



15.  
24 300627

**UNIVERSIDAD LA SALLE**

ESCUELA DE QUIMICA  
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

IS CON  
FALLA DE ORIGEN

"VIABILIDAD Y CAPACIDAD PRODUCTORA DE  
DE ENTEROTOXINA B DE *S.aureus* S-6 EN  
JAMONES, AL SER SOMETIDOS A  
DIFERENTES TEMPERATURAS DE  
COCCION Y ALMACENAMIENTO".

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**MARIA CRISTINA SALAS PEREZ**

Director de Tesis

**M. C. CONSUELO LOBATO CALLEROS**



## **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.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL  
LABORATORIO DE INVESTIGACION DE LA  
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS, EN LA  
UNIVERSIDAD LA SALLE.

# I N D I C E

1. Introducción .....	1
1.1 Generalidades de <u>S.aureus</u> .....	1
1.1.1 Hábitat .....	4
1.1.2 Aislamiento .....	4
1.1.3 Factores que afectan la resistencia al calor .....	5
1.1.3.1 Medio de suspensión .....	6
1.1.3.2 pH .....	6
1.1.3.3 Actividad de Agua (Aw) .....	6
1.1.3.4 Hidratos de carbono .....	7
1.1.3.5 Lípidos .....	8
1.1.4 Influencia de agentes externos sobre el crecimiento de <u>S.aureus</u> .....	8
1.1.4.1 Flora antagonista .....	8
1.1.4.2 Nitratos y nitritos .....	9
1.1.4.3 Ahumado .....	10
1.1.4.4 Cloruro de Sodio .....	10
1.2 Enterotoxinas Estafilocócicas .....	11
1.2.1 Características de Enterotoxinas .....	11
1.2.2 Composición Química .....	14
1.2.3 Condiciones para la producción de enterotoxinas .....	17
1.2.3.1 Composición atmosférica .....	17
1.2.3.2 Temperatura .....	18
1.2.3.3 Acidez .....	20
1.2.3.4 Cloruro de sodio .....	21
1.2.3.5 Daño subletal .....	22
1.2.4 Detección de enterotoxinas .....	23
1.3 Intoxicación estafilocócica .....	27
1.3.1 Incidencia en México .....	29
1.3.2 Alimentos implicados .....	30
1.4 Generalidades del Jamón .....	31
1.4.1 Contaminación de carne fresca durante su obtención .....	33

1.4.2	Función de la materia prima .....	34
1.4.2.1	Carne .....	34
1.4.2.2	Grasa .....	34
1.4.2.3	Sal .....	34
1.4.2.4	Sazonadores .....	35
1.4.2.5	Fosfatos .....	35
1.4.2.6	Azúcares .....	35
1.4.2.7	Agua .....	35
1.4.2.8	Nitrato de sodio .....	35
1.4.3	Elaboración de jamón cocido troceado .....	37
1.4.4	Tratamiento térmico en carnes curadas .....	39
1.4.4.1	Proceso de cocción en jamones .....	39
1.4.4.2	Normas que aplicar durante el calentamiento .....	40
1.4.5	Normas microbiológicas .....	41
1.5	Justificación .....	43
2.	Objetivos .....	44
3.	Materiales y métodos .....	45
3.1	Caracterización de la cepa de <u>S.aureus</u> S-6 .....	46
3.1.1	Observación microscópica .....	46
3.1.2	Morfología colonial .....	46
3.1.3	Prueba de coagulasa .....	46
3.1.4	Prueba de termonucleasa .....	46
3.1.5	Prueba de catalasa .....	47
3.1.6	Fermentación de azúcares .....	47
3.1.7	Movilidad .....	47
3.1.8	Reacción de Voges-Proskauer .....	47
3.1.9	Prueba de reducción del nitrato .....	47
3.2	Comprobación de la producción de enterotoxina .....	48
3.3	Prueba de inmunodifusión radial simple modificada para la detección de enterotoxina .....	49
3.4	Curva de Crecimiento de <u>S.aureus</u> S-6 .....	50
3.5	Estandarización del inóculo .....	51
3.6	Análisis microbiológico de la carne .....	52
3.6.1	Mesofílicos aerobios totales .....	52
3.6.2	Coliformes totales .....	52
3.6.3	Aislamiento e identificación de <u>Salmonella</u> .....	52
3.6.4	Aislamiento e identificación de <u>S.aureus</u> .....	52

3.7	Formulación y proceso de elaboración del jamon troceado cocido .....	53
3.8	Análisis microbiológicos de los jamones .....	57
3.9	Extracción y detección de enterotoxina .....	59
4.	Resultados y discusión .....	67
4.1	Morfología microscópica .....	67
4.2	Morfología colonial .....	68
4.3	Pruebas bioquímicas .....	68
4.3.1	Coagulasa y termonucleasa .....	68
4.3.2	Catalasa .....	70
4.3.3	Fermentación de azúcares .....	70
4.3.4	Movilidad .....	71
4.3.5	Voges-Proskauer .....	71
4.3.6	Reducción de nitratos .....	71
4.3.7	Licuefacción de la gelatina .....	72
4.4	Producción de enterotoxinas .....	72
4.5	Identificación de enterotoxina .....	73
4.6	Curva de crecimiento de <u>S.aureus</u> S-6 .....	74
4.7	Estandarización del inóculo .....	77
4.8	Análisis microbiológico de la carne .....	77
4.9	Efecto del curado sobre <u>S.aureus</u> .....	78
4.10	Tratamientos térmicos de cocción .....	79
4.11	Características microbiológicas de los jamones .....	81
4.12	Extracción y detección de enterotoxina .....	85
5.	Conclusiones .....	102
6.	Bibliografía .....	103

## I N D I C E    C U A D R O S

Cuadro 1.	Características diferenciales de las especies de <u>Staphylococcus</u> .....	2
Cuadro 2.	Factores que influyen en el crecimiento de <u>S.aureus</u> .....	3
Cuadro 3.	Características físicas y químicas de las enterotoxinas estafilocócicas .....	13
Cuadro 4.	Composición de aminoácidos de la enterotoxina B .....	15
Cuadro 5.	Producción de enterotoxina en caldo BHI .....	19
Cuadro 6.	Composición del jamón cocido .....	32
Cuadro 7.	Especificaciones microbiológicas para el jamón cocido .....	42
Cuadro 8.	Formulación del jamón troceado cocido .....	54
Cuadro 9.	Temperaturas empleadas en el almacenamiento de los jamones cocidos .....	58
Cuadro 10.	Morfología colonial del <u>S.aureus</u> S-6 .....	88
Cuadro 11.	Características bioquímicas de <u>S.aureus</u> S-6 ....	89
Cuadro 12.	Análisis microbiológico de la carne de cerdo....	90
Cuadro 13.	Cuentas de mesofílicos aerobios totales y su relación con <u>S.aureus</u> en los jamones durante su proceso y vida de anaquel .....	91
Cuadro 14.	Efecto de las sales de cura sobre la viabilidad de <u>S.aureus</u> .....	93
Cuadro 15.	Efecto de los tratamientos térmicos sobre la viabilidad del <u>S.aureus</u> .....	93
Cuadro 16.	Variación en el número de <u>S.aureus</u> durante la vida de anaquel de los jamones .....	95
Cuadro 17.	Relación entre el número de <u>S.aureus</u> y la apariencia física de los jamones durante la vida de anaquel .....	95
Cuadro 18.	Resultados de la prueba de inmunodifusión radial simple modificada en los extractos de los jamones .....	96

