípico en productos cárnicos.

2.2.1. Conocer la posible enterotoxigenicidad de las cepas atípicas aisladas, así como los principales tipos inmunológicos enterotoxigénicos presentes.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS.

Para efectuar el presente estudio se analizaron 233 productos cárnicos que llegaron al Laboratorio Nacional de Salud Pública con fines de control sanitario, para tal análisis, se siguió - la secuencia que a continuación se describe y se esquematiza en - el diagrama No. 1, pág. 35 ).

#### 3.2. CUENTA DE Staphylococcus aureus.

- Pesar 10 gr. de la muestra y homogeneizar con 90 ml de solución amortiguadora, en un vaso de licuadora, durante 90 seg. Esto constituye la dilución 1:10. A partir de ella, preparar diluciones decimales mayores 1:100, 1:1000, 1:10000.
- Transferir 0.1 ml de cada una de las diluciones decimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) a placas de agar de Baird-Parker.
- Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con una varilla estéril, utilizando una para cada dilución.
- Invertir las placas e incubar durante 48 horas a 35°C.
- Seleccionar como máximo 3 colonias atípicas tomando en cuenta - el tipo colonial que presenten y someterlas a las pruebas bioquímicas que se describen enseguida.

Para realizar lo mencionado anteriormente, se siguieron -- las especificaciones dadas por el Committee on Microbiological - Methods for foods 1976.

### 3.3. METODOS PARA IDENTIFICACION DE Staphylococcus aureus.

#### 3.3.1. Observación microscópica.

- Tomar una asada del cultivo de 24 horas crecido en agar soya - tripticasa (AST).
- Teñirlo por la técnica de Gram.
- Observar formación de cocos en racimos Gram (+) típicos de - - S. aureus.

#### 3.3.2. Prueba de catalasa.

- Poner una asada de cultivo de 24 horas crecido en AST, sobre un portaobjetos limpio.
- Poner con pipeta pasteur una gota de agua oxigenada reciente-- mente preparada al 3.5%.

Lectura:

Observar la formación de burbujas. Las colonias que no presen ten formación de gas son catalasa negativo (Baird-Parker 1963).

### 3.3.3. Producción de pigmento.

- Pasar una asada del cultivo de 24 horas crecido en caldo BHI - (Brain Heart Infusion) a un tubo con agar soya tripticasa.
- Incubar durante 3 días a 37°C.

#### Lectura:

Observar la producción de pigmento.

Tomar en cuenta que S. aureus generalmente produce un pigmento amarillo (Baird-Parker 1963, Devriese 1981).

### 3.3.4. Prueba de coagulasa.

- Sembrar en 0.5 ml de caldo BHI.
- Incubar a 37°C durante 24 horas. Al mismo tiempo, inocular en la misma forma cepas conocidas de S. aureus y S. epidermidis - como testigo (+) y testigo (-) respectivamente.
- Transferir 0.3 ml a un tubo estéril para la prueba de termonu-- cleasa.
- Agregar al resto del cultivo 0.2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril al 0.85%.
- Incubar en baño María con una temperatura de 35 a 37°C y observar en intervalos de una hora durante 6 horas.

Lectura:

Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo total de la mezcla (se siguieron las especificaciones dadas por Lachica 1973).

3.3.5. Prueba de termonucleasa.

- Agregar a un portaobjetos limpio 3 ml de medio de agar azul de toluidina-DNA fundido; esparcir por toda la superficie y dejar solidificar.
- Hacer perforaciones de 2mm de diámetro con una pipeta pasteur.
- Calentar el cultivo de caldo BHI en baño Ma. a 90°C durante -- 15 min.
- Transferir una gota de cada tubo a un orificio de la laminilla, - sin olvidar los testigos.
- Incubar en cámara húmeda durante 4 horas a 35°C.

Lectura:

La aparición de un halo color de rosa alrededor de la perforación se considera (+). S. aureus produce halos hasta de 7mm de diámetro (se siguieron las especificaciones dadas por Lachica - 1973).

Las cepas que dieron las dos pruebas anteriores positivas

y su morfología mostraba ser atípica ó aunque sólo dieran una de las dos pruebas anteriores y presentaban morfología típica ó atípica fueron sometidas a las siguientes pruebas:

### 3.3.6. Fermentación de azúcares.

- Tomar una asada de un cultivo de 24 horas crecido en AST.
- Inocular dos tubos con caldo base manitol rojo de fenol y sellar uno de ellos con aceite mineral estéril para proporcionar condiciones de anaerobiosis.
- De la misma manera, inocular dos tubos con base caldo glucosado rojo de fenol y sellar uno de ellos en la misma forma.
- Incubar a 37°C durante 24 horas. Si es necesario, dejar hasta 36 horas.

#### Lectura:

S. aureus es anaerobio facultativo, es decir, oxida y fermenta la glucosa y el manitol (Baird-Parker 1963).

### 3.3.7. Actividad de lecitinasa.

- Observar, después del crecimiento de 24 y 48 horas sobre agar - Baird-Parker, la aparición de un halo transparente en contraste con el medio opaco. Esto indica una reacción positiva. - - -  
S. aureus es lecitinasa (+).

### 3.3.8. Reducción de telurito.

- Observar la pigmentación de las colonias que estan sobre el medio de Baird-Parker, después de 24 y 48 horas de incubación.

#### Lectura:

Las colonias negras y grises se consideran reacciones positivas fuerte y débil respectivamente. S. aureus reduce completamente el telurito y forma colonias negras sobre el medio (Baird-Parker 1962).

Las cepas consideradas como S. aureus atípico (con apoyo - en las pruebas bioquímicas anteriores) fueron clasificadas de - - acuerdo a sus características comunes entre sí. Se utilizaron - las claves del I al V romano con subíndice A para los tipos coloniales que presentaban actividad de lecitinasa y con subíndice B para los que no presentaban actividad de lecitinasa.

Posteriormente, se les aplicaron las siguientes pruebas -- para determinar su enterotoxigenicidad:

### 3.3.9. Producción de enterotoxina.

Se utilizó el método de celofán sobre agar (Robbins R. - - 1974), ya que es fácil de ejecutar y produce niveles de entero---toxina satisfactorios. Este método se describe a continuación:

- Cortar círculos de papel celofán para diálisis y de papel filtro; todos de 9 cm de diámetro.

- Humedecer con agua destilada y esterilizar los círculos en una caja de petri a 121°C/20 min. colocándolos alternativamente y ver que no se formen burbujas o arrugas.
- Colocar los círculos de celofán ya esterilizados, sobre placas de medio de agar BHI pH 6.0 sin que se formen burbujas o arrugas.
- Distribuir, de manera homogénea, 0.1 ml del microorganismo a probar, proliferado en 5 ml de caldo BHI a 37°C/ 24 horas con una varilla de vidrio, sobre el celofán de la placa.
- Incubar la placa invertida a 37°C durante 24 horas.
- Recoger el crecimiento abundante del microorganismo con 2.5 ml de fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.01M moviendo la caja y sustrayendo con pipeta pasteur.
- Centrifugar el cultivo obtenido a 2,500 rpm/60 min.
- Utilizar el sobrenadante transparente para identificar la enterotoxina.

#### 3.4. IDENTIFICACION DE ENTEROTOXINAS.

Se utilizó la técnica de inmunodifusión en gel sobre microplaca (Food Drugs Asociation 1976) que a continuación se describe:

- Usar portaobjetos sin rayar, perfectamente limpios y sin grasa;

usar detergente líquido Extran y agua destilada. Dejar los -- portaobjetos en alcohol para desengrasarlos.

- Cortar cintas de aislar de aproximadamente 10 cm de longitud y envolver los portaobjetos, perfectamente desengrasados, en ambos extremos dejando una distancia de 2 cm entre las cintas.
- Colocar, en la superficie delimitada por las cintas, una delgada película de agar al 0.2%.
- Dejar secar en una estufa de 45°C durante un minuto aproximadamente.
- Colocar sobre la película de agar 0.4 ml de agar noble al 1.2% (preparado en una solución de NaCl al 0.85%, barbital sódico al 0.8% y merthiolate 1:10000 cristalino) a un pH 7.4.
- Engrasar con silicón la parte trasera del molde de plástico, sin obturar los pozos.
- Colocar el molde engrasado sobre el agua inmediatamente antes de que este solidifique.
- Una vez solidificado el agar, llenar los pozos de la siguiente manera:
  - Colocar el antisuero en el centro.
  - Poner la enterotoxina tipo, en el pozo superior.

-Poner los sobrenadantes a probar en los pozos restantes.

Lo anteriormente descrito se hizo con la ayuda de una pipeta Oxford especial para el llenado de pozos. El sistema de difusión se dejó correr durante 72 horas a temperatura ambiente, en atmósfera húmeda.

- Habiendo pasado el tiempo de difusión, quitar el molde y sumergir la microplaca durante 10 min. en cada uno de los siguientes baños:

3 baños de agua destilada.

1 baño de solución de rojo de thiazina al 0.1% en ácido acético al 1%.

2 baños de ácido acético al 1%.

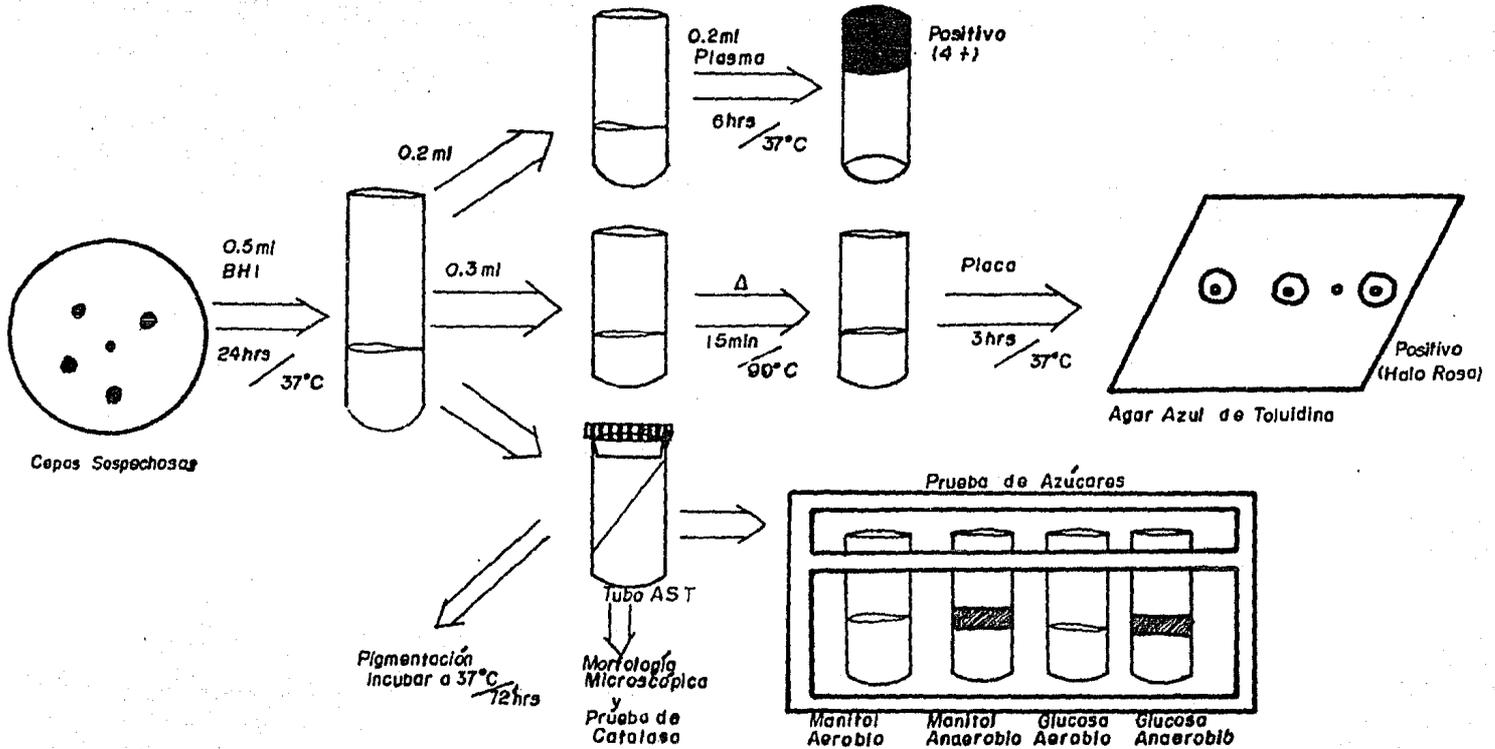
1 baño de glicerol al 1% en ácido acético al 1%.

