

27/16



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

*EXTRACCION E IDENTIFICACION DE  
ENTEROTOXINA ESTAFILOCOCCICA EN  
QUESOS.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A:

**SUSANA GONZALEZ FLORES**



MEXICO. D. F.

1987.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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

	Pags.
GENERALIDADES:	1
1.- Historia de <u>Staphylococcus aureus</u> .	1
2.- Características de <u>Staphylococcus aureus</u> .	1
3.- Métodos utilizados en el aislamiento de <u>S. aureus</u> .	4
4.- Enfermedades de <u>Staphylococcus aureus</u>	5
5.- Características de S. aureus enterotoxigenico.	5
6.- Historia de las Enterotoxinas.	6
7.- Características de las Enterotoxinas.	8
8.- Alimentos involucrados en la intoxicación estafilocócica.	11
9.- Enfermedades causadas por las Enterotoxinas.	14
10.- Modo de acción de las Enterotoxinas.	15
11.- Manere de eliminar a la Enterotoxina.	16
12.- Métodos de determinación para Enterotoxinas.	17
12.I.- Métodos Biológicos	17
12.II.- Métodos Inmunológicos	18
 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	 21
 OBJETIVÓS	 22
 HIPOTESIS	 23

	Págs.
MATERIAL Y METODOS:	24
a).- Material	24
b).- Métodos:	24
I.- Método Baird-Parker.	24
II.- Prueba de la Coagulasa.	25
III.- Prueba de la Termonucleasa.	26
IV.- Producción de Enterotoxinas partir de cepas de S. aureus.	27
V.- Método para la Extracción de Entero- toxina en Alimentos.	27
VI.- Identificación de Enterotoxinas; técnica de microplaca.	30
 RESULTADOS.	 32
 ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.	 38
 CONCLUSIONES.	 43
 APENDICE	 44
 BIBLIOGRAFIA.	 51

GENERALIDADES

1.- Historia de Staphylococcus aureus.

Estafilococo proviene del vocablo griego Stahylé que significa racimo de uvas y coccus que quiere decir granos o bayas. (22)

En 1978 Roberto Koch fue el primero en descubrir al estafilococo en un pus humano.(9)

En 1880, Pasteur descubrió el germen como un organismo formado de pequeños puntos esféricos agrupados en parejas de dos granos, pero frecuentemente asociados en pequeños acumulos.

En este mismo año. Onatón observó células bacterianas redondas en el pus de un absceso. Por su agrupación semejante a un racimo de uvas les dio el nombre de "estafilococos".

En 1884 Rosembach realizó un estudio detallado del estafilococo y descubrió las variedades de pigmentación como doradas, blancas y naranjas, denominándose respectivamente aureus, albus y citreus.

Desde 1884, taxonomicamente los estafilococos fueron puestos dentro de la familia Micrococcaceae.

En 1965 se distinguieron los géneros Staphylococcus y Micrococcus por la fermentación de un azúcar (glucosa), además de que el género Staphylococcus contenía la mayoría de los cocos Gram positivos parasíticos, anaerobios facultativos, con producción de ácidos de glucosa en condiciones de anaerobiosis.(3)

2.- Características de Staphylococcus aureus.

El S. aureus esta distribuido ampliamente en la naturaleza (aire, polvo, suelo, ropa, agua, aguas negras etc.).

La principal fuente de contaminación de este microorganismo es el hombre, encontrándose en nariz, manos y heridas infectadas. (27)

Actualmente S. aureus se define como un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóviles, no esporulados cuyo diámetro varía de 0.8 a 1.2 micras.

Puede ser cultivado en medios que contengan 7.5 % de sal, se desarrolla en cualquier temperatura entre 10 y 45 grados centígrados, siendo la de 37° C la mejor temperatura para su crecimiento.

El rango de pH para que crezca esta dentro de 4.2 y 9.3 y su pH óptimo esta entre 7.0 y 7.5. (3)

La mayoría de cepas de Staphylococcus aureus patógeno fermentan el manitol, producen hemólisis y son coagulasa positivos, estudios recientes han demostrado la producción de otra enzima, la termoneucleasa, que resiste al igual que las enterotoxinas a muchos factores adversos para los microorganismos.

La especie aureus es fosfatasa positiva, produce ácidos de la dextrosa, lactosa, sacarosa, manitol y glicerina, reduce los nitratos a nitritos, hidroliza la urea y reduce el azul de metileno. (3)

El Staphylococcus aureus produce también enzimas proteolíticas con lo que adquieren resistencia a los lípidos bactericidas de la piel.

El S. aureus produce metabolitos y enzimas bacterianas que son los siguientes. (9)

- a) Antígenos de superficie
- b) Coagulasa
- c) Hialuronidasa
- d) Estafilokinasa
- e) Gelatinasa
- f) Proteasa
- g) Lipasa

- h) Lecitinas
- i) Fosfatasa
- j) Lisozima
- k) Penicilinas
- l) Termonucleasa
- m) Exotoxinas
- n) Enterotoxinas.

A continuación se describen las más usadas para la identificación de cepas de S. aureus patógeno.

#### Coagulasa:

Neo Loeb en 1903 "in vitro" utilizó plasma de gusano y pudo observar que el Staphylococcus aureus influía específicamente en el fenómeno de la coagulación de la sangre, debido probablemente a una enzima preformada en el cultivo y se dedujo que la mayoría de las cepas patógenas de esta especie para el hombre producen una sustancia proteica que se comporta como una enzima y que coagula el plasma oxalato o citrato en presencia de un factor contenido en muchos sueros.

Este factor reacciona con la coagulasa, generando enterasa y una actividad de coagulación. (10)

#### Termonucleasa:

La termonucleasa es una enzima extracelular que hidroliza los enlaces éster de fosfato del DNA.

La DNAsa, muy común en tejidos animales y microorganismos ataca los enlaces 5' para dar grupos finales de 3' monofosfato. (9)

Es una enzima muy estable al calor, pues resiste temperaturas de ebullición durante 15 minutos, no es inactivada por concentraciones elevadas de cloruro de sodio.

Enterotoxinas:

Estas se verán más adelante.

3.- Métodos utilizados en el aislamiento de S. aureus.

En 1946 Chapman desarrolló el medio No. 110 y el medio Chapman Stone; ambos contenían sal e incorporaban la reacción gelatinolítica "Reacción de Stone".

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

En 1955 Zebovitz y Evans desarrollaron el agar telurito.

En 1960 el agar Vogel-Johnson apareció como resultado de la adición de cloruro de litio y el telurito de potasio al agar sal-manitol.

Estos medios son diferenciados por el tipo de agente selectivo usado en el medio de aislamiento como: Cloruro de sodio, telurito de potasio, glicina, azida de sodio, polimixina, etc.

Uno de los medios selectivos más recientes para el estafilococo coagulasa positivo fué la adición de yema de huevo como un agente de diagnóstico.

Colbeck, en 1956 desarrolló el primer medio yema de huevo considerando que Staphylococcus aureus emplea la lipovitelinina del huevo y ocasiona la transparencia del medio debajo y alrededor de las colonias. (24)

En 1971 Minor y Marth concluyeron que el medio --- Baird-Parker era específico para la detección y enumeración de S. aureus en los alimentos. (22)

El crecimiento de Staphylococcus aureus en este medio es: Colonias negras, brillantes, convexas de 1.5mm



de diámetro y coagulasa positivo al realizar la prueba. (2, 14).

#### 4.- Enfermedades de Staphylococcus aureus.

S. aureus está entre las bacterias de mayor importancia como agente etiológico de enfermedades en el humano y puede causar desde una gran variedad de infecciones supurativas en la piel hasta enfermedades de mayor mortalidad como las septicemias, endocarditis, neumonías, osteomielitis, meningitis, infecciones en heridas, así como algunas toxinosis entre ellas las intoxicaciones alimentarias y los síndromes estafilocócicos de la piel escaldada.

Se aísla frecuentemente de portadores asintomáticos de la piel, nariz, orofaringe, nasofaringe y aparato gastrointestinal. (11)

#### 5.- Características de Staphylococcus aureus en terotoxiogénico.

Una de las primeras pruebas empleadas para identificar al S. aureus patógeno, fue la de manitol, ya que los estafilococos tienen la capacidad de fermentarlo. (13)

Pero se ha demostrado que el error que presenta es mucho en comparación con la prueba de coagulasa, ya que dicha prueba es una propiedad bioquímica del Staphylococcus aureus, no sucediendo así con la prueba de manitol, ya que aparte de S. aureus otras bacterias pueden fermentarlo como son: E. coli, Serratia marcescens, S. typhi A, etc.

El S. aureus posee la enzima coagulasa, que coagula el plasma citratado humano y de conejo.

