VI

EL LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA COMO INSTRUMENTO EN LA HIGIENE ALIMENTARIA

Ilma. Sra. Dra. Dña Concepción Espejo Serrano

Discurso
Leído el 23 de noviembre de 2006, en el Solemne Acto de Recepción Pública como Académica de Número

Y contestación por el
Excmo. Sr. Prof. Dr. D. Benito Mateos-Nevado Artero

La Ilma. Sra. Dra. Dª Concepción Espejo Serrano da lectura a su discurso de ingreso

Excmo. Sr. Presidente, Ilustres Sres. Académicos, Sras. y Sres.:

La historia de las toxiinfecciones alimentarias (T.I.A.) se comienza a documentar y legislar en el siglo X, con el botulismo en Bizancio y documentos sobre el ergotismo en el siglo XVI. En el siglo XIX, aparecen las primeras conservas enlatadas y Pasteur asocia el deterioro de los alimentos con las bacterias. En el siglo XX, se produce un desarrollo espectacular de la microbiología de los alimentos, con el establecimiento de la etiología de las T.I.A., el comienzo de una nueva era de la química e ingeniería alimentaria, el desarrollo de sistemas de radiación de los alimentos, la introducción de nuevos conceptos, "Análisis de puntos críticos" (APPCC), el desarrollo de técnicas genéticas o moleculares aplicadas al estudio de los patógenos alimentarios etc.

Empieza a realizarse en leche y productos lácteos. Referido a otros alimentos se llevó a cabo primero en moluscos bivalvos y más tarde, a partir de 1950, empezó a generalizarse a otros productos.

Con la aparición del Código Alimentario, que empieza a ver la luz a partir de 1967 aparecen normas microbiológicas oficiales que van a servir de apoyo a la hora de hacer una evaluación de la calidad higiénico sanitaria de un alimento.

Desde otro punto de vista, y velando siempre por la salud del consumidor, el fin principal a la hora de analizar una muestra, está en descubrir la presencia de gérmenes patógenos, causantes de alteraciones patológicas en el consumidor; caso de las toxiinfecciones alimentarias (T.I.A.).

Las infecciones alimentarias son las enfermedades derivadas de la ingesta de alimentos, en las que los agentes causales son microorganismos, reservándose el término intoxicación , para cuando el trastorno se debe a la acción de toxinas microbianas preformadas en el alimento. Al conjunto de estas enfermedades, se conoce como toxiinfecciones alimentarias

(T.I.A.). La gravedad de ellas depende de múltiples causas: agente causal, dosis ingerida de microorganismos, estado del individuo etc.

En la mayoría de las T.I.A., para que se produzca enfermedad, los microorganismos deben encontrarse en concentraciones (u.f.c. / gramo) altas (d.i.m.), aunque en algunas bastan unas pocas células para provocar la toxiinfección.

La misión del laboratorio consiste en realizar un estudio microbiológico en las muestras recibidas, bien como consecuencia de una T.I.A. declarada (aquí juega un papel importantísimo el estudio epidemiológico), o bien en las remitidas por la inspección encargada del control higiénico sanitario de los alimentos. La falta de calidad higiénico sanitaria en los mismos, supone un riesgo para la salud del consumidor.

En el momento en que se recibe una muestra en el laboratorio, se somete la misma a un protocolo que nos irá marcando los pasos a seguir. Dos son los valores primordiales a considerar:

A.-Evaluación higiénico sanitaria de la muestra.

B.-Investigación de posibles gérmenes patógenos.

El procedimiento a seguir, varía según se trate de determinar la calidad higiénico sanitaria del alimento, o la presencia de gérmenes patógenos. En el primer caso, se determinará si la cantidad de gérmenes por gramo rebasa el índice marcado por la ley, considerando que dichos límites están muy por debajo de la dosis mínima infectante, con el fin de garantizar una amplia franja entre éste y el dintel donde empieza el riesgo sanitario para el consumidor. A grandes rasgos, podemos describir el tratamiento seguido, para hacer la investigación de la muestra como sigue:

1º.-Revitalización de los gérmenes en agua de peptona.

2º.-Enriquecimiento según casos.

3º.-Siembra en medios de selección y aislamiento.