- Leer inmediatamente con la ayuda de una lámpara y observar, en caso de que las enterotoxinas estén presentes, bandas de precipitación entre los pozos.

Las toxinas tipo, así como los antisueros específicos, fueron proporcionados por el Dr. Melvin S. Bergdoll del Food Research Institute of Wisconsin, E.U.A.

# DIAGRAMA No 1

## PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA Staphylococcus aureus



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

Se analizaron 233 muestras de productos cárnicos, de los cuales 33 (14.1%) presentaron S. aureus atípico, es decir, con propiedades diferentes a las señaladas como típicas para este microorganismo (Baird-Parker 1962, Bergey's 1974) (ver tabla No. 5, pág. 60).

En relación al encuentro de S. aureus atípico, Hall, en 1968, reportó un 10.5% en productos alimentarios, y Gramoli y Wilkinson, en 1978, reportaron un 15.3% en productos de diferentes fuentes. Sus resultados están de acuerdo con los obtenidos en este estudio.

Respecto a las cepas típicas de S. aureus halladas en cárnicos, Jay, en 1962, Chou y Marth, en 1969, y Messer, en 1970 (citados por Minor y Marth 1971), encontraron una frecuencia de 39%, 35% y 40% respectivamente.

Como podemos ver la frecuencia de S. aureus atípico en productos cárnicos es mucho menor que la de la forma típica.

Las características del tipo alimentario analizado, así como el daño que cada germen sufre cuando el producto alimentario es sometido a diferentes procesos, impiden o alteran la forma de crecimiento típica del microorganismo en el medio de aislamiento (Hurst 1977), y son una probable explicación de la presencia de cepas atípicas.

En este estudio se utilizó el medio de Baird-Parker para el aislamiento de S. aureus atípico por ser usado en forma rutinaria en el Laboratorio Nacional de Salud Pública para la enumeración de S. aureus típico proveniente de alimentos y, además, por ser ampliamente recomendado para células alteradas pues se considera un medio enriquecido. (Baird Parker y E. Davenport 1965, Holbrook R. y col. 1969, Stiles y Clark 1974, Collins-Thompson 1974, Niskanen A. y M. Aalto 1978, Rayman M.K. y Purvis 1978).

Las células atípicas pueden ser células alteradas que sobreviven a los diferentes procesos o tratamientos de obtención del alimento (cocción, ahumado, curado, maduración y conservación). Esto es confirmado por A. Hurst 1977, quien dice además, que estos procesos pueden ser físicos o químicos y que los físicos comprenden el calor, la actividad osmótica, la irradiación y el secado; los químicos el pH, los preservativos, los aditivos alimentarios, la sal (NaCl) y los colorantes.

Todo esto afecta de alguna manera a los microorganismos modificando sus propiedades fisiológicas y, de esta forma su morfología colonial. Esto dá lugar a cierto riesgo en la salud pública pues las células alteradas presentes en los alimentos escapan a la detección porque no se desarrollan o se desarrollan mal en sus medios selectivos y además son capaces de repararse, proliferar y producir enterotoxina (Collins 1973, citado por A. Hurst 1977).

A pesar de que el medio Baird-Parker es ampliamente recomendado, se ha visto que sus propiedades inhibitorias son bloqueadas cuando se analizan productos cárnicos con un elevado índice de contaminación bacteriana (De Waart 1968, L.A. Devriese 1981 y Stiles y col. 1981). Una flora contaminante abundante sobre el medio de Baird-Parker, afecta la selectividad y capacidad favorecedora sobre gérmenes alterados y no alterados que compiten en nutrientes y lo hacen poco confiable (Hurst 1977). Por eso Devriese 1981, aconseja que se adicionen al medio de Baird-Parker, antibióticos, que inhiban en gran parte, la numerosa flora competitiva procedente de productos de origen animal que crecen en él. Sin embargo, no se sabe el posible efecto que pueda tener este medio suplementado sobre células alteradas.

Hurst 1977, afirma que, con un procedimiento nutricional, se logra regenerar algunas de las enzimas bacterianas alteradas o inhibidas. Tal vez así se logre recuperar las células alteradas. Collins y col. 1974, proponen el agar soya tripticasa para la recuperación de células alteradas por calor. Hurst también menciona que la alteración celular puede darse a nivel de pared, membrana, ribosomas o cromosomas.

En la gráfica No. 1, pág. 61, se observa que los productos que, en mayor proporción, presentaron muestras positivas atípicas fueron el chorizo y la longaniza, que son productos madurados y de amplio consumo en el país; les siguieron en menor proporción los productos cocidos como el queso de puerco, jamón, salami, - -

pasteles de carne, salchichas; algunos de estos presentaron una cuenta estafilococal hasta de cero.

Esto concuerda con los resultados de Amador (1982), quien, al estudiar cepas típicas de S. aureus en cárnicos, encontró que los productos más comunmente contaminados fueron el chorizo y la longaniza.

La constante frecuencia de cepas atípicas en productos madurados, probablemente, se deba al tipo de empaquetado y a la elevada cantidad de ingredientes involucrados que pueden estar contaminados, pues se trata de productos muy condimentados. Hay que recordar que S. aureus es resistente a la desecación, por lo que puede estar presente en los productos con  $a_w$  bajo, y que si prolifera - en gran cantidad, puede producir enterotoxina suficiente como para producir intoxicación.

La frecuencia de S. aureus atípico en productos cocinados concuerda con la frecuencia encontrada en el estudio realizado por Amador (1982) con cepas típicas en dichos productos.

Posteriormente se analizó la proporción en que se encontraba S. aureus atípico dentro de los intervalos de cuenta (ver tabla No. 6 y gráfica No. 2 pags. 62 y 63) y se observó que la mayoría de las muestras (51.5%) estuvo en el intervalo medio (1001-10 000 col/g.); este comprende 10 productos madurados, 2 semicocidos y - 5 cocidos. Los intervalos superiores (10001- 1 000 000 col/g.)

sólo tuvieron un 18% de muestras y dentro de ellas predominaron - los productos madurados. En los intervalos inferiores (1-1 000 col/g.) hubo un 30.2%, de los cuales, casi todos fueron productos cocidos.

Ningún caso presentó más de 200 000 col/g.

Estos resultados justificarían el uso (en la determinación rutinaria que se hace del microorganismo) de un caldo de enriquecimiento para gérmenes alterados por procesos alimentarios.

De acuerdo a las normas de estandarización (ICMSF 1978), - el límite de cuenta para longaniza y chorizo es de 5 000 col/g. y para carnes procesadas, de 10 000 col/g. Según esto, el 70% de las cepas encontradas queda dentro de las especificaciones y comprende, en mayor grado, productos madurados.

Se debe hacer la observación de que la mayor parte de los productos se halla dentro de un límite de 10 000 col/g., mientras que, en el estudio hecho por Amador (1982) con cepas típicas, está dentro de un límite de 100 000 col/g. y en el estudio de Reyes (1981) en productos lácteos con S. aureus típico, la mayoría pasa el límite de 100 000 col/g.

Otros efectos que pueden dar lugar a la presencia del microorganismo y ayuden a causar su alteración por procesos alimentarios es el  $a_w$  y la presencia de sales de curado. El  $a_w$  es un factor necesario para la proliferación de los gérmenes y, aunque

se reporta que hay desarrollo substancialmente reducido de estafilococos a nivel menores de  $a_w$  0.94, se ha visto crecimiento aerobio a  $a_w$  tan bajo de 0.86 (Minor y Marth 1972); esta propiedad depende grandemente de la cantidad de NaCl presente en los alimentos.

En cuanto a las sales de curado, éstas mantienen una atmósfera reducida que supuestamente inhibe el crecimiento de S. aureus, pues se ha reportado que los nitritos adicionados a salchichas a la concentración convencional o máxima son insuficientes para prevenir su crecimiento (Bayne y col. 1975). De tal manera que, con el tiempo, este microorganismo puede multiplicarse y producir toxina al bajar la flora competitiva y subir el pH del producto (Banwart 1979). De modo similar, algunos preservativos alimentarios sólo retardan el desarrollo de S. aureus y la presencia de lípidos en el alimento disminuye su efecto antimicrobiano (Davidson y col. 1981), esto dispone la presencia del estafilococo en el alimento y propicia lo mencionado por Banwart.

En relación a la concentración de NaCl, sabemos que la tolerancia a la sal es una característica de S. aureus (Chapman y Koch 1942, citados por Stiles y Clark 1974). Sin embargo, Lawrence y col. 1974, en un estudio incrementando la sal de 0.0-7.5% descubrieron que cuando había un aumento fuerte de sal, las células no alteradas disminuían, mientras que células calentadas mostraban marcada sensibilidad a 4% de sal. Por otra parte, Iandolo y Ordal (citados por A. Hurst 1977) sugirieron que los medios con concentración de sal de hasta 8% sólo enumeraban organismos no -

alterados y definieron a los estafilococos alterados como organismos capaces de desarrollarse en el medio óptimo pero que pierden su tolerancia a la sal. Tales cambios en la tolerancia a la sal y a cualquier otro agente selectivo en el medio de aislamiento, - obviamente, reducen la efectividad de éste para enumerar selectivamente S. aureus.

La presencia de sal, no tan sólo limita el desarrollo de S. aureus alterado, sino que influye notablmenete en su capacidad para producir enterotoxinas; así lo declararon Mc. Lean y col. -- (citados por Banwart 1979). Ellos probaron diferentes concentraciones de sal entre 0.0 y 10% y observaron que desde 0.5% de sal hay disminución en la producción de enterotoxina B y que esta reducción es más acentuada entre 2 y 4% de sal.