## INDICE FIGURAS

Figura 1.	Enlace entre las moléculas de cisteína en la enterotoxina B .....	16
Figura 2.	Prueba de radioinmunoensayo .....	26
Figura 3.	Prueba de ELISA .....	28
Figura 4.	Cambios que pueden ocurrir durante el curado de la carne .....	36
Figura 5.	Método de elaboración de jamón troceado cocido .....	38
Figura 6.	Prueba de termonucleasa .....	62
Figura 7.	Método del celofán para producción de enterotoxina .....	63
Figura 8.	Prueba de inmunodifusión radial simple modificada .....	64
Figura 9.	Método de Baird-Parker para cuantificación de <u>S.aureus</u> .....	65
Figura 10.	Tratamientos térmicos empleados en la cocción de los jamones .....	50
Figura 11.	Método de extracción de enterotoxina de alimentos .....	66
Figura 12.	Curva de crecimiento de <u>S.aureus</u> S-6 en medio BHI .....	97
Figura 13.	Tasa de destrucción del <u>S.aureus</u> en los diferentes tratamientos térmicos .....	98
Figura 14.	Variación de las cuentas de <u>S.aureus</u> en el jamón cocido a 66 °C, durante su vida de anaquel .....	99
Figura 15.	Variación de las cuentas de <u>S.aureus</u> en el jamón cocido a 68 °C, durante su vida de anaquel .....	100
Figura 16.	Variación de las cuentas de <u>S.aureus</u> en el jamón cocido a 70 °C., durante su vida de anaquel .....	101

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 GENERALIDADES DE S.aureus

Taxonómicamente, el estafilococo ha sido clasificado dentro de la familia Micrococcaceae. El género Staphylococcus está constituido por varias especies: S.aureus, S.epidermidis, S.hyicus y S.intermedius, las cuales se diferencian básicamente en la habilidad de producir coagulasa, endonucleasa y de fermentar el manitol (cuadro 1).

El S.aureus se define como cocos gram positivos, cuyo diámetro se encuentra entre 0.8 - 1.0 micras. La forma como se agrupan mas frecuentemente es en racimos. Son microorganismos anaerobios facultativos, fuertemente catalasa positivos, no móviles, no forman esporas y algunas cepas poseen cápsula o capa viscosa (59).

Los estafilococos pueden desarrollarse en medios que contengan 7.5 % de NaCl. La mayoría crecen a temperaturas entre 6.5 y 45 °C, siendo la óptima de 37 °C. El rango de valores de pH que pueden tolerar está comprendido entre 4.5 y 9.3, siendo el intervalo mas favorable de 7.0 a 7.5. El valor de actividad de agua (Aw) mínimo para permitir el crecimiento aeróbico de las células es de 0.86 (7)(59) (Cuadro 2).

CUADRO 1. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES  
DE Staphylococcus.

<u>MEDIO DE PRUEBA</u>	<u>S.aureus</u>	<u>S.epidermidis</u>	<u>S.hycus</u>	<u>S.intermedius</u>
Coagulasa	+	-	V	-
DNAsa	+	V <sub>1</sub> <sup>-</sup>	V	+
Manitol	Acido	V <sup>-</sup>	-	-
Fosfatasa	V <sub>1</sub> <sup>+</sup>	V <sup>-</sup>		
Pigmentación	Dorado	Blanca	Blanca	Blanca
Hemólisis	+	V <sub>3</sub>	-	+

- 
- ‡ Variable, en su mayoría positiva
  - ‡ Variable, en su mayoría negativa
  - ‡ Variable

Fuente: Bergdoll, M.S. (1972)

**CUADRO 2. FACTORES QUE INFLUYEN EL EL CRECIMIENTO DE  
S. aureus**

<u>FACTOR</u>	<u>MINIMO</u>	<u>OPTIMO</u>	<u>MAXIMO</u>
Aw	0.83-0.86	0.99-1.0	0.99-1.0
pH	4.0	6.5-7.5	9.8
Temperatura ( °C )	6.5	30-37	45-47.8
NaCl (%)	0	0	18

---

Fuente: Minor, T.E. (1971).

### 1.1.1 H A B I T A T

El S.aureus es un organismo ampliamente diseminado en la naturaleza, se puede aislar del aire, aguas, suelo, heridas infectadas, membranas nasales, folículos capilares, piel y perineo de animales de sangre caliente (7)(21).

### 1.1.2 A I S L A M I E N T O

Para facilitar el aislamiento de S.aureus, han sido desarrollados varios medios selectivos y diferenciales. El uso de estos está basado en su tolerancia al cloruro de sodio, habilidad para reducir los teluritos, fermentación del manitol y reacción con la lipovitelina, protefina del huevo (63).

El medio de Baird-Parker ha sido seleccionado por la A.O.A.C. ( Association of Official Analytical Chemists ) como el mas apto para el aislamiento de S.aureus de los alimentos, conteniendo telurito de potasio y yema de huevo como agentes diferenciales (93).

El S.aureus tiene la habilidad de reducir aeróbicamente los teluritos a su forma metálica, con la consiguiente formación de colonias negras. También utiliza la lipovitelina del huevo de la siguiente forma:

- a. Transparencia del medio yema de huevo por proteólisis.
- b. Desarrollo de zonas opacas dentro de las zonas transparentes, es decir, aparición de un precipitado blanco amarillento por la formación de sales de calcio y magnesio los ácidos grasos liberados (3)(63).

Las colonias de S. aureus en el medio de Baird-Parker presentan la siguiente morfología colonial: colonias negras, brillantes, convexas, de 1-1.5 mm de diámetro, viscosas, rodeadas por halos transparentes de 2-5 mm de diámetro (2)(42).

La mayoría de las cepas patógenas de S. aureus presentan las siguientes características bioquímicas: fermentan el manitol, lactosa y sacarosa; producen hemólisis; son coagulasa y fosfatasa positivas; reducen el azul de metileno y los nitratos; producen termonucleasa e hidrolizan la urea (3).

### 1.1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA RESISTENCIA AL CALOR

Los principales efectos del calor sobre las células microbianas son: desnaturalización de las proteínas, ruptura en la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) y daños en la membrana citoplasmática.

La desnaturalización de las proteínas implicadas en la respiración y multiplicación celular, son consideradas como la causa mas importante de muerte celular.

Russell (79), señaló que en células no formadoras de esporas, la degradación del ácido ribonucleico (RNA), se relaciona estrictamente con la muerte inducida por calor. Para que el crecimiento pueda iniciarse, es necesario reparar los daños ocurridos en el RNA y en la membrana (4).

La resistencia al calor que pueden adquirir las células de S. aureus, está influida por algunas condiciones como: medio de suspensión, pH, tipo de tratamiento térmico, condiciones de

crecimiento y el método empleado para el recuento de supervivientes (40)(85).

#### 1.1.3.1 MEDIO DE SUSPENSION

Las características físico-químicas que presente el medio de suspensión en que se calienten los microorganismos influyen en su resistencia al calor.

El efecto mas importante sobre la resistencia al calor lo ejerce el pH de la suspensión, además de la actividad de agua (AW), la presencia de hidratos de carbono y lípidos. Debido a que los alimentos varían en estas características, la resistencia al calor del S.aureus varía según el alimento en que se encuentre (4).

#### 1.1.3.2 pH

En forma general, los estafilococos resisten mejor el calor en un pH proximo a 7.0. Conforme el pH se aleja de este valor, ocurre un aumento en la sensibilidad térmica debido a que tanto las proteínas como los microorganismos en general, van perdiendo estabilidad. Por ello, para los tratamientos térmicos en alimentos muy ácidos, es necesario aplicar menos calor para lograr una disminución en el número de microorganismos (45).