4º.-Confirmación mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

Este proceso se sigue en cadena, partiendo de una solución al 10% en agua de peptona.

Conviene distinguir dos grandes grupos de gérmenes a investigar:

A. Indicadores (de origen fecal).
B. Patógenos (per se, o por toxinas elaboradas en el alimento por el propio germen).

Interesa también el estudio de otros indicadores, de origen no fecal, con significado propio, que, aun siendo saprófitos, pueden presentar un riesgo sanitario al consumidor, si consiguen multiplicarse en el alimento de forma excesiva. Por eso, hay que hacer un recuento de los mismos y comprobar que no sobrepasan nunca los límites establecidos por la ley. Nos referimos aquí a los siguientes grupos:

1º.-Mesófilos.

2º.-Psicrotróficos.

3º.-Anaerobios.

4º.-Estafilococos.

El grupo de los indicadores fecales está compuesto como sigue:

E. Coli.
Klebsiela.
Citrobacter.
Enterobacter.

Estos gérmenes, pertenecen al grupo de las enterobacterias, fermentadoras de la lactosa. Como figura estrella, se toma de referencia el E. coli, que se caracteriza por su debilidad frente al medio ambiente, por su aptitud para multiplicarse a 43,5º C. – 45,5º C., capacidad para desarrollarse en presencia de sales biliares y producción de indol en agua de peptona (Mackencie). E. Coli es el marcador sanitario ideal en el análisis microbiológico de los alimentos crudos, o que no han sido sometidos a ningún tratamiento para asegurar su inocuidad. Así por ejemplo, si este microorganismo se encuentra en alimentos tales como verduras, hortalizas, moluscos bivalvos etc, puede inferirse que ha tenido lugar una contaminación fecal y que, por tanto, han podido llegar a estos alimentos microorganismos patógenos de procedencia entérica ya que el E. Coli es huésped habitual del intestino humano y de los animales.

El segundo grupo de los indicadores, está representado por los estreptococos del grupo D de Lancefield. Aunque su procedencia es fecal, el hecho de que sean muy resistentes en hábitat extra entéricos, determina que su presencia en los alimentos no deba relacionarse con una contaminación de origen fecal, al menos reciente, ni, consiguientemente, con la presencia simultanea de microorganismos patógenos de procedencia entérica. Su notable resistencia a los agentes de todo tipo(desecación, calor, congelación y descongelación, detergentes y desinfectantes, etc) supone, sin embargo, una ventaja para la utilización como marcadores en alimen-

tos tratados por calor moderado, congelados, etc. Su detección en productos alimenticios se utiliza con éxito para comprobar las condiciones higiénico sanitarias de una planta industrial.

El tercer grupo de los indicadores está representado por los Clostridios. Tienen en común reducir el sulfito a sulfuro. En ocasiones pueden utilizarse como índice de contaminación fecal, sobre todo para apreciar la calidad higiénica del agua y productos animales o de origen animal. Su capacidad para esporular les confiere gran resistencia.

Así como la presencia en los alimentos de E. Coli indica contaminación fecal reciente y su supervivencia en los mismos puede ser corta, los esporos de Clostridium sulfito reductores tienen una considerable resistencia en medios naturales y son huésped del intestino humano y algunos animales. Entre ellos cabe destacar el Clostridium Perfringens, capaz de producir una enterotoxina que le da su carácter patógeno.

En el laboratorio no solo se investiga la presencia de indicadores en los alimentos para calificar la calidad higiénico sanitaria de los mismos. En el caso de la T.I.A. se investiga la etiología de las mismas, que podemos clasificarlas en:

Infecciones alimentarias producidas por bacterias (Salmonelas, Shigellas, Coli enteropatógeno, Yersinia, Campilobacter, etc.).

Intoxicaciones producidas por las toxinas de origen bacteriano preformadas en los alimentos (Botulismo y estafilococias especialmente).

Las toxiinfecciones alimentarias más importantes de origen microbiano, tienen el denominador común de un corto periodo de incubación (de dos a diez horas) y de un cuadro clínico gastroentérico (diarreas, vómitos, dolor abdominal, etc) con fiebre o no y ciertas peculiaridades en algunos casos. Sin embargo, pueden originarse complicaciones graves e incluso mortales (Niños y ancianos debilitados).

