



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**“ Características e Importancia Sanitaria de
Staphylococcus Aureus en la Leche y Productos
Lácteos que se Consumen en el
Distrito Federal ”**

Estudio Monográfico:

QUE PRESENTA LA PASANTE DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

Orientación Tecnología de Alimentos

CONCEPCION GARCIA ORTIZ

México, D. F.

1 9 8 0



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

J U R A D O

PRESIDENTE	PROF. NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA
VOCAL	PROF. RUBEN BERRA GARCIA-COSS
SECRETARIO	PROF. EDUARDO BARZANA GARCIA
1er. SUPLENTE	PROF. FIDEL FIGUEROA MARTINEZ
2do. SUPLENTE	PROF. RICARDO BERNAL CASTELAZO

Sitio donde se desarrolló el tema: FACULTAD DE QUIMICA Y
OTRAS BIBLIOTECAS.

Nombre del sustentante: CONCEPCION GARCIA ORTIZ

Nombre del asesor: NATALIA SALCEDO OLAVA -
RRIETA.

C O N T E N I D O

OBJETIVO.

GENERALIDADES SOBRE LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS.

GENERALIDADES SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

IDENTIFICACION DE CEPAS.

PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS.

CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

O B J E T I V O :

A pesar de la extensa investigación sobre Staphylococcus aureus, sus requerimientos de crecimiento, epidemiología y medidas de combate, este microorganismo continúa siendo uno de los principales organismos productores de intoxicaciones alimentarias. La intoxicación causada por Staphylococcus aureus se caracteriza por su baja mortalidad y relativamente corta duración.

La intoxicación es causada por un grupo de toxinas potentes, diferenciadas serológicamente, estables al calor, las cuales son difíciles de determinar rutinariamente en las instalaciones de elaboración de alimentos.

Por estas razones, las medidas que se han tomado para combatir al organismo e impedir la producción de enterotoxinas han sido especialmente críticas. No hace mucho tiempo que la Ciudad de México se vió sacudida por una intoxicación masiva de niños, los cuales habían ingerido un producto derivado de la leche; este brote fué sumamente dramático y causó el pánico en muchas familias mexicanas.

Es por esto que nos aplicamos a la búsqueda bibliográfica de nuevos métodos más sensibles y rápidos, a fin de que en el futuro, en casos que esperamos sean fortuitos, sea más fácil determinar la presencia de estas toxinas.

xinas alimentarias, así como establecer las medidas adecuadas para evitar en todo lo posible su formación en los alimentos.

LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

Características:

[La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría, es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y reacción iónica (pH) cercana a la neutralidad.

[La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituido por otros alimentos.]

[La leche es una emulsión de materia grasa en forma globular, es un líquido que presenta analogías con el plasma sanguíneo. Este líquido es asimismo una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución verdadera que contiene principalmente, lactosa y sales minerales.

[La leche de vaca contiene 88% de agua y 12% de sólidos, los sólidos comprenden 3.3% de proteína, 3.6% de grasa y 4.7% de lactosa. En la Tabla 1 se da la composición media de la leche de vaca en sus principales elemen-

tos y las propiedades físicas más importantes.

En la Tabla 2 se da el valor nutritivo de la leche de vaca, estas cifras muestran que 570 ml. diarios de leche proporcionan una gran parte de las proteínas, el calcio, la riboflavina y la vitamina "A" necesarios.

// Productos lácteos: //

Entre los productos lácteos se encuentran:

- 1) Leche de consumo, no modificada.
 - a) Leche cruda.
 - b) Leche pasteurizada y esterilizada.
- 2) Crema: parte de leche rica en materia grasa y separada de la leche desnatada mediante reposo o centrifugación.
- 3) Mantequilla: obtenida por batido de la crema.
- 4) Queso: Obtenido por coagulación de la leche, generalmente bajo la acción del cuajo. El coágulo se separa del suero (que contiene las sustancias solubles) y forma el queso tras el prensado y la maduración; contiene la caseína y la grasa de la leche. La Tabla 3 indica un modo útil de clasificar los tipos y variedades importantes de queso. Se basa en gran parte en las propiedades de textura de los quesos y en el principal ti

po de maduración. La Tabla 4 muestra las composiciones aproximadas, en porcentajes, de varios de estos quesos.

5) Leches elaboradas:

- a) Leche entera en polvo: la leche entera se deshidrata hasta el nivel de un 97% de sólidos mediante el secado por atomización o en tambor.
- b) Leche descremada en polvo que no contiene grasa.
- c) Leche en polvo semidescremada que se usa en ocasiones para la alimentación infantil.
- d) Leche evaporada o condensada sin endulzar: la leche evaporada es la forma de leche concentrada que más se usa, se concentra hasta que su contenido de sólidos sea aproximadamente 2,25 veces el de la leche entera natural. Generalmente su procesamiento sigue este orden: la leche cruda entera se clarifica, se concentra, se fortalece con vitamina D (para que contenga 400 unidades por litro cuando la leche evaporada se diluye con un volumen igual de agua), se homogeneiza se introduce a las latas, se esteriliza ya envasada en grandes autoclaves de operación continua a unos 117.5°C por 15 min. y se enfría. Este tratamiento térmico da a la leche evaporada el color caramelizado y el sabor a cocido que la caracteriza.
- e) Leche condensada, endulzada: a diferencia de la leche evaporada, la leche concentrada azucarada no es

tá estéril, pero la multiplicación de las bacterias presentes en este producto se evita mediante la acción preservativa del azúcar. El producto se hace a base de leche pasteurizada, concentrada primero y luego suplementada con sacarosa, se ajustan la concentración y la adición de azúcar a fin de que ésta represente un 63% del producto final.

f) Leche fermentada.

La leche fresca sólo se conserva durante pocas horas, a menos que se enfríe, la leche esterilizada se conserva durante varias semanas. Sin embargo, la razón principal para pasteurizar la leche es garantizar que las bacterias patógenas, provenientes de una vaca que pueda estar enferma o de leche contaminada, no causen infecciones al consumidor. El producto más nuevo introducido al mercado es la leche tratada a temperaturas sumamente elevadas que se conserva durante varios meses.

La pasterización es un tratamiento a base de calor ligero y provoca la pérdida de aproximadamente el 20% de la vitamina "C", el 10% de la tiamina y una cantidad menor de la vitamina B₁₂. De todas maneras, como la leche contribuye en muy poco al contenido en vitamina "C" de nuestra dieta, estas pérdidas representan una desventaja muy pequeña en comparación con el beneficio de contar con una leche inocua.

Se distinguen tres tipos de pasterización:

- 1) Pasterización por lotes o de retención: En que se calienta cada partícula de la leche hasta que alcanza una temperatura mínima de 62.7°C y se retiene por un mínimo de 30 min. Además de eliminar los patógenos comunes este tratamiento también inactiva la enzima láctea lipasa, que de otra manera, enranciaría la leche.

- 2) Pasterización a elevada temperatura por corto tiempo: Se emplea una temperatura mínima de 71.5°C y se retiene por un mínimo de quince segundos.

- 3) Pasterización ultra rápida: En la que la leche se calienta en capa fina a 120°C por 1 seg. Pueden utilizarse $125-135^{\circ}\text{C}$ de 2 a 3 seg.; esta pasterización afecta a la proteína y a la grasa de la leche. Se usa generalmente con leches con poca grasa.