#### 1.1.3.3 ACTIVIDAD DE AGUA (AW)

La resistencia al calor de las células microbianas aumenta en proporción a la disminución de la humedad.

La desnaturalización de las proteínas es un mecanismo de muerte térmica y se produce mas rápidamente cuando se emplea calor húmedo.

No ha sido establecida la forma exacta en que el agua facilita la desnaturalización térmica de las proteínas, pero se ha señalado que determina la formación de grupos -SH libres, con el consiguiente aumento en la capacidad de las proteínas para captar agua. La presencia de ésta, permite la ruptura por el calor de los enlaces peptídicos, proceso que requiere mas energía en ausencia de agua (45).

#### 1.1.3.4 HIDRATOS DE CARBONO

La presencia de azúcares en el medio determina un incremento en la resistencia térmica de los microorganismos suspendidos en el. Probablemente, este efecto se deba principalmente a la disminución de la actividad acuosa, tanto del medio que los rodea como intracelularmente, causada por la alta concentración de azúcares (45).

Corry (18), halló que la sacarosa era el carbohidrato que provocaba una mayor resistencia de las bacterias al calor. El orden decreciente de su resistencia para los 5 carbohidratos investigados fue: sacarosa > glucosa > sorbitol > fructosa > glicerina.

La presencia de carbohidratos mas complejos como el almidón o la pectina, parece dar alguna protección a las células, aumentando su estabilidad al calor (4)(85).

### 1.1.3.5 L I P I D O S

Los estafilococos suspendidos en grasas o aceites son mas difíciles de destruir que aquellos que se encuentran en un medio acuoso, debido a la escasa conductividad térmica del aceite y a que la humedad celular se ve directamente afectada (4)(45).

Sugiyama (89), demostró el efecto protector frente al calor de los ácidos grasos de cadena larga, ya que al parecer éstos son mas efectivos que los de cadena corta.

### 1.1.4 INFLUENCIA DE AGENTES EXTERNOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE S.aureus

#### 1.1.4.1 FLORA ANTAGONISTA

Cuando un alimento ha sido contaminado por S.aureus, el desarrollo de éste puede ser influido por la presencia de otros microorganismos (45).

Peterson et al. (71) y Troller et al. (91), han demostrado que los estafilococos son incapaces de competir con las bacterias comúnmente transmitidas por los alimentos, tanto en los productos frescos como en los congelados. Es decir, a temperaturas que favorezcan el crecimiento de los estafilococos, la microflora normal de los alimentos es antagónica a su crecimiento, actuando competitivamente frente a los elementos nutritivos y modificando las condiciones ambientales hasta hacerlas desfavorables para el crecimiento del estafilococo.

Las principales bacterias antagónicas para S.aureus incluyen: Acinetobacter, Aeromonas, Bacillus, Pseudomonas,

Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae y S.epidermidis (45)(62).

#### 1.1.4.2 NITRATOS Y NITRITOS

El nitrato sodico ( $\text{NaNO}_3$ ) y el nitrito sodico ( $\text{NaNO}_2$ ) forman parte de las fórmulas empleadas para el curado de la carne.

El nitrito sódico está permitido en carnes curadas a niveles que no excedan 156 ppm (15).

La acción del nitrito de sodio sobre los microorganismos se lleva a cabo mediante el ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) no disociado. Este puede reaccionar con una amplia gama de sustancias, entre ellas la mioglobina, ácido ascórbico, fenoles, aminas secundarias, grupos amino y tiol.

La acción antimicrobiana del ácido nitroso es dependiente del pH de la siguiente manera:

- Un pH arriba de 7.5 puede contribuir al crecimiento bacteriano.
- El efecto antibacteriano cuando el pH se encuentra entre 6.0 y 7.0 es muy reducido, debido a que solo se encuentra presente una pequeña fracción de ácido nitroso no disociado.
- A un pH entre 4.5 y 5.5 se tiene un amplio efecto antimicrobiano.
- Debajo de pH 4.5, el ácido nitroso se descompone en ácido nítrico, óxido nítrico y agua, los cuales no tienen la misma actividad contra los microorganismos (15)(45).

Concentraciones de nitrito de sodio del orden de 200  $\mu\text{g/g}$ , no afectan el crecimiento de S.aureus o su producción de enterotoxina en caldo BHI ( Infusión Cerebro-Corazón ) a un pH de 7.0. Sin embargo, 120  $\mu\text{g/ml}$  de nitrito, 2 % de sal común y 200  $\mu\text{g/ml}$  de nitrato redujeron el total de enterotoxina producida (55).

#### 1.1.4.3 AHUMADO

El efecto conservador del ahumado, es resultado de la combinación del secado y depósito de los agentes químicos que resultan de la descomposición térmica de la leña, entre éstos se encuentran: ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, resinas, compuestos de carbonilo, ceras y alquitranes. Los ácidos, fenoles y carbonilos, se consideran como los componentes que mas contribuyen al olor y sabor del humo.

El formaldehído, los ácidos y fenoles, son agentes antimicrobianos y se les considera responsables de la mayor parte de la acción antibacteriana en las carnes ahumadas.

El humo líquido a 0.08 % retrasa pero no detiene el crecimiento de las bacterias. Por encima de 0.4 %, los efectos conservadores son excelentes, pero el olor a humo es muy intenso (4).

#### 1.1.4.4 CLORURO DE SODIO

Una de las formas mas antiguas de conservación de los alimentos es el empleo del cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ).

La concentración salina necesaria para impedir el

crecimiento microbiano depende del pH, actividad de agua, tipo de microorganismo, temperatura y composición química del sustrato (25).

Dentro de los efectos de la sal sobre las bacterias, se encuentran la plasmólisis, deshidratación, supresión del oxígeno, interferencia con las enzimas y alteración del pH. Cuando su concentración es muy elevada, los iones cloro o sodio se vuelven tóxicos.

La tolerancia a la sal de los microorganismos es variable. Los estafilococos pueden resistir niveles de aproximadamente 30 %, al igual que los micrococos y bacterias formadoras de esporas (37)(45).

## 1.2 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOVICAS

Las enterotoxinas estafilocócicas son proteínas extracelulares producidas por algunas cepas de S.aureus en ciertos alimentos y medios de cultivo en el laboratorio. Tienen un peso molecular bajo, alta toxicidad, relativamente baja antigenicidad y están clasificadas en 7 grupos: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D y E; todas ellas tienen estructuras y propiedades biológicas similares (46)(78).

### 1.2.1 CARACTERISTICAS DE ENTEROTOXINAS

Las enterotoxinas puras son de color blanco, higroscópicas, muy solubles en agua y soluciones salinas.

Algunas de las propiedades físicas y químicas de las enterotoxinas se ilustran en el cuadro 3 (60).

Cuando se encuentran en estado activo, pueden resistir la acción de enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, renina y papaína, además, son de las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteínica resistentes al calor (7)(45).

Metzger, et al. (57), realizaron un estudio donde demostraron que  $3.0 \times 10^7$  U.F.C. (Unidades Formadoras de Colonias) / ml, produjeron  $1.46 \pm 0.51$   $\mu$ g de enterotoxina B / ml, en medio Agar Soya Tripticasa (AST).

En los alimentos, las enterotoxinas no resultan completamente inactivadas por la cocción normal, la pasteurización u otros tratamientos térmicos corrientes. Tatini (90), afirma que el tratamiento térmico no garantiza la inactivación de dichas toxinas. Por otra parte, a dosis iguales, las toxinas que han pasado por un tratamiento térmico, presentan mayor actividad biológica que las no tratadas.

Read et al. (73), demostraron que los preparados brutos de toxina son mas termoestables que las toxinas puras.