La prueba de la coagulasa ha sido tomada para fundamentar el criterio en la diferenciación de S. aureus - enterotoxigénico patógeno de otros microorganismos saprofitos relacionados con él. Sin embargo debido a mutaciones de la especie, hay cepas de Staphylococcus aureus -- que han perdido la capacidad de producir coagulasa en -- cantidad suficiente para dar una reacción positiva, por lo que se ha buascado otra característica fisiológica -- que permita hacer una mejor identificación de S. aureus, como es la producción de termonucleasa; Lachica publicó un estudio en el que la prueba de termonucleasa presenta más correlación que la prueba de coagulasa con la producción de enterotoxina. (19)

Se ha aceptado generalmente que la producción de - enterotoxinas esta asociada a cepas de Staphylococcus aureus coagulasa positiva, (18), sin embargo, se han aislado cepas enterotoxigénicas coagulasa negativa, pero termonucleasa positiva.

También debe tomarse en cuenta que aunque exista - una cantidad elevada de S. aureus en el alimento no es - suficiente razón para deducir que este microorganismo es el causante de la intoxicación alimentaria; por lo que - se hace necesario una previa demostración de que la cepa encontrada es enterotoxigénica o la demostración de la - enterotoxina directamente.

#### 6.- Historia de las Enterotoxinas.

En 1881 se publicó el primer brote de intoxicación estafilocócica alimentaria.

Vaughn ingirió material extraído del queso respon-

sable de la intoxicación, y mostró los síntomas de la enfermedad.

El examen microscópico reveló bacterias esféricas, concluyendo Vaughn que las bacterias producían un veneno que era el causante de la intoxicación alimentaria. (22)

La primera intoxicación alimentaria bien documentada producida por los estafilococos fué en el año de 1914 donde Barber, estudiando un brote de origen lácteo aisló estafilococos en repetidas ocasiones de una vaca que tenía mastitis.

En el año de 1930, Dack y col. aislaron un estafilococo de un alimento que ocasionó un brote de intoxicación.

Para comprobar que el estafilococo era el causante de dicha intoxicación, un grupo de voluntarios ingirió - filtrado estéril obtenido a partir del caldo donde el estafilococo aislado se cultivó, los voluntarios presentaron los síntomas típicos de la enfermedad, demostrándose sin duda alguna la naturaleza toxigénica del síndrome. (23).

Los brotes de intoxicación alimentaria publicados anualmente sobrepasan en número a cualquier otro brote causado por un agente único y conocido como Salmonella. (15).

En Inglaterra, así como en Gales, se han publicado más de 2 000 casos de intoxicación estafilocócica alimentaria en los años de 1949 y 1971, pero hay países como - Nueva Zelanda y Hungría en los que el S. aureus enterotóxico causó más brotes aun que Salmonella sp.o Clostridium perfringens. (15)

Un estudio realizado en el Laboratorio Nacional de Salubridad en México D.F. en junio de 1957 y junio de 1962, se analizaron 524 muestras de quesos, obteniéndose resultados donde se demuestra la frecuencia de S. aureus (96.4 %), el 10.8 % de estas muestras causaron intoxica-

ción alimentaria.

Un grave brote de intoxicación alimentaria causada por S. aureus fue registrado en México en abril de 1978 demostrándose una cuenta de Staphylococcus aureus en el medio de Baird-Parker que oscilaba entre  $1 \times 10^5$  y  $5.5 \times 10^6$  colonias/gramo a partir de las muestras analizadas de un flan, procedentes de diversas fuentes.

El alimento, así como las cepas aisladas a partir de dicho flan dieron la prueba de Dolman y Termonucleasa positivas, identificándose posteriormente una cepa productora de enterotoxina A. (29)

#### 7.- Características de las Enterotoxinas.

Las enterotoxinas purificadas son de aspecto blando, color blanco nívoo, son higroscópicas y muy solubles en agua y en soluciones salinas. (23)

Las enterotoxinas son termoestables y resisten a la ebullición durante 30 minutos.

Las enterotoxinas son proteínas simples, que incluyen solamente aminoácidos.

El hecho de que únicamente el N- y el C- terminal de aminoácidos hayan sido detectados para cada enterotoxina, indica que son cadenas simples de polipéptidos.

Los aminoácidos terminales se dan en la tabla No. 2 pag No. 10. Los estudios sobre conformación de enterotoxinas indica que son moléculas compactas.

No hay grupos -SH libres y solo un puente disulfuro esta presente, pero este no es necesario para la actividad biológica como tampoco para la conformación de dicha enterotoxina. (24)

Tabla No. 1

Características Físicas y Químicas de las Enterotoxinas.

Propiedad.	A	B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D	E
Peso Molecular.	27,800	28,266	34,100	34,000	27,000	29,600
Dosis emética, (SD <sub>50</sub> mcg/mono)	5	5	5	5-10	20	10
Contenido de ni- trogeno.	16.2	16.1	16.2	16.0	--	--
Coefficiente de sedimentación.	3.03	2.78	3.00	2.90	--	2.60
Punto isoelec- trico.	6.9	8.6	8.6	7.0	7.4	7.0
Absorción máxi- ma(nanómetros)	277	277	277	277	278	277
Extinción <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>	14.6	14.4	12.1	12.1	--	12.5
Coefficiente de difusión(D <sub>20</sub> <sup>0</sup> -- x10 <sup>-7</sup> cm/seg).	9.80	8.22	8.10	8.10	--	--
Viscosidad redu- cida ml/g.	4.07	3.81	3.40	3.70	--	--

Tomada de Minor, T.E., E.H. Barth. 1976. Stafilococci.

Tabla No. 2

## Aminoácidos terminales de las Enterotoxinas

Enterotoxina	Aminoácido N-terminal	Aminoácido C-terminal
A	Alanina	Serina
B	Ac. Glutámico	Lisina
C <sub>1</sub>	Ac. Glutámico	Glicina
C <sub>2</sub>	Ac. Glutámico	Glicina
E	-	Treonina

Bergdoll 1965, Bergdoll 1970, Huang 1967 y Borja 1971.

En 1952 Sargalla uso la propiedad de que las proteínas son formadoras de anticuerpos específicos en animales de laboratorio como una respuesta a ellas, desarrollando así una prueba serológica "in vitro". (24)

Bergdoll en 1959 observó la neutralización de las enterotoxinas parcialmente purificadas por anticuerpos específicos lo que ha sido de gran ayuda para descubrir que existen hasta la fecha 6 tipos inmunológicos. (5)

La enterotoxina A descubierta por Casman en 1960, Enterotoxina B por Bergdoll en 1969, Enterotoxina C por Bergdoll, Borja y Avena en 1975 (Hay dos tipos que son la C<sub>1</sub> y la C<sub>2</sub>, clasificadas así en base a sus diferentes puntos isoeléctricos).

Enterotoxina D por Casman en 1967, Enterotoxina E por Bergdoll en 1971. (5)

Algunas de las propiedades físicas y químicas se ven en la tabla No.1 pag No. 9.

Las enterotoxinas en estado activo resisten a enzimas proteolíticas como tripsina, quimiotripsina, renina, y papaína. (23)

#### 8.- Alimentos Involucrados en la Intoxicación Estafilocócica.

El problema de las intoxicaciones alimentarias causadas por Staphylococcus aureus, tiene importancia cada vez más reconocida, pues este microorganismo es el responsable de un número mayor de intoxicaciones en los países afectados.

El S. aureus enterotoxigénico puede encontrarse en los alimentos a partir de un doble origen:

- a) Endógeno que es dado por animales enfermos de donde los alimentos son obtenidos, y
- b) Exógeno dado por la contaminación de portadores huma-

nos durante la manipulación de los alimentos.(1)

Se precisan varias condiciones para que en un ali-  
mento se pueda producir cantidad suficiente de enteroto-  
xina capaz de desencadenar un cuadro de intoxicación.

Estas condiciones se resumen en dos grandes puntos:

- a) Presencia de Staphylococcus aureus enterotoxi-  
génico - en el alimento y;
- b) Un desarrollo adecuado del microorganismo.