La leche pasterizada no está estéril, de manera que es preciso enfriarla rápidamente después de la pasterización a fin de impedir la multiplicación de las bacterias supervivientes, se enfría hasta alcanzar temperaturas de unos 7°C o inferiores a ésta.

Microorganismos patógenos en la leche:

La leche y la mayor parte de los productos lácteos (crema, mantequilla, queso, etc.), pueden contener microorganismos patógenos para el hombre y ser agentes de

transmisión de enfermedades contagiosas, estos microorganismos tienen varios orígenes:

1) El animal:

- a) Cuando existen microorganismos en la mama pasan a la leche con el ordeño, éste es el origen más importante del bacilo tuberculoso (BK tipo bovino), brucelas y estafilococos. Las enterobacterias (E. coli, Salmonella), Coxiella burneti, los estreptococos y otros microorganismos menos frecuentes, pueden tener este origen.
- b) El animal puede ser una causa indirecta de infección mediante los excrementos; las partículas de éstos, bajo diferentes formas, llegan fácilmente a la leche cuando su recogida no se hace con cuidado y los microorganismos peligrosos como BK y brucelas, penetran de esta manera en ella.
- c) La proximidad de animales de otras especies aumenta los riesgos de infección, por ejemplo la cabra es un vehículo de brucelas.

- 2) El medio exterior: Las aguas y el suelo son depósitos de microorganismos patógenos. Con el polvo, las gotas de agua y las infiltraciones diversas, estos microorganismos pueden llegar a la leche en el momento de la recogida y a lo largo de las manipulaciones y tratamien-

tos a que se le somete. Este tipo de contaminación no es específico de la leche, sino que puede encontrarse en todas las sustancias alimenticias; se refiere principalmente a los causantes de enfermedades propias del hombre, por ejemplo: Salmonelas, estreptococos, bacilos diftéricos (Corynebacterium diptheriae), virus de la poliomielitis y otros.

- 3) El hombre: El mismo hombre es una causa directa de contaminación que no debe despreciarse; puede realizarla por las manos, las expectoraciones, los vestidos sucios y de otras muy diversas maneras.

Toxinas:

La leche y los productos lácteos pueden presentar un peligro para el hombre, no solamente a causa de la presencia de bacterias patógenas sino también a causa de las sustancias tóxicas elaboradas por algunas de ellas (bacterias toxígenas). Estos venenos se difunden en el medio y son de diferentes clases; los más importantes desde el punto de vista de la higiene de la leche son los producidos por los estafilococos. Se han encontrado en la leche otros microorganismos productores de toxinas mucho más temibles, pero felizmente se presencia parece ser rara, se trata de Clostridium perfringens y de C. diptheriae.

El peligro no reside en la simple presencia de

un pequeño número de estos microorganismos tóxicos, sino que se manifiesta cuando las condiciones son favorables para su multiplicación, especialmente durante la permanencia prolongada a temperaturas medias en los bidones o depósitos; entonces proliferan y forman su toxina.

Una propiedad importante de estas sustancias tóxicas es, en general, su termoestabilidad; permanecen bajo forma activa en condiciones que provocan la destrucción de las bacterias, como la pasteurización y la desecación de la leche. La eliminación de las bacterias patógenas no significa, por consiguiente, que siempre se ha realizado un saneamiento total. El mantenimiento de la leche a bajas temperaturas es, evidentemente, un medio eficaz para impedir la producción de toxinas.

T A B L A . 1

LA LECHE DE VACA

Composición típica y propiedades físicas

	Composición gramos por litro	Estado físico de los componentes
Agua	905	Agua libre (disolvente)+ agua ligada (3,7%)
Glúcidos: lactosa	49	Solución
Lípidos	35	
Materia grasa propiamente di- cha	34	Emulsión de los glóbulos grasos (3 a 5 micras)
Lecitina(fosfolípidos)	0,5	
Parte insaponificable (estero- les, carotenos, tocoferoles)..	0,5	
Prótidos.....	34	Suspensión micelar de fosfocaseinato de cal (0,08 a 0,12 micras)
Caseína	27	
Prótidos "solubles"(globulinas, albúminas).....	5,5	Solución (coloidad)
Sustancias nitrogenadas no pro- teicas.....	1,5	Solución (verdadera)
Sales.....	9	Solución o estado coloidal (P y Ca) (Sales de K, Ca, Na, Mg, etc.)
del ácido cítrico(en ácido)...	2	
del ácido fosfórico(P_2O_5).....	2,6	
del ácido clorhídrico (NaCl)..	1,7	
Componentes diversos.....		
(vitaminas,enzimas,gases,di- sultos).	trazas	
Extracto seco (total).....	127	
Extracto seco desengrasado	92	

PROPIEDADES FISICAS:

Densidad de la leche completa.....	1,032
Densidad de la leche descremada.....	1,036
Densidad de la materia grasa	0,940
Poder calórico (por litro), calorías	700
pH	6,6-6,8

Conductibilidad eléctrica, mhos	45×10^{-4}
Tensión superficial (dinas/cm/15°).....	53
Viscosidad absoluta (15°).....	0,0212-0,0354
Viscosidad relativa (específica).....	1,6-2,15
Indice de refracción	1,35
Punto de congelación.....	-0,55°
Calor específico	0,93

Alais, Ch. (1971).

T A B L A 2

Valor nutritivo de la leche de vaca.

	kcal.	proteína (g)	Ca (mg)	Invierno (U.I)	Verano (U.I)	B ₁ mg .	B ₂ mg .
Por 28 g.	19	0.9	34	30	40	0.01	0.04
Por 570 ml.	380	18	680	600	850	0.2	0.8
Proporción de la ración diaria por 570 ml.	1/6	1/3	100%	1/4	1/3	1/5	1/2

Fisher, B.P. (1972)

LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

TABLA 3
CLASIFICACION DE QUESOS 1

BLANDOS:**Sin Madurar:**

- Poca grasa__requesón, queso fresco, queso de panadero.
- Mucha grasa__ queso crema, Neufchatel (como se elabora en los Estados Unidos)
- Madurados: Bel Paese, Brie, Camembert, queso cocido, queso de mano, Neufchatel (como se elabora en Francia).

SEMIBLANDOS:

- Madurados principalmente por bacterias: Brick, Münster.
- Madurados por bacterias y microorganismos en la superficie: Limburger, Port-Salut, Trapista.
- Madurados, principalmente por mohos en el interior: Roquefort, - Gorgonzola, Azul, Stilton, Wensleydale.

DUROS:

- Madurados por bacterias, sin ojos: Cheddar, Granular, Caciocavallo.
- Madurados por bacterias, con ojos: Emmentaler, Gruyère.

MUY DUROS (para rallar):

- Maduros por bacterias: Asiago viejo, Parmesano, Romano, Sapsago, Spalen.

QUESOS PROCESADOS:

- Pasteurizado, empacado en frío, productos análogos.

QUESOS DE SUERO:

- Mysost, Primost, Ricotta.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Características:

Familia Micrococcaceae: Son células esféricas de 0.5 a 3.5 μ de diámetro, se dividen en más de un plano para formar racimos regulares o irregulares o paquetes. - Móviles o inmóviles. No se producen estados de latencia. - Gran positivas.