La enterotoxina B es la mas termoestable, requiriendo para su inactivación un calentamiento a  $99^\circ\text{C}$  durante 87 minutos (6).

El calentamiento de la enterotoxina B a  $60, 80$  y  $100^\circ\text{C}$  provoca una rápida pérdida de la activación de la misma, debido tanto a la acción térmica, como a la unión de ésta enterotoxina con las proteínas de la carne (mioglobina o metamioglobina) (7)(81).

**CUADRO 3. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS**

<b>PROPIEDAD</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>PESO MOLECULAR</b>	27,800	28,366	34,100	34,000	27,000	29,600
<b>DOSIS EMETICA ( ED<sub>50</sub> ug/mono)</b>	5	5	5	5-10	20	10-20
<b>CONTENIDO DE NITROGENO (%)</b>	16.2	16.1	16.2	16.0	--	--
<b>PUNTO ISOELECTRICO</b>	6.9	8.6	8.6	7.0	7.4	7.0
<b>ABSORCION MAXIMA (nm)</b>	277	277	277	277	378	377
<b>VISCOSIDAD REDUCIDA (ml/g)</b>	4.07	3.81	3.40	3.70	--	--

---

**Fuente:** Bryan, F.L. (1979)

Jamlang et al. (44), encontraron una pérdida mas rápida de la actividad inmunológica cuando la enterotoxina B fue calentada en una solución reguladora de acetatos o fosfatos a una temperatura de 70 a 80 °C, que a la temperatura de 90 a 100 °C.

Reichert y Fung (74), demostraron que la enterotoxina B inactivada por el calor, despues de 24 horas de almacenamiento podía reactivarse dependiendo del tiempo de calentamiento y temperatura aplicada, habiendo una mayor recuperación después de ser sometida a 80 °C.

### 1.2.2 COMPOSICION QUIMICA

Las enterotoxinas son cadenas simples de polipéptidos que contienen cantidades relativamente grandes de lisina, aspartato, glutamato y tirosina. Aunque existen diferencias en la composición de las mismas, estas no revisten mayor significancia, excepto por el efecto que pueden ejercer sobre su punto isoelectrico (7).

La enterotoxina B está formada por 239 aminoácidos (cuadro 4), siendo el aminoácido N-terminal el ácido glutámico y el C-terminal la lisina (23). Tiene un puente disulfuro entre 2 moléculas de cisteína, localizado en el centro de la proteína (23)(46)(48) (figura 1).

Chu et al. (92), estudiaron el efecto de la acetilación, succinilación, guanidinación y carbamilación sobre la actividad biológica de la enterotoxina B, producida por cepas S-6. Demostraron que la guanidinación del 90 % de los restos de lisina no tiene efecto sobre la actividad de la enterotoxina.

CUADRO 4. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA ENTEROTOXINA B  
( g/100 g proteina )

<u>Aminoacido</u>	<u>%</u>
Alanina	1.3
Arginina	2.7
Aspartato	18.1
Cisteina	0.7
Glutamato	9.5
Glicina	1.0
Histidina	2.3
Isoleucina	3.5
Leucina	6.9
Lisina	14.9
Metionina	3.5
Fenilalanina	6.2
Prolina	2.1
Serina	4.1
Treonina	4.5
Tirosina	11.5
Triptofano	1.0
Valina	5.7

---

Fuente: Bergdoll, M.S. (1972)



Sin embargo, la acetilación, succinilación y carbamilación disminuyen la carga neta positiva de la toxina, aportada por los grupos amino. Se piensa que la carga positiva normal de la toxina juega un papel importante en la actividad emética y su capacidad combinatoria con anticuerpos específicos.

### 1.2.3 CONDICIONES PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS

#### 1.2.3.1 COMPOSICION ATMOSFERICA

Metabólicamente, S.aureus se considera como una bacteria anaerobia facultativa que crece con mayor velocidad bajo condiciones aeróbicas, por lo tanto, la aereación tiene un efecto positivo en su crecimiento y síntesis de enterotoxinas (84).

McLean et al. (55) y Dietrich et al. (22), encontraron que la aereación con agitación a 37 °C, permite que S.aureus produzca mayor enterotoxina B. Con un 100 % de oxígeno disuelto, el crecimiento del microorganismo a 37 °C es máximo, pero no hay síntesis de enterotoxina B. La máxima producción de dicha enterotoxina se da con 10 % de oxígeno disuelto.

En los alimentos, S.aureus crece y produce enterotoxina bajo condiciones anaeróbicas. Genigeorgis et al. (31), reportaron que la enterotoxina B se produjo en jamones incubados a 22 y 30 °C, ambos bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Mientras que el crecimiento de S.aureus puede predecirse, no se puede anticipar la producción de enterotoxina en jamones.

Cuando se ha inoculado e incubado S.aureus en camarones, bajo condiciones aeróbicas y a temperaturas menores de

26 °C con aereación, se detectó producción de enterotoxina B después de 7 días (84).

Bennett y Amos (5), encontraron que sandwiches conteniendo niveles detectables de enterotoxina, fueron organolépticamente aceptables.

### 1.2.3.2 TEMPERATURA

La temperatura para la producción de enterotoxina empleada con mayor frecuencia es de 37 °C. La toxina puede sintetizarse a temperaturas de 25 y 30 °C, pero en menor cantidad que ha 37°C (13). McLean et al. (55), reportaron que solo pequeñas cantidades de enterotoxina B se produjeron a 16 y 20 °C. La cantidad decreció marcadamente conforme la temperatura disminuyó.

Hojvat y Jackson (35), realizaron un estudio sobre la producción de enterotoxina B en medio BHI con agitación y a diferentes temperaturas (cuadro 5).

Genigeorgis (31), observó que jamones almacenados anaeróticamente a 10, 22 y 30 °C, presentaron crecimiento de S.aureus y producción de enterotoxina B.

Algunos resultados de estudios en los cuales emplearon medios microbiológicos sintéticos sugieren que:

- a. La temperatura óptima para la producción de enterotoxina son pocos grados por arriba que la de crecimiento.
- b. Los cambios en la temperatura, afectan mas fuertemente la síntesis de enterotoxina que el crecimiento del microorganismo.

**CUADRO 5. PRODUCCION DE ENTEROTOXINA EN CALDO BHI**

<u>TIEMPO</u> (días)	<u>TEMPERATURA</u> ( °C )	<u>CANTIDAD ENTEROTOXINA</u> ( µg / ml )
8	35	1,000
8	30	300
8	25	150
8	20	25

---

Fuente: Hojvat y Jackson (1969)

Aquellos alimentos que son sujetos a algún abuso en la temperatura de almacenamiento ( $> 10^{\circ}\text{C}$ ), deben ser considerados como candidatos potenciales para producir un ataque de intoxicación.

La reducción en la producción de enterotoxina a bajas temperaturas, es debido a un efecto directo en la biosíntesis de toxina, o bien, como resultado de algún cambio en el estado fisiológico o nutricional del microorganismo (70)(84).

### 1.2.3.3 A C I D E Z

El pH al cual algunas cepas de S.aureus crecen, dependerá del tipo de medio, concentración de sal, tamaño del inóculo y atmósfera. La producción de enterotoxina se limita a un pH de 5.15 a 9.0 (83).

Genigeorgis et al. (32), demostraron que el pH mas bajo que permite el crecimiento y producción de enterotoxina de S.aureus aeróbicamente es de 4.0.

Scheusner et al. (82), demostraron que la enterotoxina B se detectó en un tiempo de 4-6 horas en caldo BHI, incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  y ajustado inicialmente a un pH de 5.02 o 9.08. Cuando se parte de un pH de 6.8, hay mayor producción de enterotoxina B que de un valor inicial de 5.3 a 6.0 (75).

