



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

EVALUACION DE UN METODO RAPIDO Y DIRECTO
PARA LA DETERMINACION DE LA ENZIMA TERMO-
NUCLEASA EN QUESOS FRESCOS COMO POSIBLE
INDICIO DE LA PRESENCIA DE Staphylococcus aureus.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
CELSO RUBEN GONZALEZ AGUILAR

Director de Tesis Q.F.B. Martha A. Pérez Reyes
Q.F.B. Luz María Nava Fernández

México, D. F.

Mayo de 1987



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

	Pág.
1.- TITULO	1
2.- INTRODUCCION	2
2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.....	2
2.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE <u>S. aureus</u>	2
2.2.1. HABITAT.....	3
2.2.2. TEMPERATURA.....	3
2.2.3. pH.....	3
2.2.4. CONCENTRACION DE SAL.....	4
2.2.5. CONCENTRACION DE AZUCAR.....	4
2.2.6. DESECACION.....	4
2.2.7. RESISTENCIA A AGENTES QUIMICOS.....	4
2.2.8. COMPETENCIA CON OTROS MICROORGANISMOS.....	5
2.3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR EL CONTACTO Y/O INGESTION DE <u>S. aureus</u>	5
2.4. CARACTERISTICAS DE AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE <u>S. aureus</u>	6
2.4.1. DISPOSICION DE LAS CELULAS EN LA TINCION DE GRAM DE UN CULTIVO EN CALDO.....	7
2.4.2. ASPECTO DE LA COLONIA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO TALES COMO AGAR BAIRD-PARKER, AGAR VOGEL-JOHNSON Y STAPH 110.....	7
2.4.3. TIPO DE HEMOLISIS EN AGAR SANGRE.....	9
2.4.4. PRODUCCION DE PIGMENTO.....	9
2.4.5. PRUEBAS BIOQUIMICAS DIFERENCIALES DE <u>S. aureus</u>	9
2.4.5.A. PRUEBA DE CATALASA.....	10
2.4.5.B. CAPACIDAD DE DESARROLLAR EN PRESENCIA DE CLORURO DE SODIO AL 6.5%.....	10
2.4.5.C. CAPACIDAD DE DESARROLLAR EN MEDIOS A 10°C Y A 45°C.....	10
2.4.5.D. PRUEBA DE FERMENTACION DE AZUCARES (MANITOL Y GLUCOSA).....	10
2.4.5.E. PRUEBA DE REDUCCION DE TELURITO.....	11
2.4.5.F. PRUEBA DE FOSFATASA.....	11
2.5. METABOLITOS BACTERIANOS PRODUCIDOS POR <u>S. aureus</u>	11
2.5.1. EXOTOXINAS (HEMOLISINAS).....	12
2.5.2. ENTEROTOXINAS.....	12
2.5.3. METABOLITOS NO TOXICOS.....	13
2.5.3.A. COAGULASA.....	14
2.5.3.B. TERNONUCLEASA.....	15
2.6. PROPIEDADES METACROMATICAS DEL AZUL DE TOLUIDINA.....	16
2.7. MEZCLA DE AZUL DE TOLUIDINA-DNA-AGAR (TDA).....	17

2.8. RELACION ENTRE LA TERMONUCLEASA, COAGULASA, ENTEROTOXINA Y NUMERO DE COLONIAS DE <u>S. aureus</u>	17
2.9. RELACION DE LA TERMONUCLEASA CON RESPECTO AL DIAMETRO DEL HALO.....	18
2.10. COMPARACION DEL METODO DE LA MICROPLACA METACROMATICA POR DIFUSION EN AGAR (MAD) CON OTROS METODOS SIMILARES.....	19
3.- FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	31
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
5.- OBJETIVOS.....	35
6.- HIPOTESIS.....	36
7.- MATERIAL Y METODOS.....	37
8.- REACTIVOS.....	37
9.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	38
9.1. CONSIDERACION PREVIA.....	38
9.1.1. TOMA DE MUESTRA.....	38
9.2. DESARROLLO DEL TRABAJO.....	38
9.2.1. METODO DE EXTRACCION DE TERMONUCLEASA.....	38
9.2.2. DETECCION DE TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.....	38
9.2.3. DETECCION DE TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.....	39
9.2.4. DETECCION DE LA ENZIMA COAGULASA.....	39
10.- RESULTADOS.....	44
11.- DISCUSION DE RESULTADOS.....	59
12.- CONCLUSIONES.....	61
13.- PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.....	63
14.- ANEXOS.....	64
14.1. PREPARACION Y ESTANDARIZACION DE SOLUCIONES.....	64
14.2. PREPARACION Y ESTANDARIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	64
14.3. TECNICAS ADICIONALES.....	66
15.- BIBLIOGRAFIA.....	69

1.- T I T U L O

Evaluación de un método rápido y directo para la determinación de la enzima termonucleasa en quesos frescos, como posible indicio de la presencia de Staphylococcus aureus.

2.- INTRODUCCION.

2.1. Antecedentes historicos.

La palabra Staphylococcus se deriva del nombre griego Stahylé que significa "racimo de uvas" y coccus que quiere decir "granos o bayas".

Roberto Koch en 1878, fué el primero en descubrir el estafilococo en un pus humano, y unos años después en 1880, Luis Pasteur descubrió el germen como "un organismo formado por pequeños puntos esféricos reunidos en parejas de dos granos, pero frecuentemente asociados en pequeños acúmulos". A partir de 1884, Rosenbach hizo un estudio detallado del mismo y los nombró Staphylococcus describiendo las variedades de pigmentación como doradas, blancas y naranjas. De aquí los nombres de aureus, albus y citreus respectivamente.(11).

En 1914, Barber aisló el estafilococo a partir de la leche de una vaca enferma de mastitis.

Dark, en la Universidad de Chicago en 1930, logró hacer crecer el microorganismo en cultivo puro, mientras que Jordan en ese mismo año obtuvo filtrados estériles del cultivo, los cuales al ser ingeridos por voluntarios humanos produjeron síntomas característicos de gastroenteritis.(12).

Desde 1884, en taxonomía, los estafilococos fueron puestos dentro de la familia Micrococcaceae y en 1965, mediante una prueba de fermentación de glucosa se distinguieron los géneros Staphylococcus y Micrococcus y se convino en que el género Staphylococcus podría contener la mayoría de los cocos Gram positivos, patógenos, anaeróbios facultativos, que producen ácido de glucosa bajo condiciones anaeróbicas; y el género Micrococcus que comprendería la mayoría de los cocos Gram positivos, saprofíticos aeróbios, que producen ácido de glucosa en aeróbiosis, no así en anaeróbiosis.(17,18,36).

El manual de Bergey en 1974, describe el género Staphylococcus como aquel que comprende las especies de Staphylococcus aureus que fermentan el manitol y son coagulasa positivos, Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus saprophyticus que no fermentan manitol y son coagulasa negativos.(8,35).

2.2. Características generales de S. aureus.

Actualmente el S. aureus se define como un coco Gram positivo, patógeno, aeróbio facultativo, fuertemente catalasa positivos, inmóviles, que no forman esporas. Miden generalmente de 0.8 a 1.0 micras de diámetro (ocasionalmente exceden las 2 micras de diámetro). Su actividad mínima de agua (Aw) que permite su desarrollo aeróbicamente es de 0.86.

Las características más comunes que diferencian al S. aureus de otras especies son: 1) La habilidad del S. aureus de crecer en presencia de concentraciones específicas de cloruro de sodio, 2) La forma y apariencia de colonias de S. aureus (morfología microscópica), 3) Capacidad de producir productos metabólicos capaces de hidrolizar sustratos tales como yema de huevo o DNA y, 4) Producción de una sustancia que coagula el plasma.(9,16,17,36).

A continuación se describen algunas características más importantes de S. aureus:

2.2.1. Habitat.

S. aureus es un germen ampliamente diseminado en la naturaleza; es posible aislarlo del aire, del agua, del suelo, del pus, de las membranas nasales, de los folículos capilares, de la piel y del perineo de los animales de sangre caliente. Puede formar parte de la flora normal de la piel y de las mucosas del hombre; en tanto que otros estafilococos provocan supuraciones y abscesos. Por ser los estafilococos organismos causantes de forúnculos y granos, no debe sorprender que los casos de intoxicación alimentaria tengan este origen. Los alimentos más comúnmente responsables son aquellos cuya preparación requiere de extensa manipulación.(9,17,35,36).

2.2.2. Temperatura.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque se desarrollan a cualquier temperatura entre 10 y 47°C.

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

Minor y Marth, reportarán escape de constituyentes intracelulares cuando se almacenó S. aureus en baño maría a temperatura mayor de 50°C, lo que implicó un daño a nivel de membrana celular; a 60°C el perjuicio aumentaba.(9,17,36).

2.2.3. pH.

El pH óptimo de crecimiento de S. aureus se encuentra entre 7.0 y 7.5, aunque puede crecer también a un rango de pH que va de 4.2 a 9.3.

Los estafilococos se muestran sensibles a la presencia de ácidos. Se reportaron en orden decreciente de efectividad: acético, láctico, tartárico, clorhídrico y bórico.(Minor y Marth).(9,17,36).

2.2.4. Concentración de sal.

Los estafilococos pueden ser cultivados en medios que contengan 7.5% de cloruro de sodio. Sin embargo S. aureus muestra diferentes grados de sensibilidad a la sal. Nunheimer y Fabian, citados por Minor y Marth 1971, observaron que a concentraciones de sal de 15% a 20% y a 37°C se inhibía el crecimiento de S. aureus, mientras que a concentraciones de 20 a 25% eran bactericidas. El efecto de la concentración de sal se ve influido por el pH. Genigeorgis y Sadler notaron buen crecimiento de S. aureus a pH de 6.9 y 16% de sal en caldo a 37°C; pero a pH de 5.1 y 16% de sal, las células no sobrevivieron.

Existe una relación entre el valor del pH y la concentración de cloruro de sodio para permitir el crecimiento de S. aureus. Si se varían los valores de pH y la concentración de sal, es posible demostrar que a medida que aumenta la concentración de sal se hace necesario un pH más básico, para permitir el crecimiento de S. aureus. (9,15,27,35).

2.2.5. Concentración de azúcar.

El estafilococo es resistente a elevadas concentraciones de azúcar. Hucker y Haines 1971 notaron crecimiento vigoroso en una solución de azúcar por arriba del 50% durante las primeras 24 horas de crecimiento y Nunheimer y Fabian reportaron que concentraciones de sacarosa de 60% a 70% y de dextrosa del 40% al 60% tenían acción bactericida. (17,36).

2.2.6. Desecación.

Los estafilococos, cuando están sobre papel o telas pueden sobrevivir durante muchas semanas. Debido a que son resistentes a la desecación, es frecuente encontrarlos sobreviviendo en el polvo y en objetos que están en cuartos deshabitados. (17).

2.2.7. Resistencia a agentes químicos.

S. aureus tiene un elevado grado de tolerancia con respecto a compuestos tales como telurito, cloruro mercúrico, neomicina, polimixina, azida de sodio, etc.; por tal motivo estas sustancias se usan como base en medios selectivos.

Los nitratos y nitritos usados en carnes curadas no tienen efecto sobre la producción de enterotoxina y son escasamente potentes como antimicrobianos a la concentración usual de 100 ppm.

Por otra parte el cloramfenicol inhibe la producción de enterotoxina B. La penicilina, la D-cicloserina y bacitracina afectan la síntesis de la pared celular en diferentes sitios, de esta forma se impide la formación de enterotoxina. Además, S. aureus es afectado por sustancias tales como: Fosfato ácido de potasio, cloruro de potasio, fluoruro de sodio y fosfato de espermina. (9,10,13,17).

2.2.8. Competencia con otros microorganismos.

El desarrollo de S. aureus en su temperatura óptima disminuye cuando tiene que compartir con la flora normal del alimento, debido a que ésta ofrece protección contra el crecimiento por estafilococos y produce un efecto antagónico por la competencia de nutrientes (como biotina y niacina), y la modificación del medio ambiente.

Las bacterias antagónicas a S. aureus incluyen enterobacterias, Lactobacillus, Pseudomonas, S. epidermidis, etc..(17).

S. aureus es muy sensible a organismos competidores, pues estos últimos previenen la formación de niveles detectables de enterotoxina. Se demostró que el ácido láctico y el peróxido de hidrógeno producidos por la competencia pueden inhibir el crecimiento de S. aureus.(9,17,37).

2.3. Infecciones producidas por el contacto y/o ingestión de S. aureus.

En la producción de las infecciones estafilocócicas juegan un papel importante tanto los productos extracelulares de S. aureus, como factores ambientales (hábitat y diseminación), así como también factores predisponentes del huésped como son: lesiones de la piel, infecciones virales como sarampión e influenza, defectos leucocitarios, defectos en la fagocitosis, deficiencia en la inmunidad humoral, etc.

Todo lo anterior se requiere para que se presente la enfermedad infecciosa, en la cual S. aureus puede diseminarse con extensión a tejidos contiguos o a través de vasos linfáticos.

Cuando S. aureus se presenta en infecciones de piel y músculo esquelético, se presenta con reacción inflamatoria aguda y acumulación de enormes cantidades de neutrófilos, dichas lesiones tienden a formar paredes mediante el depósito de fibrina, observándose trombosis de los pequeños vasos sanguíneos y esto conduce a necrosis del exudado inflamatorio actuando las DNAsas, coagulasa y otras enzimas estafilocócicas en la formación del pús, y esto puede ocasionar absceso.

Entre las infecciones estafilocócicas producidas en piel y músculo esquelético tenemos: Foliculitis, Forunculosis, Hidradenitis supurada, Ectima, Impétigo, Necrólisis epidérmica tóxica, Carunco o Antrax, Infecciones de la glandula mamaria e infecciones metastásicas, Abscesos en organos internos, Faringitis, Infección de heridas.

En el caso de que S. aureus o alguno de sus productos se ingiera por medio de algun alimento contaminado, los sintomas son totalmente diferentes, presentandose generalmente vómito, a menudo del tipo de vómito en proyectil, salivación, náuseas, espasmos abdominales de diversa intensidad y diarrea.

Vómitos y heces en los casos graves son a veces sanguinolentos y contienen mucosidad. Con frecuencia se presentan dolores de cabeza, calambres musculares, sudoración, escalofríos, postración, pulso débil y shock.

Estos síntomas se producen debido a que la enterotoxina es ingerida y absorbida en el intestino y transportada por la sangre al SNC en donde estimula los centros de motilidad intestinal.

El periodo de incubación (tiempo transcurrido desde el consumo de los alimentos hasta la aparición de los primeros síntomas) suelen ser de dos a tres horas (oscilando entre 1 y 6), a diferencia de otras toxiinfecciones alimentarias que tienen periodos de incubación considerablemente superiores. (9,16,41).

2.4. Características de aislamiento y determinación de S. aureus.

En general las técnicas de identificación y diferenciación de especies para los estafilococos varía entre los diferentes laboratorios, pero en general las pruebas más comunes llevadas a cabo son las siguientes:

- 1).-Disposición de las células en la tinción de Gram a partir de la muestra.
- 2).-Aspecto de la colonia en medios de cultivo tales como Agar Baird-Parker, Agar Vogel Johnson y Agar Staph 110.
- 3).-Tipo de hemólisis en Agar Sangre.
- 4).-Producción de pigmento.
- 5).-Algunas pruebas bioquímicas diferenciales como son:
 - a).-Capacidad de desarrollar en presencia de cloruro de sodio al 6.5%.
 - b).-Capacidad de desarrollar en medios a 10°C y a 45°C.
 - c).-Capacidad de hidrolizar ciertos compuestos como gelatina, almidón y arginina.
 - d).-Capacidad de desarrollar en medios con bilis al 40%.
 - e).-Prueba de catalasa.
 - f).-Prueba de coagulasa.
 - g).-Prueba de termonucleasa.
 - h).-Prueba de fermentación de azúcares en anaeróbiosis (glucosa y manitol).
 - i).-Prueba de producción de enterotoxinas.
 - j).-Prueba de reducción de telurito.
 - k).-Prueba de fosfatasa.
 - l).-Prueba de sensibilidad a antibióticos como polimixina, neomicina y novobiocina.
 - m).-Prueba de desarrollo en medio de tioglicolato.