Metabolismo respiratorio o fermentativo. Producen ácido sin gas de la glucosa. Sus requisitos nutricionales son variables. Todas las cepas crecen en presencia de 5% de NaCl; muchas crecen en 10-15% de NaCl. Catalasa positivas.

Son aerobias o anaerobias facultativas. El contenido de G (guanina) + C (citosina) del DNA va de más o menos 30-75 moléculas %.

La familia está formada por tres géneros: Micrococcus, Staphylococcus y Planococcus. En la Tabla 5 se dan las principales características de los tres géneros - comparados con el género Aerococcus.

Género II. Staphylococcus Rosenbach: Son células esféricas de 0.5-1.5 μ de diámetro, se presentan aisladas, en pares y se dividen en más de un plano para formar racimos irregulares. Són inmóviles. No se les conocen etapas de latencia. Gram positivas.

La pared celular contiene dos componentes principales: un péptidoglucano y sus ácidos teicoicos asociados. El péptidoglucano consta de glucana compuesta de unidades que repiten la unión β 1,4 de N-acetil-glucosamina y residuos de ácidos N-acetil-murámico que van unidos a través de N-acetil-muramil-L-alanina unidos a subunidades peptídicas que consisten de N-(L-alanil-D-isoglutamil)-L-lisil-D-alanina. Las subunidades peptídicas están unidas transversalmente por puentes de pentapéptidos que contienen principalmente glicina. Estos puentes se extienden desde el residuo NE-lisina, residuo de una subunidad péptida al C-terminal D-alanina de una subunidad péptida vecina. Están enlazados en una proximidad muy estrecha a la péptidoglucana los ácidos teicoicos que, dependiendo de la especie, contienen ribita o glicerina unidos a un azúcar o a un aminoazúcar.

TABLA 5

Características diferentes de los géneros de la familia
Micrococcaceae y del género Aerococcus (Streptococcaceae).

	<u>Micrococcus</u>	<u>Staphylococcus</u>	<u>Planococcus</u>	<u>Aerococcus</u>
Células esféricas, Gram-positivas	+	+	+	+
Disposición: Recimos irregulares	+	+	-	-
Tetradas	v	-	+	+
Fermentación de la glucosa	-	+	-	d
Citocromos	+	+	+	-
Catalasa: Heme	+	+	+	-
No heme	-	-	-	v
Formación de peróxido de hidrógeno	-	-	-	+
Movilidad	-	-	+	-
Pigmento amarillo-pardo	-	-	+	-
Contenido de G+C del DNA (Moles%)	66 - 75	30-40	39-52	37-41

= mayor parte (90% o más) de las cepas es positiva.

-= mayor parte (90% o más) de las cepas es negativa.

v= caracteres inconstantes y en una cepa algunas veces puede ser positivo y en otras negativo.

d= Algunas cepas (menos del 90%) son positivas.

Son quimioorganótrofos, metabolismo respiratorio y fermentativo, producen catalasa; las menaquinonas y citocromos a, b₁ y 0 forman el sistema de transporte electrónico; pueden estar presentes pigmentos carotenoides. El oxígeno es el aceptor de electrones universal terminal. Una amplia escala de carbohidratos puede ser utilizada, particularmente en presencia de aire, con la producción de ácido pero no de gas. En condiciones de anaerobiosis el principal producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico, en presencia de aire el principal producto es el ácido acético con pequeñas cantidades de CO₂; habitualmente se forma acetona como un producto final del metabolismo de la glucosa. El pH terminal en caldo glucosado sin amortiguar es de 4.2-5.4. Por lo común no se produce ácido a partir de la arabinosa, celobiosa, inosita, inulina o rafinosa. Por lo común no hidrolizan al almidón ni a la esculina.

Se forman enzimas y toxinas extracelulares, pueden ser hidrolizados una variedad de proteínas y sus tratos que contienen grasas. No se forma indol. Se requieren amino ácidos y vitaminas para el crecimiento aerobio; además, se requiere uracilo y una fuente de carbono fermentescible para el crecimiento en anaerobiosis.

Anaerobios facultativos, el crecimiento es más rápido y abundante bajo condiciones aerobias. La temperatura óptima de crecimiento es de 35-40°C; la escala de crecimiento es de 6.5-46°C; el pH óptimo es de 7.0-7.5; la escala de pH de crecimiento es de 4.2.-9.3.

La mayor parte de las cepas crece en presencia de 15% de NaCl o 40% de bilis. Son sensibles a la lisis por la endopeptidasa de la lisostatina (1 unidad/ml.). Resisten a la lisis por la lisozima (100 ju/ml.). Generalmente son sensibles a los antibióticos tales como los que tienen B lactama y antibióticos macrólidos, tetraciclinas, novobiocina y cloramfenicol, pero son resistentes a la polimixina y a los polienos. Son sensibles a los antibacterianos como los fenoles y sus derivados, a los compuestos que abaten la tensión superficial, las salicilamidas, carbamidas, halógenos (cloro y yodo) y sus derivados como las cloraminas y yodóforos. Generalmente son sensibles al calor ($D_{60^{\circ}\text{C}}=3$ min. o más en regulador, pH 7.0). Son moderadamente resistentes a las radiaciones γ (D valor aproximado de 20 Krads en amortiguador, pH 7.0). Son huéspedes para una amplia escala de bacteriófagos que pueden tener una escala estrecha o amplia de huéspedes. Se ha demostrado la transferencia de caracteres por transducción para S. aureus.

Están principalmente asociados con la piel, glándulas de la piel y las membranas mucosas de los animales de sangre caliente. Su escala de huéspedes es amplia y muchas de las cepas son patógenas potenciales. El contenido de G+C del DNA va de 30-40 moles %.

Especie Staphylococcus aureus: Son esferas de 0.8-1.0 μ de diámetro. Las células se presentan aisladas, en pares y se dividen en más de un plano para formar racimos irregulares. Algunas cepas poseen una cápsula gomosa. La pared celular contiene fósforo orgánico, ribita,

glucosamina, ácido murámico, glicina, lisina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, alanina y pequeñas cantidades de treonina, prolina, valina y leucina. Estos componentes se pueden presentar en tres principales componentes de la pared celular que son los peptidoglucanos, los ácidos teicoicos de la ribita, y la proteína A del precipitinógeno que es específico para la especie. Las membranas celulares contienen los glucolípidos, mono y diglucosil-diglicérido y los fosfolípidos, lisil-fosfatidil-glicerol, fosfatidil-glicerol y cardiolipina.

Las colonias son lisas, poco convexas, brillantes, butirosas y con un borde entero. Bajo condiciones que inhiben el crecimiento normal se pueden producir colonias variantes (R) rugosas o (D) enanas. La pigmentación de las colonias es extremadamente variable, de aquí la variedad de epítetos específicos tales como aureus, albus y citreus que se han aplicado a esta especie. El color de las colonias en la mayor parte de las cepas es naranja, aunque ciertas cepas resistentes a los antibióticos y cepas de fuente de bovino están más comúnmente pigmentadas en amarillo. El crecimiento sobre gelosa inolinada es abundante, opaco, liso, plano, húmedo y blanco, de color amarillo o naranja. En caldo el crecimiento primeramente da por resultado turbiedad, más tarde el caldo se vuelve claro con un depósito fino que fácilmente se puede poner en suspensión; frecuentemente hay una película en forma de anillo.