Scheusner y Harmon (83), estudiaron que la enterotoxina estafilocócica es producida en una variedad de alimentos, cuyo rango de pH va de 5.5-6.6, pero no la detectaron en aquellos cuyo pH fuera inferior a 5.0.

Los alimentos en cuyo proceso está implicado una fermentación o acidificación, en caso de haber sido preparados en forma apropiada, no deben presentar suficiente crecimiento de S.aureus como para que se lleve a cabo la biosíntesis de enterotoxina, aun cuando exista un abuso en la temperatura de almacenamiento (60)(65).

#### 1.2.3.4 CLORURO DE SODIO

S.aureus requiere la presencia de varios minerales para su desarrollo, tales como pequeñas cantidades de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .

La óptima producción de enterotoxina se realiza con 0 % de NaCl, pero puede producirse en un rango de 0-10 %. La síntesis de enterotoxina B decrece de un valor de aproximadamente 500 ug/ml a 0 ug/ml, al incrementarse el nivel de NaCl de 0 a 10 % (55).

Empleando el medio BHI con un pH inicial de 6.0 a 6.9, Genigeorgis y Sadler (30), encontraron abundante producción de enterotoxina B después de incubar a 37 °C durante 48 horas, en presencia de 2-6 % de NaCl; hubo una reducción en la síntesis con un 8 % de NaCl y no la hubo con 10 % de sal (84).

Para reducir el consumo de sodio, se ha sugerido que el NaCl sea reemplazado parcial o completamente por KCl,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  o una combinación de dichas sales, aunque no se conoce el efecto que pueden tener sobre el crecimiento y producción de enterotoxina (66).

Morita et al. (61), demostraron que el adicionar Mg al

medio de cultivo, estimula la producción de enterotoxina por S.aureus.

#### 1.2.3.5 D A N O S U B L E T A L

Cuando S.aureus es sujeto a factores como calor, frío, radiación o agentes químicos, presenta un daño celular evidente (14)(39).

La principal manifestación de daño en S.aureus, es la pérdida en la composición de la membrana. Así, algunos componentes celulares como ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, lípidos y iones, pueden encontrarse en el medio extracelular como respuesta (36)(38)(41).

Las células dañadas presentan una mínima capacidad metabólica y no pueden llevar a cabo la síntesis de enterotoxina (10). Sin embargo, cuando ocurre un daño por efecto del calor, puede haber una recuperación del microorganismo al ser transferido a un medio que contenga una fuente de aminoácidos, glucosa, fosfato y magnesio (36)(41).

Collins-Thompson et al. (16), demostraron que cuando células de S.aureus fueron dañadas por calor y se transfirieron a un medio microbiológicamente adecuado, la bacteria reparada pudo crecer, su desarrollo y síntesis de enterotoxina B, fueron similares a aquellas células sin daño. Del mismo modo, sugirieron que el S.aureus dañado por algún proceso en la elaboración de alimentos, puede recuperarse e iniciar la síntesis de enterotoxina, sobre todo a temperaturas de almacenamiento elevadas (84).

#### 1.2.4 DETECCION DE ENTEROTOXINAS

Los principales métodos para la detección de enterotoxinas, pueden dividirse en sistemas biológicos y serológicos.

En los sistemas serológicos, se aprovecha la propiedad que tienen las enterotoxinas de producir anticuerpos en animales de laboratorio (7).

El hecho de poder formar un precipitado al reaccionar el antígeno con el anticuerpo, se emplea como base de varios métodos para demostrar la presencia de enterotoxinas. Algunos sistemas serológicos propuestos para el ensayo de las enterotoxinas comprenden:

a. Prueba en tubo de difusión en gel.

Se emplea un tubo en el cual se tiene antitoxina previamente incorporada en el agar. Se agrega la solución que contiene la enterotoxina y se observa la precipitación en la zona de equivalencia. Tiene una sensibilidad de 5-200  $\mu\text{g/ml}$  de enterotoxina.

b. Prueba de doble difusión en gel.

Esta prueba tiene una sensibilidad de 5-10  $\mu\text{g/ml}$  de enterotoxina. Se emplea una placa en la cual se realizan algunas perforaciones. Se coloca la solución con el antígeno y anticuerpo en pozos adyacentes, al difundir se formará una banda de precipitación en el punto en que interaccionan. Esta técnica se emplea para detectar la presencia de enterotoxina en extractos obtenidos de alimentos.

**c. Prueba de precipitación en tubo.**

Es una prueba cuantitativa, la cual se realiza poniendo en contacto la toxina con la antitoxina correspondiente. Se analiza el nitrógeno total en la zona del precipitado por la técnica de micro-kjeldahl (92).

**d. Prueba de hemaglutinación.**

En este método, los anticuerpos están unidos a eritrocitos. Esta solución se pone en contacto con la enterotoxina y si hay suficiente concentración de antígeno, se llevará a cabo la reacción de aglutinación. La sensibilidad de la técnica es de 0.0015 ug/ml de enterotoxina (92).

**e. Prueba de difusión radial simple.**

La prueba tiene una sensibilidad de 1.0 ug/ml de enterotoxina. El antisuero se agrega al agar, se mezcla y se vierte en placas que se dejan enfriar. Se realizan perforaciones y se colocan concentraciones diferentes de enterotoxina. Se deja la placa incubar durante 24 horas en un ambiente húmedo. La enterotoxina habrá difundido alrededor de los pozos formando un anillo de precipitación, el cual puede ser medido y así elaborar una curva estándar (92).

**f. Prueba de radioinmunoensayo.**

La prueba tiene una sensibilidad de 0.0015-0.010 ug/ml de enterotoxina. El procedimiento en general consiste en que la antitoxina específica se adsorbe sobre una placa sensible para antígenos. Se agrega la toxina marcada con  $I^{125}$  y se deja actuar por un tiempo, se remueve la enterotoxina excedente y se

determina radioactividad emitida (8)(92) (Figura 2).

g. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Es una de las técnicas más rápidas y específicas para detectar la presencia de toxinas estafilocócicas. La sensibilidad del método en el caso de alimentos es de menos de 0.1 ng por ml de extracto. Los principios para esta prueba son idénticos a los de radioinmunoensayo.

Este método incluye el uso de una enzima unida a la enterotoxina o anticuerpo específico. La enzima frecuentemente se encuentra unida al anticuerpo de manera que la cantidad de enzima-anticuerpo que de el desarrollo del color, será directamente proporcional a la cantidad de enterotoxina en la muestra probada.

