

Infecciones e intoxicaciones alimentarias: investigación de patógenos microbianos en comidas preparadas

R. Pérez Grana¹.*Med Mil (Esp) 1999; 55 (3): 139-144*

RESUMEN

Antecedentes y objetivos. Como consecuencia de la recepción en el laboratorio de muestras de comidas preparadas, procedentes de brotes sospechosos de infección e intoxicación alimentaria, se hace un estudio microbiológico de las mismas, con el objetivo de identificar patógenos microbianos. **Lugar de realización.** Centro Militar de Veterinaria y AALOG - 61. **Diseño.** Los protocolos de investigación de los brotes estudiados, se han diseñado en función de la sintomatología de los afectados, de los resultados del examen microscópico del alimento, y de los alimentos ingeridos. Se han analizado un total de 82 muestras, procedentes a su vez de 11 brotes sospechosos de enfermedades transmitidas por alimentos. El procesamiento de las muestras se inicia con un diagnóstico presuntivo rápido, mediante microscopía. En base a esto, se establece un diagnóstico confirmativo, y se investiga: *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropatógeno, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico y *Bacillus cereus*. En 3 muestras (huevos rellenos con mayonesa, ensaladilla rusa y tortilla de patata), el 3,65% (3/82), procedentes de 3 brotes, se identifica *Salmonella* enterica subespecie I serotipo enteritidis 9,12:gm:-. En una muestra (huevos con salsa), el 1,22% (1/82), procedente de otro brote, se obtienen 1.10^8 ufc/g de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico. En otra muestra (sopa), de otro brote, se hallan recuentos de *Bacillus* spp de 1.10^9 ufc/g. **Conclusiones.** Se establece una relación entre comidas preparadas que llevan como ingrediente el huevo y serotipo enteritidis.

PALABRAS CLAVE: Infecciones e intoxicaciones alimentarias. Patógenos microbianos. Comidas preparadas.

INTRODUCCIÓN

El cambio en los hábitos alimenticios de la población, debido al consumo de alimentos preparados, comidas fuera del hogar, fallos en determinados puntos críticos, ha determinado un aumento considerable de la frecuencia de presentación de infecciones e intoxicaciones alimentarias (1). También la Organización Mundial de la Salud (2), alerta sobre el incremento de las enfermedades transmitidas por alimentos, como consecuencia de innovaciones en la tecnología alimentaria, comercio internacional, adaptaciones microbianas, cambios demográficos y ciertos comportamientos sociales.

Es de destacar también la participación de nuevos patógenos, denominados patógenos emergentes, que se deben de tener en cuenta en la investigación de brotes de infecciones alimentarias (Tabla 1).

En las investigaciones efectuadas a partir de muestras sospechosas de producir infecciones e intoxicaciones alimentarias, a veces no se encuentra ninguna bacteria responsable. Es posible que un porcentaje de estos brotes cuya etiología no es identificada, es debido a virus, pero su aislamiento e identificación requiere técnicas complicadas (3).

Tabla 1. Nuevos patógenos microbianos que pueden ser transmitidos por alimentos

<i>Cyclospora cayetanensis</i> (algas verde azuladas)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Streptococcus suis</i> (grupo C)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	
<i>Clostridium butyricum</i> (algunas cepas)	
<i>Clostridium spiriforme</i> (cepas especiales)	
<i>Clostridium botulinum</i> tipo G	
<i>Edwardsiella tarda</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	

El serotipado de las cepas del microorganismo implicado en este tipo de brotes, permite efectuar diversos estudios epidemiológicos, con la finalidad de adoptar medidas preventivas.

Los protocolos de investigación de los brotes estudiados, se han diseñado en función de la sintomatología que presentan los enfermos, de los resultados de análisis microscópico del alimento, y de los platos preparados ingeridos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado un total de 82 muestras de comidas preparadas, procedentes a su vez de 11 brotes sospechosos de infección e intoxicación alimentaria (Tabla 2).

¹ Comandante de Sanidad. Cuerpo Militar de Sanidad (Veterinaria).