Son quimioorganótrofos. Metabolismo respiratorio y fermentativo. Las menaquinonas y citocromos a, b₁ y

O forman el sistema de transporte electrónico enlazado a la membrana. Se producen pigmentos carotenoides por la mayor parte de las cepas, dando células que van, en color, desde el naranja oscuro al amarillo pálido la producción de pigmentos depende de las condiciones de crecimiento y pueden variar dentro de una sola cepa. La energía se obtiene vía glucólisis, el esquema de la hexosa monofosfato y del ciclo del ácido cítrico. El funcionamiento de estos ciclos depende de las condiciones del crecimiento. La respiración endógena ocurre ya sea por la utilización de amino ácidos libres dentro de la célula o por la utilización del poli-B-oxibutirato.

La catalasa se produce por células que crecen aerobiamente y puede estar ausente en las mutantes que tienen deficiencias respiratorias. La glucosa es fermentada con la producción de ácido L-láctico ópticamente inactivo. En presencia de aire se producen principalmente acetato y pequeñas cantidades de CO_2 . Se produce ácido en condiciones aerobias o anaerobias a partir de la glucosa, lactosa, maltosa y manitol. En presencia de aire una amplia escala de carbohidratos se utilizan como fuente de carbono y energía. Las hexosas, pentosas, disacáridos y alcoholes azucarados son metabolizados con producción de ácido. No se forma ácido de la arabinosa, celobiosa, dextrina, inosita, rafinosa, ramosa o xilosa. La esculina y el almidón, por lo común, no son hidrolizados. El ácido hialurónico puede ser hidrolizado por la liasa del ácido hialurónico. Se produce acetona como un producto final del metabolismo de la glucosa; pH terminal en caldo glucosado 4.4 a 5.0. Los nitratos son reducidos por las nitratasas. Se produce amoníaco a partir de la arginina por la

acción de la dihidrolasa de la arginina. Se pueden formar cantidades huella de sulfhídrico a partir de la cisteína; el ácido glutámico y la lisina no son descarboxilados.

Se producen proteasas, lipasas, fosfolipasas, lipoproteínlipasa, estererasas y liasas. La mayor parte de las cepas hidrolizan a las proteínas de origen animal, por ejemplo hemoglobina, fibrina, albúmina de huevo, caseína y polipéptidos tales como la gelatina. Los lípidos son hidrolizados por los agentes tenso depresores como los Tweens, Spans y fosfolipoproteínas con la liberación de ácidos grasos. Algunas cepas producen lecitinasa A pero no lecitinasa C; la fosfolipasa C posee actividad beta-hemolisina contra la esfingomielina. Los mucopolisacáridos pueden ser degradados por las liasas del ácido hialurónico y las glucanas de la pared celular por la lisozi_{ma}. Las cepas de fuentes animales y las cepas antibiótico resistentes generalmente producen menor cantidad de este tipo de enzimas. Las coagulasas las producen virtualmente todas las cepas; se producen varias coagulasas antigénicamente diferentes y específicas a partir del sustrato. Se producen tres hemolisinas (alfa, beta y delta) que se distinguen por el tipo y escala de hemólisis en eritrocitos de borrego, conejo y humanos. Una sola cepa produce más de una hemolisina; la beta hemolisina se produce más comúnmente, en cepas que provienen de animales. Se producen fosfatasa_s ácidas y/o alcalinas y nucleasa_s termorresistentes (fosfodiesterasas).

Hasta doce amino ácidos, adenina y tiamina, se requieren para el crecimiento en aerobiosis; para el cre-

cimiento en anaerobiosis se requieren uracilo y una fuente de carbono fermentescible. Los anaerobios facultativos crecen mejor bajo condiciones aerobias.

La mayor parte de las cepas crecen entre 6.5 - y 46°C, el óptimo es de 30-37°C; los valores de pH están entre 4.2 y 9.3; el pH óptimo es de 7.0-7.5; y en 15% de NaCl o 40% de bilis. La actividad de agua mínima que permite el crecimiento de las células que crecen en aerobiosis es de 0.86. El contenido de G+C del DNA es de 30.7-39 moles %. (Bergey's Manual...1).

Ciertas cepas, bajo condiciones favorables, producen no solamente exotoxinas (hemotoxina, dermatoxina, toxina letal, etc.), sino también enterotoxinas, las cuales son potentes y causan intoxicaciones alimentarias. Los estafilococos producen cinco tipos serológicos de enterotoxinas: A, B, C, D y E, que difieren en su toxicidad (Minor y Marth...2).

La enterotoxina A pura es un material suave, blanco, altamente higroscópico y muy soluble en agua y soluciones salinas. Tiene un punto isoeléctrico de 7.26 a 4°C, con un peso molecular de 27,800, el cual se determinó por equilibrio de sedimentación. Sobre gel de poliacrilamida, en presencia de desnaturalizantes, da un peso molecular de 27,500. Da una absorción máxima de 277 nm, un coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) (S) de 3.03 y un coeficiente de difusión (D)^a ($\text{cm}^2 \text{seg}^{-1}$) de $9,8 \times 10^{-7}$.

La molécula está formada de una cadena polipeptídica con un puente disulfuro y grupos sulfhidrilo libres. Se ha identificado la serina como C-terminal, pero no como N-terminal libre. La dosis letal (ED_{50}) por vía intravenosa es de 0.03 μ g/kg.

(Spero y col. ...3).

La enterotoxina B es una exoproteína soluble en agua. Se puede obtener muy pura de los sobrenadantes de las cepas estafilocócicas. Es un mitógeno no específico, que estimula a los linfocitos "in vitro" para llevar a cabo transformaciones blastoides con actividad mitótica y para dejar en libertad el factor inhibidor de la migración del macrofago. La enterotoxina B es una proteína globular con un peso molecular de 28,500, se compone de una cadena peptídica que contiene 239 amino ácidos residuales. El enlace sencillo disulfuro, intramolecular, se extiende hasta 21 amino ácidos entre los residuos 92 y 112; 32 de los 34 residuos aromáticos en la molécula de la toxina están localizados fuera de la vuelta disulfuro, la cual está cerrada. Los residuos básicos y ácidos están distribuidos a lo largo de la cadena. Tiene un punto isoeléctrico de 8.7 (Warren y col. ...4).

Se han identificado dos tipos de enterotoxina C, que se designan como C_1 y C_2 . Ambas dan valores idénticos de peso molecular y coeficiente de sedimentación, pero poseen diferentes movilidades electroforéticas y pun -

tos isoelectrónicos. La enterotoxina C_1 tiene un punto isoelectrónico de 8.6 y la C_2 de 7.0 (Minor y Marth ...5).

La enterotoxina C_1 tiene dos ligaduras peptídicas, una sencilla y otra doble y, por hidrólisis con tripsina, una parte de la molécula hidrolizada da un peso molecular de 29,100 y un coeficiente de sedimentación de -2.85, lo cual es casi idéntico a la enterotoxina C_1 . Estos segmentos de la enterotoxina C_1 son altamente mitogénicos. La dosis letal de la enterotoxina C_1 , por vía intravenosa, (ED_{50}) es de 0.30 jug/kg. (Spero y col. ...6).