Los productos analizados contienen cierta cantidad de sal; jamones y salchichas tienen 2% (Depto. Ing. Bioquímica E.N.C.B. - 1980). Este hecho podría ser una limitante para el aislamiento de S. aureus alterado, en dichos alimentos, e influir en la producción de enterotoxinas.

Se han reportado varias interacciones entre el pH y la -- concentración de sal. Sabemos que el pH de crecimiento para células normales de S. aureus es de 4.2 a 9.3, y que el óptimo va de 7.0 a 7.5 (Bergey's 1974). Sin embargo, Genigeorgis y Sadler (citados por Minor y Karth 1971), observaron que estos rangos --- cambian para células alteradas, las cuales presentaron una tole--

rancia de no menor a pH 5.6 en carnes curadas. Así como también notaron que el crecimiento de S. aureus y la producción de enterotoxina era mejor cuando se incrementaba el pH y la concentración de sal se disminuía. Nelson (citado por Hurst 1977) reportó que los efectos inhibitorios de pH ácido y concentraciones de hasta - 7.5% de sal, fueron aditivos cuando se enumeraron células alteradas por calor.

La presencia de flora microbiana antagonista a S. aureus - como sería la presencia de flora láctica y coliformes en productos madurados que, según Gilliland y Speak (citados por Banwart 1979) inhiben el desarrollo de este microorganismo, influye en la recuperación de S. aureus típico. La flora microbiana y los efectos adversos mencionados antes pueden contribuir a dar lugar a la manifestación atípica en el medio selectivo, y traer como consecuencia una recuperación total mínima de la forma típica buscada.

En este estudio, se obtuvieron dos variedades de pigmento (ver tabla No. 7, pág. 64 ): un pigmento amarillo (55.7%) y un pigmento blanco (44.2%). De los que observamos que las cepas -- con pigmento blanco manitol negativo (12.8%) pudiesen ser - - - - S. hyicus; ya que este microorganismo de origen animal posiblemente estuviese presente en los alimentos analizados, pues es inhibido incompletamente sobre el medio de Baird-Parker, (Devriese y Hájek 1980). Sin embargo, sus características coloniales son diferentes a las de las colonias que resultaron ser atípicas.

La producción de pigmento es independiente al resultado obtenido en cada una de las fermentaciones por cepas atípicas de S. aureus; esto es confirmado con un nivel de significancia del 0.05. Aunque las cepas pigmento amarillo dieron más resultados positivos a las fermentaciones (Hayslett 1980).

Desde 1962 se ha afirmado que la producción de pigmento es de poco valor taxonómico (Baird-Parker 1963). Sin embargo, L. A. Devriese y V. Hájek 1980 consideraron que esta característica es de gran valor diagnóstico en la identificación de estafilococos patogénicos aislados de alimentos derivados de origen animal y -- dieron más crédito al pigmento amarillo para diferenciar S. aureus de otros estafilococos coagulasa positivos. En este estudio, las cepas con pigmento amarillo se apegaron más a las propiedades -- bioquímicas típicas del S. aureus.

Todas las cepas produjeron la prueba de catalasa. Sin embargo, aproximadamente el 40% no la manifestó tan intensamente como se describe en la literatura (Bergey's 1974).

Una probable explicación a esto la constituyen los efectos alteradores de la fisiología bacteriana por procesos alimentarios anteriormente discutidos y reconfirmados por Bucker y Martin (1981). Estos autores muestran un daño hecho a nivel de la actividad de la enzima dismutasa que es necesaria para que se manifieste actividad de catalasa por la acción del calor y de la sal.(NaCl).

En cuanto a la fermentación de azúcares, el manitol aerobio dió positivo tanto para las cepas de pigmento amarillo como para las de pigmento blanco; no fué utilizado por el 1.4% del total de cepas probadas. Esto podría ser explicado por el hallazgo de De Waart y Mossel (1968). Ellos reportaron mutantes manitol aerobio negativas de S. aureus que no se detectan claramente en el medio selectivo; encontraron un 4.4% de este tipo de cepas en muestras trabajadas de tipo clínico y alimentario y argumentaron que las - cepas de esta clase generalmente son glucosa fermentativas.

En este estudio, se obtuvo un 17.1% de cepas que no utilizaron manitol anaeróbicamente; esta prueba, en cuanto a fermentación de azúcares, fué la que tuvo más resultados negativos. Esto puede deberse a la fuente de aislamiento del microorganismo, pues to que White y col. (citados por Baird-Parker 1965) reportaron -- que sólo el 73% de cepas de S. aureus de origen bovino fermentó - el manitol y Evans y col. (1983), en un estudio con S. aureus - - atípico de pollo, hallaron que sólo el 76% utilizaba manitol anaeróbicamente.

En cuanto a la fermentación de glucosa, sólo una cepa (1.4%) no fué utilizada anaeróbicamente. Casi todas las cepas fueron -- glucosa fermentativas. En apoyo a lo anterior, Stiles y col. - (1981) obtuvieron fermentación de glucosa y manitol de S. aureus atípico procedente de carne cruda y procesado en un 93.5%.

En este estudio se obtuvo el 80% de fermentaciones positivas a los dos azúcares.

En este trabajo, se utilizó el criterio de Turner y - - - Schwartz (1958) (ver diagrama No. 2, pág.65 ) para la lectura de - la prueba de coagulasa.

En el diagrama No. 3, pág. 66, se observa que de 33 alimentos que presentaron S. aureus atípico, se obtuvieron 70 cepas con las siguientes características:

54.2% coagulasa (+) termonucleasa (+)

44.2% coagulasa (-) termonucleasa (+)

1.4% coagulasa (+) termonucleasa (-)

Se obtuvieron 5 cepas que dieron coagulasa 3+ y una coagula sa 2+ termonucleasa positivas. El resto de las 70 cepas aisladas fueron coagulasa 4+.

Stiles y col. (1981) en su estudio en carnes utilizando - - plasma de conejo, descubrieron que las cepas aisladas coagulasa - 3+ y 4+ fueron S. aureus; esto lo confirmaron con pruebas bioquími cas y con la prueba de termonucleasa.

En este estudio también se utilizó plasma de conejo en la determinación de la coagulasa (Lachica 1973).

La prueba de coagulasa presenta problemas en su capacidad para reproducirse y en los métodos de conducción. Esto ha hecho que aun hoy en día, no haya sido estandarizada. Estos problemas

se presentan más frecuentemente en cepas provenientes de origen -- animal que en las de origen humano (L.A. Devriese 1981, Evans y -- col. 1983).

Es posible que en cárnicos, debido a la alteración fisioló-- gica celular provocada por algún efecto dañino, se origine, en un número significativo de casos, la inhibición parcial o total de la coagulasa estafilococal. Amador (1982) encontró que, de un total de 153 cepas típicas aisladas de productos cárnicos, el 48.3% fue-- ron cepas coagulasa (-) termonucleasa (+). Sin embargo, debe to-- marse en cuenta que el autor usó plasma humano en la determinación de la coagulasa estafilococal y, a menudo, esto da resultados mu-- cho menos satisfactorios en cuanto a reproducibilidad, que si se utilizaran otros plasmas. En los estudios hechos sobre plasmas -- usados en la prueba de coagulasa, Sperber y Tatini (1975) y Gramo-- li y col. (1978) pusieron de manifiesto esta cuestión y sugirieron el uso de plasma de cerdo sólo o mezclado con plasma de conejo y argumentaron que esta mezcla realza la producción de coágulo en la ejecución de la prueba. Con base en esto, se han recomendado va-- rios medios con esta composición; algunos de ellos son el medio -- plasma de cerdo-conejo de Julseth y Dudley (1973), el medio de -- Boothby (1979) en el que se incorpora la prueba de coagulasa y ter-- monucleasa y el agar Baird-Parker plasma de cerdo de Idziak y -- Mossel (1980).

No se ha logrado encontrar un sitio taxonómico para este -- tipo de cepas. Smith y Farkas, citados por Gramoli y Wilkinson --

(1978), publicaron que las cepas atípicas participaban características de estafilococos coagulasa (+) y coagulasa (-); formaban así, un continuo espectro entre los dos extremos de S. aureus y S. epidermidis y quedaban como un organismo intermedio.

Como se ven en el diagrama No. 3, pág. 66 , la habilidad de producción de termonucleasa se relaciona bien con S. aureus. Sin embargo, esta prueba no ha sido oficializada. Esto ya había sido comprobado por Amador (1982) quien encontró una relación de un - - 51.6% entre las pruebas coagulasa y termonucleasa.

En este trabajo, con un  $\alpha$  de 0.05, se encontró una relación de un 56.5% entre las dos pruebas.

Estos resultados son bajos comparados con la correlación que encontraron Lachica (1969) y Reyes (1981), la cual fué de más del 90% entre las dos pruebas cabe mencionar que dichos estudios fueron hechos en productos lácteos.

La prueba de termonucleasa ha mostrado que se relaciona mejor con S. aureus que la prueba de coagulasa; esto es de suma importancia, pues todavía algunas industrias procesadoras y algunos laboratorios se basan solamente en la prueba de coagulasa para - - identificar S. aureus contaminante de alimentos. Por otro lado - se han recomendado una serie de pruebas para la identificación de S. aureus atípico que incluyen la termonucleasa. Lotter y - - - Genigeorgis (1975) aconsejaron el uso de las pruebas de la termo-

nucleasa, la coagulasa, la fermentación de manitol y la sensibilidad a la lisostafina. Evans y col. (1983) sugirieron el empleo de tan sólo 3 pruebas diagnósticas: la coagulasa, la termonucleasa y la fermentación de manitol. Recientemente ha habido dificultades para diferenciar S. aureus coagulasa (+) de S. intermedius coagulasa (+), por lo que Rous y Love (1983) recomendaron las siguientes pruebas: producción de acetofina, utilización de maltosa y determinación de actividad de hialuronidasa.

En este estudio, por la constante positividad que producen en cepas atípicas, se aconsejan las pruebas de la termonucleasa, la fermentación de manitol, la lecitinasa y la coagulasa.

Se ha visto (Gramoli y col. 1978) que otras cepas de origen epidérmico humano como son el S. xylosus, S. simulans, S. capitis y S. sciuri, de los cuales los tres últimos utilizaron el manitol anaeróbicamente, produjeron termonucleasa estable al calor con reacciones débiles creando halos de 1-3 mm de diámetro. Sin embargo, no se sabe si dan este resultado en forma típica o son casos raros y no bien documentados. En el presente trabajo se encontraron 13 cepas termonucleasa (+) débiles, de las cuales 9 eran coagulasa (-) y 4 coagulasa (+).

En la tabla No. 8, pág. 67, se enumeran 5 tipos de colonias que produjeron transparencia del medio de Baird-Parker, es decir, que son actividad de lecitinasa (+) y 5 tipos que son lecitinasa (-), las cuales se encontraron que crecen en forma atípica sobre -

el medio de Barid-Parker.

La morfología celular fué típica para todos los tipos coloniales. Sin embargo, la morfología colonial se presentó en forma atípica en diversos grados, en cada tipo colonial:

CARACTERISTICAS MAS FRECUENTES DENTRO DE LOS GRUPOS

CARACTERISTICA	LECTINASA (+)	LECTINASA (-)
Dimensión.	1-2 mm	1-2 mm
Forma.	no redonda	redonda
Elevación de la superficie.	convexa	poco convexa
Bordes.	no enteros	enteros
Superficie colonial.	lisa	lisa
Características ópticas.	poco brillosas	poco brillosas
Consistencia.	viscosa	viscosa
Pigmento.	no negras	no negras.