Dirección para correspondencia: Dr. D. Roberto Pérez Grana. Paseo Zorrilla, 141 (La Rubia) 47008 Valladolid.

Recibido: 2 de marzo de 1999.

Aceptado: 4 de mayo de 1999.

Tabla 2. Distribución de las muestras de comidas preparadas

Ingrediente básico	Núm. de muestras
Carne	28
Cereales	2
Huevos	10
Leche	5
Pastas alimenticias	6
Pescado	16
Pollo	5
Vegetales	10
TOTAL	82

En todos los brotes estudiados se realiza un diagnóstico presuntivo rápido para obtener información aproximada del tipo de microorganismos presentes, e iniciar el diagnóstico confirmativo.

1. DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO RÁPIDO

Se utiliza la técnica de Breed para calcular el número de bacterias por campo, mediante examen microscópico directo. El examen bacterioscópico, sigue siendo un criterio de gran utilidad en la investigación de infecciones e intoxicaciones alimentarias (4). Tiene la ventaja de su fácil y rápida utilización, y permite tener una información aproximada del tipo de microorganismos presentes (5, 6).

Para la preparación de la extensión se parten de 10 g de alimento, que se mezclan con agua destilada estéril para obtener una dilución al 1:10. Se deja que sedimente durante 5 minutos. Del sobrenadante obtenido se hace una extensión con 0,01 ml sobre el área de 1 cm² de un portaobjetos. No se debe dejar secar la preparación más de 5 minutos para evitar una posible multiplicación de bacterias (7).

La observación microscópica, se lleva a cabo con un microscopio de investigación, dotado de sistemas de fluorescencia y contraste de fases, y se observan las preparaciones a una ampliificación de x1250 y x2500.

En cuanto a los métodos de tinción, habitualmente se utiliza la tinción de Gram, pero para bacterias Gram negativas, que a veces son difíciles de diferenciar de restos de alimento, se siguen las recomendaciones de algunos autores (8), empleando un colorante fluorescente. Los colorantes fluorescentes, como el naranja de acridina, hace que los ácidos nucleicos de los microorganismos emitan fluorescencia al ser iluminados con luz ultravioleta (9).

La técnica de tinción con naranja de acridina consiste en:

1. Extender y dejar secar la preparación.
2. Fijar suavemente al calor.
3. Cubrir la preparación con naranja de acridina al 0,01% en tampón acetato de pH 4, dejando actuar 2 minutos.
4. Lavar con agua destilada.
5. Dejar secar al aire.
6. Observación con objetivo de fluorescencia.

Se debe contar cada bacteria como una, así como las cadenas y grumos de bacterias. Las que se encuentran separadas del

grupo, a una distancia mayor que la longitud de la más larga de las bacterias que lo constituyen, deben contarse separadamente (10). Para lograr una exactitud aceptable se van contando los campos mediante movimientos de orilla a orilla de la extensión, y haciendo los sucesivos movimientos en ángulo recto.

La microscopía de contraste de fases, se ha puesto en práctica para visualizar posibles géneros de microorganismos móviles o que presentan un movimiento típico, y para el estudio morfológico de microorganismos esporulados.

2. DIAGNÓSTICO CONFIRMATIVO

El diagnóstico confirmativo se basa en la utilización de diversas técnicas microbiológicas dependiendo del patógeno microbiano. Cuando existe un síndrome febril y gastroenteritis, para el análisis microbiológico se tendrán en cuenta los siguientes microorganismos: *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropatógeno, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Campylobacter*.