Entre las propiedades biológicas y serológicas de las enterotoxinas estafilocócicas está la de poseer una notable estabilidad térmica. La estabilidad térmica de las enterotoxinas está influenciada por la naturaleza del alimento, pH, presencia de NaCl, etc., y el tipo de enterotoxinas; la enterotoxina "A" es relativamente más estable al calor a pH de 6.0 o mayor, que a pH de 4.5 a 5.5. La enterotoxina D es relativamente más estable a pH de 4.5 a 5.5 que a pH 6.0 o mayor.

Los tratamientos térmicos comúnmente usados en alimentos procesados, como la pasterización (72°C/15 seg) o temperaturas de ultra calentamiento (143°C/9 seg) o ahumado y calentamiento para curado de salchichas a 70-100°C o calentamiento de queso Cheddar a 70-90°C, no son efectivos para completar la destrucción de la enterotoxina A o D cuando se encuentran inicialmente a niveles

normales en alimentos (0.5 a 1.0 $\mu\text{g}/100\text{ ml o g}$). Las enterotoxinas A o B (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en calentamiento a 100°C durante 25 min. en solución salina con 2% de gelatina y 0.3% de proteasa paptona y a pH de 7.0, retienen su actividad biológica para humanos y se observa un aumento en su actividad biológica después del tratamiento con calor. El tiempo de duración requerido a una cierta temperatura para la completa destrucción de la enterotoxina, en un alimento dado, depende de la sensibilidad del sistema de identificación usado y la cantidad de muestra del alimento usado. El tratamiento térmico de las toxinas en leche las inactiva (\leq de 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en 15 min. a 121.1°C ; entre 13.8-14.8 min. para la enterotoxina A y 12.8-13.8 min. para la toxina D. (Tatini... 7).

El tiempo requerido para un 90% de inactivación de la enterotoxina B a 110°C (valor D_{110}) en regulador de Veronal 0.04M (pH 7.4) es de 18 min. y en caldo de carne de vaca es de 60 min. (Lee y col. ... 8).

Producción de enterotoxinas en alimentos:

Temperatura del producto: Las temperaturas óptimas para la producción de toxinas y crecimiento del organismo están entre 35 y 39°C. Los límites de temperatura en que crece son amplios y varían de 7°C a una temperatura máxima de 48°C aproximadamente. Los porcentajes de crecimiento disminuyen progresivamente conforme se acercan a las temperaturas mínima y máxima. La producción de enterotoxinas ocurre entre límites de temperatura en tanto es estrechos, normalmente cesa alrededor de 10°C y 45°C. La enterotoxina B tiene una escala de temperaturas algo pequeña para su producción 15.2 a 43.2°C. La temperatura óptima para la producción de enterotoxina es más o menos, la misma que para el crecimiento (35-39°C) A las temperaturas que exceden los 45°C, o a menos de 5°C se restringe severamente o limita el crecimiento y la producción de enterotoxina por este microorganismo.

pH del producto: El pH mínimo para iniciar el crecimiento estafilocócico es alrededor de 4.6 a 4.7, esto depende del ácido usado para ajustar el pH y de otras condiciones del huésped. El límite superior de pH para el crecimiento es probablemente de unos 9.5 a 9.8; no obstante, la producción de enterotoxina normalmente no ocurre a pH de 9.0 y se reduce al 50% a pH 8.0 niveles de pH de 5.0 o menos se produce poca o ninguna toxina. El valor óptimo de pH para la producción de enterotoxinas B y C es de 6.8, mientras que la síntesis de enterotoxina A ocurre óptimamente en una escala de pH de 5.3 a 6.8. La enterotoxina B se desnaturaliza rápidamente a pH de 3.5. La com-

binación de temperaturas elevadas y diversos valores de - pH, elevados o bajos, con frecuencia acelera la inactivación.

Actividad de agua del producto: Uno de los aspectos más singulares del crecimiento de S. aureus es su habilidad para crecer a niveles de aw relativamente bajos. El aw mínimo para crecer en la mayoría de los medios de laboratorio es aproximadamente de 0.86; algunas cepas pueden crecer a un aw de 0.83. La producción de enterotoxina se suprime marcadamente por reducción del aw. La producción relativa de toxina por las células productoras cesa virtualmente a niveles de aw 0.90; no obstante, el crecimiento, como se observó antes, ocurre a aw_s muy bajos. - (Troller... 9 y 10).

Crecimiento asociado con el de otros microorganismos: Otro factor limitante del crecimiento, que probablemente ocurre en alimentos pero que no es explotado frecuentemente para obtener una disminución activa del crecimiento estafilocócico en alimentos, es la inhibición por otros microorganismos. Como regla general, este organismo no es un buen competidor y en la mayoría de las circunstancias tiende a ser suprimido por el crecimiento de otros microorganismos. El origen de estos factores competitivos puede ser el resultado de la producción de sustancias inhibitoras, competencia nutricional, o la alteración de varios factores ambientales a niveles que no le son favorables. Los microbiólogos lácteos están de acuerdo en que un buen iniciador activo es esencial para prevenir el crecimiento de S. aureus durante la fabricación -

del queso. En esta situación las bacterias del ácido láctico suprimen el crecimiento del estafilococo y la producción de enterotoxina A.

Aprovechamiento de oxígeno: La composición de la atmósfera puede también restringir el crecimiento y producción de enterotoxina. El estafilococo crece bajo ambas condiciones, aerobia y anaerobia en medios de laboratorio; no obstante, la producción de toxina normalmente se reduce bajo condiciones anaerobias. Esta es la razón del interés científico de producción de enterotoxina para investigación, que propone con frecuencia que los frascos con cultivo se agiten, o que los vasos de fermentación se aireen para maximizar la producción. En alimentos existe una situación similar: el crecimiento y formación de toxina pueden ocurrir bajo condiciones anaerobias, pero el crecimiento y la cantidad de toxina producida no son tan grandes como en presencia de oxígeno.

Aditivos químicos: Los aditivos químicos actualmente sirven poco para suprimir el crecimiento estafilocócico. Por supuesto, existen inhibidores químicos para S. aureus, pero su uso, por una variedad de razones, no se permite en alimentos.

Los ácidos acético, fosfórico, cítrico y láctico son relativamente efectivos como supresores del crecimiento, pero estos ácidos son efectivos principalmente en la forma no disociada y se requieren valores de pH relati

vamente bajos. El nitrito en concentraciones de 200 ppm - también prolonga la fase estacionaria e inhibe el creci - miento de S. aureus pero no afecta la producción de la en - terotoxina, al igual que el propionato de sodio y benzoa - to de sodio. El sulfito de sodio en concentraciones de - 1000 ppm disminuye la producción de enterotoxina A. Los - azúcares reducidos xilosa, lactosa, glucosa, maltosa y - fructosa, tienen un efecto protector para la enterotoxina A, cuando ésta se calienta a 60°C. (Troller ...9; Chor - dash y Potter ... 11).

S. aureus es capaz de crecer en presencia de - NaCl en concentraciones de 12% a 20% y 35°C; la produc - ción de enterotoxina B es inhibida a menos de 35°C en pre - sencia de 4 y 8% de NaCl y con 12% de NaCl a temperatura - de 4-35°C. Las concentraciones de 10% de NaCl no afectan - la producción de enterotoxina A. La producción de entero - toxina C es afectada por el NaCl a concentraciones de - 12%. (Minor y Marth. ...5).