También debe tomarse en cuenta que aunque exista -  
una cantidad elevada de S. aureus en el alimento, no es  
suficiente razón para deducir que este microorganismo es  
el causante de la intoxicación alimentaria; por lo que -  
se hace necesario una previa demostración de la enteroto-  
xina directamente.(21)

Sin embargo números elevados de Staphylococcus au-  
reus (por arriba de las normas establecidas por la S.S.A  
o sea una cantidad mayor de 1 000 colonias por gramo de  
queso) en los alimentos determina un riesgo potencial pa-  
ra la salud pública.(32)

Por lo que la necesidad de demostrar enterotoxinas  
en el alimento abarca dos áreas:

a) Alimentos que han sido implicados en brotes de  
intoxicación alimentaria, por lo que la demostración de  
enterotoxinas es confirmatoria de los alimentos involu-  
crados en brotes.

b) Alimentos que son sospechosos de contener ente-  
rotoxinas; aquí la presencia o ausencia de enterotoxinas  
determina la autorización o no de la venta del produc-  
to.(1)

Por lo anterior los investigadores han tratado de  
buscar métodos para la demostración de las enterotoxinas  
directamente de los alimentos, así como la prueba de la  
termonucleasa directa de los alimentos.(19, 28)



En 1974 Bergdoll hizo algunas modificaciones a la técnica de Conaway y Reiser y logro extraer enterotoxinas de los alimentos contaminados por S. aureus.(28)

El problema de la contaminación de alimentos por Staphylococcus aureus se debe a una educación sanitaria deficiente. Si los manejadores de alimentos estuvieran concientes de las prácticas higiénicas evitarían grandemente dicha contaminación, y las intoxicaciones alimentarias por S. aureus disminuirían notablemente, ya que la contaminación tan alta esta dada precisamente por el manejador.(31)

Es importante saber que el Staphylococcus aureus habita normalmente en las membranas mucosas como son: de boca, nariz, nasofaringe, encontrándose en más del 50 % de adultos sanos, haciendo por consiguiente que el hombre sea una de las fuentes más importantes de contaminación de los alimentos ya que estan relacionados directamente con su elaboración, manejo y preservación.

Se ha visto que de 30 a 50 % de los portadores contaminan el alimento por via nasal, de un 7 % por descargas nasofaringeas y de 4 a 44 % por la piel.(27)

Los alimentos involucrados más frecuentemente en los brotes de intoxicación por S. aureus son productos alimenticios de origen animal como:

Carne, embutidos frescos, jamon ahumado, pescado, mariscos, leche de oveja, de vaca y productos derivados ( quesos, leche condensada, helados lácteos, etc.) Pero la incidencia de S. aureus en nuestro país es mayor en productos lácteos que en productos cárnicos.(26, 29,y31)

Por tal motivo es de sumo interés establecer una metodología que identifique a las enterotoxinas estafilocólicas en un alimento sospechoso de provocar un brote de intoxicación alimentaria.

## 9.- Enfermedades Causadas por las Enterotoxinas.

### Síntomas Típicos:

No todas las personas involucradas en un brote de intoxicación alimentaria presentan los mismos síntomas, pues la gravedad de estos depende de la concentración de enterotoxina en el alimento, la cantidad de alimento ingerido y la susceptibilidad del individuo.(4)

Los síntomas típicos son vómito y diarrea con un período de incubación entre 2 y 6 horas, con mayor incidencia de 2 a 4 horas después de haber ingerido el alimento contaminado con enterotoxinas, pueden presentarse otros síntomas como son: salivación, náuseas y dolor abdominal.

En casos extremos hay dolor de cabeza, calambres musculares, sudoración y postración.

En casos graves puede haber fiebre, una disminución de la presión sanguínea, y el vómito y las heces pueden contener sangre y moco.(4)

No se sabe la cantidad necesaria de enterotoxina para causar los síntomas característicos de intoxicación alimentaria en humanos, para fundamentar lo anterior Gilbert en 1974 reportó que la dosis necesaria se encuentra entre 0.015 y 0.357 mcg/Kg de peso, pero esto varía dependiendo de la sensibilidad del individuo hacia las enterotoxinas,(12), basándose en los siguientes resultados de varios experimentos:

En el instituto de alimentos de los Estados Unidos se obtuvieron resultados negativos con dos individuos, empleando 1 mcg y 10 mcg de toxina pura ( enterotoxina B) para cada individuo respectivamente.

En otro laboratorio con 3 individuos voluntarios - emplearon 50 mcg de enterotoxina B con un 50 % de pureza los 3 voluntarios mostraron los síntomas típicos de intoxicación alimentaria después de dos horas de ingerir la toxina.(25)

#### 10.- Modo de Acción de las Enterotoxinas.

No se sabe con exactitud el modo de acción de las enterotoxinas en el humano ya que los individuos no son hospitalizados debido a una pronta recuperación de - estos, pero principalmente a que las intoxicaciones que causan dichas enterotoxinas no son fatales.(24)

La émesis es un síntoma fácil de observar en monos el sitio de acción emético de las enterotoxinas en el mono, esta en las vísceras abdominales y el estímulo para esta acción alcanza el centro del vómito vía los nervios vagos y simpáticos.

Sin embargo no se ha identificado un órgano específico como el sitio de la acción emética.(24)

En relación con la diarrea Shemano realizó experimentos con perros y pudo concluirse que la diarrea inducida por las enterotoxinas se debe en parte a la inhibición de la absorción de agua de la pared intestinal o a un flujo incrementado de líquido o a ambas causas.(33)

Al administrar 100 mcg/Kg de enterotoxina a perros intravenosamente, estos presentaron depresión marcada -- del tono intestinal y de la contractibilidad; luego entonces las enterotoxinas inhiben marcadamente el transporte intestinal en perros.(33)

La enteritis se presenta en intoxicaciones alimentarias graves.

La administración de 0.1 a 0.5 mg/Kg de enterotoxina en perros produce salivación, vómito, diarrea acuosa a menudo con restos de sangre.

Presentaron también enteritis aguda con edema, hiperemia en el páncreas y congestión del hígado produciendo también destrucción de la superficie del epitelio de la mucosa.

Merrill y Spring administraron 150 mcg. de enterotoxina intragástricamente a monos, los que presentaron cambios importantes en las crestas vellosas como son: Lige-

ra vacuolización citoplasmática en el epitelio superficial correspondiendo a una degeneración de las mitocondrias de las células vellosas y de la cripta epitelial - de donde estos investigadores han sugerido que el desarrollo rápido de una lesión y su limitación casi exclusiva a la mitocondria indica que el sitio de acción de las enterotoxinas se encuentra en esos sitios. (21)

Se han reportado pocos casos fatales de personas - con intoxicación estafilocócica sobre todo en niños los que presentaron un grado moderado de edema con congestión marcada en los vasos alveolares y zonas con hemorragias dentro del alveolo, mostraron también una pequeña cantidad de infiltrado leucocitario en la áreas periportales del hígado. (26)

En un estudio usando de 50 a 1 000 mcg/Kg en monos la enterotoxina se les aplicó intravenosamente, les provocó hipotensión arterial irreversible con todas las dosis letales de la toxina. (26)

Se ha establecido que la inyección intravenosa de las enterotoxinas en monos, produce muerte sin antecedentes de émesis y diarrea. Esto sugiere la posibilidad de que sean diferentes los mecanismos que conducen a la muerte, y que la émesis y la diarrea no sean factores esenciales que se atribuyen a la muerte por enterotoxinas. (24)

#### 11.- Manera de Eliminar a la Enterotoxina.

Se ha comprobado que la toxina desaparece de la corriente sanguínea muy rápidamente.

El principal órgano para la eliminación de la toxina es el riñón pues se acumula aproximadamente en un tercio de la dosis inyectada, localizada en la corteza renal

en 30 minutos; los túbulos contorneados del riñón son -- los sitios principales de remoción de la toxina.

La toxina llega a estos sitios por procesos de filtración glomerular y reabsorción tubular; la toxina parece tener afinidad solamente por el borde de cepillo del epitelio tubular. (26)

La enterotoxina desaparece rápidamente del riñón y en 8 horas se elimina por completo.

Se sabe que las células tisulares destruyen la toxina, pero no se conoce como sucede este fenómeno. Se ha comprobado que el riñón es de particular importancia en la remoción de la toxina, pues en los animales con nefrectomía, se presenta una disminución de la velocidad de eliminación de la toxina en sangre.

A parte del riñón, el hígado también participa en la eliminación de la enterotoxina de la sangre; la toxina se concentra principalmente en las células de Kuffer.

En otros órganos, como los pulmones, corazón, bazo, tiroides y cerebro se concentran cantidades muy pequeñas de toxina. (24)

## 12.- Métodos de Determinación para Enterotoxinas.

Un problema al que se han enfrentado los investigadores en el campo de las enterotoxinas, es la falta de métodos prácticos y sensibles, para la demostración y ensayo de las enterotoxinas.

Los investigadores cuentan ahora con dos métodos: Biológicos e Inmunológicos.

### I.- Métodos Biológicos:

a) Inyecciones intraperitoneales o intravenosas en gatos y gatitos.

Esta prueba requiere la inactivación de sustancias que podrían provocar síntomas similares a los cau--

sados por las enterotoxinas cuando se adminintra por --  
vía parenteral.