Investigación de *Salmonella*

Se pesan 25 g de alimento, y se añaden 225 ml de agua de peptona tamponada y se somete la mezcla a trituración, obteniéndose una dilución al 1:10. Se incuba a 37° C durante 24 horas. Se toman 0,1 ml, y se añaden a 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis. Se incuba a 43° C durante 24 horas. También a partir del cultivo en agua de peptona, se toman 10 ml, y se añaden a 100 ml de caldo selenito cistina. Se incuba a 37° C durante 24 horas. Se subcultivan en medios sólidos de aislamiento: agar verde brillante rojo fenol y agar Rambach. Se incuba a 37° C durante 24 horas. En el agar verde brillante rojo fenol aparecen unas colonias de color rojizo y translúcidas, y en el agar Rambach, medio de cultivo cromogénico, aparecen unas colonias con centro rojo rodeadas de un halo transparente, como consecuencia de la fermentación del propilenglicol (11), y ello permite hacer una diferenciación de *Proteus* spp (12). A partir de las colonias que presentan un aspecto típico, se realizan las pruebas bioquímicas en dispositivos comerciales como BBL® Enterotube™ II (Becton Dickinson, Germany). Aquellas colonias que presentan un patrón bioquímico característico de *Salmonella*, se confirman mediante serología eliminando primero las cepas autoaglutinables. Se toma una porción de la colonia y obtiene una suspensión en solución salina fisiológica. Las cepas no autoaglutinables, se enfrentan, a antisueros polivalentes somáticos (13), Bacto *Salmonella* O Poly A-I y Vi (Difco Laboratories, USA), utilizando un control positivo y negativo. Las cepas consideradas en el laboratorio como *Salmonella*, se remiten al Centro Nacional de Referencia para *Salmonella* (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid), para su tipificación completa.

Investigación de *Escherichia coli* enteropatógeno

La investigación de *Escherichia coli* enteropatógeno en alimentos resulta difícil, ya que no existen medios selectivos

específicos para los distintos tipos de cepas, por ello los métodos de investigación difieren de los utilizados para el *Escherichia coli* clásico, debido a que las formas patógenas son anerógenas, no fermentan la lactosa o la fermentan tardíamente, y algunas cepas patógenas humanas son inhibidas por las sales biliares, no resisten las operaciones de enriquecimiento, y en el caso de la serovariedad O157:H7, no crece a 44,5° C (14).

Se pesan 25 g de alimento y, se depositan 0,1 ml de cada una de las diluciones decimales, 10^{-1} a 10^{-5} , en placas de caldo trip-tona peptona de soja (TSB) más agar (15 g/l de agua destilada), sembrando dos placas por cada dilución. Se extienden convenientemente los inóculos, dejando las siembras durante 5-6 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se cubre cada placa con 20 ml de agar MacConkey. Se deja solidificar y se incuba a 44° C durante 18-24 horas. Las colonias sospechosas se someten a pruebas bioquímicas mediante batería API 20E® (Bio Merieux, France).

Investigación de *Shigella*

Se pesan 25 g de muestra, y se añaden 225 ml de caldo EE de Mossel, obteniéndose una dilución al 1:10. Tras una incubación a 37° C durante 18-24 horas, las muestras fueron subcultivadas en agar MacConkey y en agar XLD, incubándose a 37° C durante 24 horas. Las colonias sospechosas de pertenecer al género *Shigella* se siembran en el dispositivo de pruebas bioquímicas BBL® Enterotube™ II.

Investigación de *Campylobacter*

En un trabajo publicado por Robinson (15), señala que la dosis infectiva es baja, alrededor de 2-3 microorganismos/g de alimento; por tanto es necesario efectuar un enriquecimiento de la muestra.

Al tratarse de un microorganismo exigente, requiere medios de cultivo selectivos muy complejos y atmósfera microaerófila.

Se pesan 25 g de alimento, y se añaden 225 ml de caldo de enriquecimiento más suplemento Skirrow. Se incuba a 43° C durante 24-48 horas. La adición de antibióticos (vancomicina, polimixina y trimetoprim) que componen el suplemento elimina el crecimiento de la flora entérica normal, como coliformes, algunas especies de *Proteus* y *Enterococos*. A partir de aquí se siembra en agar Skirrow, incubando a 43° C durante 24-48 horas y en atmósfera microaerófila (5% O₂; 10% CO₂; 85% N₂).

La confirmación de las colonias sospechosas, se practica mediante estudio microscópico de contraste de fases, para observar la movilidad oscilatoria típica. Las pruebas bioquímicas que se estudian para *Campylobacter* son: catalasa, oxidasa, sensibilidad al ácido nalidíxico e hidrólisis del hipurato.