Destacamos en este grupo las salmonelosis, enfermedades gastroentéricas producidas por la Salmonela. Se trata de un bacilo Gram negativo perteneciente al grupo de las enterobacterias no fermentadoras de lactosa.

Son un ejemplo ilustrativo de patología bien conocida, pero cuya importancia cualitativa y cuantitativa no decrece en la actualidad. A pesar de las medidas higiénico sanitarias que se toman hoy día en la industria y del conocimiento que tenemos sobre los microorganismos, el número de brotes por Salmonella no disminuye. De ahí la importancia del control

higiénico sanitario de cualquier tipo de alimento y por consiguiente el estudio microbiológico de los mismos. El origen de la contaminación de los alimentos por la Salmonela es doble: endógena (salmonelosis clínica o subclínica del animal) y exógena (manipuladores, mataderos, el uso de abonos orgánicos contaminados por Salmonela, riego de verduras con aguas residuales y contaminación de animales marinos (moluscos bivalvos) por agua ricas en detritus orgánicos, etc. Aquí adquiere un papel importantísimo la falta de higiene en la manipulación de los alimentos. Podemos establecer dos tipos de manipuladores:

1) Manipuladores enfermos que nunca deberán estar en contacto con los alimentos, aún cuando está demostrado que una buena limpieza de manos elimina el riesgo.
2) Manipuladores aparentemente sanos.

En este grupo nos referimos a aquellos individuos que han padecido la enfermedad y han curado; pero se da el caso de que la Salmonela se sigue eliminando por heces durante un periodo de hasta cuatro meses y medio después de haber superado la crisis, porque una vez que el organismo se recupera, la Salmonela se acantona en vesícula biliar y poco a poco se va eliminando por heces durante este periodo. Cuando aparece un brote (suele ser tras la celebración de una comida colectiva), que suelen ser más frecuente en verano, porque los platos se tienen elaborados desde la víspera y la temperatura es de lo más adecuada (es fácil llegar a 37º C en Andalucía), la Salmonela se desarrolla a placer, y el plato está servido, porque aparentemente el alimento no presenta ninguna alteración organoléptica.

Si en la investigación, del laboratorio se descubre presencia del germen, se piensa en los huevos como posible vehículo contaminante (tortillas, mayonesas, etc,). Es cierto que puede ocurrir, pero no es menos cierto que, en la mayoría de los casos, aparece el mismo germen en el análisis coprológico de algunos de los manipuladores. Lógicamente, la calidad higiénico sanitaria con que se ha llevado a cabo la elaboración de estos platos ha sido muy escasa.

En un estudio que hicimos el año 86-87, en huevos recogidos en los mercados por la inspección, se analizaron 1600 unidades individualmente (cáscara, clara y yema) y únicamente en el que hacía el número 812 encontramos un cultivo puro de Salmonela del grupo enterítidis.

La idea que teníamos era que la cadencia venía a ser un tres a un tres y medio por mil. Bien es verdad que donde caiga un huevo contaminado, el

resultado puede ser de lo más aparatoso. Para paliar esto la industria elabora actualmente los alimentos con huevos pasterizados, o con productos sustitutivos, por ejemplo, leche en el caso de las mayonesas.

Hoy día la industria ha avanzado enormemente en cuanto a tecnología e higiene de los alimentos con la aplicación de calor y frío en las distintas facetas entre unos y otros. La Salmonela es un germen sensible al calor (Se destruye a temperatura de pasteurización baja) también se destruye en medio ácido. El hecho paradójico de que a pesar de que los avances tecnológicos en la industria alimentaria sean espectaculares en cuanto a la higienización de los mismos y continúen apareciendo cada año brotes de Salmonelas se podría explicar entre otros factores al aumento de uso de antibióticos en granjas o las concentraciones subterapéuticas de los mismos en la agricultura que influirían sobre el aumento de las resistencias cruzadas. Por ello es inevitable el control analítico en el laboratorio de microbiología alimentaria y su papel llega a ser imprescindible a la hora de determinar, entre otros factores, el origen de la infección y evitar la exposición de la misma.