A continuación se explican brevemente algunas de estas pruebas dada su importancia en la identificación de S. aureus :

2.4.1. Disposición de las células en la tinción de Gram de un cultivo en caldo.

Para la observación microscópica de S. aureus, se requiere de un cultivo de la muestra a investigar, (ya sea de material clínico o bien de alimentos), el cual se obtiene al sembrar la muestra en un medio de caldo nutritivo, e incubar a 37°C durante 24 hr. De este cultivo se realiza un frotis y se tñe por medio de la técnica de Gram, la cual se basa en que las bacterias Gram positivas poseen varias características que ayudan a diferenciarlas de los microorganismos Gram negativos. De fundamental importancia es el elevado contenido de glucopeptidos y el menor contenido lipídico de sus paredes celulares. Los alcoholes y otros solventes orgánicos no penetran las paredes celulares deficientes en lípidos de las células Gram positivas (por ejemplo S. aureus). Esto permite que los organismos Gram positivos retengan el colorante cristal violeta en la tinción de Gram. S. aureus, cuando se tñe mediante la técnica de Gram, retiene el cristal violeta y aparecen como esferulas azules o moradas agrupados generalmente en racimos. (ver tabla No. 1). (16,18).

2.4.2. Aspecto de la colonia en los medios de cultivo tales como Agar Baird-Parker, Agar Vogel Johnson y Staph 110.

Los primeros estudios sobre el diagnóstico y medios selectivos para aislamiento y enumeración del estafilococo en alimentos, se ha realizado desde 1936 por Chapman y en 1942, Koch, los cuales condujeron al desarrollo del primer medio diferencial de sal, al aprovechar las características halofílicas del germen. En 1946 Chapman desarrollo el medio No. 110 y el medio Chapman's Stone, ambas contenían sal e incorporaban la reacción gelatinolítica llamada "reacción de Stone".

En 1949, Ludlam reportó el uso del telurito de potasio como un agente de diagnóstico y selectivo para estafilococos. En 1960, el Agar Vogel Johnson apareció como resultado de la adición de LiCl y el telurito de potasio al agar sal manitol.

Estos métodos difieren principalmente en el tipo de agentes selectivos utilizados en el medio de aislamiento como son NaCl, telurito de potasio, LiCl, glicina, azida de sodio, polimixina, etc.

El Agar Baird-Parker ha sido el avance más reciente en el desarrollo de medios selectivos para estafilococo coagulasa positivos en el cual se utilizó la adición de yema de huevo como un agente diagnóstico. Este medio se fundamenta como ya se mencionó anteriormente en su contenido de yema de huevo en donde la gran mayoría de cepas de S. aureus utilizan la lipovitelina, que es una lipoproteína presente en la yema de huevo, lo que trae como consecuencia la formación de zonas claras transparentes alrededor y debajo de las colonias, sobre el medio que es opaco (prueba de actividad de lecitinasas). Esta propiedad demuestra dos actividades sobre el

agar Baird-Parker: a) Transparencia del medio yema de huevo por proteólisis o lipólisis.

- b) Desarrollo de zonas ópacas dentro de las zonas transparentes. es decir, aparición de un precipitado blanco o amarillento por la formación de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados.

Ambas características constituyen la denominada "reacción de yema de huevo". (Baird-Parker 1962). (21,45).

Minor y Marth, en 1971, concluyeron que virtualmente, todos los medios selectivos y diferenciales usados para aislar el estafilococo son algunas veces inhibitorios para el crecimiento, cuando este se encuentra en estado débil o alterado, y que el medio Baird-Parker era específico para la detección y ennumeración de S. aureus, ya que este medio es una modificación del agar Glicina-Telurito ocasionada por la adición de yema de huevo y piruvato de sodio, que estimula el crecimiento de S. aureus.

Este medio ha sido propuesto como medio estándar para el aislamiento del germen, además es particularmente útil en la recuperación de S. aureus de alimentos procesados en los cuales los organismos han sido alterados por efectos físicos o por efectos químicos. (45).

La principal desventaja del medio Bair-Parker radica en tener que adicionar al medio de cultivo sustancias tanto estimulantes del crecimiento de S. aureus, como inhibitorias de germen contaminantes, por lo cual el medio resulta algo caro, además de que una vez que el medio base ha sido preparado, esterilizado y vaciado a las cajas de petri no puede ser almacenado por largos periodos de tiempo y el medio debe utilizarse en un lapso de 24-48 hr., de lo contrario disminuye su selectividad.

No obstante, estas desventajas son compensadas por la gran selectividad y especificidad del medio, que detecta niveles entre 10^1 y 10^2 col./g. de alimento, (21,45), el medio no inhibe a estafilococos dañados y sus colonias son de fácil reconocimiento, ya que aparecen colonias negras, brillantes, convexas, de 1.0 a 1.5 mm. de diámetro, además son fuertemente positivas a la prueba de la coagulasa.

Es importante recalcar, que por lo general, S. aureus desarrollando en medios sólidos lo hace en forma de racimos, pero en caldo con frecuencia se encuentra en cadena corta y diplococos. (21,45).

El Agar Vogel-Johnson nos permite obtener un crecimiento rápido de S. aureus coagulasa positivos y observar su capacidad de fermentar el manitol sin necesidad de cultivos adicionales, pues el contenido de éste azúcar en el medio es elevado y además contiene rojo de fenol como indicador de pH. Los estafilococos

coagulasa positivos forman pequeñas colonias negras en el medio (el medio es de color rojo). Si hay fermentación de manitol, las colonias aparecen rodeadas por zonas amarillas, debido a la formación de ácido proveniente del manitol. Si no hay fermentación del manitol, no se observa ninguna zona amarilla y el color del medio alrededor de las colonias puede ser aún más rojo. El color negro de las colonias se debe a que el estafilococo es capaz de reducir el telurito de potasio del medio de cultivo a telurio libre. (9,16,17,36).

El Agar Staph 110 es un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos. El medio contiene gelatina y manitol, facilitando así el aislamiento de estafilococos que atacan y degradan dichas sustancias. La microflora acompañante que entorpece el aislamiento de los germenés de interés médico, es ampliamente inhibida por la alta concentración de cloruro de sodio presente en el medio. Las dos especies de estafilococos, aureus y epidermidis se reconocen en la mayoría de los casos por el color de las colonias que forman. Las colonias de S. aureus son de color amarillo dorado, mientras que las de S. epidermidis son blancas aporcelanadas. El pigmento amarillo esta compuesto por dos carotenoides que son, el s-caroteno y la sarcinaxantina. (9,36).

2.4.3. Tipo de hemólisis en Agar Sangre.

Si bien los estafilococos pueden ser fuertemente hemolíticos, las zonas de hemólisis son menores en relación con el tamaño de las colonias. La hemólisis se basa en la producción de hemolisinas por parte de S. aureus (ver tabla #2 y tabla #3) la cual hemolisa los eritrocitos presentes en el medio de cultivo. (9,16,17).

2.4.4. Producción de pigmento.

Las cepas aisladas de S. aureus producen generalmente un pigmento amarillo-oro al ser cultivados en medio sólidos. Este pigmento dorado puede observarse al sembrar el S. aureus en un medio como el agar sangre de carnero al 5% o bien en Staph 110, después de una incubación de 24-72 hr., mientras que las cepas de S. epidermidis son de color blanco aporcelanado. Como ya se mencionó anteriormente el pigmento dorado esta dado por dos carotenoides: s-caroteno y sarcinaxantina. (9,36).

2.4.5. Pruebas bioquímicas diferenciales de S. aureus

A continuación se mencionarán algunas de las pruebas bioquímicas más comunes en la identificación de S. aureus, pues muchas de las pruebas anteriormente mencionadas, debido a la complejidad de su determinación, así como el costo

de las mismas son de difícil interpretación, y rara vez se emplean en el diagnóstico de S. aureus. La prueba de coagulasa y term nucleasa, dada su importancia en el diagnóstico de S. aureus son tratadas ampliamente más adelante.

2.4.5.A. Prueba de la catalasa.

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono. Si se deja acumular el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas.



Excluyendo los estreptococos, la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas poseen actividad de catalasa.

Esta prueba es comúnmente utilizada para diferenciar estreptococos (catalasa negativos), de estafilococos (catalasa positivos). (ver tabla #1). (18).

2.4.5.B. Capacidad de desarrollar en presencia de cloruro de sodio al 6.5%.

S. aureus posee la propiedad de crecer en medios con concentraciones de cloruro de sodio hasta de un 10%, y esta propiedad ha sido aprovechada en la preparación de medios selectivos para este microorganismo. La mayor parte de las estirpes crecen en un 10% de NaCl, siendo algunas capaces de crecer hasta en un 20% de NaCl, aunque se ha observado que niveles de sal por encima de un 3% inhiben la producción de enterotoxina B. (ver tabla # 1). (17,36).

2.4.5.C. Capacidad de desarrollar en medios a 10°C y a 45°C.

S. aureus, como algunos estreptococos se multiplica adecuadamente dentro de un amplio margen de temperatura. Aunque se ha señalado que S. aureus es de naturaleza mesofílica, puede crecer a temperaturas tan bajas como 6.7°C (Angelotti y col. 1961), y una temperatura máxima de 44.4 a 46.6°C (9). En general, cuanto mejor sea el medio de cultivo, más amplio será el margen de temperatura en que pueda crecer. Por supuesto, el crecimiento a temperaturas extremas es muy lento. (17,18,36).

2.4.5.D. Prueba de fermentación de azúcares. (manitol y glucosa).

S. aureus, en contraste con el S. epidermidis, fermenta manitol con producción de ácido láctico, tanto en condiciones de anaerobiosis como de

aeróbiosis. El agar sal y manitol es un medio altamente selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos. Las colonias de S. aureus se desarrollan bien en el medio, formando un halo amarillo en el agar circundante que indica la producción de ácido a partir de manitol. Esta prueba también puede ser llevada a cabo en tubos con medio de Hugh y Leifson con manitol, con sello y sin sello de nujol. (El sello es para propiciar condiciones de anaeróbiosis).

Una relación similar, en las mismas condiciones de aeróbiosis y anaeróbiosis se presenta al contener el medio glucosa, pues el S. aureus posee la capacidad de fermentar la glucosa con producción de ácido. (9,17,18,36).

2.4.5.E. Prueba de reducción del telurito.

El agar telurito también sirve como medio selectivo para el aislamiento de S. aureus. Este medio inhibe el desarrollo de cepas estafilocóccicas coagulasa negativas, y las colonias de S. aureus aparecen negras debido a la reducción del telurito a telurio libre. Ocasionalmente se encuentran cepas de estafilococos manitol positivas y/o telurito positivas que son coagulasa positivas. Por esta razón, la identidad de S. aureus se establece principalmente en base a la reacción de la coagulasa y termonucleasa, y las pruebas de telurito y/o manitol se utilizan solo para confirmación. (Ver tabla #2). (18,36).

2.4.5.F. Prueba de fosfatasa.

Algunos autores reportan una buena correlación entre la producción de fosfatasa y la patogenicidad, aún en cepas coagulasa negativas. (Aunque en realidad son muy pocos). La cantidad o grado de actividad de fosfatasa se sabe que varía con el grupo fágico del estafilococo. La enzima fosfatasa rompe la fenolftaleína difosfato, y su producción se determina por la liberación de fenolftaleína libre, indicada por un cambio de color debido a que la fenolftaleína liberada reacciona con álcalis para dar un color rosa brillante.

FENOLFTALEINA DI-P (SAL SODICA)-----FENOLFTALEINA LIBRE
FENOLFTALEINA + ALCALI (NaOH ó NH₃)-----COLOR ROSA BRILLANTE

2.5. Metabolitos bacterianos producidos por S. aureus.

Los metabolitos conocidos pueden ser clasificados de la siguiente forma:

- 2.5.1. Exotoxinas. (Hemólisin).
- 2.5.2. Enterotoxinas
- 2.5.3. Metabolitos no-toxicos.

2.5.1. Exotoxinas. (Hemolisinas).

En la tabla #3 se muestran las exotoxinas producidas por cepas virulentas de Staphylococcus aureus. Se notará que las enterotoxinas que causan intoxicación alimentaria no se incluyen, estas toxinas resistentes a la ebullición y que en otros aspectos no corresponden ni a las exotoxinas, ni a las endotoxinas típicas, se mencionaran más adelante. (Ver tabla #4). (16,18,41).

2.5.2. Enterotoxinas.

Las enterotoxinas purificadas son de aspecto blando, color blanco, son hifroscopicas, muy solubles en agua y en soluciones salinas. Son proteínas simples que incluyen solamente aminoácidos. El hecho de que unicamente el N- y un C- terminal de aminoácidos hayan sido detectados para cada enterotoxina indica que son cadenas simples de polipeptidos. Los estudios sobre la conformación de las enterotoxinas indican que se trata de moléculas compactas. (4,6,42,43).

Las enterotoxinas son termoestables y resisten la ebullición durante 30 min.. Algunas propiedades físicas y químicas se ilustran en la tabla #4.

Una de las ventajas de estas proteínas es su capacidad para formar anticuerpos específicos, lo que ha sido de gran ayuda para descubrir que existen seis tipos de enterotoxinas antigénicamente diferentes: la enterotoxina A se ha encontrado con mayor frecuencia en casos de intoxicación alimentaria; la enterotoxina B que es un poco menos frecuente; la enterotoxina C que no es patógena para el hombre y que puede ser C₁ y C₂, y la enterotoxina D y enterotoxina E de las cuales se sabe muy poco. (13,14).

En general las infecciones alimentarias estafilocócicas están causadas por la ingestión de enterotoxinas preformadas, aún cuando los síntomas pueden aparecer como resultado del crecimiento de cepas enterotoxigénicas en tracto intestinal y posiblemente en cualquier otra parte del organismo. (9,16).

Las enterotoxinas son de las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteica que son resistentes al calor. La enterotoxina A y B son las más resistentes al calor, se establece como base que la enterotoxina B es destruida a una temperatura de 99°C durante 87 min.. Para destruir la enterotoxina A se requiere de una temperatura de 100°C y un tiempo de 1 min., demostrándose de esta manera que la enterotoxina B es más resistente al calor que la enterotoxina A. (13,14).

El proceso de irradiación o esterilización en alimentos no inactiva la enterotoxina B cuando ésta está presente en los alimentos. (38).

También las enterotoxinas en estado activo son resistentes a enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, renina y papaína. (9,36).

Considerando la importancia que tiene la existencia de enterotoxinas producidas por cualquier tipo de cepas de S. aureus, se han ideado métodos para su determinación. Estos métodos pueden ser: la administración oral a humanos y a animales, ó la serología. (42,43). Este último método es el más utilizado.

En 1958, Ouchterlony desarrolló la técnica de difusión en gel para la detección de antígenos solubles. Actualmente el método de la microplaca para la identificación de enterotoxinas adoptado por Casman y Bennett en 1969 es el que se recomienda para uso rutinario, porque ofrece varias ventajas, ya que además de usar pocos reactivos, puede detectar cantidades muy pequeñas (0.1g.) de enterotoxina A y B por mililitro. El fundamento del método anterior es que los reaccionantes (Ag y Ac), en orificios separados, difunden uno hacia el otro; esto crea un gradiente de concentración en el gel, y donde la concentración antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) sea óptima para la inmunoprecipitación, se observara una línea opaca en el agar (Clausen, 1975). (4,6).

Existen otros métodos para la determinación de enterotoxinas que son mucho más sensibles, como lo son: el radioinmunoensayo, ELISA, y la hemaaglutinación. Estos métodos requieren poco tiempo para su realización, pero requieren de sustancias más complejas y más precauciones para su realización. El método del radioinmunoensayo requiere de la elevada purificación de la enterotoxina, así como la preparación de la antitoxina. (10,17).

Las dosis tóxicas de las enterotoxinas varían un poco debido en parte a lo amplio de la variación en la susceptibilidad de los diferentes individuos a las enterotoxinas estafilocócicas. (35).

En estudios con voluntarios que ingirieron alimentos contaminados con S. aureus, la estimación de la enfermedad y la dosis/50 (ID/50 es la cantidad de toxina que produce la enfermedad en 50% de los sujetos probados), de enterotoxina A, B y C fué de un rango de 0.134 a 0.183 g/Kg de peso corporal. Tomando como promedio un peso de 70 Kg en el hombre, la ID/50 fué aproximadamente de 10-13 g.. No obstante, la sensibilidad de cada individuo puede mostrar síntomas con 1.0 g o menos de enterotoxina A. (9,17,35,36).

2.5.3. Metabolitos no-tóxicos.

Estos metabolitos se muestran en la tabla #5.

De estos metabolitos se explicará brevemente la función de la enzima coagulasa, que ha sido una de las características del microorganismo que se ha tomado como base para la identificación de S. aureus. Recientemente se ha demostrado que existe otra enzima: la desoxirribonucleasa, que puede considerarse como indicadora de la presencia de estafilococo patógeno, de la cual también se explicaran sus características principales.

2.5.3.A. Coagulasa.