Investigación de *Yersinia enterocolitica*

La dosis mínima infectiva (DMI), es elevada para las serovariedades patógenas, se estima que se sitúa alrededor de 10⁹ unidades formadoras de colonias (ufc)/g de alimento (16).; por

tanto a partir de la serie de diluciones decimales, 10^{-1} a 10^{-9} , se siembra con asa de platino sobre la superficie bien seca de agar CIN de Schiemann, con la finalidad de detectar los serotipos patógenos. Se incuba a 31° C durante 24-48 horas.

Las pruebas bioquímicas que se utilizan para identificar las colonias sospechosas son las siguientes: oxidasa, fermentación de la glucosa, ureasa, citrato y movilidad a 20-25° C.

Investigación de *Clostridium perfringens*

Partiendo de la serie de diluciones decimales, 10^{-1} a 10^{-5} , y utilizando dos tubos por dilución, se inocula 1 ml de las diluciones en agar sulfito polimixina sulfadiazina (SPS), fundido y atemperado a 45° C, de tal manera que se alcance el fondo del tubo. Se coloca un tapón de parafina, y se incuba a 46° C durante 18-24 horas, no observándose colonias de color negro. No se trata de un medio de cultivo especialmente selectivo (17), puesto que la mayor parte de los *Clostridium* spp, por su acción sulfito reductora, reducen el sulfito a sulfuro. Al incorporar en su composición sulfadiazina, inhibe las bacterias Gram negativas.

Puesto que *Clostridium perfringens* apenas esporula en los alimentos, se debe de evitar el calentamiento de las diluciones, ya que se podrían destruir formas vegetativas.

Investigación de *Enterobacteriaceae*

Muchas *Enterobacteriaceae* no pertenecientes a los tipos clásicos enteropatógenos, se ha comprobado que producen gastroenteritis (18), tal es el caso de algunas especies de los géneros *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Enterobacter* y *Edwardsiella*.

A partir de las diluciones decimales, 10^{-1} a 10^{-9} , se siembra 1 ml por duplicado en placas de Petri, añadiendo a continuación agar verde biliado rojo violeta glucosa (VRBG). Una vez solidificado se añade una segunda capa. Se incuba a 37° C durante 24 horas. Las colonias típicas presentan aspecto rojo violáceo rodeadas de un halo de igual color, se siembran en el dispositivo comercial API 20E®; si bien, antes se realiza la prueba de la oxidasa.

Investigación de *Bacillaceae*

Dentro del género *Bacillus* existen otras especies patógenas que pueden ser transmitidas por alimentos, entre ellos se encuentran *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus sphaericus* (19).

A partir de las diluciones del alimento, del orden de 10^{-1} a 10^{-9} , se siembran 0,1 ml sobre la superficie seca de agar para recuento en placa (PCA). Se incuba a 37° C durante 24 horas. A partir de las colonias con crecimiento extenso, y que se comportan como Gram positivas y catalasa positivas, se realiza una microscopía de contraste de fases para efectuar una clasificación por grupos del bacilo, según la morfología de las esporas. Cuando no había una esporulación suficiente, se siembran en el medio Finley-Fields, incubando a 37° C 24 horas. La microscopía

pía de contraste de fases, evidencia microorganismos de morfología bacilar, con esporas elipsoides, que originan hinchazón del esporangio. Las pruebas bioquímicas se llevaron a cabo mediante galerías API 50 CHB y API 20 E®.

Investigación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico

A partir de las diluciones decimales, 10⁻¹ a 10⁻⁵, del alimento se siembran 0,1 ml sobre placas de Petri con agar Baird-Parker, y se incuba a 37° C durante 24 horas. Las colonias de color negro y lecitinasas positivas, se someten a pruebas de aglutinación látex (20) Staphaurex® (Murex Diagnostics Limited, England) para detectar caracteres de patogenicidad: proteína A y factor de agregación.

En ocasiones la técnica de recuento de *Staphylococcus aureus* tiene un valor limitado, sobre todo en alimentos calentados, en los que a pesar de que no se recuenten estafilococos vivos, puede persistir la enterotoxina que habían elaborado previamente.