Síntomas de la intoxicación.- El consumo de - alimentos contaminados, con suficiente cantidad de entero - toxina, usualmente origina síntomas iniciales de envenena - miento alimentario estafilocócico en humanos en 2 a 4 h; no obstante, el tiempo inicial puede variar de 0.5 a más - de 7 h. El principio de los síntomas de la intoxicación - en humanos se manifiesta por salivación, seguida en rápi - da sucesión por náusea, vómito, dolores y con frecuencia - diarrea. Las complicaciones pueden ir acompañadas de ata - ques severos que incluyen deshidratación, choque, y san - gre y moco en el excremento y en el vómito. Otros sínto -

IDENTIFICACION DE CEPAS ESTAFILOCOCCICAS

Medios y métodos para el aislamiento de estafilococos:

Staphylococcus aureus coagulasa positivo, es una de las bacterias que más permanece en los alimentos, por lo cual representa un serio riesgo potencial en alimentos, aún cuando no todos los estafilococos coagulasa positivo producen enterotoxinas. Hay casos en los cuales las bacterias, S. aureus coagulasa positivo han causado intoxicación por alimentos y raramente han sido reportados. Esta es una de las causas principales, en microbiología de alimentos, para hacer análisis exactos en el número de estafilococos coagulasa positivos presentes en los alimentos antes de aceptar o rechazar un lote.

Se han desarrollado diversos medios selectivos para identificar al estafilococo. El uso de estos medios se basa en la tolerancia a la sal, producción de hemotoxina, habilidad para reducir en aerobiosis teluritos o metales de telurio (con la consecuente formación de colonias negras), producción de pigmento amarillo, reacción de la yema de huevo, etc. Ninguna de estas propiedades, ya sea aislada o en combinación, puede garantizar la correcta identificación; por lo tanto se requieren todavía pruebas adicionales sobre las propiedades de S. aureus. (Niskanen y Aalto. ...12)

Otro asunto que se plantea para la correcta identificación de S. aureus, es el daño que causa a las células el tratamiento térmico, reducción de la actividad

de agua, liofilización, etc.

Casi todos los métodos y medios selectivos -
que han sido propuestos para el recuento de S. aureus, -
son inhibidores para las células lesionadas. Una excep -
ción es la gelosa de Baird-Parker, la cual ha demostrado -
ser efectiva para el recuento de células lesionadas por -
congelación, secado o por calor. Esto se debe a que el pi -
ruvato es el componente responsable del crecimiento acre -
centado de las células lesionadas y sus efectos se deben -
a la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un -
efecto similar lo tiene la adición de catalasa al medio.

La producción de H_2O_2 durante el crecimiento -
aerobio y la incapacidad de las células dañadas para des -
truir este compuesto tóxico da por resultado una pérdida -
en la capacidad formadora de colonias. Ya que la catalasa -
celular se reduce por lesión térmica y por el NaCl que co -
múnmente se encuentra en los medios selectivos para esta -
filococos. Esta pérdida de productividad se supera con la -
adición de catalasa. La adición de catalasa a diferentes -
medios, que anteriormente eran inadecuados para el recuen -
to de S. aureus lesionado, incrementa el recuento sobre -
estos medios.

Entre los medios recomendados para el recuento
de S. aureus se encuentra, en primer lugar, la gelosa de -
Baird-Parker, por ser menos inhibitorio que los otros me -
dios propuestos, le siguen: la gelosa soya tripticasa -
(TSA); gelosa soya tripticasa con 7.0% de NaCl (TSAS); ge

losa de Vogel-Johnson (VJ); gelosa manitol sal (MSA); gelosa telurito polimixina-yema de huevo (TPEY); gelosa 110 para Staphylococcus (S 110); caldo soya tripticasa con 10% de NaCl (TSBS).

La adición de catalasa, para mejorar los medios propuestos para el recuento de S. aureus, se hace de la siguiente manera:

A los medios TSA y VJ se les añade piruvato de sodio en concentraciones de 0.1 y 1.0% respectivamente, antes de hacer la esterilización en autoclave (121°C por 15 min). La catalasa de bovino (3900 unidades/mg) se añade a los medios gelosados, excepto a la gelosa de Baird-Parker (ya que ésta no la necesita por ser la única gelosa que no es inhibitoria para el estafilococo), por aspersión de 0.1 ml de una solución al 0.2% esterilizada por filtración, dando por resultado aproximadamente 780 unidades por placa o tubo (10 ml). Todos los tubos y placas se incuban a 35°C durante 48 h. (Flowers y col. ... 13).

Otra técnica para el recuento de S. aureus es la técnica del número más probable (NMP). Se considera generalmente más eficiente para conocer números bajos de organismos o cuando hay elevados niveles de organismos competitivos. El valor del NMP es un cálculo de la población y no un número preciso de organismos viables. Las cuentas microbiológicas se reportan como "número de microorganismos por cantidad de muestra por el método del NMP.

Cuando S. aureus está presente en bajas cantidades, puede significar un riesgo importante en los alimentos para personas mayores o ancianos y para criaturas. Además, los estafilococos presentes a niveles bajos, en alimentos precocinados, se consideran a menudo como un índice de que se tuvieron malos cuidados en la sanidad. Por esto se recomienda el procedimiento del NMP para la enumeración de números bajos ($< 100/g$) de estafilococos, empleando caldo soya tripticasa (TSB) y caldo soya tripticasa con 10% de NaCl (TSBS).

Como se vió anteriormente el caldo TSBS es inhibidor para las células de S. aureus que han sido dañadas por el calor, debido a su alto contenido de sal. Este inconveniente se elimina o se supera con la adición de catalasa a un nivel de 200 unidades/ml o de piruvato al 1% (peso/vol). El piruvato se añade al medio antes de meterlo al autoclave. (Brewer y col. ...14)

PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS

Medios y métodos sugeridos para producción en gran escala de enterotoxinas:

Durante los últimos años se han hecho progresos notables en la elucidación de las condiciones ambientales bajo las cuales crece y produce sus enterotoxinas Staphylococcus aureus y en el desarrollo de procedimientos para la determinación de estas toxinas en alimentos.

En la industria de alimentos (especialmente las de fabricación de queso y salchichas fermentadas) muchos de los laboratorios no están equipados para llevar a cabo procedimientos químicos más avanzados y pueden carecer de personal y tiempo para analizar grandes números de muestras, por lo tanto, siempre se necesitan métodos confiables, sencillos, rápidos y que sean baratos. Tales procedimientos permiten discriminar gran número de muestras de alimentos y que la industria de alimentos establezca programas para desechar en masa y planear experimentos adicionales para conocer más acerca de la fisiología de la producción de enterotoxinas.

En presencia de cantidades crecientes de compuestos orgánicos, ya sea en el medio de cultivo, o del alimento, o de los que producen los estafilococos, los métodos serológicos se vuelven menos confiables y requieren

un cierto grado de purificación de la enterotoxina. Es - esta purificación la que permanece como un cuello de botella que no se ha podido solventar para poner en evidencia la toxina.

En la práctica, el procedimiento para la determinación de enterotoxinas por métodos serológicos se lleva a cabo en cuatro pasos:

- 1) Extracción de las enterotoxinas a partir de los alimentos.
- 2) Purificación.
- 3) Concentración a niveles que se puedan poner en evidencia; y
- 4) Determinación.