La mayoría de los estafilococos patógenos para el hombre producen una sustancia proteica que se comporta como una enzima y que coagula el plasma oxalitado o citratado en presencia de un factor contenido en muchos sueros. Este factor reacciona con la coagulasa, genera tanto enterasa como una actividad de coagulación, en forma similar como se realiza la activación de la protrombina a trombina.

No esta bien determinada la contribución exacta de la coagulasa en el poder patógeno de los estafilococos, aunque existe la posibilidad de que la coagulasa proteje por lo menos en forma temporal a los estafilococos que estan invadiendo los tejidos. (2,5,12).

Esta enzima proteica presenta un peso molecular de 44000 daltons y su composición química aún se desconoce. Presenta actividad semejante a la pretrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Se cree que la coagulasa funciona in vivo produciendo una barrera en el sitio de la infección estafilocócica. Esto puede servir para localizar los organismos en abscesos, carbuncos, forúnculos, etc.

En el laboratorio la prueba de la coagulasa se utiliza más comunmente para diferenciar el Staphylococcus aureus (coagulasa positivos) de otros estafilococos.

La coagulasa se haya presente en dos formas: "libre" y "fija", cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas separadas.

La coagulasa fija (prueba en portaobjetos) es conocida como factor de aglutinación, esta unida a la pared bacteriana y no esta presente en los filtrados de cultivos. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en plasma (fibrinógeno) provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjetos. La actividad de la coagulasa fija no es inhibida por los anticuerpos formados contra la coagulasa libre. Esta prueba es simple y rápida, pero tiene la desventaja de detectar solo coagulasa "combinada" o "fija" o "factor de aglutinación". Se le denomina tambien coagulasa unida.

La coagulasa libre (prueba en tubo) es una sustancia semejante a la trombina que se halla presente en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezclan en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma en un tubo de ensaye se forma un coagulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina. Las cepas coagulasa positivas producen usualmente un coagulo visible en 1 a 4 hr. (Ver figura 12 y 14). (12,18).

2.5.3.B. Termonucleasa.

Entre los metabolitos no tóxicos y como una enzima intracelular se ha colocado la termonucleasa, la cual es producida por el S. aureus. Esta enzima también es llamada Desoxirribonucleasa; DNasa; Desoxirribonucleasa-3'-nucleótido hidrolasa; Nucleasa estafilococcica; Nucleasa micrococaceae y E.C.3.1.4.7.. (35).

Debido a la relativa simplicidad de la estructura que presenta esa enzima ha servido como modelo para el estudio de las propiedades de algunas proteínas y enzimas de otro tipo.

La Nucleasa estafilococcica es una proteína de tipo globular que consiste en una cadena polipéptidica simple constituida por 149 residuos de aminoácidos los cuales no contienen en su cadena grupos sulfhidrilos ni uniones por grupos disulfuro. (ver figura #1 y #2). Tiene un peso molecular de 16,807 daltons y presenta un punto isotónico a un pH de 9.62 ± 0.03 . (ver tabla #6).

Esta enzima presenta actividad endonucleolítica y exonucleolítica, y se ha establecido que es una 5' fosfodiesterasa, la cual por hidrólisis degrada el DNA produciendo 3'-mono y 3'-dinucleótidos, requiriendo el ión calcio (Ca^{++}) para su actividad. (ver figura #3).

Se presume que la función de la termonucleasa es participar en el catabolismo de los ácidos nucleicos en el medio de crecimiento para producir fragmentos que puedan ser metabolizados por la bacteria.

Su producción es satisfactoria y óptima en la fase logarítmica del crecimiento de la bacteria y continúa con una velocidad alta en la fase estacionaria de crecimiento. (ver figura #9). (35,48).

Se ha demostrado que es definitivo el oxígeno para la producción de la enzima y que la aeración tiene un marcado efecto estimulador en la producción de termonucleasa. Caso contrario sucede en condiciones anaeróbicas, en donde la producción de nucleasa estafilococcica es severamente inhibida. (1,43).

El pH óptimo para la producción de la enzima es de 8.3 empleando un sistema buffer de hidroximetilamina metano, resultando un incremento en su producción, comparando con una solución buffer de fosfatos. Cabe hacer mención que la solución buffer de hidroximetilamina metano (TRIS) estimula la producción de termonucleasa en mayor proporción que otras soluciones buffer. (1,41,48).

La Nucleasa estafilococcica es extremadamente estable al calor y puede llegar a resistir la ebullición durante 30 min., y hasta $130^{\circ}C$ durante 16.6 min. (ver figura #10). (18,43). De hecho Cords y Tatini (6), determinaron que la termonucleasa es más resistente al calor que la enterotoxina, no es inactivada por concentraciones elevadas de sal y resiste en general los mismos factores que las enterotoxinas estafilococcicas.

Aunque esta enzima es particularmente estable al calor, existen procedimientos para estabilizar y proteger la enzima, como son:

1.-Esta enzima es protegida por DNA nativo, y esta protección se hace más efectiva al adicionar albúmina de suero bovino (BSA).

2.- La presencia simultánea de calcio 0.01M y albúmina de suero bovino 0.05%.

Además del ión calcio la enzima también es activada, aunque en menor grado, por la presencia de iones Co^{++} , Cu^{++} y Mg^{++} , pero su actividad disminuye bastante al eliminar el buffer TRIS. (43,48).

Se ha establecido también que la glucosa inhibe la producción de Nucleasa y probablemente es debido a la producción de ácido, por la fermentación del azúcar durante el crecimiento del organismo, con la consecuente disminución del pH y la disminución también de la producción de termonucleasa. (1,35,48).

Esta enzima es fuertemente inhibida también por algunos iones divalentes como son Hg^{++} , Zn^{++} y Cd^{++} , y algunos iones trivalentes (serie de los lantánidos). (43).

Es concebible que las enzimas proteolíticas bacterianas puedan inactivar la termonucleasa (22).

La enzima termonucleasa puede ser aislada y purificada por diferentes métodos, siendo uno de los más utilizados el método que incluye una separación por cromatografía en sephadex G-75 y electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. (43).

2.6. Propiedades metacromáticas del Azul de Toluidina.

A diferencia de los colorantes monocromáticos, los colorantes metacromáticos, tales como el Azul de Toluidina no obedece la Ley de Berr dado que su espectro de absorción varía al cambiar la concentración de colorante o en presencia de polímeros aniónicos en solución acuosa. La solución acuosa diluida de azul de Toluidina tiene su máximo de absorción a 612nm. Michaelis explica que la presencia de un polianión como el agar hace que se polimerice el colorante, desplazando el máximo de absorción a 540nm, punto en el que la mezcla es de color rosa vivo. Por otra parte, cuando a la solución colorante se agrega DNA, se produce un pequeño desplazamiento a una longitud de onda más alta (634 nm), a la cual se produce un color azul. Se ha observado que ello ocurre tanto en presencia de DNA como también en presencia de DNA más agar. (ver figura # 4). El comportamiento del azul de toluidina en presencia de DNA puede ser análogo al del complejo del naranja de acridina y DNA, en el cual el colorante se intercala entre las capas sucesivas de cada par de bases. Michaelis y

Granick, sugirieron que cuando esta presente el agar, las moléculas del colorante son absorbidas en el agar. Los complejos del azul de toluidina con agar son aparentemente más débiles que con ácido nucleico y éste desplaza la máxima de absorción a una longitud de onda más elevada. Solo cuando desaparece el DNA, tal como en el caso de su hidrólisis, es que el colorante actúa sobre el agar, cambiando la coloración azul a un color rosado. (Ver figura #5 y figura #6). (21,22,24,25).

2.7. Mezcla de Azul de Toluidina-DNA-Agar.(TDA).

Experimentos preliminares fueron llevados a cabo para determinar la mejor combinación de Azul de Toluidina-DNA-Agar, las cuales pueden mostrar un buen color de contraste y largas zonas de actividad de termonucleasa. La siguiente formulación de la mezcla Azul de Toluidina-DNA-Agar (TDA) fue elegida de otras combinaciones: A 1000 ml de buffer TRIS 0.05 M (pH 9.0) se agregan 0.3 g de DNA (Difco), 10.0 g de Agar (Difco), 1.0 ml de CaCl_2 0.01 M, 10.0 g de NaCl y 3.0 ml de Azul de Toluidina 0.1 M. Antes de adicionar el Azul de Toluidina a la solución ésta debe calentarse hasta disolver completamente el DNA y el Agar. La mezcla es entonces dividida en pequeños volúmenes y almacenada en frascos con tapón de caucho y a temperatura ambiente. Para su uso la mezcla de TDA es simplemente fundida. (22).

Un factor importante es que la mezcla TDA es notablemente estable, no es necesaria su esterilización y puede ser almacenada hasta por cuatro meses. Por otra parte, se han obtenido resultados satisfactorios aún cuando la mezcla se funde varias veces. La estabilidad de la mezcla puede atribuirse a la propiedad inhibitoria del Azul de Toluidina hacia las bacterias Gram positivas, especialmente hacia las bacterias esporuladas, y a la estabilidad que presenta también el complejo Azul de Toluidina-DNA al calentamiento. Para su preparación ver anexo 13.2. (21,23,25).

2.8. Relación entre la termonucleasa, Coagulasa, Enterotoxina, y Número de Colonias de S. aureus.

La relación entre la termonucleasa y la producción de coagulasa ha sido investigada y desarrollada para un rápido diagnóstico, y distinguir las cepas de estafilococos patógenos y toxigénicos de las cepas relativamente saprofitas.

Los criterios que se utilizan en la determinación de S. aureus enterotoxigénicos, se basan en la relación que existe entre la producción de la enzima coagulasa y la producción de enterotoxinas, pero este criterio no es muy eficiente debido a que se ha demostrado que existen cepas que no coagulan el plasma y sin embargo se producen enterotoxinas. (22).

En 1971, Lachica demostró que la producción de la enzima termonucleasa esta íntimamente relacionada con la producción de enterotoxina, ya que todas

las cepas de S. aureus enterotoxigénicas son termonucleasa positivas. (21,23).

Recientemente Cord y Tatini (6) comprobaron la relación entre la multiplicación de S. aureus y la producción simultánea de termonucleasa y enterotoxina en ciertos alimentos. (Ver tabla #7). Después de varios estudios, estos autores llegaron a la conclusión de que la enzima termonucleasa se detectaba cuando la cuenta de colonias ascendía a 10^6 colonias/gramo y 10^7 colonias/gramo de alimento para la detección de enterotoxinas. (esto mediante un método turbidimétrico).

En 1975, Lotter utilizando cepas estafilocócicas enterotoxigénicas encontró positividad para la termonucleasa y negatividad para la prueba de coagulasa, demostrando así comparativamente la mayor confiabilidad de la primera, inherente a su ya bien conocida resistencia al calor. (28).

El estudio de diversas enterotoxinas producidas por S. aureus revelan que no existe correlación entre el tipo de enterotoxinas y la producción de termonucleasa, y además existen factores que interfieren negativamente en una relación cuantitativa entre la cantidad de enzima presente y el número de estafilococos presentes en la muestra. (1).

Entre las 250 cepas productoras de enterotoxina del Food Research Institute Culture Collection (Wisconsin), el 95% produce termonucleasa y el 93% produce coagulasa. (22). De las cepas coagulasa positivas el 95% produce la termonucleasa. Aunque 10 de las 31 cepas coagulasa negativas produjeron la termonucleasa, 9 de las 10 cepas también produjeron enterotoxina. Estas cepas probablemente representan mutantes que pierden su capacidad de producir coagulasa.

La excelente relación de la termonucleasa producida (271/283 ó 93%) proporciona la posibilidad del empleo de esta enzima termoestable en la descripción de S. aureus para un rápido diagnóstico y un procedimiento cuantitativo. (23).

Con esto se concluyo que la producción de esta enzima es una prueba de mayor confiabilidad que la prueba de la coagulasa. (Ver tabla #7).

2.9. Relación de la termonucleasa con respecto al diámetro del halo.

Lachica, Hoeplich y Franti (26) llevaron a cabo un estudio sobre la relación de la termonucleasa y el diámetro del halo producido por la hidrólisis del DNA, en donde utilizaron nueve niveles de la concentración de la enzima (0.005;0.01; 0.02;0.05;0.1;0.2;0.5;1.0 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$), además de variar el período de incubación (1, 2, 3 y 4 horas). Se observó que la concentración de la enzima es esencialmente de tipo lineal, y la desviación de la linealidad es favorecida por el incremento de los períodos de incubación, lo cual es muy pronunciado a las cuatro horas. (Ver figura #7 y figura #8).

Mediante la técnica de la "microplaca metacromática por difusión

en agar" (MAD) se demuestra la relación lineal entre el diámetro de zona debido a la acción de la termonucleasa y el logaritmo de la concentración de termonucleasa, lo cual se observa en las figuras #6, #7 y #8. (22, 25).

2.10. Comparación del método de la microplaca metacromática por difusión en agar (MAD), con otros métodos similares.

Existen gran variedad de factores que afectan la determinación de la actividad de la termonucleasa, por lo cual los métodos disponibles, en la mayoría de los casos no son aplicables.

Chesbro y Auburn (4) emplean un método espectrofotométrico que implica laboriosas etapas de purificación para reducir a un nivel bajo la cantidad de oligonucleótidos y nucleótidos presentes en la mayoría de las veces.

Otros autores han tratado de eliminar la purificación previa requerida mediante el uso de DNA marcado con C^{14} como sustrato de la enzima. El costo y las precauciones especiales necesarias en el manejo de materiales radioactivos anulan las ventajas del procedimiento. (4).

Otros métodos tienen la desventaja de la relativa complejidad en la manipulación necesaria para el uso de luz ultravioleta, y la sencibilidad del naranjado acridina fluorescente para extinguirlo por proteínas. (21).

Para sistemas opacos e impuros solo el método del verde de metilo y la técnica por inundación con HCl, modificada por Harwis y Lawrence, proporcionan buenos resultados, aunque presentan la desventaja de requerir sustratos altamente polimerizados de DNA. (23).

Con otros métodos serológicos, la sencibilidad es relativamente baja y se requieren complicados procedimientos de extracción, concentración y purificación, que implican varios días para llevarlo a término, además de que la recuperación de S. aureus de colonias puede que no indique la verdadera población máxima.

La mayoría de los métodos están limitados por la interferencia con las proteínas. (23, 24, 25, 26).

Por lo que respecta al MAD (Método de la Microplaca Metacromática por Difusión en Agar), el método es adecuado, simple, económico, rápido y sensible. Se utiliza un equipo de bajo costo, no requiere de DNA altamente polimerizado y en sistemas opacos e impuros que contienen altas concentraciones de proteínas, se obtienen buenos resultados cuantitativamente reproducibles, además de no requerir técnicas adicionales de extracción, concentración y purificación. (23, 24).

El método MAD es lo suficientemente específico y sensible para detectar la presencia de cantidades mínimas de termonucleasa de hasta 0.005 $\mu\text{g/ml}$.

Examina gran número de muestras por medio de un simple trabajo de laboratorio.

Una de las ventajas más relevantes de este método es el hecho de que la termonucleasa es detectada aún cuando no haya presencia de S. aureus en el alimento, los cuales pudieron haber muerto por algún proceso físico ó químico en el alimento.

Un factor importante es que la mezcla TDA (Azúl de Toluidina--DNA-Agar) es tan estable que las placas pueden ser refrigeradas y preservadas por largo tiempo (hasta por cuatro meses)., no es necesaria su esterilización y por otra parte se han obtenido resultados satisfactorios aún cuando la mezcla se funde varias veces. La estabilidad de la mezcla puede atribuirse, como ya se menciono anteriormente, a la propiedad inhibitoria del Azúl de Toluidina hacia las bacterias Gram positivas y la propiedad que presenta el complejo Azúl de Toluidina-DNA-Agar (TDA) al calentamiento. (21,24,25).

Este método es automatizable utilizando un radar automatico del tamaño o diámetro de zona. (25).

La técnica es aplicable también a la determinación de otro tipo de desoxirribonucleasas como por ejemplo la desoxirribonucleasas I pancreática. (25).

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LOS GENEROS MICROCOCCUS Y
STAPHYLOCOCCUS DE LA FAMILIA MICROCOCCACEAE.