Todas estas alteraciones en los S. aureus pueden ser consecuencia de una información genética incorrecta causada por algún cambio a nivel de DNA extracromosomal, de manera que, cuando surge división celular, estas características persisten. Esta suposición concuerda con la hipótesis sugerida por Muth (citado por Minor y Marth 1971 a) quien dijo que los marcadores genéticos responsables de la producción de coagulasa y morfología colonial única -

se encuentran enlazados y son extracromosomales. Minor y Marth -- (1971 a) declararon que las mutantes que sufren alteración o pérdida en producción de toxina, también, pueden perder sus características parentales, como la habilidad a secretar coagulasa, desoxirribonucleasa, hemolisina y no ser tipificados por bacteriófagos y mencionaron el hallazgo de una sustancia dializable, resistente al calor y no afectada por enzimas proteolíticas que inhibe la producción de coagulasa, de desoxirribonucleasa y de producción de enterotoxina. Por otra parte, Lotter y Genigeorgis (1977), al estudiar variantes de S. aureus coagulasa (+) enterotoxigénicas obtenidas de cepas de S. aureus coagulasa (-) enterotoxigénicas, encontraron 2 tipos de colonias provenientes de una sola cepa; un tipo era coagulasa positivo y crecía mucho más rápido que sus parientes vecinales, que eran coagulasa negativo más pequeñas. Los autores supusieron que, dentro de la población coagulasa negativo, podrían existir unas pocas células coagulasa positivo, y que, de algún modo, por selección crecían mucho más rápido que sus vecinas coagulasa negativo.

El encuentro de las variaciones morfológicas mencionadas -- con anterioridad en este estudio concuerda con la investigación hecha en carnes por Stiles y col. (1981). Ellos hallaron sobre el medio de Baird-Parker, S. aureus que tenían color gris oscuro a -- gris negrusco, y no negras brillantes como se describen generalmente (Baird-Parker 1962y ICMSF 1978). También encontraron colonias con características típicas que no produjeron transparencia sobre el medio y que fueron identificadas como S. aureus. Este tipo de colonias fue designado como del tipo II por la ICMSF (1978). Stiles

y col. (1981) notaron que, en su trabajo, esta clase de colonias - - tampoco eran negras. Otros tipos de colonias descubiertas por los anteriores autores son gris-oscuro, brillantes y con borde blanco, con halo y sin halo transparente, coagulasa (-), y otras, gris brillante con las mismas características; no resultaron ser todas - - S. aureus, cuando se confirmaron con la prueba de termonucleasa.

La falta de manifestación parcial o total, sobre el medio - de Baird-Parker, de los dos principales marcadores diagnósticos como son la transparencia de la yema de huevo y la reducción de telurito, estuvo presente en este estudio. Se ha reportado (De Waart y col. 1968, Devoyod 1976, Devriese 1981) que cepas de S. aureus, de procedencia alimentaria, no producen transparencia de la yema de -- huevo, tal vez por la inhibición de la enzima estafilococal lipopro<sub>teica</sub> (lecitinasa).

Esto influye notablemente en los germenos alterados por - - procesos que pierden su tolerancia a la sal, mencionados anterior-- mente, puesto que Baird-Parker (1962) dijo que la opacidad del me-- dio que tiene yema de huevo depende principalmente del contenido de sal del mismo; por lo que la transparencia, se debe, presumiblemen-- te, a la solubilización de la lecitoproteína del huevo, que se di-- suelve por la adición de sal.

Se enfatiza la importancia de estas reacciones diagnósticas puesto que Devriese (1981), al trabajar con muestras de origen ani-- mal, observó que esos dos marcadores no funcionaban satisfactoria--

mente por lo cual no se podía diferenciar completamente S. aureus - de otras colonias contaminantes y, muy frecuentemente, encontró - - S. aureus lecitinasa negativo en muestras procedentes de carne bovina. Por otra parte, si recordamos que Stiles y Clark (1974) y - - Hurst (1977) hicieron mención de que una de las características de los microorganismos alterados por calor es la pérdida de resisten-- cia a agentes selectivos, posiblemente es natural que, en los ali-- mentos procesados, estos microorganismos se vuelvan sensibles y - - pierdan su expresividad en el medio de aislamiento.

Por las razones anteriores, se han propuesto versiones modi ficadas de medios selectivos que, en lugar de la "reacción yema de huevo", utilizan el plasma o fibrinógeno como marcador selectivo. Así, por ejemplo, se usan el medio plasma de cerdo-conejo de Julseth y Dudley (1973) -mencionado anteriormente- el medio a base de plas- ma de cerdo de Devoyod (1976), el medio de Stadhouders (1977) y el agar plasma de cerdo de Hauschild y col. (1979).

En la tabla No. 9, pág. 68, se observan los resultados posi tivos de 2 pruebas bioquímicas ya analizadas anteriormente que, jun to con una tercera prueba (actividad de lecitinasa) se comparan las variaciones que estas determinaciones tienen con respecto a los di- ferentes tipos coloniales encontrados.

El tipo colonial I fué el que aportó más cepas positivas a estas 3 pruebas; después, en menor frecuencia, el tipo colonial III. Además en esta tabla, se puede distinguir claramente que la prueba

que más resultados positivos dio fué la de termonucleasa; luego, - la de lecitinasa y por último, la de coagulasa (esto es afirmado con un nivel de significancia del 0.05 (Hayslett 1980).

Los tipos coloniales que mostraron menos resultados positivos a estas determinaciones fueron el II, IV y V.

En el diagrama No. 4, pág. 69, se distingue que las cepas - lecitinasa (+) fueron las que, en un 68.6%, predominaron sobre las cepas lecitinasa (-) (31.4%); dentro de las primeras se encontró un 42.8% de cepas coagulasa (+), un 25.7% de cepas coagulasa (-) y casi la totalidad (67.1%) de cepas termonucleasa (+).

Como se puede notar de los resultados anteriores, la mayo-- ría de las cepas, independientemente del tipo colonial, tienden a apegarse más a las características típicas de S. aureus. Stiles y col. (1981) descubrieron, en su estudio en carnes crudas y procesadas, que, dentro del 15.1% de cepas lecitinasa negativas, el 4% - - (que comprendía 8 cepas coagulasa 3+ y 3 cepas coagulasa 2+) fué - S. aureus; esto se confirmó con la prueba de termonucleasa. El resto, 11.1% fue coagulasa negativo que no fué positivo a la termo-- nucleasa; Stiles y col. pensaron que se trataba de otros estafilo-- cocos y micrococos.

Es importante hacer notar que el trabajo anterior incluía - carnes crudas que no sufren ningún tipo de proceso alimentario.

En la tabla No. 10, pág. 70 se observan los diferentes tipos coloniales aportados por las distintas clases de productos --- analizados en función de la prueba de lecitinasa; en esta prueba, --- los productos que más cepas atípicas aportaron, tanto del grupo --- lecitinasa positivo como del negativo, fueron el chorizo y la longaniza. Los tipos coloniales más frecuentes dentro de el grupo --- lecitinasa positivo fueron el I y el III.

En la tabla No. 11 pág. 71, se advierte lo mismo que en la tabla anterior, pero ahora en función de la prueba de coagulasa. De igual forma, los productos que más cepas atípicas aportaron, --- tanto del grupo coagulasa positivo como negativo, fueron el chorizo y la longaniza. El tipo colonial más frecuente fué el I, en cada uno de los dos grupos de coagulasas.

Por último, en la tabla No. 12, pág. 72, se ven los distintos tipos coloniales proporcionados por las diferentes clases de --- producto, en función de la prueba de termonucleasa; como en los --- casos anteriores, el chorizo y la longaniza, fueron los productos que más cepas termonucleasa positivas suministraron. Los tipos --- coloniales más frecuentes dentro del grupo de termonucleasa positivos fueron el I, III y IV.

Resumiendo las tres tablas anteriores, se distingue clara--- mente que el tipo colonial I fué el contaminante más frecuente en los diferentes tipos de productos analizados, y que la longaniza y el chorizo fueron los productos principales en los que se aisló --- este tipo colonial.

Stiles y col. (1981) también encontraron en carnes, que el tipo colonial más frecuente era de la clase lecitinasa positivo, - coagulasa positivo y termonucleasa positivo.

Al ver la frecuencia con que estas cepas aparecían en los alimentos, se les probó su enterotoxigenicidad para detectar el -- riesgo que pueden presentar en el consumo humano. Con este fin, se probaron sólo 47 cepas atípicas, del total de 70 aisladas, debido a la escasez de enterotoxinas tipo.

En la tabla No. 13, pág. 73, se ven los tipos coloniales - atípicos enterotoxigénicos procedentes de los diferentes productos analizados en función de la prueba de lecitinasa. Los productos que mas cepas enterotoxigénicas aportaron dentro de los 2 grupos de lecitinasas fueron el queso de puerco y el chorizo, y los tipos coloniales que más cepas enterotoxigénicas presentaron fueron del - - grupo de las lecitinasas positivas (tipos I y III).

En la tabla No. 14, pág. 74 , se observa lo mismo que en la tabla anterior; sólo que ahora se presentan en función de la prueba de coagulasa. También aquí los productos que más cepas enterotoxigénicas aportaron fueron el queso de puerco y el chorizo, pero - -- ahora, se encontraron principalmente dentro del grupo de las coagu-lasas negativas. El tipo colonial más frecuente en el grupo de -- las coagulasa positivas fué el tipo I y, dentro del grupo de las - coagulasa negativas, fué el IV.

En la tabla No. 15, pág. 75, se representan otra vez los -

diferentes tipos coloniales enterotoxigénicos procedentes de los -- distintos productos cárnicos, en función de la prueba de termonu--- cleasa. También el queso de puerco y el chorizo fueron los productos que más cepas enterotoxigénicas aportaron, y los tipos coloniales más frecuentes, dentro de el grupo termonucleasa positivo, fueron el I, III y IV. No hubo ningún tipo termonucleasa negativo -- enterotoxigénico.

En las tablas anteriores, se puede observar que el tipo colonial I no sólo fué la más frecuente clase atípica que se encontró creciendo sobre el medio de Baird-Parker sino que fué el que más se apegó a las características típicas de S. aureus y, lo más importante, es que fué el más enterotoxigénico. El tipo colonial III le siguió en importancia por el número de productos en los que estuvo presente y por su frecuencia en enterotoxigenicidad. Los demás -- tipos coloniales se presentaron en una proporción escasa en los productos estudiados y algunos fueron enterotoxigénicos.

La presencia de lípidos puede ser una de las posibles cau-- sas de que productos tales como queso de puerco, chorizo y longaniza hayan estado más contaminados que otros productos; ya que los -- lípidos ejercen un efecto protector para los microorganismos contra actividades antimicrobianas (Davidson 1981).