Los procedimientos actualmente recomendados para la determinación de las enterotoxinas estafilocócicas en alimentos son laboriosos y consumen mucho tiempo. El - método que se ha utilizado más extensamente para la extracción, purificación y concentración de las enterotoxinas es el método de Casman y Bennett. Dependiendo del tipo de alimento, se ha modificado este método y así se puede lograr determinar las enterotoxinas en 1 a 7 días. La mayor parte de los métodos para la recuperación de las enterotoxinas a partir de alimentos, se basa en el empleo - de cromatografía por intercambio iónico. Recientemente se

han reportado los métodos de radio-inmuno-ensayo en fase sólida para la determinación de las enterotoxinas; son métodos más rápidos, sencillos y sensibles, pero requieren un manejo especial de reactivos y equipo.

Entre los diversos métodos de separación bioquímica de las enterotoxinas a partir de alimentos, está el desarrollo de la cromatografía de afinidad. Este método permite el aislamiento de sustancias de acuerdo con su función biológica, por lo cual difiere radicalmente de las técnicas cromatográficas convencionales en las cuales la separación depende de las diferencias químicas y físicas entre las sustancias. Debido a las interacciones únicas de especificidad antígeno-anticuerpo, la cromatografía de afinidad permite la separación de o el antígeno o el anticuerpo en forma sumamente purificada. (Genigeorgis y Kuo. ... 15).

Una propiedad que últimamente se ha estudiado y que se puede tomar como una medida precisa del crecimiento significativo de S. aureus en un producto alimenticio, es la producción de nucleasa, la cual es específica y característica de S. aureus y estable al calor.

La nucleasa, así como las enterotoxinas, puede sobrevivir a los procedimientos de tratamiento que matan al organismo. Debido a la dificultad y al tiempo que se pierde en demostrar la presencia de las enterotoxinas, se ha estudiado la presencia de la nucleasa activa en alimen

tos para determinar un índice de contaminación por S. aureus y producción de enterotoxinas.

Un método sencillo es el siguiente:

Medio de gelosa para la prueba de nucleasa: a 100 ml de agua se añaden 0.6 g de trizma base, 0.045 g de ácido desoxirribonucleico DNA, Difco), 1.25 g de agar (Difco), 1.0 g de NaCl, y 0.2 ml de solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 0.01 M. El pH se ajusta a 9.0 con HCl 1 N. La solución se hierve durante 20 min antes de ser vaciada en cajas de Petri (60 por 15 mm). Inmediatamente antes de usarse se hacen horadaciones en la gelosa, separadas más o menos 1 cm con un horador del Núm. 2, y los tapones son removidos por succión. El medio puede ser almacenado, en frascos tapados, durante varias semanas, a temperatura ambiente, así el pH y la carencia de nutrientes lo hace del todo estable.

Procedimiento de extracción y ensayo: Para un alimento líquido, como la leche, se usa una muestra analítica de 20 a 30 ml. Para alimentos sólidos se mezclan 15 a 20 g con agua en una licuadora Waring. Cada muestra es vertida en un tubo de centrifuga, y el pH se ajusta a 5.5. Los tubos se tapan y se colocan en un baño de agua hirviendo durante 20 min, en seguida se enfrían en un baño de hielo, antes de centrifugar, usando una centrifuga de cabezal, durante 45 min a 7500 rpm. Se usan pipetas Pasteur para transferir gotas del fluido sobrenadante de los tubos centrifugados a los cortes en el medio de deso-

xirribonucleasa (DNAsa). Las placas se incuban durante 1 h. a 50°C y se inundan con HCl 4 N.

Las zonas claras con un anillo de precipitado, que indican nucleasa activa, son visibles inmediatamente viéndolas sobre un fondo obscuro. En los niveles más bajos que se pueden poner en evidencia (3,3 ng/ml de extracto), las zonas tienden a desvanecerse rápidamente, y se obscurecen por precipitación en un minuto. Las zonas claras llegan a ser mucho más estables conforme aumentan los niveles de nucleasa que se analizan. Con esta prueba se pueden evidenciar hasta 10 ng/g de producto. (Koupal y Deibel.. 16).

Otro procedimiento para determinar enterotoxinas en alimentos es el método de precipitación con sulfato de amonio y tratamiento enzimático.

Se han propuesto varios procedimientos para la extracción de enterotoxinas estafilocócicas de los alimentos. Muchos de estos métodos se basan en el uso de material intercambiador de iones para una purificación parcial de las enterotoxinas a partir de extractos de alimentos.

Un método más corto es la utilización de la absorción por lotes de las enterotoxinas en resinas intercambiadoras de iones y la digestión proteolítica de los extractos parcialmente purificados. El tratamiento enzimá

tico con una mezcla de tripsina y peptidasa de Pseudomonas es un procedimiento más útil que el empleo de material intercambiador de iones. Este método se adoptó para poner en evidencia enterotoxinas estafilocócicas en alimentos con alto contenido proteico.

El método consiste en la extracción de las enterotoxinas con agua destilada, tras lo cual las proteínas solubles se precipitan con ácido a pH 4.5 y el sobrenadante se lava con cloroformo (pH 7.5). El extracto se trata con tripsina y peptidasas de Pseudomonas durante 2 h a 37°C. El material residual, sin hidrolizar, se precipita con sulfato de amonio al 60% durante 15 min. a 4°C. El precipitado se redisuelve en una solución amortiguadora de fosfato y se concentra por diálisis con polietilenglicol. El concentrado se lava con cloroformo y se liofiliza. El material seco se disuelve en 0.2 ml de agua destilada y las enterotoxinas se ponen en evidencia por el método de microplaca empleando 24 h de incubación a 37°C; usando este procedimiento es posible, en tres días, poner en evidencia de 0.2 a 1.0 μ g de enterotoxina A.

El principio básico del método es que los materiales que interfieren con la determinación de las enterotoxinas son eliminados por la acción de las enzimas y por la precipitación con sulfato de amonio. La acción combinada de tripsina y peptidasas de Pseudomonas reduce el tamaño de las moléculas de las proteínas que interfieren y de los metabolitos microbianos extraídos de las muestras de alimentos, a nivel de amino ácidos y polipéptidos que no fueron precipitados por el sulfato de amonio.

Las enterotoxinas estafilocócicas no se afectan de manera importante por el tratamiento enzimático, -- pero son precipitadas con otros materiales no hidrolizables. Las ventajas de este método son su sensibilidad, rapidez y el hecho de que el método se puede llevar a cabo fácilmente aún en laboratorios equipados sólo con una buena centrífuga además de otro equipo estándar que se emplea en laboratorios microbiológicos. (Niskanen y Lindroth. 17 y 18)

CONCLUSIONES.

Las condiciones necesarias para que se produzca un brote de intoxicación alimenticia por estafilococos son:

- 1) Que el alimento contenga estafilococos productores de enterotoxinas.
- 2) Que sea un buen medio de cultivo para los estafilococos y adecuado para la producción de toxina.
- 3) Que la temperatura sea adecuada y se les de tiempo suficiente para la producción de toxina, y
- 4) Que se consuma el alimento que contiene la enterotoxina.