El método en general es el siguiente:

- a. En una placa de microtitulación, se agrega el antígeno específico (extracto del alimento) a probar. Se lava la placa después de un tiempo de reacción.
- b. Agregar la solución que contiene el anticuerpo. Dejar actuar por un tiempo.
- c. Adicionar un ligando, que tendrá la capacidad de unirse específicamente al anticuerpo. Este ligando contiene la enzima correspondiente (por ejemplo, peroxidasa).
- d. Observar el desarrollo del color colocando sobre la placa el sustrato (cromógeno), que por medio de la acción de la enzima, produce una reacción colorida que puede medirse con un lector específico para placa de microtitulación (9)(27)(48)

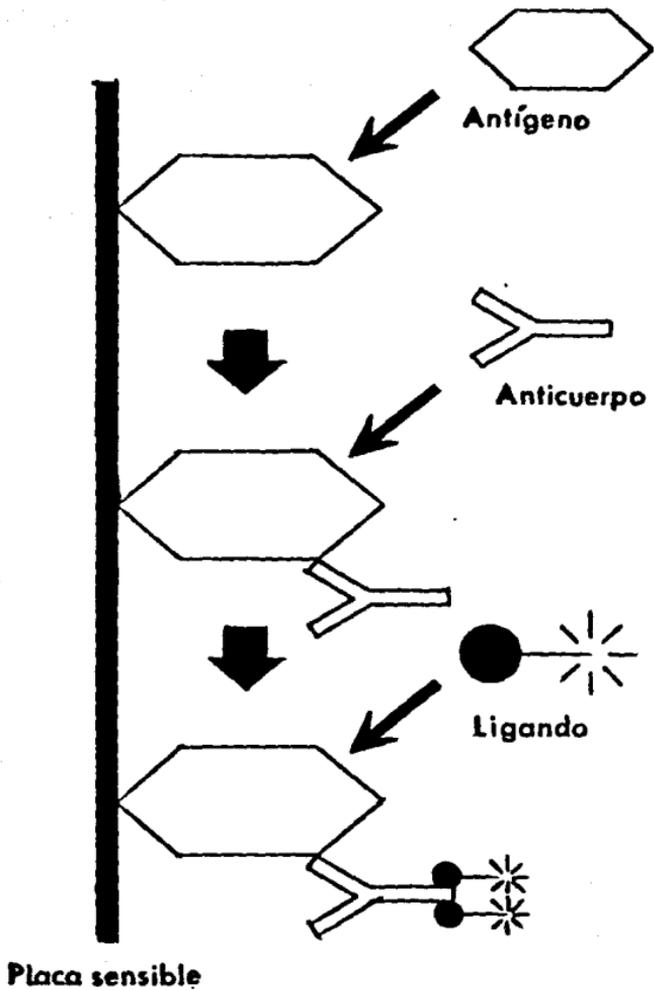


FIGURA 2. PRUEBA DE RADIOINMUNOENSAYO

( Figura 3 ).

### 1.3 INTOXICACION ESTAFILOCOGICA

Debido a que los casos individuales de intoxicación estafilocócica no son denunciados y a que numerosas personas afectadas no acuden al médico, se desconoce la extensión e importancia de la enfermedad (46).

Se carece de datos fehacientes sobre el mínimo de enterotoxina necesario para producir síntomas en las personas. Gilbert (56), estudió que los síntomas resultan de una variación de 0.015 a 0.357  $\mu\text{g}$  de enterotoxina por kilo de peso corporal, así como una variación en la sensibilidad a la toxina entre individuos (46).

Hobbs (33), indicó que debe haber de 500,000 a 1,000,000 de células de S.aureus por gramo, para poder producir síntomas de toxiinfección alimenticia en el hombre.

Genigeorgis et al. (31), observaron que el recuento celular mínimo sobrepasaba  $4 \times 10^6$  U.F.C. en los jamones toxigénicos e hicieron notar que incluso tras un período de incubación de dos meses a  $10^\circ\text{C}$ , éstos conservaban su aspecto normal, aun conteniendo mas de  $10^6$  estafilococos por gramo de carne.

El período de incubación de un brote típico, suele ser de 30 minutos a 8 horas, con un mayor número de ocurrencias a las 2-4 horas siguientes a la ingestión del alimento sospechoso.

( Figura 3 ).

### 1.3 INTOXICACION ESTAFILOCOGICA

Debido a que los casos individuales de intoxicación estafilocócica no son denunciados y a que numerosas personas afectadas no acuden al médico, se desconoce la extensión e importancia de la enfermedad (46).

Se carece de datos fehacientes sobre el mínimo de enterotoxina necesario para producir síntomas en las personas. Gilbert (56), estudió que los síntomas resultan de una variación de 0.015 a 0.357  $\mu\text{g}$  de enterotoxina por kilo de peso corporal, así como una variación en la sensibilidad a la toxina entre individuos (46).

Hobbs (33), indicó que debe haber de 500,000 a 1,000,000 de células de S. aureus por gramo, para poder producir síntomas de toxiinfección alimenticia en el hombre.

Genigeorgis et al. (31), observaron que el recuento celular mínimo sobrepasaba  $4 \times 10^6$  U.F.C. en los jamones toxigénicos e hicieron notar que incluso tras un período de incubación de dos meses a  $10^\circ\text{C}$ , éstos conservaban su aspecto normal, aun conteniendo mas de  $10^6$  estafilococos por gramo de carne.

El período de incubación de un brote típico, suele ser de 30 minutos a 8 horas, con un mayor número de ocurrencias a las 2-4 horas siguientes a la ingestión del alimento sospechoso.

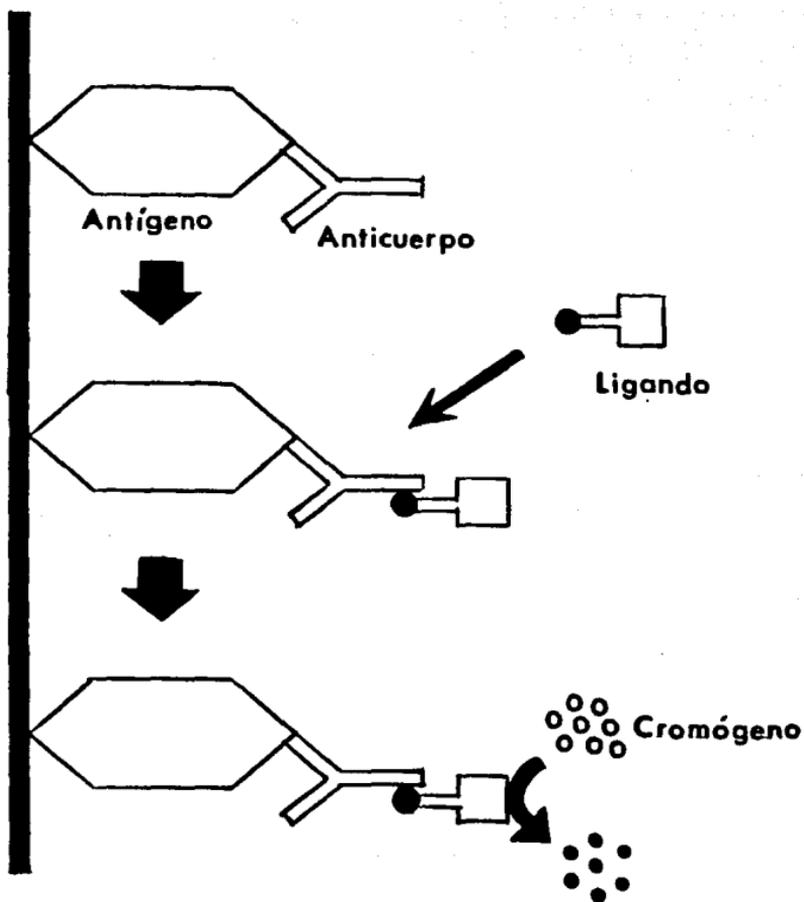


FIGURA 3. PRUEBA DE ELISA ( ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY )

La gravedad de los síntomas varía según la concentración de enterotoxina en el alimento, la cantidad ingerida de éste y a la susceptibilidad del individuo. Los principales síntomas son: náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea. En algunos brotes, también pueden producirse shock, anorexia, cianosis, salivación, malestar, sudoración y deshidratación (13).

El mecanismo de acción de la enterotoxina no está entendido completamente, pero probablemente causa vómito y diarrea por su acción emética en la región abdominal (24).

Los síntomas suelen atenuarse al cabo de uno o dos días. Debido a la rapidez con que se instauran los síntomas y a la corta duración de la enfermedad, rara vez se recurre a un tratamiento (13).