En la tabla No. 16, pág.76, se aprecia que, de las 47 cepas probadas para enterotoxigenicidad, 12 (25.5%) resultaron ser enterotoxigénicas. El diagrama No. 5, pág. 77, engloba lo anterior y muestra que todas las cepas enterotoxigénicas fueron termonucleasa - -

positivas, el 66.6% de las cepas fueron lecitinasa positivas y sólo el 50% de las cepas fueron coagulasa positivas. Esto, en lo que se refiere a la termonucleasa, concuerda con la relación encontrada por Lachica (1969) quien reporta un 95% de correspondencia entre la enterotoxigenicidad y la prueba de termonucleasa. Sin embargo, la relación encontrada por el autor, respecto a la prueba de coagulasa y enterotoxigenicidad, no concuerda con el presente estudio en colonias atípicas debido al origen alimentario y tipo de cepas estudiadas, pues el autor encontró un 93% de relación entre sus cepas típicas coagulasa positivas de origen lácteo y la enterotoxigenicidad.

Por otro lado, los reportes existentes, ya mencionados en este estudio, sobre cepas lecitinasas positivas y negativas no mencionan nada en cuanto a su enterotoxigenicidad.

En la tabla No. 17, pág.78, se resumen los tipos coloniales enterotoxigénicos y se hace énfasis en que el tipo I es el más peligroso, puesto que produjo 3 cepas coagulasa positivo-lecitinasa positivo originando las enterotoxinas A, B y D, y una coagulasa negativo-lecitinasa positivo con enterotoxina D.

El tipo colonial III presentó 2 cepas coagulasa positivo lecitinasa positivo con las enterotoxinas B y D y una coagulasa negativo-lecitinasa positivo produciendo la enterotoxina A.

El tipo colonial II originó una cepa coagulasa negativo-lecitinasa positivo con enterotoxina D.

El tipo colonial IV dió lugar a una cepa coagulasa negativo -lecitinasa positivo y 2 cepas coagulasa negativo-lecitinasa negativo productoras de enterotoxina D.

El tipo colonial V presentó una cepa coagulasa positivo- - - - -lecitinasa negativo excretora de enterotoxina D.

En esta tabla también se observa que el tipo de enterotoxina más frecuentemente encontrado fué el D (66.6%), la cual es de -- origen animal (Casman y Bennett 1967); esto va de acuerdo con los - resultados de Raska y Harvey (datos no publicados, citados por Evans 1983). Ellos, en un trabajo con cepas atípicas de S. aureus procedentes de pollo, encontraron que el 49.4% producía enterotoxina D. Este resultado es apoyado por Amador (1982), quien encontró que la enterotoxina C -que también es de origen animal (Casman y Bennett - 1967)- tenía una frecuencia de aparición de 50% en cepas típicas de S. aureus.

En este estudio no se hallaron cepas productoras de 2 tipos serológicos de enterotoxina. Sin embargo, Amador (1982) encontró el 31% de este tipo de cepas y un 4.8% de cepas que produjeron 3 - tipos serológicos. En el presente estudio sólo una cepa originó - esta característica y no se encontraron cepas que ocasionaran 4 ó más tipos serológicos de toxina.

TABLA No. 5

FRECUENCIA DE S. aureus ATIPICO AISLADOS DE PRODUCTOS CARNICOS

TIPO DE MUESTRA	No. DE MUESTRAS ANALIZADAS	No. DE MUESTRAS POSITIVAS	% DE MUESTRAS POSITIVAS
JAMON COCIDO	75	9	12.0
SALCHICHAS	45	1	2.2
QUESO DE PUERCO	25	4	16.0
CHORIZO	19	7	36.8
LONGANIZA	12	5	41.6
FIAMBRE DE CERDO	10	0	0.0
SALAMI	8	1	12.5
PATHE	6	0	0.0
OTROS	33	6	18.1
TOTAL	233	33	14.1

OTROS: TOCINO, PASTELES DE CARNE, GALANTINA  
MORCILLA, SALCHICHON, MORTADELA

# GRAFICA No 1

## FRECUENCIA DE S. AUREUS ATIPICO EN PRODUCTOS CARNICOS

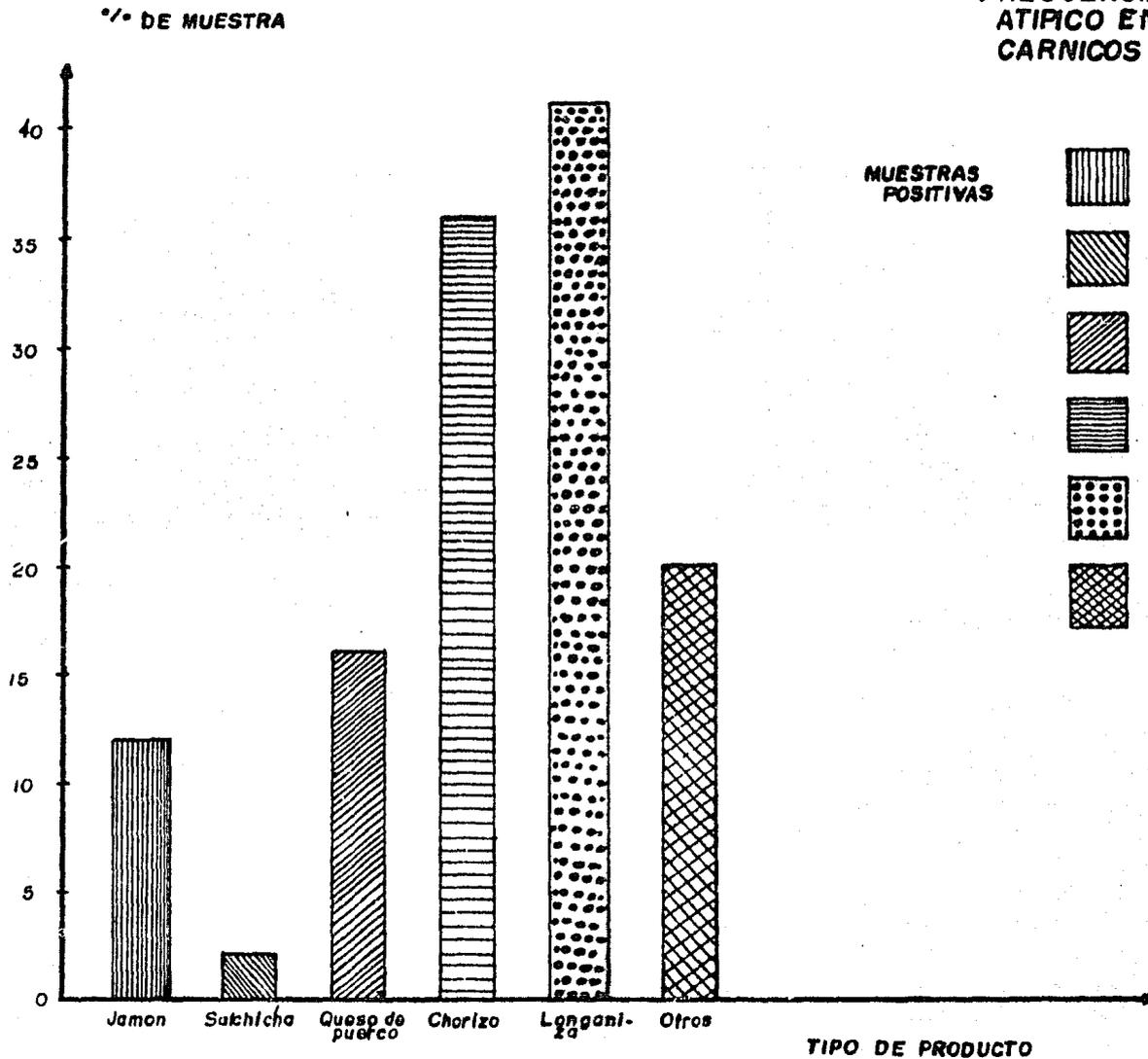


TABLA No. 6

CUENTA DE Staphylococcus aureus ATIPICO EN PRODUCTOS CARNICOS

COLONIAS / g	MARCA DE CLASE ( $x = \frac{x_2 - x_1}{2}$ )	No. DE MUESTRAS	%	FRECUENCIA RELATI- VA ( $f_1 = \frac{x_1}{N}$ )
1 _____ 100	50.5	5	15.1	0.1515
101 _____ 1000	550.5	5	15.1	0.1515
1001 _____ 10000	5500.5	17	51.5	0.5151
10001 _____ 100000	55000.5	5	15.1	0.1515
> 100,000	> 550000.5	1	3.03	0.0303
TOTAL		33		