Una desventaja de usar los gatos como animales de --  
experimentación es que son relativamente insensibles a --  
la enterotoxina C y requieren 50 veces más enterotoxina  
A y B para producir émesis en estos animales. (14, 11)

b). Alimentación a monos rhesus jóvenes.

De las sustancias tóxicas por el estafilococo so  
lamente las enterotoxinas causan émesis en estos anima--  
les.

La prueba consiste en administrar por medio de una  
sonda las enterotoxinas en solución, a monos jóvenes.

Los animales son observados durante 5 horas después  
de la adminintración, si se presenta vómito se acepta co  
mo una reacción positiva a la enterotoxina. (15)

## II.- Métodos Inmunológicos:

Se ha aprovechado la propiedad que tienen las ente-  
rotoxinas de producir anticuerpos en animales de labora-  
torio, para el desarrollo de métodos específicos. (5)

El hecho de que forman un precipitado, cuando el --  
antígeno se mezcla con el anticuerpo, se ha usado como --  
base de varios métodos para demostrar enterotoxinas.

Aunque la reacción antígeno-anticuerpo no necesaria-  
mente indica actividad biológica en muchos casos, sin --  
embargo es adecuada para justificar el uso de reacciones  
inmunológicas en métodos específicos de ensayo.

Entre los métodos que se han propuesto estan los si  
guientes:

a) Prueba en tubo de difusión simple en gel:

Se emplea un tubo en el cual se tiene antitoxina

embebida en el agar, se agrega solución de enterotoxina 5-200 mcg/ml y se observa precipitación en la zona de -- equivalencia.

b) Prueba de precipitación en tubo:

Es una prueba cuantitativa, que se realiza poniendo en contacto a la toxina y a la antitoxina, en el precipitado se analiza nitrógeno total por la técnica de micro-Kjendahl.

c) Prueba de doble difusión en gel:

Se realiza la técnica de Ouchterloni; se detectan entre 5-10 mcg/ml.

d) Prueba en tubo de difusión doble en gel:

Por este método se alcanza a detectar hasta 0.05 mcg/ml de enterotoxina, consiste en poner una placa de agar entre las placas del antígeno y del anticuerpo.

Se emplea para detectar la enterotoxina en extractos de alimentos.

e) Prueba de la inhibición de la Hemaglutinación:

Es un método muy sensible para la investigación de las enterotoxinas. Silverman, Knott y Howard en 1966 emplearon este método en el cual los anticuerpos están unidos a eritrocitos de carnero, haciéndose reaccionar con la solución de la enterotoxina.

La sensibilidad del método es hasta 0.0015 mcg/ml, se lleva a cabo en dos horas.

f) Prueba de Radioinmunoensayo:

Por esta técnica es posible detectar hasta 0.005 mcg de la enterotoxina.

g) Prueba de Anticuerpos Fluorescentes:

Su sensibilidad es de 1 mcg/ml.

h) Técnica de Microplaca:

Esta técnica se usa para la identificación de enterotoxina de pequeñas cantidades de extractos de alimentos o filtrados de cultivos de estafilococos, alcanzándose una sensibilidad de 0.1 mcg/ml.

Una de las ventajas de esta técnica es que utiliza una mínima cantidad de reactivos (alrededor de 0.02 ml - por pozo).

El método empleado depende del tipo de experimento que se vaya a efectuar.

La demostración de enterotoxinas a partir de cepas y de alimentos, requieren una previa extracción de las enterotoxinas, el método empleado principalmente para la extracción a partir de cepas es el de la membrana sobre agar o de Hallender; y para la extracción de los alimentos se emplea el método de Casman y Bennett o el método de Reiser, Conaway y Bergdoll.

Para la identificación del tipo inmunológico se emplea cualquiera de los métodos anteriores.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La intoxicación alimentaria causada por las enterotoxinas estafilocócicas es probablemente la que se presenta con mayor frecuencia en el mundo.

En nuestro país a menudo se detectan brotes con características clínicas de este tipo, existiendo escasa información en cuanto a la frecuencia con que ocurren este tipo de intoxicaciones así como el tipo inmunológico de la enterotoxina causante.

Los criterios que se utilizan en el laboratorio para demostrar la presencia de S. aureus, se basan en la relación que existe entre la producción de coagulasa y la termonucleasa.

Este criterio es útil cuando se lleva control sanitario de rutina en los alimentos; pero cuando se presentan brotes de intoxicación, lo indicado es extraer la toxina del alimento involucrado e identificarlo, con lo cual no quedaría duda alguna de la culpabilidad del alimento.

Por otra parte la calidad sanitaria de los quesos, sobre todo frescos que se consumen tan ampliamente en nuestro país, es muy deficiente, ya que un 30 % se encuentran por arriba del límite de S. aureus permitido (Archivo Dpto. de Microbiología Sanitaria D.N.R.)

En un estudio sobre 81 muestras de quesos hecho por Reyes, H.M.L., de 324 cepas aisladas se encontraron 137 cepas de S. aureus capaces de producir por lo menos un tipo de enterotoxina.

Por lo que es de gran interés conocer la frecuencia con que se pueden encontrar enterotoxinas en este tipo de alimentos

**OBJETIVOS:**

- 1.- Establecer el método para la extracción de Enterotoxina de Staphylococcus aureus en quesos.
- 2.- Conocer la frecuencia con que se presenta la Enterotoxina de S. aureus en los quesos.
- 3.- Identificar los tipos de Enterotoxina para saber cual se presenta más frecuentemente en este tipo de alimentos.
- 4.- Determinar la correlación que existe entre el número de S. aureus y la presencia de Enterotoxina.
- 5.- Producir e identificar la Enterotoxina a partir de cepas aisladas y comparar los resultados obtenidos -- con los del método de extracción de Enterotoxina en el queso.

HIPOTESIS:

Dado que la calidad sanitaria de los quesos sobre todo los frescos es muy deficiente, pues un 30 % de estos tiene un número de S. aureus por arriba del límite permitido (Archivo Dpto. de Microbiología Sanitaria L.M. R.), seguramente se encontrarán presentes entotoxinas en los quesos analizados.

## MATERIAL Y METODOS:

Se analizaron 30 muestras de queso fresco para detectar enterotoxina estafilocócica (Método de Reiser, Conaway y Bergdoll); a su vez se hizo la cuenta de Staphylococcus aureus y se probó para ver si era capaz de producir algún tipo de enterotoxina.

El método de extracción se efectuó a partir de 100 gramos de muestra haciendo varias extracciones y concentrándolo hasta llevar a un volumen de 0.2 ml; el cual se probó con las diferentes antitoxinas.

### a) Material:

El material que se utilizó es el común en un laboratorio de alimentos.

Equipo especial:

- 1.- Liofilizadora
- 2.- Centrífuga Refrigerada de alta velocidad Beckman Modelo J-6

Reactivos especiales:

- 1.- Toxinas y antitoxinas de Staphylococcus aureus las cuales fueron donadas por el Dr. Merlin S. Bergdoll, así como su forma de preparación.

### b) Métodos:

1.- Método Baird-Parker para la cuenta de Staphylococcus aureus. (20), Ver diagrama No. 1 pag No.45.

- 1.- Pesar 10 g de queso y homogenizar con 90 ml de solu-

ción amortiguadora, en un vaso de licuadora estéril, durante 3 minutos.

Esto constituye la dilución 1:10, a partir de esta preparar diluciones mayores, hasta  $1 \times 10^5$ .

- 2.- Trasferir 0.1 ml de cada dilución en cajas petri que contengan agar Baird-Parker.
- 3.- Distribuir el inóculo con una varilla estéril, empleando una para cada dilución.
- 4.- Incubar las cajas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24-48 horas.
- 5.- Realizar el recuento de colonias típicas de S. aureus (colonias negras brillantes, rodeadas de una zona blanca)
- 6.- Tomar 4 colonias típicas de S. aureus por cada alimento y efectuar la prueba de coagulasa y termonucleasa.
- 7.- Determinar si las cepas aisladas son toxigénicas por el método de la microplaca.

## II.- Prueba de la Coagulasa. (17, 20). Ver Diagrama No. 2 y 3 pag No.46, y 47.

- 1.- Sembrar en 0.5 ml de caldo BHI (Infusión, cerebro, - corazón) las colonias seleccionadas de S. aureus (cada colonia típica en diferente tubo).
- 2.- Inocular en 0.5 ml de caldo BHI cepas conocidas de S. aureus y S. epidermidis como testigo positivo y negativo respectivamente.
- 3.- Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

4.- Trasferir 0.3 ml a un tubo estéril para la prueba de la termonucleasa.

5.- Agregar al resto del cultivo 0.2 ml de plasma de conejo diluido 1:1 con solución salina estéril al 0.85 %.