Investigación de *Bacillus cereus*

En todos los casos de intoxicación por *Bacillus cereus*, los alimentos implicados, pueden haber sido cocinados o tratados de otro modo por el calor, pero no fueron enfriados con rapidez. En estas circunstancias, las escasas esporas supervivientes al cocinado pudieran germinar y multiplicarse las células vegetativas y producir enterotoxinas.

Se depositan 0,1 ml de las diluciones decimales del alimento, 10⁻¹ a 10⁻⁵, en la superficie de agar *Bacillus cereus*, y se incuba a 32° C durante 24-48 horas. Las colonias sospechosas de pertenecer a *Bacillus cereus*, se confirman mediante examen microscópico de contraste de fases, y mediante galerías 50 CHB y API 20 E® (Bio Merieux, France). Utilizando un programa de ordenador diseñado, facilita la utilización de las características taxonómicas más útiles, y una mejor lectura e interpretación de resultados.

RESULTADOS

En 3 de los brotes, el 27,27% (3/11), la sintomatología de los afectados cursaba con fiebre, vómitos y diarrea. Aunque también existe síndrome febril en otro, pero acompañado de faringitis y diarrea. En el resto de los brotes existía diarrea, un 54,54% (6/11); y vómitos y diarrea, un 9,10% (1/11). En la tabla 3 se presenta la sintomatología de los afectados, el examen bacterioscópico, el alimento ingerido y los microorganismos identificados. En 3 muestras, el 3,65% (3/82), procedentes de tres brotes distintos, se obtiene un biotipo para *Salmonella* BBL® Enterotube™ II: 37051. Esta cepa fermenta la glucosa con producción de gas, fermenta la arabinosa y dulcitol, produce lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, SH₂ y utiliza el citrato como fuente de carbono. Presenta reacciones negativas ante las siguientes pruebas bioquímicas: indol, adonitol, lactosa, fenilalanina desaminasa, ureasa y oxidasa. La cepa en estudio

Tabla 3. Cuadro clínico, examen bacterioscópico, alimento ingerido y resultados de los análisis microbiológicos

Cuadro clínico	Examen bacterioscópico	Alimento ingerido	Microorganismos
Fiebre 38,5° C, vómitos y diarrea	1 /campo Bacilos Gram-	Huevos rellenos con mayonesa	<i>Salmonella</i> enterica subespecie I serotipo enteritidis 9,12: gm:-
Fiebre, náuseas, vómitos y diarrea	1 /campo Bacilos Gram-	Ensaladilla rusa	<i>Salmonella</i> enterica subespecie I serotipo enteritidis 9,12: gm:-
Fiebre, náuseas, vómitos y diarrea	1 /campo Bacilos Gram-	Tortilla de patata	<i>Salmonella</i> enterica subespecie I serotipo enteritidis 9,12: gm:-
Diarrea	1-2 /campo Bacilos Gram + esporulados	Sopa	<i>Bacillus</i> spp.
Vómitos y diarrea	1/ campo Cocos Gram+	Huevos con salsa	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigénico

resulta ser *Salmonella* enterica subespecie I serotipo enteritidis 9,12: gm:-.

Los recuentos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, en una muestra de huevos con salsa, procedente de otro brote, el 1,22% (1/82), ascienden a 1.106 ufc/g.

En una muestra de sopa, de otro brote, un 1,22% (1/82), se obtienen recuentos de *Bacillus* spp, de 1.109 ufc/g.

Los recuentos de *Enterobacteriaceae*, son variables dependiendo de la contaminación ambiental de la muestra. En la figura 1 se indican los porcentajes de los microorganismos hallados, respecto a la totalidad de las muestras analizadas.