BOTULISMO

En el grupo de las intoxicaciones puras destacamos el botulismo.

Se trata de una intoxicación de las mas graves transmitidas a través de los alimentos, ya que determina una mortalidad muy elevada; se caracteriza por una parálisis flácida que afecta al hombre y a los animales causada por la acción de la neurotoxina botulínica.

El nombre de la enfermedad deriva de "BOTULUS", que significa salchicha, dada la asociación de esta enfermedad con el consumo de salchichas y otros productos cárnicos. La etiología bacteriana y el mecanismo toxigénico fue descubierto por van Hermengem en 1895 durante la investigación de un gran brote en Bélgica.

En 1976 se empezaron a describir los primeros casos de botulismo en el lactante. Actualmente esta forma de botulismo es la más común en países como Estados Unidos.

El agente causal, CL. BOTULINUM, es un bacilo Gram positivo esporulado y anaerobio. Generalmente es recto o ligeramente curvado, las esporas son ovales, subterminales y distienden el soma bacteriano. Es móvil por medio de flagelos peritricos. Las cepas pueden ser proteolíticas o no, y presentar propiedades bioquímicas diferentes y variables. En su

metabolismo producen numerosas sustancias, entre ellas ácidos grasos de cadena corta y exotoxinas. Los primeros ayudan a su identificación. Las exotoxinas son proteínas solubles y termolábiles, que se liberan por difusión o durante la lisis bacteriana. Estas se destruyen por exposición a 80 º C, durante 30 minutos, o por ebullición durante 10 minutos. El calentamiento final de alimentos que contienen toxinas puede prevenir la enfermedad. Son muy sensibles a pH ácido (menos de 4,5 de pH).

La multiplicación de este germen en los alimentos ante condiciones eugenésicas, determina la biosíntesis de cantidades muy pequeñas de un tipo de proteínas. Solubles y termolábiles con potente actividad neurotóxica. Se liberan en el proceso de germinación y lisis bacteriana, quedando libres en el alimento.

Debido a la producción de esporas, C. Botulinum, es muy resistente a los agentes físicos y químicos y por tanto al medio ambiente. Toleran la ebullición por horas. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza.

Existen siete tipos serológicos de toxinas que se designan con las letras de la "A" a la "G".

Una misma cepa puede producir mas de una toxina. La actividad biológica de cada toxina es específicamente neutralizada por su correspondiente antitoxina.

Para la producción de toxinas, no siempre son necesarias condiciones estrictas de anaerobiosis y aquella es optima cuando el pH y temperatura son, respectivamente, 7 y 30 º C.

En función de su peso las toxinas botulínicas son los venenos más potentes que se conocen.

Estas toxinas son liberadas como una cadena proteica atóxica (protoxina o toxina progenitora) cuyos componentes no tóxicos contribuyen a proteger la toxina del ácido y proteasas gástricas. Posteriormente, tras segmentación proteolítica en el tubo digestivo, aparece la toxina formada por dos fragmentos H y L , que se mantienen unidas por puentes disulfuro. El primero (H) tiene capacidad de fijación y el segundo (L) posee la actividad enzimática.

Actualmente se definen cinco formas clínicas:

1º.-Intoxicación alimentaria.

2º.-Botulismo por heridas.

3º.-Botulismo del lactante.

4º.-Botulismo escondido o de origen desconocido.

5º.-Botulismo inadvertido.

La intoxicación alimentaria es la forma mas común del botulismo.Es consecutiva a la ingestión de los alimentos que contienen la toxina preformada. La mayoría de las veces se trata de conservas caseras o alimentos precocinados y solo ocasionalmente de conservas comerciales. Suele aparecer en brotes. La producción de la toxina implica que los procedimientos de preparación han sido ineficaces para evitar la contaminación con esporas, los sistemas de esterilización de conservas inadecuados para destruirlas y /o las condiciones de conservación han permitido la germinación, multiplicación y producción de la misma. Hoy día esto está prácticamente eliminado, aunque no se debe rebajar la "alerta". La industria dispone de medios y conocimientos adecuados para aplicar sistemas de esterilización y conservación más idóneos y eficaces.