6.- Incubar a 37°C, observar después de 4 horas hasta 6 horas siguientes, como máximo 24 horas, dándose como positiva la prueba en aquellos tubos donde se presentó un coágulo firme bien constituido.

III.- Prueba de la Termonucleasa. (17, 20). Ver --  
diagrama No. 2 pag No.46.

1.- Agregar a un portaobjetos limpio y desengrasado 3 ml de medio agar azul de Toluidina-DNA fundido, esparcirlo por toda la superficie y dejar solidificar.

2.- Hacer perforaciones de 2 mm de diámetro.

3.- Calentar el cultivo de caldo BHI en baño maría a ebullición durante 15 minutos.

4.- Trasferir una gota de cada tubo a un orificio de la laminilla, poner en otros orificios el testigo positivo y testigo negativo respectivamente.

5.- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 4 horas (como máximo 24 horas).

6.- La aparición de un halo rosa alrededor del orificio se considera como una prueba positiva.

IV.- Producción de Enterotoxina a partir de cepas de S. aureus. (30). Ver diagrama No.4 pag.No.48

- 1.- Cortar círculos de papel celofán para diálisis y círculos de papel filtro, humedecerlos con agua destilada y colocar alternativamente en una caja de petri para esterilizar.
- 2.- Colocar los círculos de celofán estériles sobre placas de agar BHI pH 6 sin que se formen burbujas.
- 3.- Distribuir de manera homogénea con un hisopo estéril la cepa aislada del agar Baird-Parker, coagulasa positiva, termonucleasa positiva proliferada en 5 ml de caldo BHI a 37°C por 24 horas sobre el celofán de la placa. (Nota: en total las colonias probadas son 4 por cada alimento analizado).
- 4.- Incubar la placa a 37°C durante 24 horas.
- 5.- Cosechar el crecimiento del microorganismo en 2.5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M moviendo la caja con una varilla de vidrio; y sustraerlo con una pipeta pasteur, pasarlo a tubos de ensaye 13x100.
- 6.- Centrifugar el cultivo obtenido a 3 000 rpm/30 min.
- 7.- Utilizar el sobrenadante transparente para identificar el tipo de enterotoxina.

V.- Método para Extracción de Enterotoxina en Alimentos. (28). Ver diagrama No.5 pag No.49.

- 1.- Pesar 100 g de queso fresco, agregar 140 ml de agua destilada, triturar y homogenizar durante 3 minutos en vaso de licuadora.

- 2.- Agregar 10 ml de HCl 1.0 M, mezclarlo bien y llevarlo hasta un pH final de 4,5
- 3.- Centrifugar a 10 000rpm a 4°C durante 25 minutos.
- 4.- Pasar el sobrenadante a un vaso de precipitados, ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 M.
- 5.- Agregar 15 ml de cloroformo (se agrega 1 ml de cloroformo por cada 10 ml de sobrenadante). Mezclar con agitador magnético durante 3 minutos, centrifugar nuevamente a 10 000 rpm a 4°C durante 25 minutos.
- 6.- Filtrar lentamente el sobrenadante a través de una gaza húmeda, ajustar el sobrenadante a un pH de 4.5 con -- HCl 1.0 M, si se forma algún precipitado, centrifugar -- otra vez y descartar el precipitado.
- 7.- Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 M, si se forma precipitado centrifugar de nuevo y descartarlo.
- 8.- Agregar 30 ml de resina CV-50 con un pH de 5.6 (20ml de resina por cada 100 ml de sobrenadante).  
Preparación de la resina: Pesar 100 g de resina y suspenderla en 1.5 lt de agua destilada. Agregar NaOH 5 M hasta pH 12, agitar durante 1 hora. Lavar la resina varias veces con agua destilada.  
Agregar HCl 6 M hasta pH 2 agitar durante 1 hr. Lavar la resina con agua destilada varias veces hasta que tenga el pH del agua destilada. Agregar solución amortiguadora de fosfatos de sodio a un pH de 5.6. El pH final de la resina debe de ser de 5.6-5.9-
- 9.- Agitar con una barra magnética durante 1 hora a 4°C.



10.- Utilizando un embudo Buchner coleccionar la resina y lavarla con 200 ml de solución reguladora de fosfatos salina pH 5.9, 0.15 M diluido 1:10, descartar el lavado.

11.- Resuspender la resina en 30 ml de solución reguladora de fosfatos 0.15 M con 0.9 % de NaCl, ajustar el pH lentamente con agitación a 6.8; agitar con una barra magnética durante 45 minutos a 4°C.

12.- Usando un embudo Buchner filtrar la resina: -- guardar el eluido y descartar la resina.

13.- Añadir 1 g de agar purificado al eluido y agitar con barra magnética durante 1 hr a 4°C.

14.- Utilizando un embudo Buchner filtrar el agar, recolectar el filtrado, descartar el agar.

15.- Pasar el filtrado a un tubo de diálisis, colocar el saco en una solución de polietilén glicol (20 %) durante toda la noche para concentrar.

16.- Sacar el tubo de diálisis del polietilén glicol y lavarlo con agua tibia. Dejar el saco durante 20 minutos en agua tibia.

17.- Colocar el extracto en un tubo de centrifuga y lavar el saco 3 veces con agua destilada cuidando de que el volumen no sea mayor de 5 ml.

18.- Agregar 0.5 ml de cloroformo al tubo y agitar vigorosamente.

19.- Centrifugar a 7 500 rpm durante 15 minutos. Hacer 4 o 5 extracciones para evitar interferencias en los resultados.

20.- Trasferir la capa acuosa a una frasco pequeño y liofilizar.

21.- Disolver el liofilizado con 0.4 ml de tripsina al 2 %, dejar digerir durante 30 minutos.

22.- Hacer la prueba de microplaca para determinar la presencia de enterotoxina y el tipo de esta.

#### VI.- Identificación de Enterotoxinas.

Técnica de Microplaca. (7) Ver diagrama No.6 pag No.50.

1.- Usar portaobjetos sin lavar, limpios y desengrasados.

2.- Cortar cintas de aislar de aproximadamente 9 cm y envolver los portaobjetos desengradados en ambos extremos, dejando una distancia de 2 cm entre las cintas.

3.- Colocar en la superficie delimitada por las cintas - 0.2 ml de agar al 0.2 %, dejar solidificar.

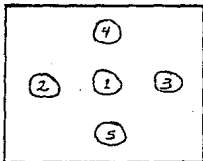
4.- Colocar sobre la película de agar 0.4 ml de agar noble al 1.2 %. (Preparado con 0.85% de NaCl, 0.8 % de bital sódico y merthiolate cristalino 1:10 000) de pH. -- 7.4

5.- Colocar el molde previamente engrasado con silicón - sobre el agar inmediatamente, antes de que solidifique.

6.- Dejar solidificar la placa en cámara húmeda durante 10 minutos.

7.- Una vez solidificada la placa llenar los pozos de la siguiente manera:

El molde tiene 5 pozos los cuales se llenaron con pipetas Oxford.



Pozo 1: Antitoxina patrón

Pozo 4 y 5: Toxinas patrón

Pozo 2 y 3 Muestras problema

8.- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 24 horas.

9.- Quitar el molde de plástico con cuidado de no desprender el agar.

10.- Lavar con agua destilada durante 3 minutos

11.- Sumergir en ácido acético al 1 % durante 3 minutos

12.- Leer con ayuda de una lámpara la presencia o ausencia de bandas de identidad.

RESULTADOS:

32

Tabla No. 1

Cuenta de *S. aureus* en las muestras de quesos frescos estudiados.

Colonias/g	No. de muestras	%	% Acumulado
Menos de 100	3	10.0	10.0
101 - 10,000	1	3.3	13.3
10,001 - 100,000	5	16.6	30.0
100,001 - 200,000	3	10.0	40.0
200,001 - 300,000	2	6.6	46.6
300,001 - 400,000	0	0.0	46.6
400,001 - 500,000	1	3.3	50.0
500,001 - 600,000	0	0.0	50.0
600,001 - 700,000	2	6.6	56.6
700,001 - 800,000	3	10.0	66.6
800,001 - 900,000	0	0.0	66.6
900,001 - 1,000,000	2	6.6	73.2
Más de 1,000,000	2	26.6	99.8
TOTAL	30	100.0	100.0

Tabla ordenada de menor a mayor número de *S. aureus* por gramo de muestra.

Tabla No. 2

Relación Entre Coagulasa y Termonucleasa de S. aureus  
En los Quesos Frescos Analizados.