### 1.3.1 INCIDENCIA EN MEXICO

El Laboratorio Nacional de Salud Pública, participó en un estudio en el que se realizó una revisión de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario entre 1980 y 1989.

Se confirmaron un 73 % de brotes de intoxicación. Los lugares donde se presentaron con mayor frecuencia fueron:

	%
Reuniones	24.1
Escuelas o guarderías	10.3
Restaurantes	8.6
Hospitales	8.6

El microorganismo que estuvo implicado de una manera muy importante fue el S.aureus, responsable del 48.2 % de los brotes.

Los alimentos mayormente implicados se mencionan a continuación (19):

	%
Quesos	29.3
Pasteles	15.5
Carne	15.1
Leche	13.8
Pescados y mariscos	7.0

### 1.3.2 ALIMENTOS IMPLICADOS

Los alimentos implicados en intoxicaciones estafilocócicas son: carne de res y cerdo, aves, mariscos, huevos, leche y sus derivados, productos de panificación, frutas y hortalizas, ensaladas y cárnicos procesados.

La carne en lata, la mortadela, el jamón y el cerdo ahumado, constituyen los principales vehículos de enterotoxina. Las carnes frescas casi no intervienen debido a que se trata de productos perecederos que suelen conservarse en el refrigerador a temperaturas que no facilitan el crecimiento y/o producción de enterotoxinas. Las carnes ahumadas, en cambio, muchas veces se dejan imprudentemente a temperatura ambiente.

Algunas ensaladas como la de papa, macarrones o atún, son a veces causa de brotes de intoxicación. Diversos productos de pastelería y panificación, tales como flan, crema, merengue,

pastel de limón y buñuelos rellenos, están implicados de una manera significativa. Los brotes causados por los rellenos utilizados en las pastelerías, constituyen un excelente medio de cultivo en donde los estafilococos se desarrollan perfectamente a la temperatura ambiente.

En las mesas que conservan calientes los alimentos en las cafeterías, restaurantes y máquinas expendedoras de alimentos calientes, puede tener lugar el desarrollo de estafilococos y la producción de toxinas (4)(28).

Otros productos involucrados son la salsa holandesa, el budín de pan, los aderezos a base de carne de aves, salsas, jugos de carne y arroz frito (4).

#### 1.4 GENERALIDADES DEL JAMON

Dentro de la clasificación de los derivados cárnicos, se encuentra la siguiente división en base a los cortes de la carne:

- Picados. Implican subdivisión de la carne cruda y el producto final está formado por pequeñas porciones de carne. Dentro de esta división se encuentra el jamón troceado cocido, mortadela, salami, etc.

- No picados. Se preparan a partir de carnes completas e intactas. En este grupo se encuentra el jamón cocido de pierna (72).

Se denomina "jamón" al producto elaborado con carne de la pierna trasera del cerdo, separada transversalmente del resto del costado en un punto no anterior al extremo del hueso de

**CUADRO 6. COMPOSICION DEL JAMON COCIDO**

<u>COMPONENTE</u>	<u>%</u>
Agua	30-64
Grasa	5-49
Proteína	15-27
Cenizas	2-4
NaCl	5-10

---

Fuente: Egan, H. (1988)

la cadera, excluyendo la carne picada no triturada. La carne deberá curarse y podrá tratarse con especias y sustancias aromáticas para posteriormente cocerse o ahumarse (56).

La composición del jamón curado se presenta en el cuadro 6 (24).

#### 1.4.1 CONTAMINACION DE CARNE FRESCA DURANTE SU OBTENCION

La calidad de los productos cárnicos aptos para el consumo humano, es inseparable de la higiene durante su obtención y en cada una de las etapas productivas.

Las fallas higiénicas durante la matanza y destace, influyen en una gran contaminación microbiana de la materia prima carne, la cual no puede ser compensada por ninguna otra medida posterior de la producción, mas aún, se programa de antemano una inevitable disminución cualitativa en los productos finales (86).

La contaminación mas importante de la carne es de origen externo, durante el sacrificio, manipulación y tratamientos a que se somete. Durante la sangría, desuello y cuarteado de los animales, las principales fuentes de microorganismos son las partes externas del animal (piel, pezuñas y pelo), conteniendo además de su flora natural, gran número de contaminantes que proceden del suelo, agua, piensos y estiércol. Los cuchillos, paños, aire, manos y ropa del personal, son posibles fuentes de contaminación intermedia (28). Durante la evisceración, puede presentarse una contaminación a partir del intestino.

La conservación de la carne, como la de casi todos los

alimentos que se alteran con facilidad, se lleva a cabo por una combinación de métodos. A menos que el enfriamiento se realice inmediatamente y con rapidez después del sacrificio, la carne puede experimentar cambios perjudiciales en su apariencia y sabor, además de soportar el crecimiento de microorganismos antes de ser convenientemente tratada para su conservación. El almacenamiento durante un tiempo prolongado a temperaturas de refrigeración, puede hacer aumentar ligeramente la carga microbiana (28).

#### 1.4.2 FUNCION DE LA MATERIA PRIMA

A continuación se describen los ingredientes tradicionales que se emplean en la elaboración del jamón:

1.4.2.1 Carne. Se define como el tejido muscular de animales sanos. Contribuye al valor nutricional y textura de los jamones mediante sus componentes principales que son: proteína, grasa y agua.

1.4.2.2 Grasa. La grasa empleada afecta en forma deseable la jugosidad y suavidad de los jamones. Sus funciones son:

- Mejorar la suavidad, jugosidad y sabor del jamón.
- Constituir una fuente de energía.
- Dar efecto de satisfacción al consumidor.

1.4.2.3 Sal. Tiene las siguientes funciones:

- Mejorar el sabor.

- Contribuir a ligar agua debido a que aumenta la cantidad de proteína soluble potencialmente utilizable.
- Influye en la conservación del jamón. Aunque los niveles utilizados no son elevados, previene el crecimiento bacteriano, inhibiendo el desarrollo de la flora normal.

1.4.2.4 Sazonadores. Producen sabores deseados que influyen en la aceptabilidad del producto por el consumidor. El mas empleado en la elaboración del jamón es el glutamato monosódico.

1.4.2.5 Fosfatos. Incrementan la capacidad ligante de agua del músculo al interaccionar con sus proteínas, aumentando su hidratación y solubilidad.

1.4.2.6 Azucres. Son utilizados en los jamones en pequeñas cantidades. Realzan el sabor de la sal y algunas especias, además de impartir sabor dulzón a los productos.

1.4.2.7 Agua. Es probablemente el ingrediente mas importante. Su adición en la elaboración de jamón es esencial pues contribuye a una adecuada jugosidad en su textura y sabor.

1.4.2.8 Nitrito de sodio. Desempeña las siguientes funciones en embutidos:

- Impartir al producto terminado la coloración y sabor de carne curada (Figura 4 ).