(tomada de Buchanan y Gibbons, 1974, pp 479)

	<u>MICROCOCCUS</u>	<u>STAPHYLOCOCCUS</u>
Células esféricas.....	+	+
Reacción de Gram.....	+	+
Agrupadas en racimos irregulares.....	+	+
Aeróbicamente.....	+	+
Acido de glucosa		
Anaeróbicamente.....	-	+
Aeróbicamente.....	+	-/+
Acido de manitol		
Anaeróbicamente.....	-	-/+
Agrupadas en tetradas.....	Variable	-
Reacción de Catalasa.....	+	+
Movilidad.....	-	-
Coagulasa.....	-	-/+
Fosfatasa.....	-	+
Crecimiento en NaCl al 15%.....	NC	C
Crecimiento en Bilis al 40%.....	NC	C
Arginina.....	-	+
Voges-Proskauer.....	-	+
Acido de: Arabinosa.....	-	-
Lactosa.....	-	+
Maltosa.....	Variable	+
Resistencia a Lisostafina.....	+	+
Reducción de nitratos a nitritos.....	-	+

DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DEL GENERO STAPHYLOCOCCUS

	<u>S. aureus</u>	<u>S.epidermidis</u>	<u>S.saprophyticus</u>
Coagulasa.....	+	-	-
Termonucleasa.....	+	-	-
Hialuronidasa.....	+	-	-
Pared Celular: Ribitol.....	+	-	+
Proteína A.....	+	-	-
Glicerol.....	-	+	Variable
Aeróbicamente....	+	Variable	Variable
Acido a partir de manitol			
Anaeróbicamente..	+	-	-
Acido sulfídrico (H ₂ S).....	Vestigios	-	-
Pigmento en agar sangre.....	Dorado	Blanco	Blanco
Hemólisis en agar sangre.....	Beta	-	-
Alfa toxina (Hemólisis).....	+	-	-
Fosfatasa.....	+	-	-
Reducción del Telurito.....	+	-	-
Reducción de nitratos a nitritos.....	+	-	-
Aeróbicamente....	+	+	+
Acido a partir de glucosa			
Anaeróbicamente..	+	+	+
Acetoína.....	+	+	-
Acido a partir de:			
Arabinosa.....	-	-	-
Lactosa.....	+	+	Variable
Maltosa.....	+	+	+
Trehalosa.....	+	-	+
Sacarosa.....	+	+	+
Crecimiento en anaeróbiosis.....	+	+	+
(caldo tioglicolato)			
Sensibilidad a Novobiocina.....	+	+	-
Sensibilidad a Polimixina.....	-	+	+
Sensibilidad a Neomicina.....	-	+	+
Diámetro de la colonia.....	7.8mm	3.7mm	7.0mm
(3 días a 35°C y 2 días ambiental)			

Tomada de Bubhanan y Gibbons (1974) pág. 485

Lenette y col. (1980) pág.84.

TABLA #3

23

PROPIEDADES DE EXOTOXINAS (HEMOLISINAS)

TIPO SEROLOGICO	ERITROCITOS SUSCEPTIBLES	LEUCOCITOS SUSCEPTIBLES	FUENTE COMUN	TOXICIDAD A ANIMALES
L	CONEJO BORREGO	CONEJO HUMANO	HUMANO	DERMONECROTICA PARA CONEJO.LETAL PARA RATON Y CONEJO.
B	BORREGO HUMANO BUEY	NINGUNOS	ANIMAL	LETAL PARA CONEJO EN GRANDES DOSIS.
γ	CONEJO HUMANO COBAYO BUEY RATA CABALLO	?	HUMANO	LEVEMENTE DERMONE- CROTICA PARA CONEJO Y COBAYO.
δ	HUMANO CONEJO CABALLO BORREGO RATA COBAYO	CONEJO COBAYO HUMANO RATON	HUMANO	EDEMA E INMADURACION EN CONEJO Y COBAYOS.

TOMADA DE DAVIS,DULBECCO Y COL. (1969).PAG. 730.

TABLA # 4

PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS.

	A ^a	B ^b	C ^c ₁	C ^d ₂	D ^e	E ^f
PESO MOLECULAR (Daltons)	27800	28366	34100	34000	27000	29600
DOSIS EMETICA (ED ₅₀) mg/mono	5	5	5	5-10	20	10
CONTENIDO DE NITROGENO (%)	16.2	16.1	16.2	16.0	---	---
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION. (S ₂₀ W) _S	3.03	2.78	3.02	2.90	---	2.60
COEFICIENTE DE DIFUSION. (D ₂₀ W) (10 ⁻⁷ cm ² sec ⁻¹)	9.80	8.22	8.10	8.10	---	---
VISCOSIDAD REDUCIDA. (ml/mg)	4.07	3.81	3.40	3.70	---	---
VOLUMEN PARCIAL ESPECIFICO.	0.72	0.72	0.72	0.72	---	---
PUNTO ISOELECTRICO. (pH)	6.90	8.60	8.60	7.00	7.40	7.00
ABSORCION MAXIMA. (nm)	277	277	277	277	278	277
COEFICIENTE DE EXTINCION. (ε _{1%} ^{1cm})	14.6	14.4	12.1	12.1	10.8	12.5

Tomada de Rajalakshmi y col. (1982) pág 127

TABLA # 5

METABOLITOS NO-TOXICOS PRODUCIDOS POR S.aureus

METABOLITO	COMPORTAMIENTO ANTIGENICO
A) ANTIGENO DE SUPERFICIE	ANTICUERPOS PROTECTORES
B) COAGULASA	ANTICOAGULASA
C) HIALURONIDASA	ANTIHIALURONIDASA
D) FIBRINOLISINA	ANTIFIBRINOLISINA
E) GELATINASA	?
F) PROTEASA	ANTIPLATEASA
G) LIPASA	ANTILIPASA
H) TRIBUTIRINASA	FACTOR ANTI YEMA DE HUEVO
I) FOSFATASA	?
J) LISOSIMA	?
K) PENICILINASA	?
L) DESOXIRIBONUCLEASA	?
M) EXPOLIATINA	?

Tomada de Reyes Carrillo G. C. (1979) pág 10

TABLA # 6

PROPIEDADES DE LA ENZIMA TERMONUCLEASA

PESO MOLECULAR	16,807 Daltons
NUMERO DE AMINOACIDOS	149
PUNTO ISOTONICO (pH)	9.62
pH OPTIMO	8.3
ESTABILIDAD AL CALOR	198°C durante 30 min. 130°C durante 16.6 min.
PRESION DE O ₂ OPTIMA	10%
PRESENCIA DE GRUPOS SULFHIDRILOS	0
PRESENCIA DE UNIONES DISULFURO	0
COEFICIENTE DE EXTINCION E _{1%} ^{1cm}	9.3
ABSORCION MAXIMA	280 nm.

Tomada de Tucker y col. (1978) pág 67

TABLA # 7

RELACION ENTRE LA COAGULASA, TERMONUCLEASA Y ENTEROTOXINA

TOTAL DEL No. DE MUESTRAS	PRODUCCION DE COAGULASA	PRODUCCION DE SIN CALENTAR EL CULTIVO	DE DNasa CALENTANDO EL CULTIVO	PRODUCCION DE POSITIVO	ENTEROTOXINA NEGATIVO
261	+	+	+	228	33
6	+	+	-	4	2
8	+	-	-	0	8
10	-	+	+	9	1
6	-	+	-	1	5
15	-	-	-	8	7
TOTAL 306	275 (+) 31 (-)	283 (+) 23 (-)	271 (+) 35 (-)	250 (+)	56 (-)

Tomada de Lachica y col. (1969) pág. 127

FIG. 1

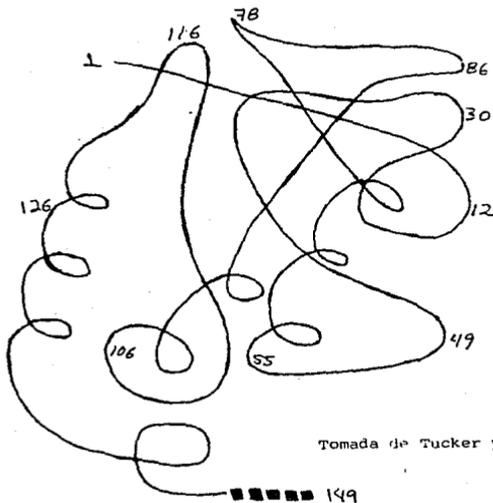
SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA NUCLEASA ESTAFILOCOCCICA.

NH₂-ALA-TRE-SER-TRE-LIS-LIS-LEU-HIS-LIS-GLU¹⁰-PRO-ALA-TRE-LEU- ILE-LIS-ALA-ILE-ASP-GLY²⁰-
 ASP-TRE-VAL-LIS-LEU-MET-TYR-LIS-GLI-GLU³⁰-PRO-MET-TRE-PHE-ARG-LEU-LEU-LEU-VAL-ASP⁴⁰-TRE-
 PRO-GLU-TRE-LIS-HIS-PRO-LIS-LIS-GLI-VAL⁵⁰-GLU-LIS-TIR-GLI-PRO-GLU-ALA-SER-ALA⁶⁰-PHE-TIR-
 LIS-LIS-MET-VAL-GLU-ASP-ALA-LIS⁷⁰-LIS-ISO-GLU-VAL-GLU-PHE-ASP-LIS-GLI-GLU⁸⁰-ARG-TRE-ASP-
 LIS-TIR-GLI-ARG-GLI-LEU-ALA⁹⁰-TIR-ILE-TIR-ALA-ASP-GLI-LIS-MET-VAL¹⁰⁰-ASP-GLU-ALA-LEU-VAL-
 ARG-GLU-GLI-LEU-ALA¹¹⁰-LIS-VAL-ALA-TIR-VAL-TIR-LIS-PRO-ASP-ASP¹²⁰-HIS-GLU-GLU-HIS-LEU-
 ARG-LIS-SER-GLU-ALA¹³⁰-GLU-ALA-LIS-LIS-GLU-LIS-LEU-ASP-ILE-TIR¹⁴⁰-SER-GLU-ASP-ASP-ALA-ASP-
 SER-GLI-GLU-COOH.

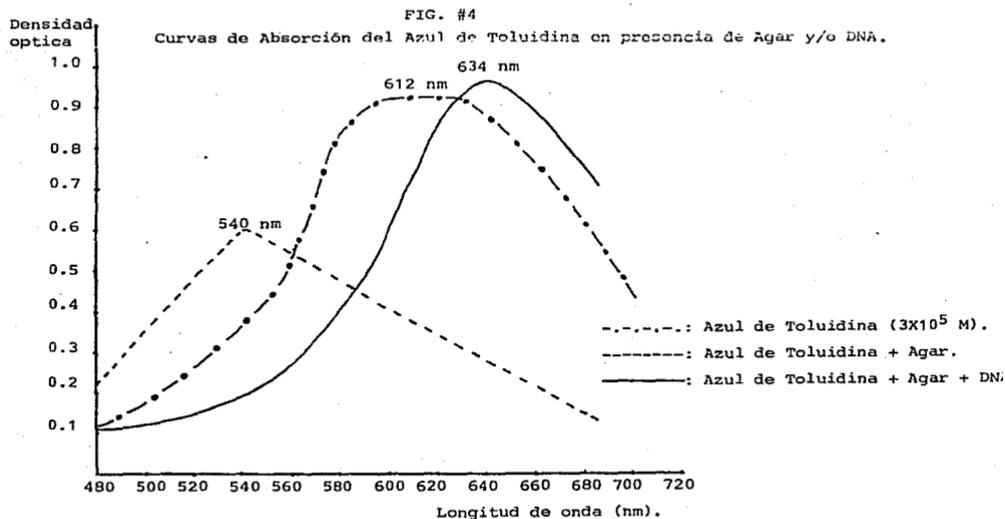
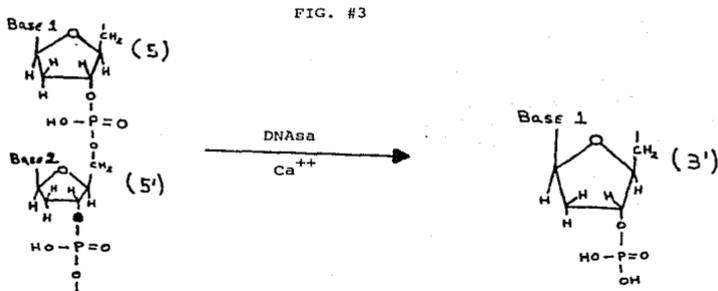
Tomada de Tucker y col. (1978) pág 70

FIG. 2

VISTA ESQUEMATICA DE LA CADENA PEPTIDICA DE LA NUCLEASA ESTAFILOCOCCICA. LOS NUMEROS INDICAN LA LOCALIZACION DE CIERTOS RESIDUOS DE AMINOACIDOS EN LA CADENA.



Tomada de Tucker y col. (1978) pág 132



Tomada de Lachica y col. (1971) pág 586.



FIG. #5.- Muestras de cinco cepas de *S. aureus* previamente calentadas que fueron colocadas en Agar-Azul de Toluidina-DNA muestran halos rosas debido a la actividad de la Termonucleasa.

Cinco muestras de *S. epidermidis* fueron Termonucleasa negativas en igualdad de condiciones. (Muestras inferiores).

Tomada de Lachica y col. (1971) pág 586

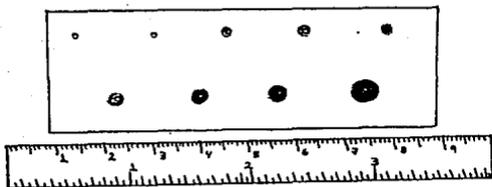
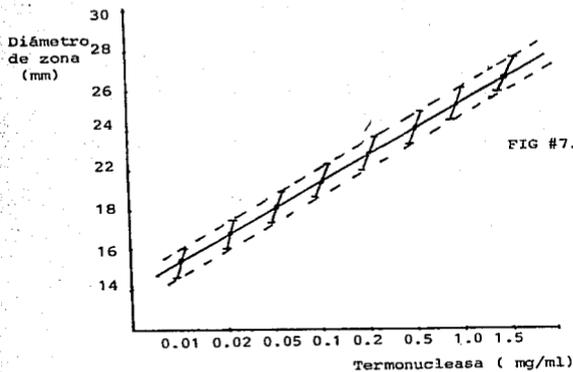
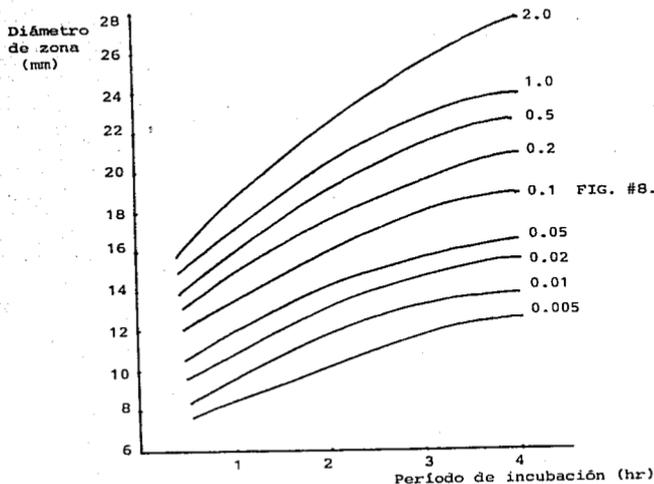


FIG. #6.- La variación del diámetro de la zona de hidrólisis del DNA varía directamente con la concentración de Termonucleasa purificada. El rango de concentración de Termonucleasa es de 0.005 g/ml hasta 2.0 g/ml con una incubación a 37°C durante 4 hr.

Tomada de Lachica y col. (1971) pág 587



Tomada de Lachica y col. (1972) pág 922.



Tomada de Lachica y col. (1972) pág 922.

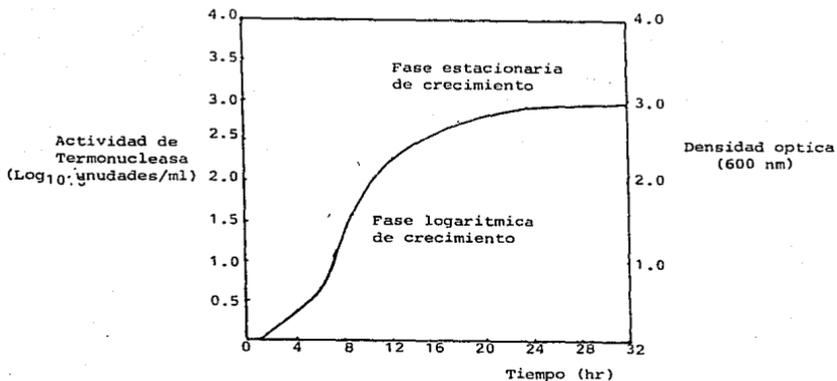


FIG. #9.- Crecimiento de *S. aureus* y producción de Termonucleasa, tomando en cuenta el período de incubación.