	No. de Muestra	%
Coagulasa positiva:	24	80
Coagulasa negativa:	6	20
TOTAL:	30	100
Termonucleasa positiva:	27	90
Termonucleasa negativa:	3	10
TOTAL:	30	100

Tabla No. 3  
 Relación de la Presencia de Enterotoxina en el Alimento y en  
 las Cepas Aisladas de Staphylococcus aureus

ENTEROTOXINA			
No. de Muestras	%	Alimento	Cena de <u>S. aureus</u>
6	20.00	Negativa	Negativa
5	16.66	Positiva	Negativa
5	16.66	Negativa	Positiva
14	46.66	Positiva	Positiva
Total 30	100.00	--	--

Tabla No. 4

Relación de las muestras que presentaron enterotoxina en el alimento y en las cepas aisladas de <u>S. aureus</u> .		
No. de Muestra	Enterotoxina del alimento	Enterotoxina de la cepa de <u>S. aureus</u>
1.- (4)	B	ABC
2.- (5)	B	B
3.- (7)	*B	AD
4.- (9)	AB	AB
5.- (10)	B	AB
6.- (12)	A	A
7.- (15)	A	D
8.- (18)	A	AD
9.- (19)	AB	B
10.- (20)	AB	AB
11.- (21)	AB	B
12.- (26)	A	AB
13.- (27)	*B	A
14.- (29)	B	ABD

\*En dos muestras los resultados no fueron completamente claros, por lo que se reportaron como negativos, para la toxina tipo A

Tabla No. 5

Muestras de quesos frescos analizados para detectar la presencia de Enterotoxina estafilococica (S.E.)

		%
Muestras positivas (S.E.)	19	63.33
Muestras negativas	11	36.66
Total de muestras trabajadas	30	100.00

Tabla No. 6

Tipos de enterotoxinas identificadas en las muestras de quesos frescos, así como sus porcentajes.

Tipo	No. de veces que se identificó	%
A	7	36.84
B	8	42.10
C	0	00.00
D	0	00.00
AB	4	21.05
Total	19	100.00

En dos muestras los resultados no fueron completamente claros por lo que se reportaron como negativos, para la toxina tipo A



Tabla. No. 7

Frecuencia de los Diferentes Tipos Inmunológicos de 19  
Cepas Enterotoxigénicas obtenidas de los quesos analizados.

Tipo	No.	%
A	13	39.39
B	11	33.33
C	00	00.00
D	9	27.27
	Total 33	100.00

### ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS:

Se analizaron 30 muestras de quesos frescos de los cuales un 90 %, los que corresponden a 27 muestras, se encontraron fuera de los límites establecidos por la S.S.A. para este tipo de productos (1 000col/g). (20)

El número de Staphylococcus aureus varió desde menos de 100 col/g hasta más de  $1 \times 10^6$  col/g. Ver tabla No.1 pag No.32.

De los 30 quesos frescos analizados, 8 (26.26 %) presentaron cuentas superiores a un millón de bacterias por gramo de alimento, lo que nos indica un alto riesgo de este tipo de productos como posibles causantes de brotes de intoxicación, ya que se ha publicado que se necesita tener una cantidad de 10,000,000 de Staphylococcus aureus por gramo de alimento para poder demostrar dichas enterotoxinas. (21)

También se puede observar en la tabla No. 1 que un 10 % el cual corresponde a 3 muestras, presentaron menos de 100 col/g; es decir que si están dentro de los límites establecidos por la S.S.A. (20); pero viendo los resultados de enterotoxigenicidad, dos de estas muestras - si presentaron enterotoxina en el alimento, indicándonos que son peligrosos para el consumidor, pues el S. aureus encontró las condiciones adecuadas para producir su enterotoxina pero que en algún momento durante la elaboración del alimento el S. aureus murió quedando su enterotoxina, la cual es termestable. (30, 31)

Como se puede ver en la tabla No. 2 pag No.33, con respecto a la prueba de coagulasa se obtuvo un 80 % de positividad la que está un poco abajo del valor obtenido por Lachica que es de un 93 %, con respecto a la prueba de la term nucleasa se obtuvo un 90 %, también un poco - abajo del obtenido por Lachica que fue del 95%. (12, 13)

Observando ambos resultados se puede ver que las - dos pruebas son útiles como un índice de contaminación - con S. aureus, notándose que la prueba de la termonuclea - sa tiene mejor relación con el Staphylococcus aureus que la prueba de la coagulasa, ya que en nuestro caso un --- 10 %, el que corresponde a 3 muestras dieron coagulasa - negativa, termonucleasa positiva, y si solo se realizara la prueba de la coagulasa, estas muestras se descarta--- rían como posibles contaminantes de S. aureus, pues en - la mayoría de los laboratorios la prueba de la coagulasa se utiliza como una prueba de identificación definitiva.

Pero se ha intentado correlacionar la producción - de enterotoxinas con la producción de coagulasa, termonu - cleasa y la fermentación de manitol, habiéndose comproba - do que ninguna propiedad única, ni combinación de propie - dades constituye un índice absolutamente fiable de ente - rotoxicidad. (14)

Pero de acuerdo a porcentajes, para la prueba de - coagulasa (93 %) y la termonucleasa (95%); dados por La - chica; (12, 13) estas pruebas de acercan más en la obten - ción de S. aureus enterotoxigénico, de ahí que se sugie - ra la realización de ambas pruebas para no correr el --- riesgo de dar una muestra contaminada con S. aureus pro - ductor de enterotoxinas como negativo.

En la realización de la coagulasa se empleó plasma de conejo para evitar cualquier tipo de interferencias. (32).

En la tabla No.3 pag No.34se observa que en 5 mues - tras (16.66 %) se encontró enterotoxina en el alimento y las cepas aisladas no fueron capaces de producir ningún tipo de toxina, debido probablemente a que el S. aureus no fue capaz de sobrevivir, pero su enterotoxina persis - te debido a que es termorresistente. (30)

Esto es muy importante ya que cuando se utiliza al

S. aureus como índice de contaminación, pero sobre todo si la cuenta está dentro de los límites permisibles, este alimento se tomaría como no riesgoso, como es el caso de dos muestras que tuvieron una cuenta de S. aureus de menos de 100 col/g.

Los tipos serológicos identificados en estas cinco muestras fueron: B; A; A; B; y A, siendo el más frecuente el tipo A.

Un 16.66 %, el cual corresponde a 5 muestras, fueron negativas en el alimento y positivas en la cena, obteniéndose los siguientes tipos serológicos: D; AB; D; - ABD; y AD, de las cinco muestras en cuatro se encontró toxina D, en tres el tipo A y en dos el tipo B, siendo el más frecuente el tipo D, luego el A y por último el B.

En tres muestras se encontró más de un tipo de toxina (ABD), lo que concuerda con la literatura ya que no se ha encontrado cepas productoras de más de tres tipos diferentes de enterotoxina. (18, 20, 30)

En esta misma tabla se puede ver que un 46.66 % de las muestras analizadas se encontró enterotoxina en el alimento así como las cepas aisladas fueron capaces de producir algún tipo de toxina.

En la tabla No.4 pag No.35 se describe con detalle el 46.66 % de muestras positivas para la presencia de enterotoxinas.

Se puede notar que los tipos serológicos identificados en el alimento concuerdan con los obtenidos por las cepas aisladas, es decir que el Staphylococcus aureus encontró las condiciones adecuadas tanto de humedad, pH, y temperatura (24) para reproducirse y elaborar su toxina en cantidad suficiente para ser detectada por el método de microplaca, notándose que en algunas muestras se detectaron más de un tipo serológico de enterotoxina.

En tres muestras los resultados son diferentes: --

pues una de estas tres muestras presento toxina tipo A - en el alimento y toxina tipo D en la cepa aislada, esto se puede deber a que para aislar una cepa de S. aureus e identificar el tipo inmunológico de enterotoxina se seleccionaron al azar cuatro colonias del medio Baird-Parker, es decir que las que se seleccionaron pudieron ser cepas no productoras del tipo ya identificado en el alimento, es decir el tipo A.

En dos de estas tres muestras a las cuales se les puso un asterisco, el resultado en el alimento fue un poco dudoso, ya que si se formó banda de precipitación al tipo serológico A, pero no se cerró el cuadro, por lo -- que los resultados se dieron como negativos. (21)

El tipo serológico más frecuente en el alimento se da a continuación en orden decreciente: B; A; aquí no se logró identificar los tipos serológicos C y D.

En las cepas aisladas de Staphylococcus aureus el tipo serológico más frecuente fue el A luego el B y por último el D.

Por lo tanto de las 30 muestras de queso fresco -- analizados el 63.33 % contenían enterotoxina. Tabla No.5 pag No.36 .

En total como se puede ver en la tabla No. 6 pag No. 36, se obtuvo en el alimento un 36.84 % del tipo serológico A, un 42.10 % de B, y un 21,05 % de AB.

Notándose que el origen de la contaminación de estos alimentos fueron de cepas de origen humano, posiblemente en la elaboración o con un mal manejo del producto por el operador, ya que de acuerdo con la literatura la toxina A proviene de cepas de origen humano, y la enterotoxina B proviene tanto de cepas humanas como animales. (33, 28).