# GRAFICA No2

**CUENTA DE S. AUREUS  
ATIPICOS EN PRODUC-  
TOS CARNICOS**

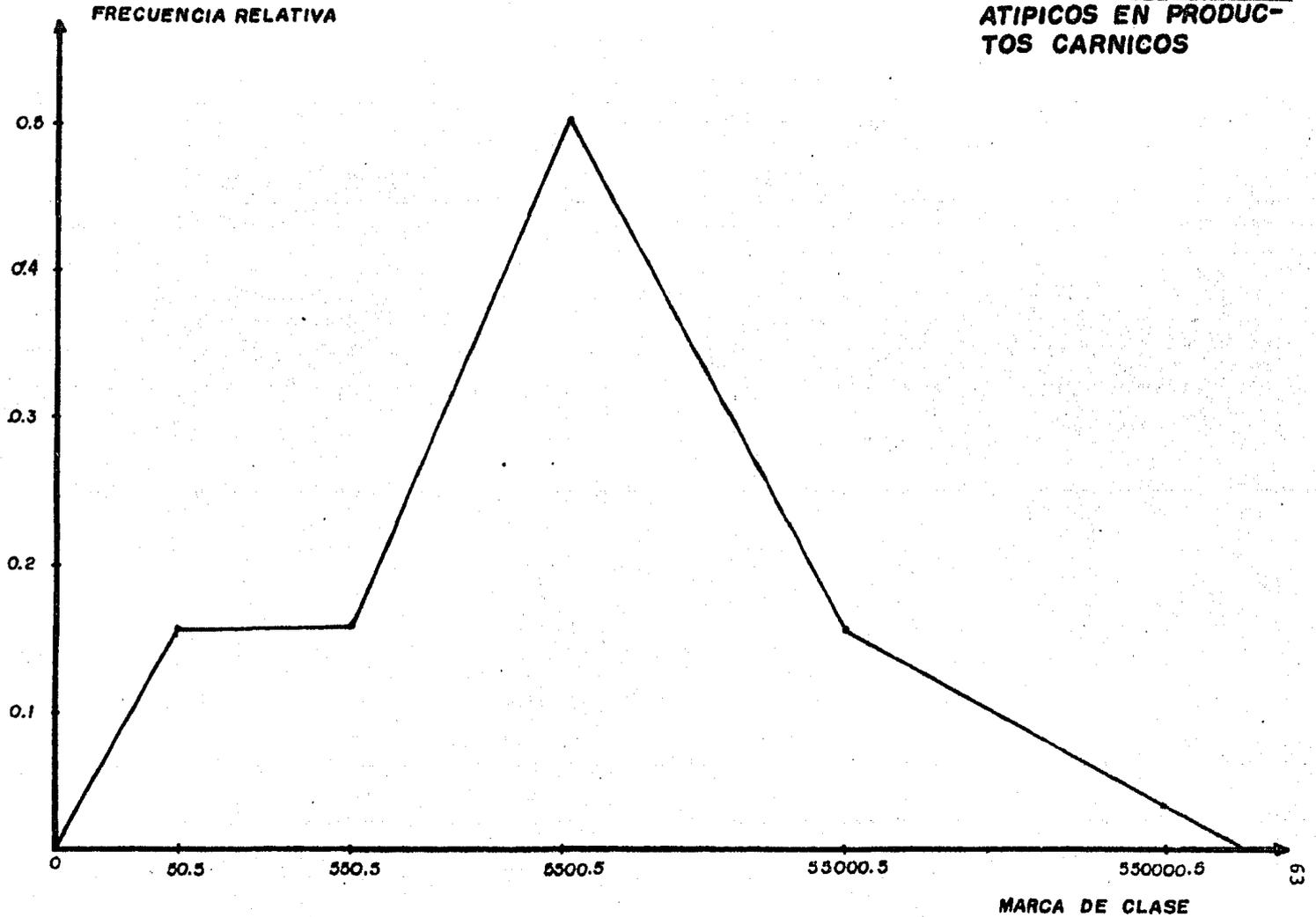


TABLA No. 7

COMPARACION DE LAS CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

PRUEBAS BIOQUIMICAS

FERMENTACION DE AZUCARES

	PRODUCCION DE PIGMENTO	CATALASA POSITIVO	MANITOL				GLUCOSA			
			AEROBIO		ANAEROBIO		AEROBIO		ANAEROBIO	
			+	-	+	-	+	-	+	-
PIGMENTO AMARILLO (55.7%)	39		38	0	36	4			*38	0
CEPAS ATIPICAS		70							70	
PIGMENTO BLANCO (44.2%)	31		31	1	*22	8			*31	1
TOTAL	70		70		70				70	

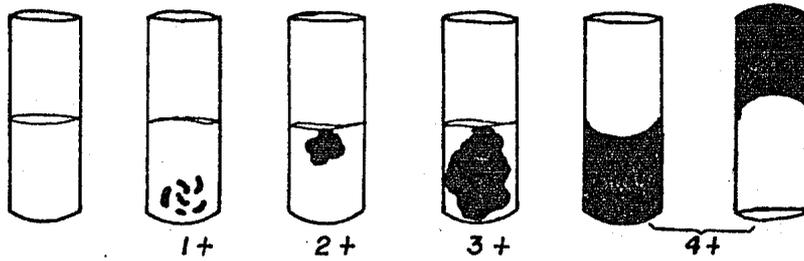
\*INVOLUCRA DOS CEPAS DUDOSAS (VIRE CON ROJO DE FENOL A NARANJA).

$$X^2 = 0.814$$

$$0.05$$

**INTERPRETACION DE  
LA PRUEBA DE  
COAGULASA**

**TIPOS DE LECTURA EN LA PRUEBA COAGULASA**



**NO EVIDENCIA DE FORMACION DE FIBRINA**

**1+ : PEQUEÑOS COAGULOS NO ORGANIZADOS**

**2+ : PEQUEÑOS COAGULOS ORGANIZADOS**

**3+ : GRANDES COAGULOS ORGANIZADOS**

**4+ : COAGULACION COMPLETA, AL INVERTIRSE, NO  
SE MUEVE DE SU LUGAR**

# DIAGRAMA No 3

## RELACION ENTRE LAS PRUEBAS COAGULASA Y TERMONUCLEASA DE LAS CEPAS ATIPICAS DE Staphylococcus aureus

TOTAL DE CEPAS SELECCIONADAS

CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

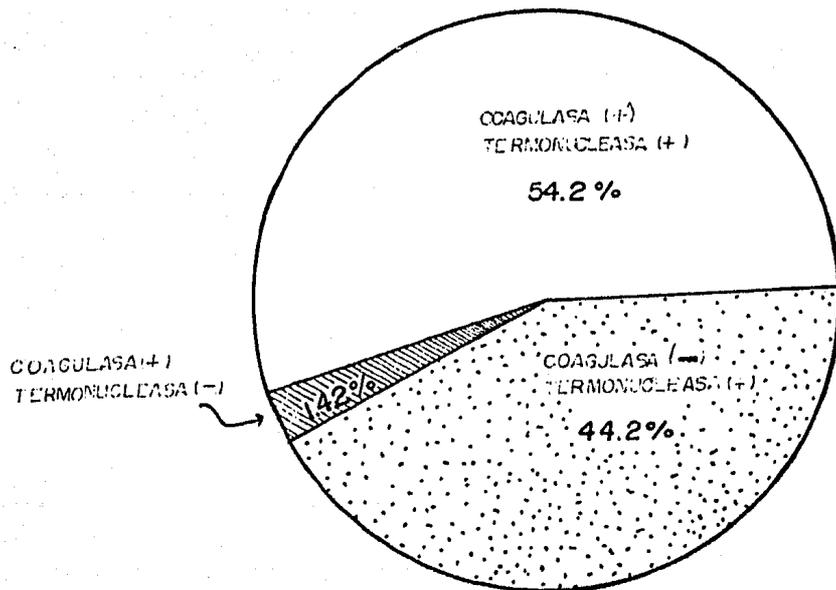
COAGULASA (+) COAGULASA (-) COAGULASA (+)  
 TERMONUCLEASA (+) TERMONUCLEASA (+) TERMONUCLEASA (-)

70  
% 100

38  
54.2

31  
44.2

1  
1.42



## MORFOLOGIA COLONIAL ATIPICA SOBRE EL MEDIO DE BAIRD-PARKER

## MORFOLOGIA COLONIAL

TIPOS DE COLONIAS	DIMENSIONES (mm)	FORMA	ELEVACION DE SUPERFICIE	BORDES	SUPERFICIE COLONIAL	CARACTERISTICAS OPTICAS	CONSISTENCIA	PIGMENTO
I <sub>A</sub>	1.0	Filamentosas	Pulvinada	Erosas	Lisa	Poco brillante	Viscosa	Negra
II <sub>A</sub>	1.5	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Lisa	Brillante	Viscosa	Gris-oscuro
III <sub>A</sub>	1.0	Poco filamentosa	Poco convexa	Erosas	Lisa	Poco brillante	Viscosa	Café-oscuro
IV <sub>A</sub>	1.5	Poco irregular	Embonada	Enteros	Rugosa	Mate	Viscosa	Gris-oscuro
V <sub>A</sub>	2.0	Redonda	Poco convexa	Enteros	Lisa	Poco brillante	Viscosa	Café-oscuro
I <sub>B</sub>	1.0	Redonda	Poco convexa	Enteros	Rugosa	Opaca	Viscosa	Gris-oscuro
II <sub>B</sub>	2.0	Redonda	Poco convexa	Enteros	Lisa	Poco brillante	Viscosa	Café-oscuro
III <sub>B</sub>	1.0	Redonda	Poco convexa	Enteros	Lisa	Brillante	Viscosa	Café-oscuro
IV <sub>B</sub>	2.0	Redonda	Embonada	Enteros	Poco rugosa	Opaca	Viscosa	Gris-oscuro
V <sub>B</sub>	2.0	Redonda	Poco convexa	Enteros	Lisa	Poco brillante	Viscosa	Café-oscuro.

A: COLONIAS CON HALO TRANSPARENTE  
 B: COLONIAS SIN HALO TRANSPARENTE.

TABLA No. 9

RELACION ENTRE TIPO COLONIAL Y PRUEBAS BIOQUIMICAS POSITIVAS A ACTIVIDAD DE -  
LECITINASA

## L E C I T I N A S A ( + )

TIPO COLONIAL	LECITINASA (+)	PRUEBAS BIOQUIMICAS COAGULASA (+)	TERMONUCLEASA (+)
I	26	17	29
II	3	3	10
III	11	5	14
IV	5	3	8
V	3	2	9
TOTAL	48	30	69
%	68.6	42.8	98.5

 $F_{0.05} = 26.2 (r)$ 
 $F_{0.05} = 8.6 (c)$



TABLA No. 10

NUMERO DE CEPAS Y TIPOS DE COLONIAS ATIPICAS DE Staphylococcus aureus SEGUN EL TIPO DE PRODUCTO EN FUNCION DE LA PRUEBA DE LECITINASA

PRODUCTO	No. DE MUESTRAS+	No. DE CEPAS SELECCIONADAS	ACTIVIDAD DE LECITINASA + ( HALO TRANSPARENTE )						ACTIVIDAD DE LECITINASA - ( SIN HALO )					
			TIPOS						COLONIALES					
			I	II	III	IV	V	TOTAL	I	II	III	IV	V	TOTAL
JAMON	9	12	3	-	2	1	1	7	1	1	-	2	1	5
QUESO DE PUERCO	4	12	4	-	1	1	1	7	-	2	-	2	1	5
CHORIZO	7	21	6	1	4	2	1	14	-	2	1	3	1	7
LONGANIZA	5	12	7	2	-	-	1	10	-	1	-	-	1	2
TOCINO	2	5	4	-	1	-	-	5	-	-	-	-	-	0
OTROS	6	8	1	-	3	1	-	5	2	-	-	1	-	3
TOTAL	33	70	25	3	11	5	4	48	3	6	1	8	4	22

\*OTROS: SALCHICHA, SALAMI, GALANTINA  
ENTRECOT, CAMARON

TABLA No. 11

NUMERO DE CEPAS Y TIPOS DE COLONIAS ATIPICAS DE Staphylococcus aureus SEGUN EL TIPO DE PRODUCTO EN FUNCION DE LA PRUEBA DE COAGULASA

PRODUCTO	No. DE CEPAS SELECCIONADAS	COAGULASA +					TOTAL	COAGULASA -					TOTAL
		I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V	
JAMON	12	3	-	-	2	1	6	1	1	2	1	1	6
QUESO DE PUERCO	12	2	-	-	1	1	4	2	2	1	2	1	8
CHORIZO	21	5	2	2	2	2	13	1	1	3	3	-	8
LONGANIZA	12	2	3	-	-	2	7	5	-	-	-	-	5
TOCINO	5	4	-	1	-	-	5	-	-	-	-	-	0
* OTROS	8	1	-	2	1	-	4	2	-	1	1	-	4
TOTAL	70	17	5	5	6	6	39	11	4	7	7	2	31

\* OTROS: PASTELES DE CARNE, GALANTINA, MORCILLA, SALCHICHON, MORTADELA

TABLA No. 12

NUMERO DE CEPAS Y TIPOS DE COLONIAS ATIPICAS DE Staphylococcus aureus SEGUN EL TIPO DE PRODUCTO EN FUNCION DE LA PRUEBA DE TERMONUCLEASA

PRODUCTO	No. DE CEPAS SELECCIONADAS	TERMONUCLEASA +						TERMONUCLEASA -					
		I	II	III	IV	V	TOTAL	I	II	III	IV	V	TOTAL
JAMON	12	3	1	2	3	2	11	1	-	-	-	-	1
QUESO DE PUERCO	12	4	2	1	3	2	12	-	-	-	-	-	0
CHORIZO	21	6	3	5	5	2	21	-	-	-	-	-	0
LONGANIZA	12	7	3	-	-	2	12	-	-	-	-	-	0
TOCINO	5	4	-	1	-	-	5	-	-	-	-	-	0
OTROS	8	3	-	3	2	-	8	-	-	-	-	-	0
TOTAL	70	27	9	12	13	8	69	1	-	-	-	-	1