El botulismo de heridas se produce por infección de las mismas con esporas ambientales.

El botulismo del lactante, aparece entre la semana y doce meses de vida y se debe a la ingestión de esporas, que al llegar al colon y ante la ausencia de flora competitiva, encuentra un terreno abonado para lograr su multiplicación y emisión de toxinas. El alimento mayormente implicado suele ser la miel a la que han llegado formas esporuladas o vegetativas. Es actualmente la forma mas frecuente en EEUU, ya que el botulismo alimentario está en franca disminución.

El botulismo escondido o de origen desconocido, puede ser la variante adulta del botulismo del lactante (botulismo entérico del adulto) y ocurre en adultos que usualmente tiene alguna alormalidad del tracto intestinal.la cual permite la colonización del C. Botulinum.

Por último, el botulismo inadvertido es la forma mas recientemente descrita. Puede ocurrir en pacientes tratados con inyecciones de toxina botulínica por desórdenes del movimiento.

En la intoxicación alimentaria del adulto se ingiere "como hemos dicho" la toxina preformada que es absorbida en el tracto intestinal y dirigida por vía linfática y sanguínea hasta llegar al sistema nervioso periférico, especialmente a nivel de la placa neuromotriz, bloqueando la liberación de acetilcolina causando de esta manera una parálisis flácida de los músculos esqueléticos y un fallo parasimpático.

En el mecanismo de acción se dan tres pasos:

1º. La cadena H de la toxina se une a receptores en la membrana presinaptica.

2º. La toxina penetra por un mecanismo activo semejante a la endocitosis.

3º. Dentro de la célula nerviosa, la toxina interfiere con la liberación de la acetilcolina, necesaria para la excitación y posterior contractura del músculo.

Haciendo un inciso vamos a destacar las fases de la contracción muscular:

1. Impulso.
2. Liberación de acetilcolina.
3. Fijación de la acetilcolina en la placa neuromotriz y producción de un potencial en placa terminal(Despolarización).
4. Despolarización de la membrana superficial de la fibra muscular produciéndose la contracción.

La toxina botulínica interfiere la despolarización en placa neuromotriz, de forma irreversible por el siguiente mecanismo: La porción L de la toxina tiene actividad peptidásica, específica para las proteínas que forman la estructura de la vesícula sináptica, que contiene la placa neuromotriz y están involucradas en la liberación de acetilcolina. Al desarrollar la toxina su actividad irreversible, se bloquea la exocitosis (liberación de acetilcolina) y de esta manera la contracción muscular, dando lugar a una parálisis flácida.

El efecto es similar al producido por el curare, usado por los indios americanos, en la punta de las cerbatanas, consiguiendo en el herido una parálisis muscular que al afectar a los músculos que intervienen en los movimientos respiratorios, morirán por no poder respirar. Hay que hacer la salvedad de que el efecto del currare es reversible y el organismo puede recuperarse aumentando la producción de acetilcolina. Esta propiedad del curare es aprovechada en medicina usándolo como relajante muscular en dosis apropiadas, que pueden neutralizarse con la administración de anticolinesterásicos.

A veces es necesario investigar la presencia de esporos toxigénicos y/o formas vegetativas de Cl. Botulinum, caso del lactante o cuando no se dispone del alimento involucrado en un determinado brote de intoxica-

ción botulínica, pero existen productos del mismo lote o de la misma naturaleza. También se sigue esta pauta para comprobar en qué condiciones higiénico sanitarias ha sido manipulado el alimento. (Caso de muestras de control alimentario). Requiere una fase previa de reconocimiento.

A grandes rasgos podemos describir la actuación del laboratorio como sigue:

Previa incubación a distintas temperaturas, se abre el envase de la muestra sospechosa con las debidas medidas para evitar su contaminación, y se mantiene una protección especial para el manipulador. Se observan las características de la muestra y se anotan las posibles "anormalidades".

Se hace una dilución de la misma con un diluyente idóneo ajustado a pH 6,5. Se tritura la muestra y se centrifuga.

El sobrenadante sin diluir servirá para la investigación de la toxina. El sedimento se usará para el aislamiento de Cl. Botulinum, en los medios específicos.