En las cepas aisladas de S. aureus fue de un 39.39 por ciento para A, 33.33 % para B y un 27.27 % para D. -- Ver tabla No. 7 pag No. 37 .

Con estos resultados se deduce que el origen de la contaminación del alimento fue tanto humana como animal, pues las enterotoxinas C y D provienen de cepas animales (vacas enfermas de mastitis). (33)

Por lo tanto, el papel que desempeña la manipulación humana es muy importante pues la mayoría de tipos inmunológicos de enterotoxina que se lograron identificar son de origen humano.

CONCLUSIONES:

1.- La técnica de extracción de enterotoxina directa del alimento fue satisfactoria, ya que se obtuvo un - 63.33 % de positividad.

2.- El método de extracción de enterotoxina directa del alimento es bueno, pero solo se recomienda cuando se encuentren alimentos involucrados en brotes de intoxicación alimentaria.

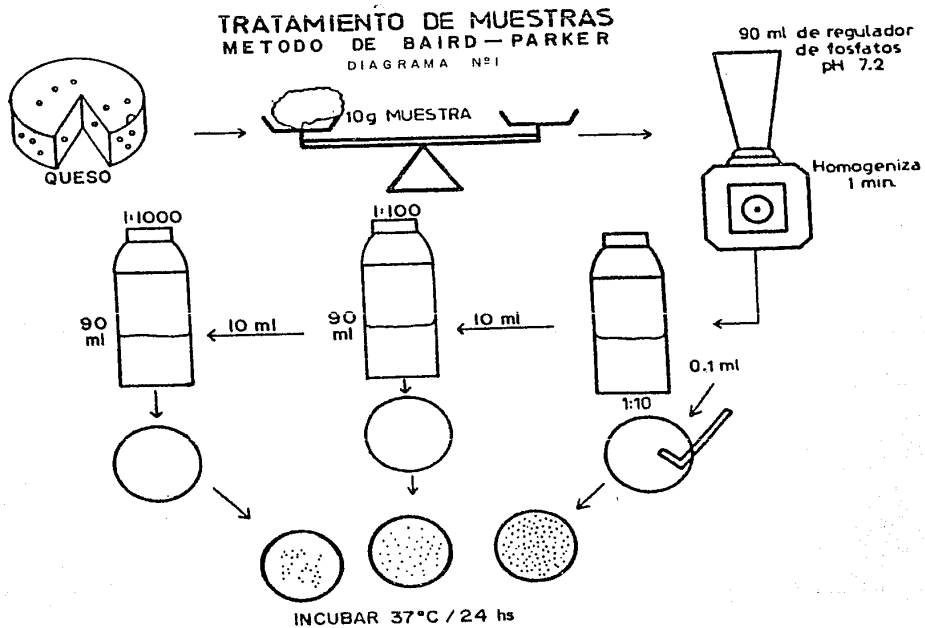
3.- No se recomienda la realización de este método de extracción como una prueba de rutina en los alimentos, debido a que es muy laboriosa, no es una prueba rápida y se requiere de equipo especializado así como de reactivos que no se encuentran disponibles en el mercado.

4.- De las 30 muestras, 27 (90 %) contenían un número elevado de Staphylococcus aureus, por lo que el recuento de este microorganismo basado en la realización de la prueba de la coagulasa así como la de la termonucleasa sigue siendo un buen indicador del riesgo potencial de que el alimento pueda contener enterotoxinas.

5.- Los tipos inmunológicos de enterotoxina aislados más frecuentemente fueron el A y el B, lo que una vez más nos confirma que el papel desempeñado por el manipulador es muy importante como una fuente de contaminación del alimento y este a su vez cause intoxicación alimentaria.

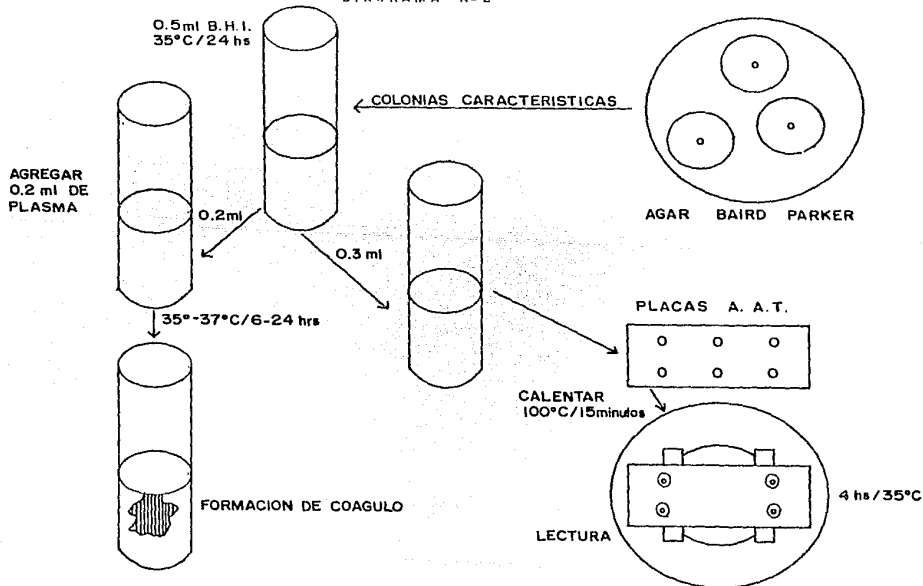
APENDICE





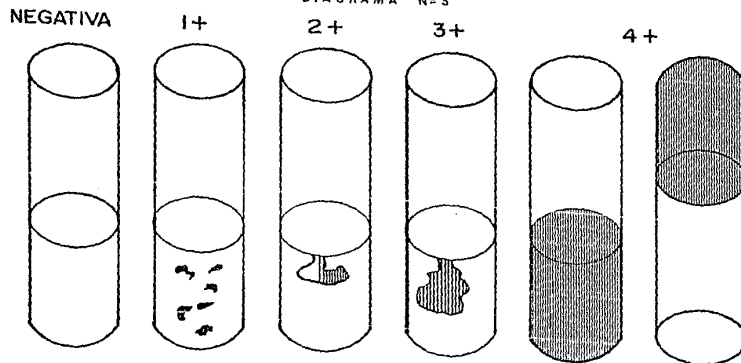
# PRUEBAS COAGULASA Y TERMONUCLEASA

DIAGRAMA N°2



## PRUEBA DE LA COAGULASA

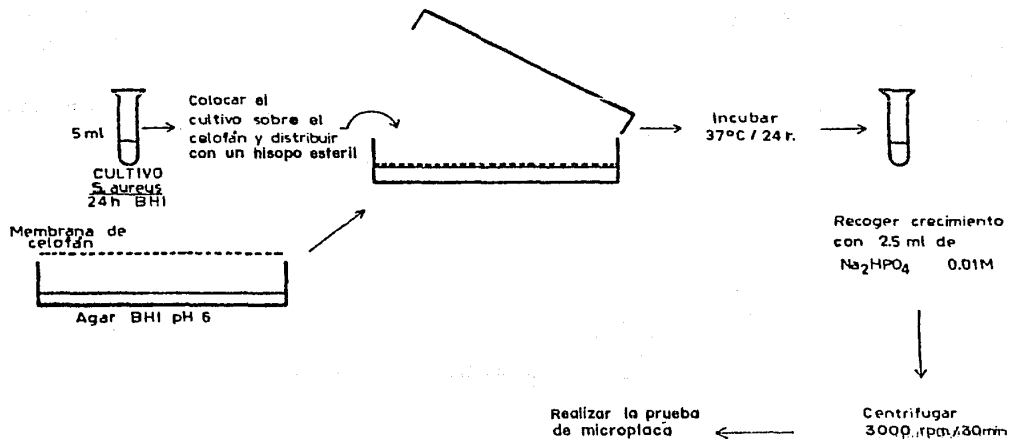
DIAGRAMA N° 3



- NEGATIVA — NINGUNA EVIDENCIA DE FORMACION DE FIBRINA
- (1+) — PEQUEÑOS COAGULOS NO ORGANIZADOS
- (2+) — PEQUEÑOS COAGULOS ORGANIZADOS
- (3+) — GRANDES COAGULOS ORGANIZADOS
- (4+) — COAGULO PERFECTAMENTE FORMADO
- NO SE DESPRENDE AUN INVERTIDO EL TUBO