Tomada de Erickson A. y Deibel A. (1973) pág 333

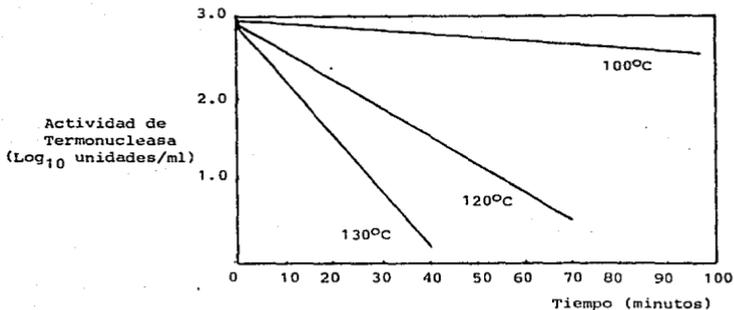


FIG. #10.- Curva de resistencia a la temperatura de la enzima Termonucleasa, relacionada con el tiempo y su actividad.

Tomada de Erickson A. y Deibel A. (1973) pág. 335.

3.- FUNDAMENTACION DEL TEMA.

En 1982, Amador encontró una correlación muy estrecha entre la prueba de la termonucleasa y la enterotoxigenicidad, observó también que no existía una correlación clara entre la producción de coagulasa y la enterotoxigenicidad de cepas aisladas.

Aún cuando se ha demostrado que la presencia de la termonucleasa esta más correlacionada con la producción de enterotoxinas y que es más útil la demostración de la termonucleasa como criterio de identificación de este microorganismo, en la mayoría de los laboratorios de nuestro país que se encargan de analizar microbiológicamente los alimentos prevalece la prueba de coagulasa como criterio de identificación del S. aureus.

La intoxicación alimentaria que con más frecuencia se presenta se debe a la ingestión de la enterotoxina producida por ciertas cepas de S. aureus cuando éstos crecen en el alimento. (9).

En el hombre los estafilococos se encuentran en nariz, ojos, garganta y tracto intestinal, a partir de aquí los organismos llegan directa e indirectamente a la piel. (9,17,36).

Las dos procedencias más importantes que contaminan alimentos son los portadores nasales y los individuos con brazos y manos infectados con diviesos y forúnculos, y que tienen acceso a la manipulación de los alimentos.

Los estafilococos son causantes de la mastitis de las vacas y algunos de estos cocos son capaces de producir enterotoxinas en la leche o en los productos lácteos. Si la leche de estas vacas se consume o se utiliza para hacer queso, las posibilidades de contraer una intoxicación alimentaria son altas, principalmente cuando se preparan con leche sin pasteurizar. (9,17,36).

Existen algunos alimentos como la ensalada de pollo, el jamón, los productos de pastelería, cremas, leches, quesos, que están frecuentemente asociados con la transmisión de intoxicaciones alimentarias estafilocócicas. (9,36).

Staphylococcus aureus produce diversas sustancias extracelulares, entre las que se encuentran las siguientes:

A).- Coagulasa: Es producida casi exclusivamente por S. aureus de ahí que se utiliza como medio de diferenciación para el organismo. Su principal acción es transformar el fibrinógeno en fibrina, y se le ha asociado a la virulencia por un mecanismo que indica que la coagulasa ocasiona una deposición de fibrina en la superficie de la bacteria protegiéndola de la fagocitosis. (2,16,23).

B).- Hemolisinas: Estas pueden ser alfa, beta, gamma, delta, epsilon, las cuales pueden ser mortales cuando se inyectan a animales de laboratorio.

(ver tabla # 3). (16,17).

C).- Fosfolipasa: Es una enzima extracelular, la cual es muy importante para la identificación de S. aureus en los medios que contienen huevo, ya que desdobra la fosfovitelina presente en la yema de huevo produciendo un halo transparente alrededor de las colonias de S. aureus. (13).

D).- Termonucleasa: Su actividad se correlaciona bien con la actividad de la coagulasa y hoy en día se utiliza para distinguir las cepas de estafilococos patógenos y toxigénicos de las saprofitas. Es llamada también DNasa. Esta enzima es capaz de despolimerizar el DNA. Su pH óptimo es de 8.3 y el empleo de hidroximetil aminometano incrementa su producción. Es extremadamente estable y puede llegar a resistir 130°C durante 16.6 min. (ver tabla #6). (9,46,48).

E).- Enterotoxinas: Los estafilococos pueden producir cinco tipos diferentes de enterotoxinas: A,B,C,D y E, que difieren en su toxicidad; resisten la ebullición durante 30 min. (16,35,42).

Un gran número de las cepas productoras de brotes de intoxicación alimentarias estudiadas forma enterotoxina A (ver tabla #4). (17).

Los síntomas más comunes de la especie humana en un envenenamiento alimentario por estafilococos son: salivación, náuseas, vómitos, espasmos abdominales de diversa intensidad y diarrea. Con frecuencia se presenta dolor de cabeza, postración, escalofríos, pulso débil, shock y respiración superficial. (9,35,36).

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Nuestra comunidad padece una alta frecuencia de intoxicaciones alimentarias, ocasionadas por la ingestión de quesos mal preparados, el deficiente control de calidad y por el escaso desarrollo socioeconómico de la gran mayoría de los grupos de población en México, lo que repercute en sus condiciones de vida: malos hábitos alimentarios e higiénicos, hacinamiento y escaso acceso a los centros de salud encargados del control de enfermedades infecciosas. (16,18).

Staphylococcus aureus puede crecer en una gran variedad de alimentos, algunas cepas productoras de enterotoxina pueden multiplicarse a niveles tales que la cantidad de toxina sea suficiente para causar la enfermedad en personas que ingieren estos alimentos.

Una de las dificultades asociadas con la intoxicación estafilocócica radica en que al crecer los organismos en los alimentos no dan lugar a olores ni sabores desagradables, y un alimento con cientos de millones de estafilococos por gramo puede saber, oler y presentar un aspecto escasamente diferente del producto en el que no ha existido multiplicación de ningún organismo. (36).

El queso causa intoxicaciones estafilocócicas al parecer por que la leche se almacena en tanques, especialmente en las cisternas de transporte, durante largos períodos de tiempo antes de su utilización. En estas circunstancias la temperatura que alcanza el producto crudo, permite que se multipliquen las bacterias hasta niveles que representan un elevado número de microorganismos en la leche.

Los quesos frescos son ricos en nutrientes y presentan condiciones adecuadas de pH, Aw, % NaCl para que se multiplique el S. aureus. Este tipo de productos generalmente se venden a granel, no se conserva a temperaturas de refrigeración y está expuesto al polvo y a los manejadores de alimentos portadores de S. aureus.

La pasteurización tiene la falla de no destruir la enterotoxina B preformada en leches que posteriormente se utilizan para la mantequilla. En ambos casos los alimentos causan la aparición de un cuadro de envenenamiento alimentario, aún cuando los microorganismos mueran durante el procedimiento de pasteurización. (35).

Los métodos para determinar la producción de termonucleasa se han basado en el aislamiento de un cultivo de S. aureus del alimento y posteriormente sembrar el cultivo en condiciones que favorezcan la producción de DNasa para después aplicar la técnica MDA. En algunos alimentos no se encuentran ya cultivos de S. aureus aún cuando en algún tiempo estuvieron contaminados con este microorganismo, y por lo tanto suponer que la muestra no representa un riesgo de salud, sin embargo pueden

contener termonucleasa y enterotoxina; con la determinación directa de la termonucleasa del alimento podemos conocer el riesgo potencial para producir una toxiinfección de dicho producto.

Los métodos de detección de enterotoxina estafilocócicas no son prácticos para exámenes rutinarios de alimentos, por lo que se ideó un procedimiento de depuración en que la nucleasa termoestable se utiliza como indicio de multiplicaciones estafilocócicas en alimentos. El uso de un medio de Agar-DNA-Azúl de Toluidina, facilita la rápida detección de la enzima en tres a cuatro horas con mínima manipulación. Los estudios indican en gran medida que la producción de termonucleasa es una propiedad característica de casi todas las cepas de S. aureus. La producción de la enzima en diversos alimentos está estrechamente relacionada con la multiplicación del S. aureus y la producción de enterotoxina. Entre las muestras de alimentos comerciales analizadas hasta la fecha las que dan resultados positivos en cuanto a la presencia de enterotoxina también contienen la termonucleasa. (23,28).

El procedimiento ideal para diagnosticar la intoxicación por alimentos estafilocócicos es el análisis que permite detectar la presencia de enterotoxina en el alimento sospechoso. Para fines de control de calidad el costo de la detección de enterotoxina en alimentos es prohibitivo y el proceso requiere de mucho tiempo, además que la recuperación de S. aureus en colonias mixtas puede que no indique la verdadera población máxima y en alimentos calentados pueden persistir enterotoxina preformada decreciendo a su vez, S. aureus viables a niveles no detectables. Para fines de exámenes rutinarios de alimentos, lo que se realiza es el conteo de células viables las cuales no deben rebasar los niveles permisibles por el control sanitario de alimentos establecido por la Secretaría de Salud, el cual es de 5,000 colonias/gramo de alimento. (17,25,26).

5.- OBJETIVOS

- 5.1. Determinar la enzima termonucleasa directamente del alimento.
- 5.2. Evaluar el método para la determinación de termonucleasa directamente del alimento, comparando con la determinación de termonucleasa a partir de la cepa aislada.
- 5.3. Aplicar el procedimiento de detección de termonucleasa directa del alimento como indicio de crecimiento de S. aureus.

6.- HIPÓTESIS.

Al someterse a ciertos procedimientos como son la cocción, pasteurización, deshidratación, etc., S. aureus puede morir, pero la enzima termonucleasa producida por el microorganismo resiste estos procesos y por lo tanto puede estar presente en el alimento, lo que nos va a indicar que éste alimento estuvo contaminado.

7.- MATERIAL Y METODO.

- 1.- Cajas de petri 10 ml.
- 2.- Frascos con capacidad de 150 ml.
- 3.- Camisas para centrifuga 100 ml.
- 4.- Matracas Erlenmeyer 500 ml.
- 5.- Matracas aforados 500 ml.
- 6.- Probetas 100 ml.
- 7.- Cuchillos estériles.
- 8.- Cucharas estériles.
- 9.- Vasos de licuadora estériles.
- 10.- Vasos de precipitados 100 ml.
- 11.- Mechero de Bunsen.
- 12.- Baño de agua.
- 13.- Pipetas Pasteur.
- 14.- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml.
- 15.- Portaobjetos.
- 16.- Balanza granataria Marca "Santorius" Mod. 98878.
- 17.- Agitador mecánico Marca "Waring Blendor" Mod. 58A60VL66.
- 18.- Centrifuga Marca "Beckman" Mod. TJ-6.

8.- REACTIVOS

- 1.- Quesos.
- 2.- Acido tricloroacético.
- 3.- Hidróxido de sodio 1.0N
- 4.- Hidroximetil-aminometano.
- 5.- Azul de toluidina.
- 6.- Agua desionizada.

9.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.

9.1. Consideración previa.9.1.1. Toma de muestra.

El tipo de quesos por analizar son quesos frescos.

El número total de muestras es de 150, de las cuales se trabajarán seis a la semana.

Todas las muestras corresponden al área metropolitana y serán tomadas al azar y de diferentes procedencias como son: plantas de fabricación, expendios (tiendas de autoservicio, mercados, abarrotes), y restaurantes de diferente categoría.

La cantidad de muestra no debe ser menor de 50 gramos.

Una vez tomada se debe mantener en refrigeración, no debe tener contacto directo con el hielo y el tiempo de muestreo y de análisis no debe ser muy prolongado.

La toma de muestra para analizar debe ser del centro de la pieza total muestreada.

9.2. Desarrollo del trabajo.9.2.1. Método de extracción de Termonucleasa.

Chesbro y Auburn (5) fueron los primeros en seguir la extracción de termonucleasa en alimentos como indicador de una multiplicación de S. aureus. Posteriormente Cords y Tatini (6), modificaron el procedimiento agregándole una fase de extracción. El método general consiste en lo siguiente:

Se añaden 40 ml de agua desionizada caliente (60-65°C) a 20 gramos de muestra de alimento (en este caso queso), se mezcla a la máxima velocidad en un agitador mecánico durante tres minutos. Se centrifuga en frío (4°C) durante 45 min. a 7500 rpm. El sobrenadante se trata con 0.05 volúmenes de ácido tricloroacético (TCA) 3 M frío. Se recentrifuga en las mismas condiciones anteriores. El precipitado se ajusta a un pH de 8.5 con NaOH 1N y se resuspende en un volumen de 2 ml. de Hidroximetil amino-metano (TRIS) 0.05M amortiguado con pH 9.0. Esta solución se coloca en agua hirviendo durante 15 minutos antes de efectuar el ensayo de actividad de termonucleasa. (ver figura # 13).

9.2.2. Detección de termonucleasa directa del alimento.

Para la detección de la termonucleasa se utiliza el método de

Lachica et al. (22,25,26), en el cual se utiliza el colorante azul de toluidina. Se prepara primeramente el medio de cultivo que consiste en una mezcla azul de toluidina-DNA-agar (TDA). (ver anexo # 13.2). Pequeños volúmenes de este medio (aprox. 3ml) son colocados sobre una placa (portaobjetos). Se deja solidificar el medio y posteriormente se hacen pequeños orificios equidistantes (aprox. 10) mediante una pipeta Pasteur, utilizando vacío. Sobre estos orificios se coloca la muestra, utilizando para ello una pipeta Pasteur (una gota). La placa es entonces incubada a 37°C, de 1-4 horas. La actividad de la termonucleasa se pone de manifiesto por pequeños halos de color de rosa alrededor de los orificios. (ver figura # 5 y 6).

9.2.3. Detección de la termonucleasa a partir de la cepa aislada.

El método para la detección de termonucleasa a partir de la cepa se muestra en la figura # 11 y 12. (ver anexo # 13.3).

9.2.4. Detección de la enzima coagulasa.

El método de la detección de coagulasa es ampliamente explicado en el anexo # 13.3 inciso b). En las tablas #13 y #14 se esquematiza también esta determinación.