OTROS: PASTELES DE CARNE, GALANTINA, MORCILLA, SALCHICHON, MORTADELA

TABLA No. 13

NUMERO DE CEPAS Y TIPOS DE COLONIAS ATIPICAS ENTEROTOXIGENICAS DE Staphylococcus aureus SEGUN EL TIPO DE PRODUCTO EN FUNCION DE LA PRUEBA DE LECITINASA

PRODUCTO	No. DE CEPAS	CEPAS ENTERO- TUXIGENICAS	LECITINASAS +						LECITINASAS -					
			ENTEROTOXIGENICAS						ENTEROTOXIGENICAS					
			I	II	III	IV	V	TOTAL	I	II	III	IV	V	TOTAL
QUESO DE PUERCO	10	4	1	-	-	1	-	2	-	1	-	1	-	2
CHORIZO	14	4	-	-	2	-	-	2	-	-	-	1	1	2
LONGANIZA	9	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0
JAMON	5	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0
• OTROS	9	2	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	0
TOTAL	47	12						8						4

• OTROS: TOCINO, CAMARON, ENTRECOT,  
GALANTINA, SALCHICHA

TABLA No. 14

NUMERO DE CEPAS Y TIPOS DE COLONIAS ATIPICAS ENTEROTOXIGENICAS DE Staphylococcus aureus SEGUN EL TIPO -  
DE PRODUCTO EN FUNCION DE LA PRUEBA DE COAGULASA

PRODUCTO	No. DE CEPAS	CEPAS ENTERO- TOXIGENICAS	COAGULASA +					TOTAL	COAGULASA -					TOTAL
			I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V	
QUESO DE PUERCO	10	4	1	-	-	-	-	1	-	1	-	2	-	3
CHORIZO	14	4	-	-	1	-	1	2	-	-	1	1	-	2
LONGANIZA	9	1	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	1
JAMON	5	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0
OTROS	9	2	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	0
TOTAL	47	12						6						6

\*OTROS : TOCINO, CAMARON, ENTRECOT, GALANTI -  
NO, SALCHICHA

TABLA No. 15

NUMERO DE CEPAS Y TIPOS DE COLONIAS ATIPICAS ENTEROTOXIGENICAS DE Staphylococcus aureus SEGUN EL TIPO DE PRODUCTO EN FUNCION DE LA PRUEBA DE TERMONUCLEASA

PRODUCTO	No. DE CEPAS	CEPAS ENTERO- TOXIGENICAS	TERMONUCLEASA +						TERMONUCLEASA -					
			I	II	III	IV	V	TOTAL	I	II	III	IV	V	TOTAL
QUESO DE PUERCO	10	4	1	1	-	2	-	4	-	-	-	-	-	0
CHORIZO	14	4	-	-	2	1	1	4	-	-	-	-	-	0
LONGANIZA	9	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0
JAMON	5	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0
OTROS	9	2	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	0
TOTAL	47	12						12						0

\*OTROS : TOCINO, CAMARON, ENTRECOT, GALANTINO  
SALCHICHA

TABLA No. 16

RELACION ENTRE LAS PRUEBAS DE COAGULASA, TERMONUCLEASA, LECITINASA Y LA ENTEROTOXIGENICIDAD EN CEPAS ATIPICAS DE Staphylococcus aureus.

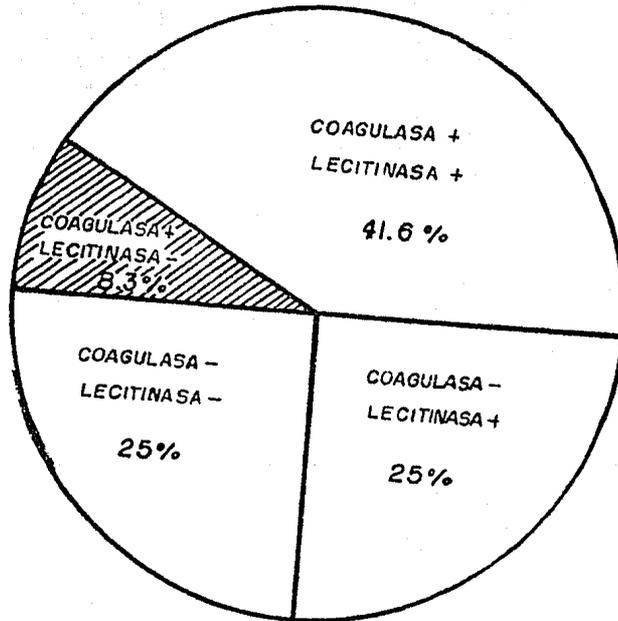
C E P A S T O X I G E N I C A S

	No. DE CEPAS TOXIGENICAS	TERMONUCLEASA +	COAGULASA + LECITINASA+	COAGULASA + LECITINASA-	COAGULASA - LECITINASA+	COAGULASA - LECITINASA-
No. DE CEPAS TOXIGENICAS	12	12	5	1	3	3
%	25.5	100	41.6	8.3	25.0	25.0

$$\chi^2_{0.05} = 56.17$$

DIAGRAMA No 5

RELACION ENTRE LAS PRUEBAS DE COAGULASA, TERMONUCLEASA, LECITINASA Y LA ENTERO TOXIGENICIDAD EN CEPAS ATIPICAS DE Staphylococcus aureus



TERMONUCLEASA POSITIVOS

TABLA No. 17

TIPOS SEROLOGICOS DE ENTEROTOXINAS Y NUMERO DE CEPAS ATIPICAS ENTEROTOXIGENICAS ENCONTRADAS

TIPO INMUNOLOGICO DE ENTEROTOXINA	LECITINASA +					TOTAL	LECITINASA -					TOTAL
	I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V	
A	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	0
B	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	0
C	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0
D	2	-	1	1	-	4	-	1	-	2	1	4
E	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0
F	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0
*ABD	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0
TOTAL						8						4

\* ABD: UNA CEPA PRODUJO 3 TIPOS SEROLOGICOS DE ENTEROTOXINAS

## 5. CONCLUSIONES

- 1- Se conocieron 10 tipos de variantes coloniales de Staphylococcus aureus que se pueden presentar sobre el medio de Baird-Parker.
- 2- La pigmentación de las cepas no tiene relación con la utilización de azúcares en la identificación de S. aureus atípico (afirmado con un  $\alpha 0.05$ ).

El tipo colonial atípico más semejante a S. aureus típico produjo con mayor frecuencia las pruebas de termonucleasa y lecitinasa; y con menor frecuencia la prueba de coagulasa. La relación entre la enterotoxigenicidad y las determinaciones de lecitinasa y termonucleasa fué mayor que la encontrada para la prueba de coagulasa (afirmado con un  $\alpha 0.05$ ).

- 3- La frecuencia de cepas atípicas de Staphylococcus aureus en productos cárnicos fué de un 1.4%.

El tipo colonial hallado más a menudo fué el más semejante a S. aureus típico y el que más cepas enterotoxigénicas produjo.

- 4- Es posible que el medio de aislamiento pueda dar origen a colonias atípicas, debido a una desestabilización del mismo, por someterlo a largos períodos de almacenamiento una vez que el medio ha sido preparado debido a la presencia de piruvato de sodio que es poco estable.

- 5- De 70 cepas atípicas aisladas de Staphylococcus aureus a 47 de ellas se les probó su enterotoxigenicidad, y resultó que en un 25.5% eran enterotoxigénicas; el tipo inmunológico más comúnmente encontrado fué el D, lo que implica contaminación de origen animal.
- 6- Los productos madurados representan una amenaza pública por su alta frecuencia en aportación de cepas tanto típicas como atípicas de Staphylococcus aureus que en un momento determinado pueden proliferar en gran cantidad y producir la enterotoxina responsable de intoxicación alimentaria.

## 6. RESUMEN

Desde 1953 se habla de variantes de S. aureus que no producen la prueba de coagulasa. En los E.U.A. es donde existe mayor información sobre estas variantes, ya que en 1967 Bergdoll induce la producción de enterotoxina estafilococal de variantes coagulasa negativas. Aún así, los casos en los que cepas atípicas han causado intoxicación alimentaria, rara vez se han publicado mundialmente.

En México, existe escasa información en cuanto a la frecuencia con que suceden las intoxicaciones que involucran cepas típicas; y menos noticias hay respecto a la existencia de variantes, ya sea de tipo bioquímico o morfológico de cepas típicas, que en este estudio se denominan "atípicas", presentes en los alimentos; tampoco se sabe nada acerca de su posible detección en el medio para su enumeración y del riesgo que representen para el consumo humano.

En 1982, se hizo un estudio, en el Laboratorio Nacional de Salud Pública, en productos cárnicos con cepas de S. aureus típicas. Más del 50% de las cepas aisladas resultaron ser atípicas de tipo bioquímico en el medio de Baird-Parker; la identificación del S. aureus típico se basó en dos pruebas bioquímicas confirmativas: -- coagulasa y termónucleasa.

Debido a lo anterior, se hizo un estudio directo sobre estas colonias atípicas con el fin de conocer las variaciones en morfología colonial o de tipo bioquímico, en cuanto a las pruebas: coagula

sa y termonucleasa, que puede presentar este germen; también, para detectar su frecuencia y enterotoxigenicidad en productos cárnicos.

Para lograr los objetivos anteriores, se asilaron cepas de S. aureus atípico que creció en el medio de Baird-Parker a partir de productos cárnicos. Se consideraron como colonias atípicas a aquellas que no resultaron positivas para alguna de las dos pruebas confirmativas principales: la coagulasa y la termonucleasa, o que no produjeron alguna de las características de morfología colonial que presentan generalmente las colonias típicas. Posteriormente se reconfirmaron como S. aureus con algunas pruebas bioquímicas y se sometieron a la producción de enterotoxina por el método de celofán sobre agar. La identificación de las enterotoxinas producidas se hizo por el método de difusión en gel sobre microplaca.

Se analizaron 233 alimentos, y se obtuvieron 33 muestras con S. aureus atípico, lo que representa una frecuencia de un 14.1%. Las muestras que más cepas atípicas aportaron fueron en orden de creciente: chorizo, longaniza, queso de puerco y jamón. Se obtuvieron 70 cepas de S. aureus atípico, las cuales fueron clasificadas de acuerdo a la similitud de características coloniales y resultaron 5 tipos coloniales lecitinasa positivo o con halo transparente y 5 tipos lecitinasa negativo o sin halo transparente. El tipo colonial más semejante a S. aureus típico, produjo con mayor frecuencia las pruebas de termonucleasa y lecitinasa y con menor frecuencia la prueba de coagulasa.

Se encontró un 25.5% de cepas atípicas enterotoxigénicas, y el tipo de enterotoxina más frecuente fué el D.

Las cepas atípicas de S. aureus probablemente son provocadas por los procesos físicos o químicos que sufre el alimento y que ocasionan alteraciones de tipo genético ó por cambios en la estabilización del medio de Baird-Parker debidos a la presencia de piruvato de sodio que impide el almacenamiento del medio por largos períodos.