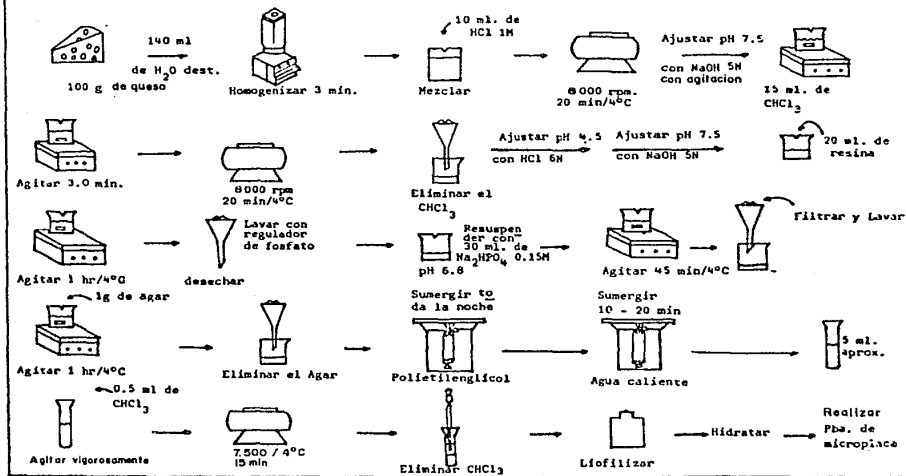
# PRODUCCION DE ENTEROTOXINA

DIAGRAMA N°4



Extracción De Enterotoxina Directamente de Alimentos

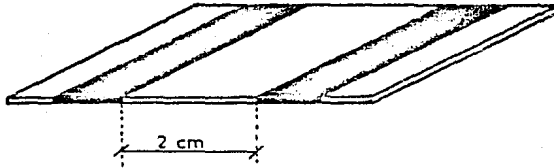
DIAGRAMA N° 5



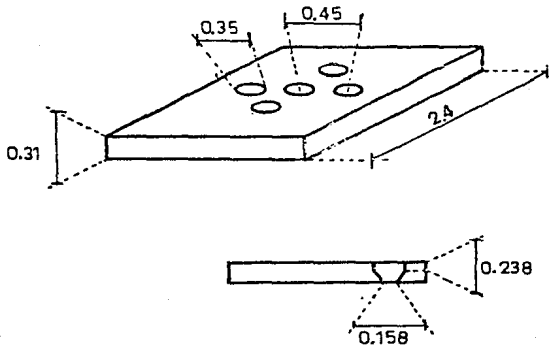
## PORTAOBJETOS CON UN AREA DELIMITADA

## CON CINTA PLASTICA

DIA GRAMA Nº 6



## CROQUIS DEL MOLDE DE PLASTICO



Acotaciones en centímetros

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- APHA 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. Editor Marvin L. Speck. Chapter 31 y 32.
- 2.- Baird-Parker, A.C. 1962 An Improved diagnostic - and Selective medium for isolating coagulase positive -- Staphylococci J. Appl. Bacteriol. 25:12-19
- 3.- Baird-Parker, A.C. 1974 Family I Micrococaceae. En Bergey's Manual of determinative bacteriology 8<sup>a</sup> edición, Editado por R.S. Buchanan y N.E. Giggins. Williams, Co. Baltimore U.S.A. pp: 478-489
- 4.- Banwart, J.G. 1979 Basic Food Microbiology. Avi. Pub. Co. Inc. Westport, Connecticut, E.U.A. pp 226-250.
- 5.- Bergdoll, M.S. 1972. The Enterotoxin. En the --- Staphylococci Editado por J.D. Cohen Wily Interscience. pp: 101-131
- 6.- Casman, E.P., Bennett, R. V., Dorsey, A.E. and Essa, J.A. 1967 Identification of fourth Staphylococcal Enterotoxin, enterotoxin D.J. Bacteriol 94:1875-1882
- 7.- Casman, E.P., Bennett W., Dorsey, E.J. And Stone, E. 1969 The microslide gel double diffusion test for the detection and assay of Staphylococcal enterotoxin. Health Lab. Sci. 6:186-190
- 8.- Casman, E.P., M.S. Bergdoll and Robinson 1963. Designation of Staphylococcal enterotoxin J. Bacteriol 85:715-716
- 9.- Davis, B.D., R. Dulbecco., H.M. Eisen, H.S. Ginsber and W.B. Wood. 1977 Tratado de Microbiología Editorial Salvat Editores S.A. pp774-780
- 10.- Dalk Stephen: Staphylococcus piogenes A Relation to Triose Editorial Eslivingstone T.T.D. Edimburg -

London 1959

- 11.- Felix Burgos G. Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis Manual de Bacteriología Médica 1987 E.N.C.B..I.P.N. México D.F. 4<sup>a</sup> ed. pp:150-156
- 12.- Gilbert, R.J. 1974 Staphylococcal food poisoning and botulism postgrad J. Med. 50:607-611
- 13.- Harrow Benjamin y A. Manzor; Tratado de Biotecnología Editorial Interamericana S.A. 6<sup>a</sup> ed. México D.F 1999
- 14.- International Commission on Microbiological -- Specification for Food (ICMSF) 1978 Sampling for Microbiological Analysis; principles and specific applications 2<sup>a</sup> Ed of the University of Toronto, press association of microbiological societies.
- 15.- Jay, L.M. 1970 Moderna Food Microbiology. Van Nostrand Reinhol. Co. USA pp:194-214
- 16.- Lachica Victor F.R., 1980 Accelerated Procedure for the Enumeration and Identification of Food-Borne. Staphylococcus aureus Appl. Microbiol. 19:17-19
- 17.- Lachica F.V.R., Barry, A.L., and Atchison, F.W. -- 1973 Identification of Staphylococcus aureus by simultaneous use of tube coagulase and deoxyribonuclease tests. Appl Microbiol. 25:496-497
- 18.- Lachica, F.V.R., K.F. Weiss and R.H. Deibel 1969 Relationship among coagulase, enterotoxin and heat stable deoxyribonuclease production by Staphylococcus aureus Appl. Microbiol. 18:126-127
- 19.- Lachica F.V.R., P.D. Hoepflich., and C. Genigeorgis 1971 Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting Staphylococcal nuclease activity Appl. Microbiol. 21:585-587



20.- Manual de Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos 1984 Dirección General de Laboratorios de Salud Pública. S.S.A. México D.F.

21.- Merrill, T.C. and Sprinz, H. 1968 The effect of Staphylococcal enterotoxin on the fine structure of the monkey jejunum. Lab. Invest. 118:114-123

22.- Minor, F.E. and Marth, E.H. 1971 Staphylococcus aureus and Staphylococcal food intoxication. A. Review -- Part I j. Milk Food Technol. 34:557-564

23.- Minor, T.E. and Marth, E.H. 1976 Staphylococci - and Staphylococcal enterotoxin in Food . Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam Holanda

24.- Montie, C.T. and Solomon, K.S. 1970. Microbiol. Toxins Vol II Bacteriol Proteins Toxins. Academic Press. New York and London Chapter 7

25.- Raj, H. and Bergdoll, M.S. 1969 Effect of enterotoxin B on human volunteers. J. Bacteriol. 98:833-834

26.- Ramirez, V.M.P. 1981 Relación entre las pruebas de Coagulasa , Term nucleasa y producción de Enterotoxinas de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de productos cárnicos E.N.C.B..I.P.N. México D.F.

27.- Reiman, H. 1969 Food-borne Infection and Intoxication A.P. New York London pp:114-118

28.- Reiser, R.D. Conaway and M.S. Bergdoll 1974 Detection of Staphylococcal enterotoxin in food Appl. Microbiol. 27:83-85

29.- Reyés, H.M.L. 1981. Determinación de la Enterotoxigenicidad de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de quesos E.N.C.B..I.P.N. México D.F.

30.- Robbins, R., S. Gould, and Bergdoll, M.S. 1974. Detecting the enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains. Appl. Microbiol. 28:946-950

31.- Sandoval, B.E. 1985 Correlación entre la prueba de la Termonucleasa y la Presencia de Enterotoxinas de Staphylococcus aureus a partir de Alimentos (carnicos y lacticos) Contaminados con este microorganismos. E.N.C.B. I.P.N. México D.F.

32.- Secretaría de Salubridad y Asistencia 1974. -- Proyectos de Normas Microbiológicas y químicas para el control Sanitario I

33.- Shemano, I., Hilches, J.M. 1967. Paradoxical intestinal inhibitory effects of Staphylococcal enterotoxin. Gastroenterol. 53:71-77

34.- Stiles, M.E. and Clark, P.C. 1974. The reliability of selective medio for the enumeration of unheated -- and heated Staphylococci Can. J. Microbiol. 20:1735-1744

35.- Sargalla, M.J., M.S. Bergdoll and Dack, G.M. 1957 Some observation on the assay of Staphylococcal by the -- Monkey feeding test. J. Lab. Clin. Med. 41:782-786