FIG. 11. TRATAMIENTO DE MUESTRAS

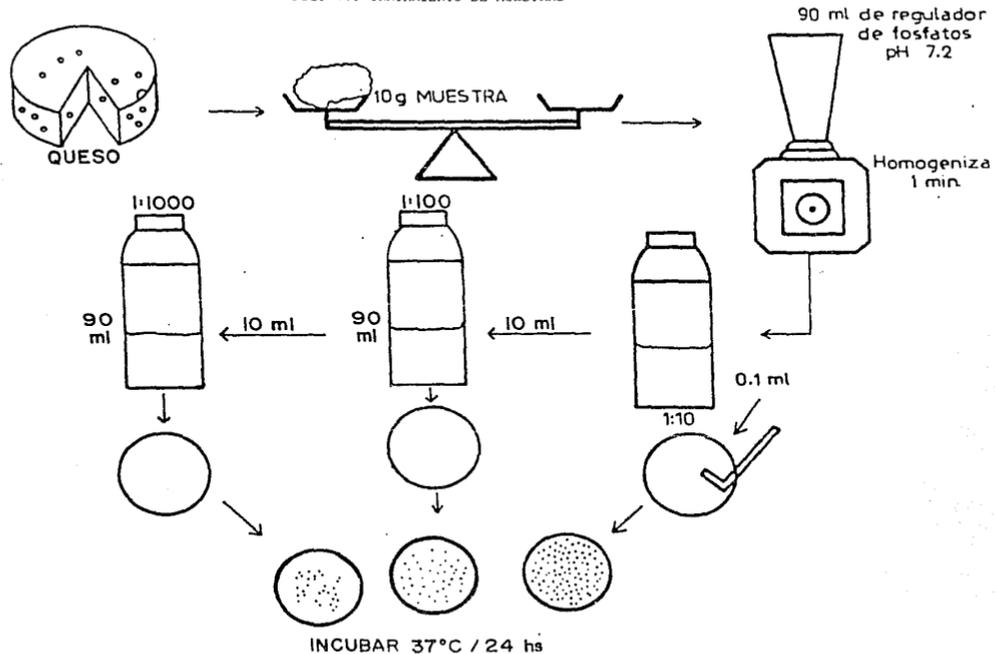


FIG. 12. PRUEBAS DE COAGULASA Y TERNONUCLEASA

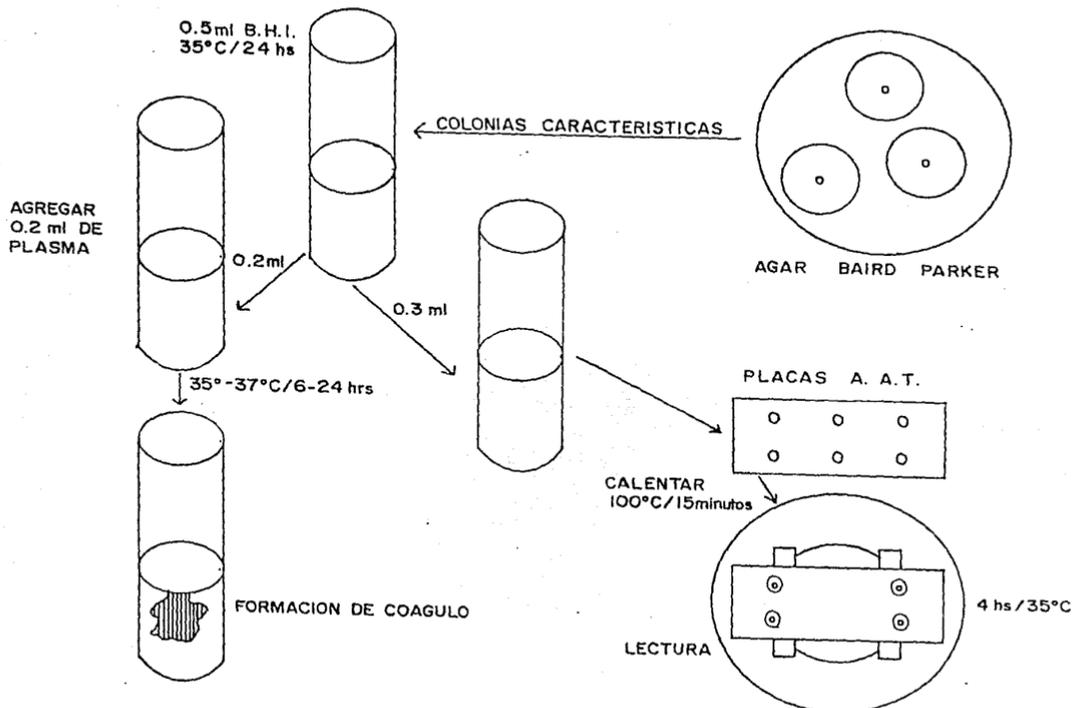


FIG.13. EXTRACCIÓN DE TERNONUCLEASA DIRECTAMENTE DEL ALIMENTO

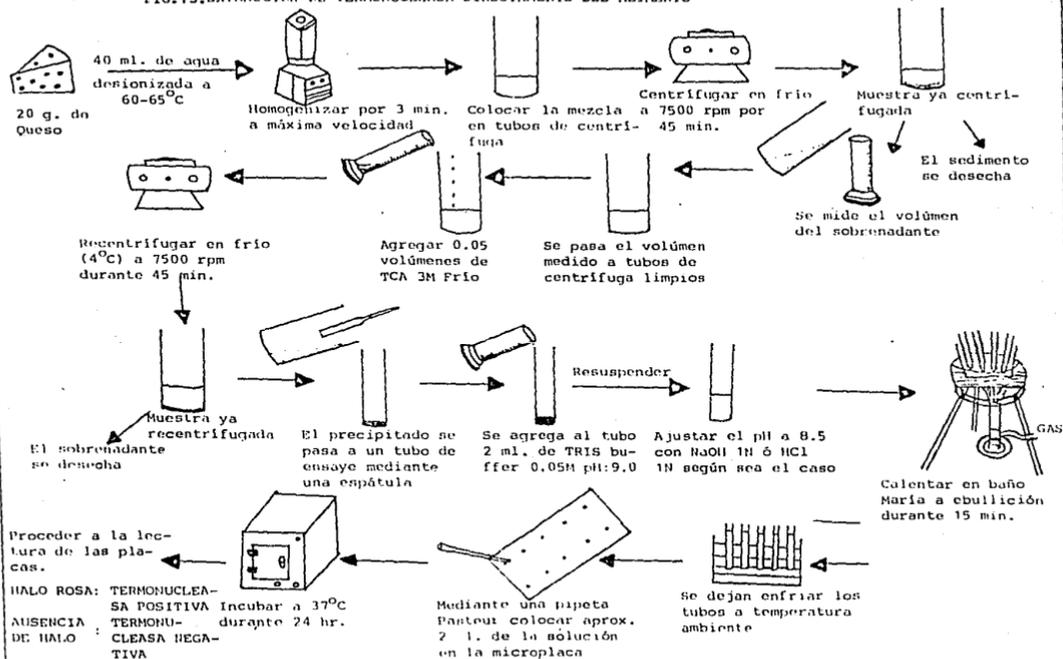
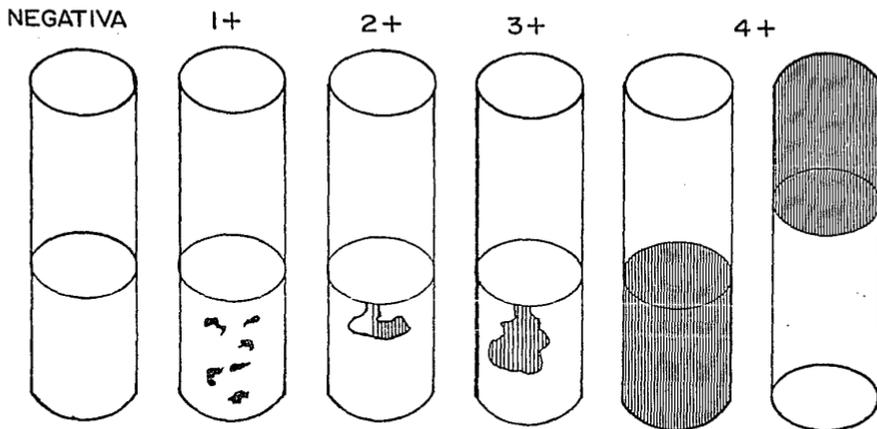


FIG. 14. PRUEBA DE LA COAGULASA.



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

10.- RESULTADOS.

Se analizaron un total de 150 muestras de quesos frescos, cuyos resultados se muestran en la tabla # 8.

En dichas muestras se determinó el No. de colonias de S. aureus/g de alimento, coagulasa y termonucleasa, tanto directa del alimento como a partir de la cepa aislada.

Refiriéndonos primeramente al No. de colonias de S. aureus/g de alimento, de las 150 muestras analizadas, 54 muestras presentaron cuentas menores de 100; 19 muestras presentaron cuentas de 100 a 5000 y por último 77 muestras rebasaron cuentas de 5000 que es el límite permisible. (ver tabla #:9).

En cuanto a la determinación de coagulasa, de las 150 muestras analizadas, 89 fueron positivas mientras que 61 fueron negativas (ver tabla #9).

Respecto a la determinación de Termonucleasa aislada de la colonia, 97 muestras fueron positivas, obteniéndose un halo promedio de positividad de 7 mm, mientras que 53 muestras fueron negativas (ver tabla #9).

Por último en la determinación de termonucleasa directa del alimento, 46 muestras fueron positivas, obteniéndose un halo promedio de positividad de 8 mm, mientras que 104 fueron negativas (ver tabla # 9).

De las 54 muestras que presentaron cuentas menores de 100 colonias de S. aureus/g de alimento se observa que la mayoría de las muestras fueron negativas tanto para la termonucleasa aislada de la colonia como para la coagulasa, (47,52,52 muestras, con porcentajes de negatividad de 87, 96.3, 96.3 respectivamente). (ver tabla # 10).

Respecto a las muestras que presentan cuentas entre 100 y 5000 colonias/g de alimento (19 muestras), resalta el hecho de que todas estas muestras fueron positivas para la termonucleasa aislada de la colonia (100%), mientras que el 94.7% (1 muestra) fué positiva para la coagulasa. En cuanto a la termonucleasa directa del alimento sólo el 21.1% (4 muestras) fueron positivas. (ver tabla #11).

De las 77 muestras que presentaron cuentas mayores de 5000 colonias/g de alimento, se observa que 35 muestras fueron positivas para la termonucleasa directa del alimento para un 54.5% . La termonucleasa aislada de la colonia presentó el 98.7% de positividad (76 muestras) mientras que 69 muestras fueron positivas para la coagulasa. (ver tabla # 12).

Relacionando el No. de colonias de S. aureus/g de alimento con respecto a la termonucleasa directa del alimento se puede observar que 7 muestras que presentaban cuentas menores de 100, fueron positivas para la termonucleasa directa del alimento, mientras que 47 muestras fueron negativas. En cuentas de 100 o más colonias

de S. aureus/g de alimento, 39 muestras fueron positivas para la termonucleasa directa del alimento y 57 muestras fueron negativas (ver figura #13).

En cuanto a la relación entre la coagulasa, termonucleasa directa del alimento y la termonucleasa a partir de la cepa aislada, se puede observar que en cuentas menores de 100 colonias /g de alimento, la mayor correlación se presentó cuando hubo negatividad para los tres parámetros (85.18%) (ver tabla #14); en cepas con cuentas de 100 a 5000 colonias de S. aureus /g de alimento se observa que la mayor correlación se presentó cuando la coagulasa y la termonucleasa a partir de la colonia fueron positivas mientras la termonucleasa directa del alimento fué negativa (73.6%) (ver tabla #15); y por último en muestras con cuentas de S. aureus mayores de 5000 la mayor correlación se presentó con igual positividad para la coagulasa y la termonucleasa a partir de la cepa aislada de la colonia, y negatividad para la termonucleasa directa del alimento (46.75%). Aunque en este caso también hubo bastante correlación cuando los tres parámetros fueron positivos (42.85%). (ver tabla #16).

En la tabla # 17 se correlaciona la determinación de la termonucleasa directa del alimento y la determinación de la termonucleasa aislada de la colonia en muestras con cuentas menores de 100 colonias /g de alimento, mientras que en la tabla # 18 se relacionan en muestras con cuentas de 100 a 5000 colonias de S. aureus /g de alimento, y por último esta relación en muestras con cuentas mayores de 5000 colonias/g de alimento se ilustra en la tabla # 19.

En la tabla #20 se observa que en muestras que presentaron termonucleasa directa del alimento positivas, el mayor porcentaje se obtuvo cuando también fueron positivas la coagulasa y la termonucleasa a partir de la cepa aislada.(37 muestras,80.45%). En esta misma tabla #20 se obtuvieron 5 muestras que presentaron termonucleasa directa del alimento positiva, y negativa tanto la coagulasa como la termonucleasa a partir de la cepa aislada, y estas 5 muestras tienen cuentas de menos de 100 colonias de S. aureus/g de alimento.

TABLA # 8.- RESULTADOS FINALES Y TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS.

Muestras de queso No.	No. de colonias <u>S. aureus</u> / g de alimento.	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CÉ-PA AISLADA.
			DIAMETRO DEL HALO (mm)	
1	menos de 100	NEGATIVO	0	0
2	200 000	POSITIVO	0	9
3	menos de 100	NEGATIVO	0	0
4	1 000 000	POSITIVO	6	10
5	500 000	POSITIVO	10	13
6	2 000 000	POSITIVO	0	6
7	4 600 000	POSITIVO	0	10
8	84 000	POSITIVO	0	9
9	8 000	POSITIVO	0	9
10	128 000	POSITIVO	0	9
11	66 000	POSITIVO	0	11
12	800 000	POSITIVO	0	9
13	9 200 000	POSITIVO	0	7
14	menos de 100	NEGATIVO	8	0
15	10 000 000	POSITIVO	0	10
16	6 080 000	POSITIVO	9	13
17	160 000	POSITIVO	10	11
18	22 000	POSITIVO	0	10
19	menos de 100	NEGATIVO	0	0
20	480 000	POSITIVO	0	13
21	4 240 000	POSITIVO	6	10
22	10 000	POSITIVO	4	10
23	501	POSITIVO	0	8
24	1 800	POSITIVO	4	9
25	menos de 100	NEGATIVO	0	0
26	43 000	POSITIVO	0	10
27	3 500	POSITIVO	0	10
28	menos de 100	NEGATIVO	0	0
29	menos de 100	NEGATIVO	0	0
30	100	POSITIVO	8	4

Muestras de queso No.	No. de colonias <u>S. aureus</u> / g de alimento.	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CÉPILA AISLADA.
			DIAMETRO DEL HALO (mm).	
31	menos de 100	NEGATIVO	0	0
32	menos de 100	NEGATIVO	0	0
33	menos de 100	NEGATIVO	0	0
34	10 760 000	POSITIVO	0	6
35	3 760 000	POSITIVO	5	5
36	8 720 000	POSITIVO	6	6
37	100 000 000	POSITIVO	7	7
38	10 000 000	POSITIVO	0	10
39	30 000	POSITIVO	0	11
40	10 000 000	POSITIVO	0	10
41	menos de 100	NEGATIVO	0	0
42	menos de 100	NEGATIVO	0	0
43	100	POSITIVO	0	5
44	menos de 100	NEGATIVO	0	0
45	22 500	POSITIVO	0	9
46	10 000 000	POSITIVO	0	11
47	menos de 100	NEGATIVO	0	0
48	menos de 100	NEGATIVO	0	0
49	menos de 100	NEGATIVO	0	0
50	88 000	POSITIVO	0	10
51	menos de 100	NEGATIVO	0	0
52	1 200	POSITIVO	0	5
53	menos de 100	NEGATIVO	0	0
54	300	POSITIVO	0	6
55	menos de 100	NEGATIVO	0	0
56	220 000	POSITIVO	4	13
57	70 000	NEGATIVO	0	11
58	menos de 100	NEGATIVO	8	0
59	1 500 000	POSITIVO	6	10
60	900 000	POSITIVO	0	13

Muestras de queso No.	No. de colonias <i>S. aureus</i> / g de alimento.	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.
			DIAMETRO DEL HALO (mm).	
61	100 000	POSITIVO	0	8
62	35 000	POSITIVO	0	10
63	menos de 100	NEGATIVO	0	0
64	menos de 100	NEGATIVO	0	0
65	menos de 100	NEGATIVO	0	0
66	1 000	POSITIVO	0	4
67	200	POSITIVO	0	4
68	menos de 100	POSITIVO	0	6
69	60 000	POSITIVO	0	8
70	100	POSITIVO	0	3
71	100 000	POSITIVO	0	10
72	menos de 100	NEGATIVO	0	0
73	1 100 000	POSITIVO	0	10
74	200	POSITIVO	0	6
75	200	POSITIVO	0	8
76	350 000	POSITIVO	0	8
77	menos de 100	NEGATIVO	0	0
78	menos de 100	NEGATIVO	0	0
79	menos de 100	NEGATIVO	0	0
80	500 000	POSITIVO	0	6
81	menos de 100	NEGATIVO	0	0
82	menos de 100	NEGATIVO	0	0
83	19 500	POSITIVO	0	8
84	110 000	POSITIVO	0	0
85	menos de 100	NEGATIVO	0	0
86	menos de 100	NEGATIVO	0	0
87	300	POSITIVO	0	8
88	menos de 100	NEGATIVO	0	0
89	50 000	POSITIVO	0	8
90	menos de 100	NEGATIVO	0	0

Muestras de quesos No.	No. de colonias <i>S. aureus</i> / g de alimento.	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.
			DIAMETRO DE HALO (mm).	
91	400 000	POSITIVO	0	10
92	menos de 100	POSITIVO	6	0
93	500	NEGATIVO	0	8
94	100	POSITIVO	0	6
95	más de 10.000 000	POSITIVO	10	10
96	187	POSITIVO	0	9
97	220 000	POSITIVO	6	10
98	585 000	POSITIVO	0	9
99	1 470 000	POSITIVO	6	10
100	15 640 000	POSITIVO	6	9
101	menos de 100	NEGATIVO	8	0
102	menos de 100	NEGATIVO	4	0
103	menos de 100	NEGATIVO	0	0
104	menos de 100	NEGATIVO	0	0
105	menos de 100	NEGATIVO	0	0
106	menos de 100	NEGATIVO	4	0
107	150 000	POSITIVO	0	8
108	más de 10 000 000	NEGATIVO	6	10
109	más de 10 000 000	POSITIVO	6	9
110	160 000	POSITIVO	0	9
111	menos de 100	NEGATIVO	0	0
112	6 000	NEGATIVO	0	10
113	menos de 100	NEGATIVO	0	0
114	menos de 100	NEGATIVO	0	0
115	menos de 100	NEGATIVO	0	0
116	100	POSITIVO	0	8
117	más de 10 000 000	POSITIVO	0	10
118	más de 10 000 000	POSITIVO	8	10
119	menos de 100	NEGATIVO	0	0
120	476 000	POSITIVO	0	12

Muestras de quesos No.	No. de colonias <u>S. aureus</u> / g de alimento	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPAS AISLADA.
			DIAMETRO DE HALO (mm).	
121	30 000	NEGATIVO	0	10
122	12 000	NEGATIVO	0	10
123	606 000	POSITIVO	10	11
124	más de 10 000 000	POSITIVO	8	12
125	más de 10 000 000	POSITIVO	6	11
126	10 000 000	POSITIVO	8	9
127	5 000 000	POSITIVO	8	8
128	600 000	POSITIVO	8	10
129	9 000	NEGATIVO	0	0
130	750 000	POSITIVO	6	10
131	650 000	POSITIVO	5	9
132	menos de 100	NEGATIVO	10	5
133	500 000	POSITIVO	6	6
134	800 000	POSITIVO	4	6
135	120 000	NEGATIVO	5	10
136	600 000	POSITIVO	8	8
137	190 000	POSITIVO	4	6
138	18 000	POSITIVO	6	8
139	menos de 100	NEGATIVO	0	0
140	menos de 100	NEGATIVO	0	0
141	menos de 100	NEGATIVO	0	0
142	menos de 100	NEGATIVO	0	0
143	menos de 100	NEGATIVO	0	0
144	menos de 100	NEGATIVO	0	0
145	150 000	POSITIVO	8	10
146	20 000	POSITIVO	7	8
147	500	POSITIVO	10	10
148	1 000	POSITIVO	10	8
149	menos de 100	NEGATIVO	0	0
150	500 000	POSITIVO	7	7

TABLA # 9

RESULTADOS TOTALES DE MUESTRAS A LAS CUALES SE LES
 DETRMINO: No. DE COLONIAS DE S. aureus /G DE ALI -
 MENTO, TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO, TERMO -
 NUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA Y COAGULASA.