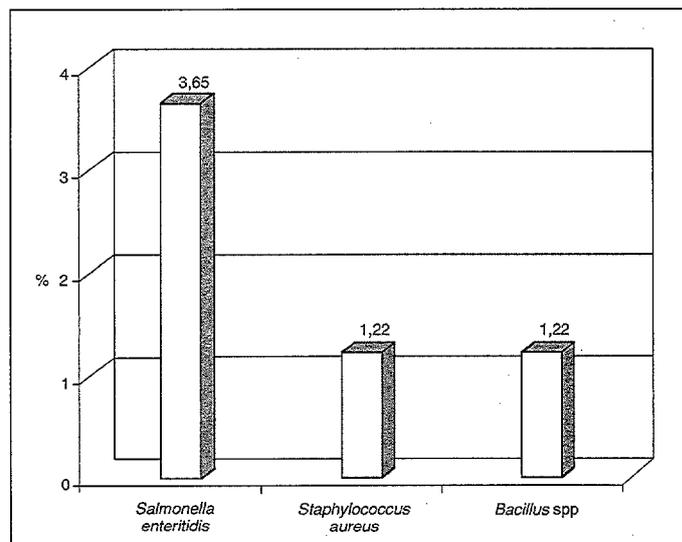


Figura 1. Porcentajes de microorganismos respecto al total de muestras analizadas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos coinciden con los descritos por otros autores (21,22), al ser *Salmonella* el microorganismo más frecuentemente aislado en los brotes de infección alimentaria.

En la investigación microbiológica de muestras sospechosas de producir salmonelosis, se recomienda una técnica rápida (23), que consiste en sembrar directamente en medios sólidos a partir de las diluciones decimales.

En este estudio se ha optado por utilizar la técnica clásica, teniendo en cuenta que la dosis mínima infectiva (DMI), para algunos serotipos puede ser inferior a 10² ufc/g, y también pudiera existir, una inhibición del crecimiento por parte de la flora competitiva.

Actualmente existen diversos métodos, como ELISA (24), inmunomagnéticos (25), genéticos, tanto por hibridación del DNA como mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (26), que aunque no son métodos oficiales, permiten llegar a un diagnóstico de forma rápida.

Utilizando métodos inmunomagnéticos, *Salmonella* Screen Verify® (Vicam, USA) e inmunocromatográficos Unique® (Bio-ser, Barcelona), se ha conseguido aislar siguiendo las recomendaciones del fabricante, *Salmonella* tiphymurium (Colección Española de Cultivos tipo n° 443) en muestras inoculadas con una dosis mínima infectiva (DMI) de 10³ ufc/g.

Se ha utilizado el caldo Rappaport-Vassiliadis, porque frente a otros medios como el caldo tetraciónato, reduce el tiempo de generación de *Salmonella* (27), y además inhibe más eficazmente las bacterias lactosa positivas, haciendo más fácil, la selección de las colonias en los medios en placa (28).

El medio agar verde brillante, se ha mostrado bastante selectivo. A pesar de ello, se han propuesto modificaciones para aumentar la selectividad (29), mediante la adición de sulfacetamida más mandelato sódico, con objeto de inhibir el crecimiento de *Proteus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Algunos serotipos como typhi y dublin, son sensibles a los medios que llevan verde brillante (30), por lo que se deben de utilizar aquellos medios de cultivo que no lo contienen o lo contienen en pequeñas cantidades.

La utilización de sistemas miniaturizados, supone un ahorro de tiempo y trabajo en relación a los métodos tradicionales, pero antes de seguir ciegamente las claves diagnósticas, deben estudiarse las propiedades fundamentales taxonómicas de los microorganismos para evitar identificaciones erróneas.

En un artículo (31) se encuentra una precisión del 99,2 % en 1.540 determinaciones con Enterotube®, y una precisión del 80,5% del sistema API®.

Como se puede observar en los resultados existe una relación entre alimentos derivados del huevo y el serotipo enteritidis. Este fenómeno es cada vez más frecuente en países como España (32), Reino Unido (33), donde se registra un incremento del serotipo enteritidis.

Podría estar relacionado con la transmisión intraovárica de *Salmonella* a través del oviducto, dónde la clara se siembra con algunas células de *Salmonella* quedando inactivas. Pero si se localizan cerca de la yema, sus factores de crecimiento, permiten que se alcancen poblaciones elevadas. Existe también la posibilidad de una contaminación de la cáscara del huevo por

Salmonella, y luego contaminación del alimento. Publicaciones posteriores detallan más estos hallazgos, aislándose *Salmonella* de los órganos reproductores de las gallinas (34).