Si lo que se busca es la presencia de la toxina, hay que recurrir a la prueba biológica en el ratón blanco de 20 gr de peso. Para ello se le inocula la cantidad adecuada por vía intraperitoneal de líquido sobrenadante sin más tratamiento a un lote de ratones blancos, y a otro lote se le administra la misma cantidad de sobrenadante, que, previamente se habrá calentado a 100º C como garantía de haber destruido la toxina.

La muerte de los ratones del primer lote significa que es positiva la presencia de la misma.

Dentro del grupo de otros indicadores de origen no fecal vamos a destacar el Staphilococus Aureus, coco Gram positivo, catalasa y Dnasa positivo, y productor de toxinas en los alimentos. Desarrolla por consiguiente una intoxicación propiamente dicha, en el sentido de que las enterotoxinas responsables se encuentran preformadas en los alimentos. Estas intoxicaciones son muy frecuentes, aunque en la mayoría de los casos, los pacientes no acuden al médico, ni denuncian ante las autoridades sanitarias.

Se caracteriza por el breve periodo de incubación. Entre las dos y dos horas y media de la ingestión del alimento contaminado aparecen los primeros síntomas: falta de fiebre, vómitos, cefaleas, hipotensión y diarreas. Su duración suele ser breve, inferior a treinta horas.

El agente causal es el Stafilococus Aureus. Se trata de un bacilo Gram positivo con capacidad de producir enterotoxinas, siendo éste el carácter fundamental del mismo.

Puede encontrarse ya en los alimentos en el momento de su obtención (contaminación endógena), que se suele eliminar con la inspección veterinaria en mataderos, o bien llegar posteriormente a ellos a partir principalmente de los manipuladores. Un porcentaje elevado de personas sanas son portadoras de S . Aureus, en fosas nasales y garganta. Este germen se encuentra también en la piel y sobre todo en procesos cutáneos (acné, forúnculos, heridas infectadas, etc). Los manipuladores de alimentos son, consiguientemente, el origen mas frecuente de estafilococos que llegan a los alimentos. Ya en ellos, si las circunstancias de temperatura, pH, etc, son idóneos, se multiplican y al alcanzar por encima de diez a la quinta (100000 gérmenes/gramo), se forman cantidades mínimas de enterotoxinas, suficientes para determinar el correspondiente síndrome en el consumidor.

Como medida preventiva, juega un papel importantísimo el conservar los alimentos en el frio. Los alimentos mas frecuentemente implicados en esta intoxicación suelen ser: jamón, algunos embutidos, pastelería rellena de crema y helados. Se trata de alimentos de agua de actividad escasa, debido al hecho de que en los alimentos con un contenido de agua de actividad elevado, el crecimiento del S. Aureus, y la producción de toxinas son, normalmente, o bien inhibidos por microorganismos competidores, o frenados por la actividad metabólica de otras bacterias cuyo desarrollo se v e impedido o, al menos, muy dificultado en los alimentos de bajo contenido en agua de actividad. No obstante, también con otros tipos de alimentos son precisas las medidas de precaución generales para evitar la contaminación de S. Aureus. Este es el caso de los alimentos ya cocinados es los que la flora microbiana ha sido en su mayor parte inactivada.

Por último, consideramos que el hallazgo de este germen en el resultado analítico de un alimento, tiene dos significados: por un lado indica la calidad higiénico sanitario con que ha sido elaborado, alertando ante un posible manipulador como portador y, por otro lado, previene del riesgo para el consumidor de la posible presencia de la toxina.

Es muy importante determinar el número de estafilococos/gramo y la presencia de dos enzimas: Dnasa y coagulasa, propios del estafilococus aureus.

En general, la actuación del laboratorio con los resultados obtenidos es como sigue:

Hallazgo de gérmenes patógenos: comunicación inmediata al Servicio de Inspección Veterinaria, y al de Epidemiología.

Presencia de indicadores: Si las cifras obtenidas no superan el índice de tolerancia establecido por la ley, se notificará resultados por vía normal. Si por el contrario superan el índice de tolerancia se comunicará con urgencia a la Inspección Veterinaria y al Servicio de Epidemiología.