No. de colonias de <u>S. aureus</u> /g de alimento.			Termonucleasa direc- ta del alimento.		Termonucleasa a par- tir de la cepa ais- lada.		Coagulasa	
100	100 a 5000	5000	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
54	19	77	46 Diámetro Prom. del halo 8mm.	104	97 Diámetro Prom. del halo 7mm.	53	89	61

No. total de muestras analizadas: 150.

TABLA # 10

52

Muestras que presentan menos de 100 colonias de S. aureus/g de alimento.

54 muestras - 36%

TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.		TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.		COAGULASA	
POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVAS	NEGATIVAS
7 muestras	47 muestras	2 muestras	52 muestras	2 muestras	52 muestras
13%	87%	3.7%	96.3%	3.7%	96.3%

TABLA # 11

Muestras que no rebasan el límite permisible de S. aureus

(100-5000 colonias / g de alimento)

19 muestras - 12.6%

TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.		TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.		COAGULASA	
POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVAS	NEGATIVAS
4 muestras	15 muestras	19 muestras	0 muestras	18 muestras	1 muestras
21.1%	78.9%	100 %	0%	94.7%	5.3%

TABLA # 12

Muestras que rebasan el límite permisible de S. aureus

(más de 5000 colonias/g de alimento)

77 muestras - 51.3%

TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.		TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.		COAGULASA	
POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVAS	NEGATIVAS
35 muestras	42 muestras	76 muestras	1 muestra	69 muestras	8 muestras
45.45%	54.55%	98.7%	1.3%	89.61%	10.39%

TABLA # 13

RELACION ENTRE LA TERMONUCLEASA DIRECTA
DEL ALIMENTO Y EL NUMERO DE COLONIAS DE
S. aureus .

	Cuenta menor de 100 colonias de <u>S. aureus</u> /g de alimento.	Cuenta de 100 o más colonias de <u>S.aureus</u> /g de alimento.
TERMONUCLEASA DIRECTA POSITIVA.	7 muestras 13%	39 muestras 40.62%
TERMONUCLEASA DIRECTA NEGATIVA.	47 muestras 87%	57 muestras 59.37%
TOTAL	54 muestras	96 muestras

TABLA # 14

RELACION ENTRE LA COAGULASA, LA TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO Y LA TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA, EN MUESTRAS QUE PRESENTAN MENOS DE 100 COLONIAS DE S. aureus /G DE ALIMENTO.

54 muestras - 36%

No. de muestras	%	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.
0	0	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
1	1.85	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA
1	1.85	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA
0	0	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
1	1.85	NEGATIVA	POSITIVA	POSITIVA
5*	9.25	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA
0	0	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVA
46	85.18	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA

* Unicamente la termonucleasa directa del alimento fué positiva.

TABLA # 15

RELACION ENTRE LA COAGULASA, LA TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO Y LA TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA, EN MUESTRAS QUE NO REBASAN EL LIMITE PERMISIBLE DE S. aureus (100-5000 COLONIAS/G DE ALIMENTO).

19 muestras: 12.6%.

No. de muestras	%	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.
4	21.05	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
0	0	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA
14	73.68	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA
0	0	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
0	0	NEGATIVA	POSITIVA	POSITIVA
0	0	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA
1	5.26	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVA
0	0	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA

TABLA # 16

RELACION ENTRE LA COAGULASA, LA TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO Y LA TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA, EN MUESTRAS QUE REBASAN EL LIMITE PERMISIBLE DE S. aureus (MAYOR DE 5000 COLONIAS/G DE ALIMENTO).

77 muestras - 51.3%

No. de muestras	%	COAGULASA	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.
33	42,85	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
0	0	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA
36	46.75	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA
0	0	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
2	2.59	NEGATIVA	POSITIVA	POSITIVA
0	0	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA
5	6.49	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVA
1	1.29	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA

TABLA # 17

MUESTRAS QUE PRESENTAN MENOS DE 100 COLONIAS DE S. aureus
(0-99 COLONIAS/G DE ALIMENTO). 54 muestras-36%

57

TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (+) , y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (+)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (+), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (-)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (-), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (+)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (-), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (-)
1 muestra 1.85%	6 muestras 11.1%	1 muestra 1.85%	46 muestras 85.18%

TABLA # 18

MUESTRAS QUE NO REBASAN EL LIMITE PERMISIBLE DE S. aureus
(100-5000 COLONIAS/G DE ALIMENTO). 19 muestras-12.6%

TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (+), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (+)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (+), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (-)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (-), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (+)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (-), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (-)
4 muestras 21.05%	0 muestras 0%	15 muestras 78.94%	0 muestras 0%

TABLA # 19

MUESTRAS QUE REBASAN EL LIMITE PERMISIBLE DE S. aureus
(MAYOR DE 5000 COLONIAS/G DE ALIMENTO). 77 muestras-51.3%

TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (+) , y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (+)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (+), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (-)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (-), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (+)	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO (-), y TERMONUCLEASA AISLADA DE LA COLONIA (-)
35 muestras 45.45%	0 muestras 0%	41 muestras 53.24%	1 muestra 1.29%

TABLA # 20

RELACION DE MUESTRAS QUE FUERON TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO POSITIVAS CON LA DETERMINACION DE TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA Y LA DETERMINACION DE COAGULASA.

No. de muestra	TERMONUCLEASA DIRECTA DEL ALIMENTO.	TERMONUCLEASA A PARTIR DE LA CEPA AISLADA.	COAGULASA	%
37	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA	80.47
5*	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	10.86
3	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVA	6.52
1	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA	2.17

* Cabe hacer mención que estas cinco muestras, en su totalidad presentan cuentas de S. aureus con menos de 100 colonias/g de alimento.

11.- DISCUSION DE RESULTADOS.

- 11.1.- Analizando los resultados se observa que el 51.3% del total de muestras, rebasan el límite permisible por la Sria. de Salud para S. aureus, (el cual es de 5000 col. de S. aureus/g de alim.); el 12.6% cae dentro de dicho límite; mientras que el 36% presentan cuentas de S. aureus de 0-99 col./g de alim.
- 11.2.- Con respecto a la determinación de termonucleasa directa del alimento, de las 150 muestras analizadas, solo 46 muestras (30.66%) fueron positivas; mientras que 104 muestras (69.34%) fueron negativas.
- 11.3.- Para la detrmínación de la termonucleasa aislada de la colonia, de las 150 muestras analizadas, 97 muestras (64.66%) fueron positivas; mientras que 53 muestras (35.34%) fueron negativas.
- 11.4.- Con respecto a la determinación de coagulasa, de las 150 muestras analizadas, 89 muestras fueron coagulasa positivas (59.33%), y 61 muestras fueron coagulasa negativas (40.67%).
- 11.5.- De las 150 muestras analizadas, 54 muestras presentaron cuentas de 0-99 col. de S. aureus/g de alim.; de las cuales 7 muestras (13%) fueron termonucleasa directa del alimento positivas y 47 muestras (87%) fueron negativas. (Pudiendo ser que en realidad no presentaron S. aureus).
- 11.6.- Por otra parte, relacionando la termonucleasa directa del alimento con la termonucleasa aislada de la colonia, se observa que de las 46 muestras que fueron positivas para la termonucleasa directa del alimento, 40 muestras (87%) también fueron positivas para la termonucleasas aislada de la colonia; mientras que 6 muestras (13%) fueron termonucleasa directa del alimento positivas y termonucleasa aislada de la colonia negativas.
- 11.7.- Relacionando la determinación de termonucleasa directa del alimento con el No. de col. de S. aureus/g de alim., se observa que de las 46 muestras positivas para la termonucleasa directa, 7 muestras (15.21%) presentan menos de 100 colonias/g de alim., 4 muestras (8.69%) presentan entre 100 y 5000 col./g de alim., y 35 muestras (76.1%) rebasan el límite permisible por la Sria de Salud.
- 11.8.- Relacionando la determinación de termonucleasa directa del alimento con la determinación de coagulasa, se observa que de las 46 muestras positivas para la termonucleasa directa, 38 muestras (86.36%) fueron coagulasa positivas; mientras que 8 muestras (17.4%) fueron coagulasa negativas.
- 11.9.- Por otra parte, relacionando la determinación de termonucleasa a partir de la cepa aislada con la coagulasa (en muestras con cuentas menores de 100 col. de S. aureus/g de alim.), se observa que hay una mejor correlación respecto al punto anterior, pues todas las muestras que fueron termonucleasa a partir de la cepa aislada positivas, también fueron positivas para la coagulasa.

11.10.- Por último, y de gran importancia, es lo que se presenta en la tabla #20, donde se relacionan muestras positivas para la termonucleasa directa del alimento, y se observa que hubo 5 muestras que presentaron negatividad para la coagulasa y la termonucleasa a partir de la cepa aislada, para un 10.86% el cual es bastante aceptable. Estas 5 muestras presentan en común cuentas con menos de 100 col. de S aureus/g de alim., lo cual puede ser la razón principal para obtener dichos resultados.

12.- CONCLUSIONES.

- 12.1.- Esta determinación es muy importante, ya que detecta la enzima termonucleasa aún cuando el microorganismo no esté presente, lo cual representa una gran ventaja, pues mediante otros métodos es necesario aislar primero el microorganismo, y después, a partir de este detectar la termonucleasa.
- 12.2.- La concentración, tiempo de incubación, la temperatura y pH (8.5), afectan significativamente el método de la microplaca por difusión en agar para determinar la enzima termonucleasa.
- 12.3.- La metodología utilizada para la demostración de la termonucleasa directamente del alimento no fué muy satisfactoria, resultando más confiable la demostración de la termonucleasa a partir de la cepa aislada.
- 12.4.- Generalmente para la determinación de termonucleasa directa del alimento la cuenta de S. aureus tiene que ser alta (1000,000 col/g de alim.), aunque existen factores que interfieren negativamente en una relación cuantitativa entre la cantidad de enzima y el número de estafilococos presentes en la muestra (temperatura, pH, destrucción de colonias por efectos físicos y químicos, etc.).
- 12.5.- A pesar de lo mencionado anteriormente, se puede determinar la termonucleasa directa del alimento aún en muestras con 0 o menos de 100 col de S aureus/g de alimento.
- 12.6.- La detección de termonucleasa directa del alimento puede sugerir inmediatamente que el alimento está o estuvo contaminado con S. aureus y que es posible la presencia de enterotoxinas.
- 12.7.- La extraordinaria termoestabilidad de la enzima representa una gran ventaja para la identificación de S. aureus y consecuentemente del origen de determinada intoxicación alimentaria.
- 12.8.- Rutinariamente deben realizarse paralelamente la prueba de la coagulasa y termonucleasa para lograr emitir un diagnóstico más confiable.
- 12.9.- Es muy importante el control sanitario de los productos lácteos, ya que, por ser alimentos que además de reunir todos los elementos nutritivos para el desarrollo de los microorganismos, generalmente se exponen a diversas fuentes de contaminación por falta de higiene y precaución en su manejo y almacenamiento.
- 12.10.- Generalmente los productos lácteos (en especial el queso), son alimento de amplio consumo que ocasionalmente sufren algún tratamiento capaz de reducir su carga bacteriana (la pasteurización entre ellos, la cual muchas veces es insuficiente o deficiente).

- 12.11.- Se puede establecer que nuestros objetivos se cumplieron en forma general, pues se logró determinar la enzima termonucleasa directamente del alimento, y está de comparó con la termonucleasa a partir de la cepa aislada, aunque el porcentaje de correlación no fué muy satisfactorio (58%). Por otra parte se relacionó adecuadamente la determinación de termonucleasa directa del alimento con el número de colonias de S. aureus/g de alimento, aún cuando también se logró determinar la enzima en muestras que presentaron 0 colonias (se puede pensar que en algún tiempo estuvo presente el S. aureus en el alimento, pero que por efectos físicos fueron destruidos y solo quedó presente la enzima termonucleasa producida en ese tiempo por el S. aureus y que dada su termoestabilidad, logró resistir dichos efectos físicos).
- 12.12.- Entre menos colonias de S. aureus estén presentes en el alimento, mejor es la correlación entre la termonucleasa a partir de la cepa aislada y la coagulasa (100% de correlación).
- 12.13.- La termonucleasa a partir de la cepa aislada se determinó en la totalidad de las muestras con cuentas de S. aureus entre 100 y 5000 col./g de alimento (100%) y el porcentaje de positividad para la misma enzima fué menor en muestras que presentaron menos de 100 colonias de S. aureus/g de alim..(Solo 2 muestras fueron positivas para un 3.7% y 52 muestras fueron negativas para un 96.3%).
- 12.14.- Entre más contaminado esté el queso, más positividad presenta la termonucleasa directa del alimento.
- 12.15.- Es mejor la correlación entre la termonucleasa a partir de la cepa aislada y la coagulasa, que la termonucleasa directa del alimento y la coagulasa.

- 13.1.-La técnica aquí descrita para la determinación de la termonucleasa directa del alimento puede llevarse a cabo de rutina en el laboratorio, ya que por medio de ella podemos determinar si un alimento es sospechoso de poder causar intoxicación alimentaria.
- 13.2.-Si el alimento resulta sospechoso mediante la técnica antes mencionada, realizar la determinación de enterotoxinas (esta prueba no se determina en rutina por sus cuidados excesivos y alto costo).
- 13.3.-Se debe concientizar a las personas que tienen acceso directo a la manipulación de alimentos, de tener una buena salud y una buena higiene general.
- 13.4.-La leche por ser un alimento rico en nutrientes, debe de almacenarse en condiciones adecuadas como son: temperatura de refrigeración, tanques de almacenamiento limpios y debidamente saneados, exámenes microbiológicos continuos, etc.
- 13.5.-Realizar muestreos periódicos de productos lácteos, principalmente en lugares insalubres o de bajo nivel económico, así como de diferentes lugares de venta (tiendas de autoservicio, abarrotes, restaurantes, plantas, etc) para tener un control microbiológico adecuado por parte de la Secretaría de salud.
- 13.6.-Se sugiere establecer en los laboratorios de diagnóstico microbiológico la prueba de termonucleasa como un criterio de identificación de S. aureus, tanto en el área médica como en el área de microbiología de alimentos.

14.- ANEXOS

14.1.- Preparación y estandarización de soluciones.

a) Acido tricloroacética (TCA) 3 M, 100 ml.

P.M. 163.39 g/mol	163.39g	-----	1 Molar
	X	-----	3 Molar
		X= 490.20g	
	490.20g	-----	1000 ml
	X	-----	100 ml
		X= 49.02g	aforados a 100ml.

b) Hidroximetin-aminometano (TRIS) 0.05M, 100 ml.

P.M. 121.1 g/mol	121.1g	-----	1 Molar
	X	-----	0.05 Molar
		X= 6.055g	
	6.055g	-----	1000 ml
	X	-----	100 ml
		X= 0.605g	aforados a 100ml.

c) Hidróxido de sodio (NaOH) 1 N, 100 ml.