Otros autores (35), describen la existencia de portadores sanos de *Salmonella*. En otro estudio (36), efectuado sobre dos brotes de toxoinfección alimentaria por *Salmonella*, se comprobó que los huevos actuaban como reservorio y fuente de infección.

Los recuentos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, coinciden con los descritos por otros autores (37), en un brote por consumo de jamón, por lo que se considera suficiente número para producir enterotoxina. Este patógeno microbiano, también ocupa el segundo lugar, en cuanto a frecuencia de presentación en los brotes de toxoinfección alimentaria en algunas Comunidades Autónomas (38).

Los recuentos elevados de *Bacillus* spp. hallados, indica la presencia de este grupo de microorganismos en este tipo de alimentos, pero no se ha demostrado la producción de toxinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Moreno García B. Importancia de los alimentos en la aparición de una segunda generación de enfermedades de la civilización. *Alimentaria* 1995; noviembre: 31-38.
- Ojeda Ortego J. Gastroenteritis agudas de causa alimentaria. *Clínica*. 1990; 3: 61-72.
- Mossel DAA, Moreno García B. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Ediciones Acribia, 1985: 40-41.
- Frazier WC. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Ediciones Acribia, 1981: 452-454.
- Evans JB, Anamba GA, Pate CA, Bergdoll MS. Enterotoxin production by atypical *Staphylococcus aureus* from poultry. *Journal of Applied Bacteriology* 1983; 54: 257.
- Harrigan WF, McCance ME. *Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*. León: Ediciones Academia, 1979: 24-34.
- Harrigan WF, McCance ME. *Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*. León: Ediciones Academia, 1979: 24-34.
- Lauer BA, Reller LB, Mirrett S. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *Journal of Clinic Microbiology* 1981; 14: 201.
- Alvarez MV, Boquet E, Fez Y. *Manual de técnicas en microbiología clínica*. Madrid: Ediciones AEFA, 1990; 21-22.
- Bourgeois CM, Leveau JY. *Techniques d'analyse et contrôle dans les industries agroalimentaires*. Paris: Ediciones Lavoisier Tec-Doc, 1991: 337-338.
- Gruenewald R, Henderson RW, Yappow S. Use of Rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Clinic Microbiology* 1991; 29: 2354-2356.
- Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp from *proteus* spp and other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1990; 56: 30-303.
- Miller RG, Tate CR, Mallinson ET. Improved XLT4 agar: small addition of peptone to promote stronger production of hydrogen-sulfide by *Salmonellae*. *Journal of Food Protection* 1995; 58: 115-119.
- Benezet A, De la Osa JM, Botas M, Olmo N, Pérez Florez F. Presencia de *Escherichia coli* O157: H7 en carnes y productos cárnicos españoles. *Alimentaria* 1995; mayo:51-55.
- Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal* 1981; 282: 1584.
- Benezet A, De la Osa JM, Botas M, Olmo N, Pérez Florez F. Investigación de *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdo. *Alimentaria* 1992; marzo: 33-37.
- Pascual Anderson MR. *Microbiología alimentaria: detección de bacterias con significado higiénico-sanitario*. Madrid: Ediciones AGISA, 1989: 65-70.
- Regueiro Varela B. *Bacillus cereus*, *Estreptococos fecales*, *Pseudomonas* y otros agentes potencialmente productores de intoxicaciones alimentarias. *Symposium Intoxicaciones y toxoinfecciones alimentarias de origen bacteriano*. León, 1974: 199-200.