La leche cumple estas condiciones:

S. aureus se encuentra sobre todo en aquellas leches que proceden de vacas enfermas que sufren de mastitis; durante el ordeño pasa a la leche. En muchos establos, como este ordeño se hace en forma manual, se llega a contaminar la leche debido a que el personal no sigue -

las reglas higiénicas, sobre todo si éste padece de resfriados, forúnculos, etc. La leche, por su contenido proteico, es un excelente medio de cultivo para el crecimiento y producción de enterotoxinas estafilocóccicas.

La mayor parte de los productores de leche se encuentran alejados de las plantas procesadoras de leche, y carecen en su mayoría de un medio adecuado para la refrigeración de la leche, por lo cual se ven obligados a mantener la leche en los bidones durante largo tiempo a la temperatura ambiente, hasta que pase el recolector y la conduzca a la planta procesadora, dando por resultado un tiempo y temperatura suficiente para que se produzca la enterotoxina.

Aunque la leche que ha sido contaminada con S. aureus sea adecuadamente pasterizada y destruido el microorganismo, si se ha producido la enterotoxina, ésta permanece en la leche pasando a los productos derivados y así llega a los consumidores.

Las medidas preventivas consisten en:

- 1) Evitar la contaminación de los alimentos por estafilococos; en el caso de la leche esto se logra manteniendo una vigilancia veterinaria sobre los animales y una vigilancia sanitaria del personal.
- 2) Impedir su crecimiento, o sea, tratar de que la leche

permanezca el menor tiempo posible sin el tratamiento de pasterización, si ésto no es posible, mantener la leche a bajas temperaturas, evitando así el crecimiento y producción de enterotoxinas de S. aureus.

- 3) Destruir los estafilococos que se encuentren en los alimentos ésto se logra con una buena pasterización.

La dosis requerida de enterotoxina para causar síntomas de intoxicación estafilocócica por alimentos en humanos, ha sido estimada en 10-13 μ g. Para individuos particularmente sensitivos la dosis puede ser menor de 1 μ g. Por estas razones los métodos de determinación actualmente en uso para la indentificación, tanto del microorganismo como de la enterotoxina en alimentos sospechosos, pueden no ser dignos de confianza ya que la mayor parte de ellos necesitan de una extracción, purificación parcial y concentración de la enterotoxina, lo cual consume mucho tiempo. Esta investigación bibliográfica tuvo por objeto encontrar métodos más sensitivos, prácticos y que consuman poco tiempo, además de ser económicos. Entre los métodos que encontramos fueron:

El medio que más recomiendan los investigadores para el crecimiento del microorganismo es la gelosa de Bair-Parker, debido a su característica principal de no ser inhibitoria para el crecimiento de S. aureus.

Para la determinación de las enterotoxinas lo

mejor es el tratamiento enzimático y precipitación con sulfato de amonio junto con centrifugación en frío y diálisis. Es un tratamiento que puede garantizar la determinación de las enterotoxinas estafilocócicas a partir de los alimentos. Este método se recomienda sobre todo para una identificación serológica más exacta de las enterotoxinas. Con este método se pueden poner en evidencia de 0.2 a 1.0 jug de enterotoxina A en tres días.

Otro procedimiento digno de confianza y mucho más rápido que el anterior es la producción de nucleasa. Aunque es una determinación indirecta de la presencia de enterotoxinas estafilocócicas, se puede utilizar como un índice de la presencia de las enterotoxinas estafilocócicas, ya que la nucleasa es característica del crecimiento de S. aureus y es termoestable al igual que las enterotoxinas. Este procedimiento se recomienda por ser casi inmediato, requiere de 2.5 h. aproximadamente, es sencillo y muy útil, sobre todo en aquellos laboratorios que trabajan gran cantidad de muestras y necesitan resultados rápidos y dignos de confianza para aceptar o rechazar un lote en el menor tiempo posible.

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

1. Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E. 1975
Bergey's manual of determinative bacteriology.
8th. ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.

2. Minor, T. E., y Marth, E. H. 1971
Staphylococcus aureus and staphylococcal food
intoxications. A review. I. The staphylococci:
Characteristics, isolation, and behavior in artificial
media. J. Milk Food Technol., 34:557-564.

3. Schentz, E. J. et al. 1972
Purification and some chemical and physical
properties of staphylococcal enterotoxin A.
Biochemistry, 11:360-366.

4. Warren, J. R., Spero, L. y Metzger, J. F. 1974
Isothermal denaturation of aqueous staphylococcal
enterotoxin B by guanidine hydrochloride, urea, and
acid pH. Biochemistry, 13:1678-1683.

5. Minor, T. E. y Marth, E. H. 1971
Staphylococcus aureus and staphylococcal food
intoxications. A review. II. Enterotoxins and
epidemiology. J. Milk Technol. 35:21-29.

6. Spero, L., et al. 1976
Effect of single and double peptide bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin. C. The Journal of Biological Chemistry, 251:5580-5588.

7. Tatini, S. R. 1976
Thermal stability of enterotoxins in food.
J. Milk Food Technol. 39:432-438.

8. Lee, I.C., Stevenson, K.E., y Harmon, L.G. 1977
Effect of beef broth protein on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B.
Appl. Environ. Microbiol. 33:341-344.

9. Troller, J. A. 1976.
Staphylococcal growth and enterotoxin production-factors for control.
J.Milk Food Technol. 39:499-503.

10. Troller, J. A., y Stinson, J. V. 1978
Influence of water activity on the production of extracellular enzymes by Staphylococcus aureus
Appl. Environ. Microbiol. 35:521-526.

11. Chordash, R. A., y Potter, N.N. 1976
- Stability of staphylococcal enterotoxin A to selected conditions encountered in foods.
Journal of Food Science, 41:906-909

12. Niskanen, S., Aalto, M. 1978
Comparison of selective media for coagulase-positive enterotoxigenic Staphylococcus aureus.
Appl. Environ. Microbiol. 35:1233-1236

13. Flowers, R. S., et al. 1977
Catalase and enumeration of stressed Staphylococcus aureus cells.
Appl. Environ. Microbiol. 33:1112-1117

14. Brewer, D.G., Martin, S.E., y Ordal, J. 1977
Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most-probable-number technique for the detection of Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microbio. 34: -797-800.

15. Genigeorgis, C., y Kio, J.K. 1976
Recovery of staphylococcal enterotoxina from foods by affinity chromatography.
Appl. Environ. Microbio. 31:274-279

16. Koupal, A., y Deibel, R. H. 1978
Rapid qualitative method for detecting staphylococcal nuclease in foods. Appl. Environ. Microbiol. 35: 1139-1197.

17. Niskanen, A., y Lindroth, S. 1977
Suitability of the enzyme treatment and ammonium sulfate precipitation method for detection of staphylococcal enterotoxin from different foods. European J. Appl. Microbiol. 4:233-237

18. Niskanen, A., y Lindroth S. 1976
Comparison of different purification procedures for extraction of staphylococcal enterotoxin A from foods. Appl. Environ. Microbiol. 32:455-463.

19. Alais, Ch. 1971.
Ciencia de la leche. 2a. ed. Compañía Editorial Continental, S. A., Barcelona, España.

20. Fisher, B. P., y Bender, E. A. 1972
Valor Nutritivo de los alimentos. 1a. ed.
Editorial Limusa-Wiley, S. A., México, D. F.

21. Potter, N.N. 1973
La Ciencia de los alimentos, 1a. ed.
EDUTEX, S. A., México, D. F.