P.M. 40.0 g/mol.	40.0g	-----1N-----	1000 ml
	X	-----1N-----	100 ml
		X= 4.0g	aforados a 100ml.

d) Acido clorhídrico (HCL) 1N, 100 ml.

P.M. 36.5 g/mol	36.5g	-----1N-----	1000 ml
densidad 1.18g/ml	X	-----1N-----	100 ml
pureza 36%		X= 3.65g	
Densidad = masa/volumen	Volumen= masa/densidad = 3.65g/1.18g/ml		-3.09ml
	3.09ml	-----36%	
	X	-----100%	
		X=8.58ml	aforados a 100 ml.

14.2.- Preparación y estandarización de Medios de Cultivo.a) Agar Baird-Parker (Agar glicina-piruvato-telurito-yema de huevo).

Este agar se utiliza para el aislamiento selectivo y enumeración de esta-filococos coagulasa positivos.

Formula aproximada en g/l :

Peptona de caseína -----	10.0
Extracto de carne -----	5.0
Extracto de levadura -----	1.0
Cloruro de litio -----	5.0
Agar -----	17.0
Glicina -----	12.0
Piruvato de sodio -----	10.0

pH final 6.8 ± 0.2

PREPARACION:

Suspender 60.0g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 5 a 10 minuto. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Enfriar a $45-50^{\circ}\text{C}$ y agregar 10 ml de solución de telurito de potasio al 1% y 50 ml de emulsión de yema de huevo.

Homogenizar suavemente y vaciar en cajas de petri.

Este medio de cultivo contiene cloruro de litio y telurito, para la inhibición de la flora acompañante, en tanto que el piruvato y la glicina actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de estafilococos.

Sobre el medio de cultivo opaco por su contenido en yema de huevo las colonias de estafilococos muestran dos características diagnósticas por lipólisis y proteólisis; se producen halos y anillos característicos y debido a la reducción de telurito a telurio se desarrolla una coloración negra. La reacción con la yema de huevo y la reducción de telurito se presentan en notable paralelismo con la coagulasa positiva y, por lo tanto, pueden utilizarse como índice de esta última.

b) Agar Azul de Toluidina-DNA (TDA).

Formula aproximada en g/l :

DNA (Merck) -----	0.3
Agar (difco) -----	10.0
CaCl_2 (0.01M) -----	1.0 ml
NaCl -----	10.0
Azul de toluidina (0.1M) -----	3.0 ml
TRIS (Sigma pH 9.0) -----	6.0

pH final 9.0 ± 0.2

PREPARACION:

Disolver completamente el DNA y el agar en la solución TRIC. Cuando ya se haya disuelto totalmente añadir el NaCl y CaCl₂. Calentar a ebullición hasta la disolución total. Al final agregar los 3.0 ml de azul de toluidina. Vertir el medio caliente en a placa de termonucleasa y dejar solidificar. El medio se almacena en refrigeración y para utilizarse posteriormente sólo se funde, sin que con esto el medio pierda en lo más mínimo sus características originales.

c) Infusión de Cerebro-Corazón (caldo BHI).

Es un medio líquido muy rico en nutrientes y especialmente útil para el cultivo y desarrollo de germen delicados y difíciles. Se utiliza para realizar la prueba de Coagulasa y la prueba de termonucleasa a partir de la cepa aislada.

Formula aproximada en g/l :

Infusión de cerebro de ternera -----	200.0
Infusión de corazón de rez -----	250.0
Peptona de gelatina -----	10.0
Dextrosa -----	2.0
Cloruro de sodio -----	5.0
Fosfato disódico -----	2.5

pH final : 7.4 ± 0.2

PREPARACION:

Suspender 37g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y calentar ligeramente, envasar y esterilizar a 121°C (15 lb de presión), durante 15 minutos.

14.3.- TECNICAS ADICIONALES.a) Cuenta de colonias de S. aureus en el medio Baird-Parker.

Pesar 10 g de muestra de alimento (en este caso queso) y homogenizar durante un min. con 90 ml de solución reguladora de fosfatos a pH 7.2. A partir de esta dilución (10⁻¹) preparar diluciones de 10⁻² y 10⁻³ con 90 ml de solución reguladora de fosfatos pH 7.2. Ya preparadas estas diluciones decimales (10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³) transferir 0.1 ml de cada dilución a placas de agar Baird Parker utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución.

Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con una varilla estéril utilizando una para cada dilución.

Mantener las placas en esa posición hasta que el inóculo sea absorbido por

el agar (aprox. 10 minutos). Invertir las placas e incubar durante 45-48 horas a 35°C (ver figura 11).

Seleccionar las placas que tengan entre 20 y 200 colonias típicas de *S. aureus*, si no es posible, las placas de diluciones más altas, aunque tengan más de 200 colonias.

Las colonias típicas son: negras, circulares, brillantes, convexas, de 2-3 mm de diámetro, rodeadas por una zona clara en todo el medio opaco.

Seleccionar el número de colonias y realizar la prueba de coagulasa y termónucleasa.

b) Prueba de coagulasa.

Sembrar el número de colonias (3 colonias, si son sospechosas menos de 50; 5 colonias, si son sospechosas entre 51 y 100; 7 colonias, si son sospechosas más de 101), en 0.05 ml. de caldo BHI. Incubar a 35°C durante 24 hr..

Al mismo tiempo inocular en la misma forma cepas conocidas de *S. aureus* y *S. epidermidis* como testigos positivo y negativo respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación, transferir 0.3 ml. a un tubo estéril, para la prueba de la termónucleasa. Al resto del cultivo agregar 0.2 ml. de plasma diluído volumen a volumen con solución salina estéril. Incubar en baño de agua a 35-37°C y observar a intervalos de 1 a 6 hr..(ver tabla #12).

Considerar positiva la prueba si hay la formación de coágulo total en la mezcla (ver tabla #14).

c) Prueba de termónucleasa a partir de la cepa aislada.

En un portaobjetos limpio y desengrasado, agregar 3.0 ml. del medio Agar-Azul de Toluidina-DNA fundido. Esparcirlo en toda la superficie y dejar solidificar. Hacer perforaciones de 2 mm de diámetro con una pipeta pasteur. Calentar el cultivo del caldo BHI (0.3 ml previamente separados en la prueba de coagulasa) en baño de agua a 100°C durante 15 min.. Transferir una gota de cada tubo a los orificios de la placa del agar. Incubar en cámara húmeda durante 4 hr a 35°C (ver figura #12).

La aparición de un halo de color rosa alrededor de la perforación se considera como prueba positiva.(ver figura #5 y #6).

d) Reporte del número de colonias de *S. aureus* en la muestra.

Computar el contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias sospechosas, la dilución seleccionada para el conteo de colonias sospechosas y el volumen de muestra inoculado.

Informar cuenta de *S. aureus* coagulasa positivos como colonias/g ó ml de ali-

mento.

Ejemplo: La caja tenia 80 colonias sospechosas en la dilución 1:1000. Se tomaron 5 colonias para la prueba de coagulasa y termonucleasa. 4 colonias fueron positivas:

$$\frac{5}{80} \times 4 = \frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640,000$$

X: 64

64: No. de colonias de S. aureus (confirmadas).

1000: Dilución utilizada

10: Volumen sembrado en la dilucion 1:1000.(Se sembró una décima.

15.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Amador, R.L., 1982. Determinación de la enterotoxigenicidad de cepas de S. aureus aisladas de productos cárnicos. Tesis profesional. E.N.C.B., I.P.N., México D.F.
- 2.- Barry, A.L., Lachica, R.V., and Atchison, F.W.. 1973. Identification of Staphylococcus aureus by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease test. Appl. Microbiol. 25: 496-497.
- 3.- Boothby, J., C. Genigeorgis, and M.J. Fanelli. 1979. Tandem coagulase/thermonuclease agar method for detection of Staphylococcus aureus. Appl. Environ Microbiology. 37: (2): 298-302.
- 4.- Casman, E.P., and R.W. Bennet. 1965. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Appl. Microbiol. 13: 181-189.
- 5.- Chesbro, W.R., and K. Auburn. 1967. Enzymatic detection of the growth of Staphylococcus aureus in foods. Appl. Microbiol. 15: 1150-1159.
- 6.- Cords, B.R. and R. Tatini. 1973. Applicability of heat stable deoxyribonuclease assay for the assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. Journal of Dairy Science. 56; (12): 1512-1519.
- 7.- Emswiler-Rose B.S., R.W. Johnston, M.E. Harris, and W.H. Lee. 1980. Rapid detection of staphylococcal thermonuclease on casing of naturally contaminated fermented sausages. Appl. and Environmental Microbiology. 40; (1): 13-18.
- 8.- Erickson, A., and R.H. Deibel. 1973. Production and heat stability of staphylococcal nuclease. Appl. Microbiol. 25: 332-336.
- 9.- Frazier, J. Microbiología de los alimentos; Editorial Acribia, 2a. ed. Zaragoza, España. 1976. pp. 430-435.
- 10.- Freed, R.C., M.L. Evenson, R.F. Raiser and M.S. Bergdoll. 1982. Enzyme linked Immunosorbent Assay for detection Elisa of staphylococcal enterotoxins in foods. Environ Microbiology. 44; (6): 1349-1355.
- 11.- García, M.L., B. Moreno, and M.S. Bergdoll. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. Appl. Environ Microbiology. 39: 548-553.
- 12.- Gramoli, J.L., and B.J. Wilkinson. 1978. Characterization and identification of coagulase negative, heat stable deoxyribonuclease positive staphylococci. J.G. Microbiology. 105: 275-285.
- 13.- Gutierrez, L.M., I. Menes, M.L. García. 1982. Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. Journal of Food Protection. 45; (14): 1282-1286.
- 14.- Ibrahim, G.F., and K. Baldock. 1981. Thermostable deoxyribonuclease content and enterotoxigenicity of cheddar cheese made with subnormal starter activity. Journal of Food Protection. 44; (9): 655-660.

- 15.- Jamlaug, E.M., M.L. Bartlett, and H.E. Snyder. 1971. Effect of pH protein concentration, and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Environ Microbiol.* 22; (6): 1034-1040.
- 16.- Jawetz, E., J. Melnick, E. Adelberg. *Manual de Microbiología Médica, Ed. Manual Moderno.*, 6a. ed., México D.F., 1975. pp 101-107, 198-203.
- 17.- Jay H. *Microbiología Moderna de los alimentos.*, Ed. Acribia., 1a. ed.; Zaragoza España. 1973. pp 190-203, 179-183.
- 18.- Koneman, E.W., S.D. Allen, W.R. Dowell, H.M. Sommers. *Diagnóstico Microbiológico.*, Ed. Panamericana, 1a. ed., Buenos Aires-Argentina. 1983. pp 291-314.
- 19.- Koupal, A., and R.H. Deibel. 1978. Rapid qualitative method for detection staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Environ Microbiology.* 35: 1193-1197.
- 20.- Lachica, R.V. 1980. Accelerated procedure for the enumeration and identification of Food-borne Staphylococcus aureus. *Appl. Environ Microbiol.* 39: 17-19.
- 21.- Lachica, R.V. 1984. Egg yok-free baird-parker medium for the accelerated enumeration of foodborne Staphylococcus aureus. *Appl. Environ Microbiol.* 48; (4): 870-871.
- 22.- Lachica, R.V., C. Genigeorgis, and P.D. Hoeprieh. 1971. Metachromatic agar diffusion method for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* 21: 585-587.
- 23.- Lachica, R.V., K.F. Weiss, and R.H. Deibel. 1969. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat stable deoxyribonuclease production by Staphylococcus aureus. *Appl. Microbiol.* 18: 126-127.
- 24.- Lachica, R.V., P.D. Hoeprieh and C. Genigeorgis. 1971. Nuclease production and lysostaphy susceptibility of Staphylococcus aureus and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.* 21: 823-826.
- 25.- Lachica, R.V., Hoeprieh, and C. Genigeorgis. 1972. Metachromatic agar diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Microbiol.* 23; (1): 168-169.
- 26.- Lachica, R.V., P.D. Hoeprieh, and C.E. Franti. 1972. Convenient assay for staphylococcal nuclease by the metachromatic well-agar diffusion technique. *Appl. Microbiol.* 24: 920-923.
- 27.- Lachica, R.V., P.D. Hoeprieh, and H.P. Rieman. 1972. Tolerance the staphylococcal thermonuclease to stress. *Appl. Microbiol.* 23;(5): 994-997.
- 28.- Lachica, R.V., and R.H. Deibel. 1969. Detection of nuclease activity in semisolid and both cultures. *Appl. Microbiol.* 18: 174-176.
- 29.- Lerman, L.S. 1963. The structure of the DNA acridine complex. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 49: 94-104.
- 30.- Lotter, L.P., and C.A. Genigeorgis. 1975. Deoxyribonuclease acid base composition and biochemical properties of certain coagulase negative enterotoxigenic

- cocci. Appl. Microbiol. 29; (2): 152-158.
- 31.- Mandokhot, U.V., and N.K. Chandiramani. 1983. Staphylococcal food poisoning by consumption of sreetmeat. Indian. J.Med. Res. 77: 190-193.
 - 32.- Medwid, R.D., and D.W. Grant. 1980. Inactivation of staphylococcal thermonuclease by an enzyme-like factor produced by Staphylococcus fecalis subsp. liquefaciens. Journal of Food Protection. 43; (3): 201-202.
 - 33.- Melconian, A.K., J.P. Flandrois, and J. Fleurette. 1983. Modified method for production and purification of Staphylococcus aureus enterotoxin B. Appl. Environ Microbiol. 45: 1140-1143.
 - 34.- Michaelis, L., & S. Granick. 1945. Metachromasy of basic dyestuffs. J. Amer.Chem. Soc. 67: 1212-1217.
 - 35.- Microbiological Specifications Commission International for Food. Microorganisms in food. 1978. I and II., 2nd. ed. University of Toronto Press, Toronto.
 - 36.- Nickerson, M. Microbiología de alimentos y sus procedimientos de elaboración. Ed. Acirbia; la. ed., Zaragoza España. 1978. pp. 40, 233-241.
 - 37.- Niskanen, A., and E. Nurmi, 1976. Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. Appl. Environ Microbiol. 31: 11-20.
 - 38.- Niskanen, A., L. Koiranen. 1977. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some biochemical properties of staphylococcal strain isolated from different sources. J. Food Protect. 40: 543-548.
 - 39.- Niskanen, A., and M. Aalto. 1978. Comparison of selective media for coagulase positive enterotoxigenic Staphylococcus aureus. Appl. Environ Microbiol. 35; (6): 1233-1236.
 - 40.- Park, C.E., H.B. Dereea, and M.K. Rayman. 1979. Effect of non-fat dry milk on recovery of staphylococcal thermonuclease from food. Can. J. Microbiol. 25: 44-46.
 - 41.- Pérez Reyez, M.A. 1985. Infecciones de la piel y músculo esquelético producidas por la familia micrococcaceae. Concurso de oposición en Biología Médica. E.N.E.P. Zaragoza., U.N.A.M., México D.F.
 - 42.- Rajalakashmi, and K. Rajalakashmi. 1982. Types of enterotoxin production by Staphylococcus aureus isolated from cases of food poisoning., Indian J. Méd. Res. 76: 127-129.
 - 43.- Reiser, R., D. Conaway, and M.S. Bergdoll. 1974. Detection of Staphylococcal enterotoxin in foods. Appl. Microbiol. 27: 83-85.
 - 44.- Ramirez, B.M.P. 1983. Relación entre la prueba de la coagulasa, termonucleasa y producción de enterotoxinas de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de productos cárnicos. Exámen general por áreas. F.N.C.B. , I.P.N., México D.F.
 - 45.- Striles M.E., and L. King. 1981. Use of baird-parkers medium to enumerate Staphylococcus aureus in meats. Journal of food Protection. 4; (8): 583-587.

- 46.- Takezo, V., and Y. Ichikawa. 1979. Characteristic's of extracellular nuclease production in Staphylococcus aureus. Microbiol. Immunol. 23;(7): 679-684.
- 47.- Tood E., R. Szabo, H. Roborn, T. Gleeson. 1981. Variation in counts enterotoxin levels and TNase in swiss-type cheese contaminated with Staphylococcus aureus. J.F. Protection. 44; (11): 839-848.
- 48.- Tucker, P.W., E.E. Hazen, and F.A. Cotton. 1978. Staphylococcal nuclease reviewed: A prototypic study in contemporary enzymology . I. Isolation physical and enzymatic properties. Molecular & Cellular Biochemistry. 22; (2): 67-77.