19. Sneath PHA. Endospore forming Gram positive rods and cocci. En: Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT y Williams ST (eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9ª ed. Batilmore: Williams and Williams, 1993: 1104-1139.
20. Chang TC, Huang SH. Evaluation of latex agglutination test for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from foods. *Journal of Food Protection* 1993; 56: 759-762.
21. Torregrosa A, Fagoaga FM, Moreno P, García M. Incidencia de *Salmonella* en productos cárnicos. *Alimentaria* 1991; julio-agosto: 27-28.
22. De Miguel C, Cano R, Hernández G, Tello O, Martínez Navarro F. Infecciones e intoxicaciones alimentarias. Estudio de los brotes notificados. *Ciencias Veterinarias* 1992; 5: 23-38.
23. Pascual Anderson MR. Microbiología alimentaria: detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Madrid: Ediciones AGISA, 1989:89-137.
24. Bainoti AE, Remondetto G, Beccaria A, Claus JC, Marcipar A. About an improvement of enzyme-immunoassay for detection of *Salmonella* in poultry products. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 1992; 10, 419-425.
25. Holt SP, Richart KG, Greene CR. Rapid detection of *Salmonella enteritidis* in pooled liquid eggs samples using a magnetic bead-ELISA system. *Journal of Food Protection*, 1995; 58: 967-972.
26. D' Aoust JY, Senell Greco P, Mozola MA, Colvin RE. Performance assessment of the Genetrak colorimetric probe assay for the detection of foodborne *Salmonella* spp. *Journal of Food Protection* 1995; 58:1069:1076.
27. Jones DD, Law R, Bej KA. Detection of *Salmonella* spp in oysters using polymerase chain reaction (PCR) and gene probe. *Journal of Food Protection* 1993; 53: 1191-1197.
28. Beumer RR, Silvis CJM, Kapelmacher EH. Proceedings 2nd World Congress Foodborne. *Infections and Intoxications*. Berlín. 1986; 426-430.
29. Kalapothaki V, Vassiliadis P, Mavrommati CH, Trichopoulos D. Comparison of Rappaport-Vassiliadis enrichment medium and tetrathionate brilliant green broth for isolation of *Salmonellae* from meat products. *Journal of Food Protection* 1983; 46:618-621.
30. Jones DD, Collins P, Hayle AJ. The effect of sodium sulphacetamida and sodium mandelate in brilliant green agar on the growth of salmonella. *Journal of Applied Bacteriology*, 1984; 57:423-428.
31. Kelly MT, Latimer JM. Comparison of the automicrobic system with API, enterotube, micro ID, micromedia systems and conventional methods for identification of enterobacteriaceae. *Journal of Clinic Microbiology*. 1980; 12: 659.
32. Pérez Tello O, Mata M, Fuente J. Foodborne infections and intoxications outbreaks evolution in Spain 1976-1984. Proceedings 2nd World Congress Foodborne. *Infection and Intoxications*. Berlín. 1986; 104-109.
33. Plummer RAS, Samantha JB, Dodd CER. *Salmonella* contamination of retail chicken products sold in the UK. *Journal of Food Protection* 1995; 58: 843-846.
34. Fajardo TA, Anantheswarn RC, Puri VM, Knabe J. Penetration of *Salmonella enteritidis* into eggs subjected to rapid cooling. *Journal of Food Protection* 1995; 58: 473-477.
35. Carbonell Pernia MC, Garcés Toledano F, Cayado Santana L, Machuca Gómez M, Davara Rodríguez C, Alonso Fuentes M. Implicación de portadores sanos de *Salmonella* en intoxicaciones alimentarias. *Reunión Científica de Microbiología de Alimentos*. Madrid. 1986; 29.
36. González Hevia MA, Margolles M, Llana J, Mendoza MC. Aplicación de métodos fenotípicos y moleculares en la tipificación de cepas de *Salmonella enterica* causantes de dos brotes de toxiinfección alimentaria. XIV Congreso Nacional de Microbiología. Zaragoza. 1993;222
37. Marín ME, Cornejo I. Toxiinfecciones e intoxicaciones por consumo de jamón serrano: revisión. *Anales de bromatología* XLIII-1 1991: 69-75.
38. Vanaclocha H *et al.* Estudio epidemiológico de los brotes de toxiinfección alimentaria en la Comunidad Valenciana 1985-1989. *Ciencias Veterinarias* 1992; 5:11-22.