## B I B L I O G R A F I A

1. Agency Committee on Microbiological Methods for Foods. 1976. -  
Compendium of methods for the microbiological examination of -  
food, prepared by the APHA intersociety. Marvin L. Speack, edi-  
tor. p. 374.
2. Amador, L.P. 1982. Determinación de la enterotoxigenicidad de  
cepas de Staphylococcus aureus aisladas de productos cárnicos.  
Tesis Profesional E.N.C.B., I.P.N., México, D.F.
3. Bacteriology Training Branch. 1983. Laboratory methods in - - -  
special medical bacteriology. Course No. 8390-C techniques. - - -  
Laboratory improvement program office. U.S. Department of - - -  
health and human service. Public Health Service. Centers for - - -  
Disease Control. Atlanta, Georgia.
4. Baird-Parker, A.C. 1962. An improved diagnostic and selective -  
medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl.  
Bacteriol. 25: 12-19.
5. Baird-Parker, A.C. 1963. A classification of micrococci and - -  
staphylococci based on physiological and biochemical tests. J.  
Gen. Microbiol. 30: 409- 427.
6. Baird-Parker, A.C. 1974. Family I. Micrococcaceae. En: Bergey's  
manual of determinative bacteriology. 8a. Edición Editado por

R.E. Buchanan y N.E. Gibbns. Williams y Wilkins, Co. Baltimore.  
E.U.A. pp 478-489.

7. Baird-Parker, A.C. and Devenport, E. 1965. The efect of recove-  
ry medium on the isolation of Staphylococcus aureus after heat  
tratment and after the storage of frozen or cells. J. Appl. - -  
Bacteriol. 28: 390-402.
8. Banwart. G.J. 1979. Basic Food Microbiology. AVI Pub. C. Co. -  
Inc. West port, Connecticut. E.U.A. pp. 215-138.
9. Bayne, H.G. and Michener, H.D. 1975. Growth of staphylococcus -  
and salmonella on frankfurters with and without sodium nitrite.  
Appl. Microbiol. 30: 844-849.
10. Boothby, J. Genigeorgis, C. and Fanelli, M.J. 1979. Tandem - -  
coagulase/thermonuclease agar method for the detection of - -  
Staphylococcus aureus. Appl. Enviromental. Microbiol. 37: 298-302.
11. Bucker, R.E. and Martin, S.E. 1981. Superoxide dismutase activi  
ty in thermally stressed Staphylococcus aureus. Appl. Enviromen  
tal. Microbiol. 41: 4490454.
12. Casman. E.P., Bennett, W., Dorsey, E., Stone, E. 1967. Identifi  
cation of fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.J. -  
Bacteriol. 94: 1875-1882.

13. Casman, E.P., Bennett, W., Dorsey, E., and Stone, E. 1969. The -  
microslide gel double diffusion test for the detection and - --  
assay of staphylococcal enterotoxins. Health Lab. Sci. 6: 186-198.
14. Clausen, J. 1975. Técnicas immunoquímicas para la identificación  
y estimación de macromoléculas. Ed. El manual Moderno. S.A.
15. Collins-Thompson, D.L., Hurst, A., and Aris, B. 1974. Comparison  
of selective media for enumeration of sublethally heated food --  
poisoning strains of Staphylococcus aureus. Can. J. Microbiol. -  
20: 1072-1075.
16. Daguet, I., y col. 1977. Exámenes de laboratorio. Técnicas en --  
Bacteriología. Tomo I. Aerobios. Ed. Jims, Barcelona, España. -  
pp. 93-102.
17. Davidson, P.M.C., Brekke, J., and Branen, A.L. 1981. A research  
note. Antimicrobial activity of butylated hydroxyanisole ter---  
tiary butylhidroquinona, and potassium sorbate in combination.  
J. Food. Science. 46: 314-316.
18. Devoyod, J.J., Millet, L., and Mocquot, G. 1976. Un milieu - --  
gélósé pour le denombrement direct de Staphylococcus aureus: -  
milieu au plasma de porc pour Staphylococcus aureus. Can J. --  
Microbiol. 22: 1603-1611.
19. Devriese, L.A. 1981. Baird-Parker medium supplemented with - -

acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of Staphylococcus aureus from heavily contaminated materials. J. Appl. Bacteriol. 50: 315-357.

20. Devriese, L.A. and Hájek, V. 1980. A review. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. J. Appl. Bacteriol. 49: 1-11.
21. De Waart, J., Mossel, D.A.A., Broeke, R.T., and A. Van De - - Moosdijk. 1968. Enumeration of Staphylococcus aureus in foods with special reference to egg-yolk reaction and mannitol negative mutants. J. Appl. Bacteriol. 31: 176-285.
22. El Banná, A.A., and Hurst, A. 1983. Survival in foods of - - Staphylococcus aureus grown under optimal and stressed conditions and the effect of some foods preservatives. Can. J. - - Microbiol. 29: 297-302.
23. Evans, J.B., Ananaba, G.A., Pate, C.A. and Bergdoll, M. S. - - 1983. Enterotoxin production by atypical Staphylococcus - - aureus from poultry. J. Appl. Bacteriol. 54: 257-261.
24. Fernández, E.E. 1976. El diseño y la aplicación de los estándares microbianos en el control sanitario de los alimentos. - Apéndice sin número S.S.A. México, D.F.
25. Gramoli, L.J., and Wilkinson, B.J. 1978. Characterization and

- identification of coagulase-negative, heat-stable deoxyribonuclease-positive staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* 105: 275---285.
26. Hauschild, A.H., Park, E., and Hilsheimer, R. 1979. A modified pork plasma agar for the enumeration of Staphylococcus aureus in foods. *Can. J. Microbiol.* 25: 1052-1057.
27. Hayslett, H.T. 1980. Estadística. Compañía General de Ediciones, S.A. México, D.F.
28. Holbrook, R., Anderson, J.M., and Baird-Parker, A.C. 1969. -- The performance of a stable version of Baird-Parker's medium for isolating Staphylococcus aureus. *J. Appl. Bacteriol.* 32: 187-192.
29. Hurst, A. 1977. Bacterial Injury: a review. *Can. J. Microbiol.* 23: 935-944.
30. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1978. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. 2a. ed. of the university of Toronto, press association of microbiological societies.
31. International Organization for Standardization (ISO). 1979. -- Detection and enumeration of Staphylococcus aureus technical committee 34-agricultural food products subcommittee 9-microbiology.

32. Introducción a la Tecnología de Alimentos. Elaboración de productos cárnicos. 2a. Edición. Departamento de Ingeniería Bioquímica. 1980. E.N.C.B., I.P.N., México, D.F.
33. Jay, J.M. 1978. Modern Food Microbiology. 2a. ed. D. Van Nostrand. pp. 241-248.
34. Julseth, R.M. and Dudley, R.P. 1973. Improved methods for enumerating staphylococci and detecting staphylococcal enterotoxin in meat foods. In 19 th European Meeting on Meat Research Workers, Centre Technique de la Charcuterie, Paris. Vol. II. pp. 511-522.
35. Kúmate, J., Gutiérrez, G. 1983. Manual de Infectología. 9a. edición. Editorial Francisco Méndez Cervantes. México, D.F. pp. 35.
36. Lachica, F.V.R., Weiss, F.K., and Deibel, R.H. 1969. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat stable deoxyribonuclease production by Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. 18: 126-127.
37. Lachica, F.V.R., Barry, A.L., and Atchison, F.W. 1973. Identification of Staphylococcus aureus by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. Appl. Microbiol. 25: 496-497.

38. Lawrence, R., Smolka, R., Nelson F.E. and Kelley, L.M. 1974. -  
Interaction of pH and NaCl on enumeration of heat -stressed - -  
Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. 27: 443-447.
39. Lotter, P.L., and Genigeorgis, C.A. 1975, Deoxyribonucleic acid  
base composition and biochemical properties of certain coagula-  
se-negative enterotoxigenic cocci. Appl. Microbiol. 29: 152-158.
40. Lotter, P.L., and Genigeorgis, C.A. 1977. Isolation of coagula-  
se-positive variants from coagulase-negative enterotoxigenic -  
staphylococci. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.: A 239: 18-30.
41. Manual de técnicas para el análisis Microbiológico de Alimentos.  
1984. Dirección General de Laboratorios de Salud Pública. S.S.A.  
México, D.F.
42. Minor, T.E. and Marth, E.H. 1971 a. Staphylococcus aureus and  
staphylococcal foods intoxications. A review. part. I. J. Milk.  
Food. Technol. 34: 557-564.
43. Minor, T.E., and Marth, E.H. 1972 a. Staphylococcal food - - -  
intoxications. A review. part. II. J. Milk. Food. Technol. - -  
35: 21-29.
44. Minor, T.E., and Marth, E.H. 1972 b. Staphylococcus aureus and  
staphylococcal foods intoxications. A review. part. IV. Staphy-  
lococci in meat, bakery products, and other foods. J. Milk. -

Food. Technol. 35: 228-224.

45. Niskanen, A. and Aalto, M. 1978. Comparison of selective media for coagulase positive enterotoxigenic Staphylococcus aureus. - Appl. Environmental. Microbiol. 31: 1233-1236.
46. Raus, J., and Love, D.N. 1982. Characterization of coagulase--- positive Staphylococcus intermedius and Staphylococcus aureus - isolated from veterinary clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 18: 789-792.
47. Rayman, M.K., Devoyod, J., Purvis, U., Kusch, D., Lainer, J., - Gilbert, R.J., Tilly, D.G., Jarvis, G.A. 1978. An international comparative study of four media for the enumeration of - - - Staphylococcus aureus in foods. Can. J. Microbiol. 24: 274-281.
48. Rayman, M.K., Park, C.E., Philpott, J. and Tood, D.C.E. 1975. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease test as means of identifying Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. -- 29: 451-454.
49. Reyes. H.L. 1981. Determinación de la enterotoxigenicidad de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de queso. Tesis Profesional E.N.C.B., I.P.N., México, D.F.
50. Robbins, R., S. Gould, and Bergdoll, M. 1974. Detecting the - - enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains Appl. Microbiol. 28: 946-950.

51. Smith, H. and Farkas-Hinsley, H. 1969. The relationship of - - pathogenic coagulase-negative staphylococci to Staphylococcus aureus. Can. J. Microbiol. 15: 879-890.
52. Sperber, W.H., and Tatini, S.R. 1975. Interpretación of the tube coagulase test for identification of Staphylococcus aureus. - Appl. Microbiol. 29: 502-505.
53. Stadhouders, Y., Hassing, F. and Van Aalst-Van Maren, N. O. - - 1977. A pour plate method for the detection and enumeration of coagulase-positive Staphylococcus aureus in the Baird-Parker -- medium without egg-yolk, Netherlands. Milk. and Dairy. J. 30: - 222-229.
54. Stiles, M.E. and Clark, P.C. 1974. The reliability of selective media for the enumeration of unheated and heated staphylococci. Can. J. Microbiol. 20: 1735-1744.
55. Stiles, M.E. and L.K. NG. 1981. Use of Baird-Parker's medium to enumerate Staphylococcus aureus in meats. J. Food Protection. 44: 583-587.