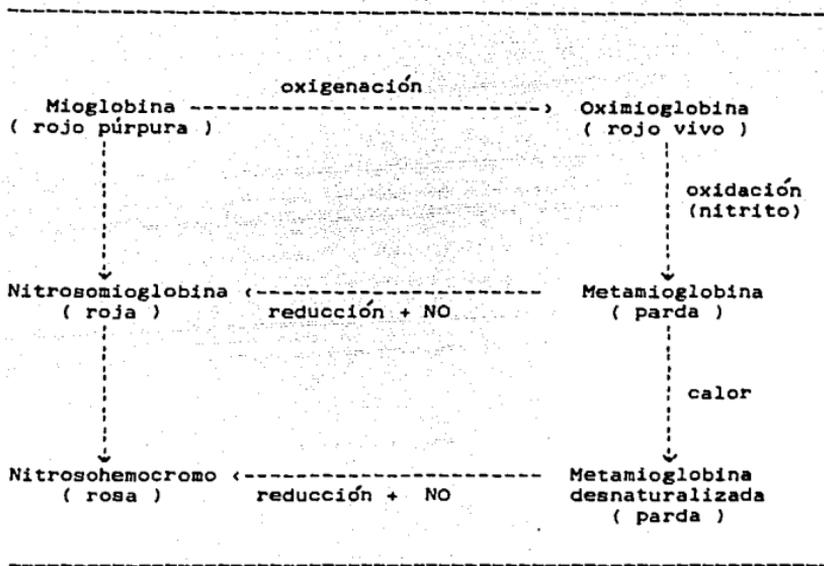


FIGURA 4. CAMBIOS QUE PUEDEN OCURRIR DURANTE EL CURADO DE LA CARNE

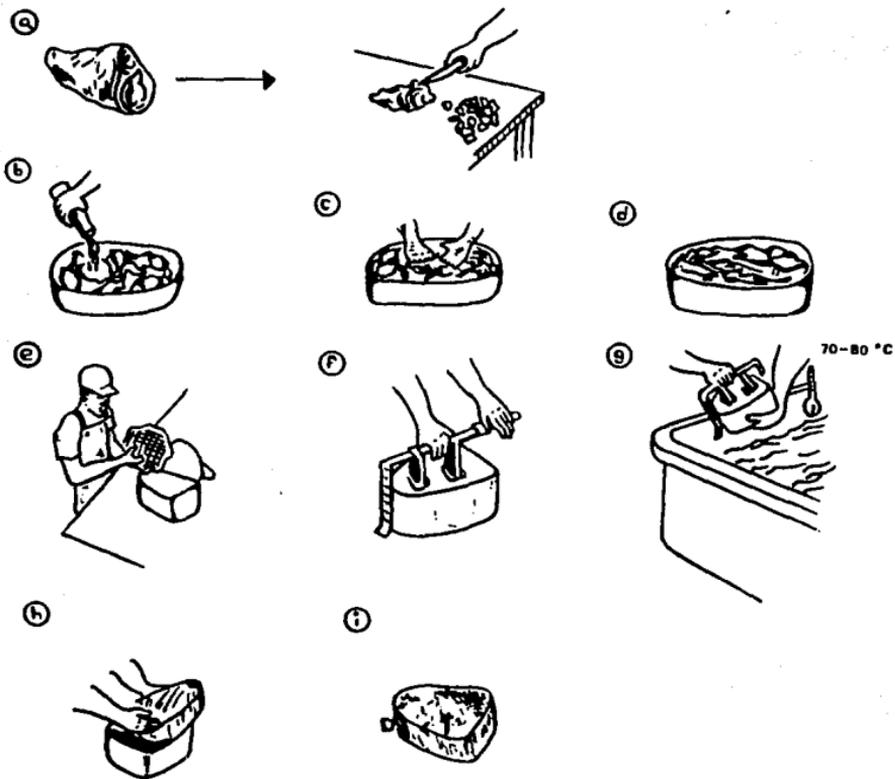
Fuente: Frazier, W.C. (1981)

• Inhibir el desarrollo del Cl. botulinum (80).

#### 1.4.3 ELABORACION JAMON COCIDO TROCEADO

El proceso de elaboración del jamón troceado cocido se describe a continuación:

- a. Se selecciona la carne, eliminando el exceso de grasa. Cortar en cubos de aproximadamente 5 cm por lado.
- b. Añadir 500 ml de salmuera por cada 3 Kg de carne.
- c. Masajear vigorosamente durante 30 minutos.
- d. Los jamones se dejan curar durante 16-24 horas a una temperatura aproximada de 5 °C.
- e. Se enfunda una cantidad de jamón correspondiente al tamaño del molde en una malla de algodón.
- f. Se coloca la tapa al molde ejerciendo una presión uniforme.
- g. Se sumergen los moldes en pailas con agua a 70-80 °C, hasta que la temperatura en el centro alcance los 70 °C.
- h. Se saca el jamón del molde y de la malla. Se lava con agua tibia y se recortan los bordes sobresalientes.
- i. Los jamones se embuten en fundas de plástico y se ata el extremo.
- j. El producto se comercializa bajo refrigeración (54)  
( Figura 5 ).



**FIGURA 5. METODO DE ELABORACION DE JAMON TROCEADO COCIDO**

#### 1.4.4 TRATAMIENTO TERMICO EN CARNES CURADAS

El tratamiento térmico de carnes curadas se lleva a cabo en autoclaves con agua o aire caliente, o bien, en tanques abiertos con agua a temperaturas de 70 a 85 °C, lo que da lugar a una temperatura final en el centro del producto entre 65 y 75 °C.

Los productos que se manipulan después de tratados térmicamente, pueden contaminarse al ponerse en contacto con el equipo o personal, con una flora que crece bien a pesar del contenido de sal y nitrito, siendo los aumentos en las cuentas bacterianas de unas 10 veces por semana a 5 °C y de 100 veces a 10 °C.

El patógeno mas importante de las carnes curadas pasteurizadas es el S.aureus, que rara vez sobrevive a un tratamiento térmico, pero que frecuentemente es un contaminante procedente de las manos de las personas que manipulan y envasan las carnes despues de procesadas. Su crecimiento no lo controlan las concentraciones corrientes de sal y de nitritos, además, a temperaturas adecuadas para su crecimiento aeróbico, forman enterotoxina (23).

##### 1.4.4.1 PROCESO DE COCCION EN JAMONES

El proceso de cocción debe programarse de manera que se compaginen la capacidad de conservación, enrojecimiento y estabilidad del color, con un rendimiento y sabor aceptables.

Los jamones se cuecen en función de su temperatura interna. Son suficientes temperaturas internas de 62 o 64 °C.

Si los productos curados cocidos se fabrican para

introducirse en envases o conservarse en recipientes, se recomienda siempre incrementar la temperatura interna a 70 °C y mejor todavía, a 72 °C. Cada grado de aumento de la temperatura de escaldado, proporciona una capacidad de conservación y estabilidad del color sustancialmente mas largas.

Los gérmenes acidificantes y alteradores del color como lactobacilos y estreptococos, no se pueden destruir con temperaturas internas de 64 °C. En la cocción, hasta que se logra alcanzar la temperatura interna deseada, conviene tener en cuenta que la aplicación de calor debe suspenderse cuando la temperatura alcanzada este unos 2 o 3 grados por debajo de la temperatura interior prevista como óptima, ya que en el seno del jamon tiene lugar todavía una elevación de la temperatura, aún cuando la zona cortical ya se haya enfriado. De esta manera, pueden evitarse perdidas innecesarias por cocción como consecuencia de alcanzar temperaturas internas demasiado elevadas (29).

#### 1.4.4.2 NORMAS QUE APLICAR DURANTE EL CALENTAMIENTO

Existen algunas reglas que deben observarse al llevar a cabo la cocción de embutidos, estas son:

- Cocer de acuerdo a la temperatura interna.
- Temperaturas internas de 62 a 64 °C, son insuficientes desde el punto de vista de la capacidad de conservación.

- No elevar las temperaturas internas por encima de 75 °C (29).

#### 1.4.5 NORMAS MICROBIOLÓGICAS

Las especificaciones microbiológicas para el jamón cocido están resumidas en el cuadro 7 (64).

**CUADRO 7. ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS PARA  
EL JAMÓN COCIDO**

<u>PRUEBA</u>	<u>CUENTAS PERMITIDAS</u> ( U.F.C. / g máximo )
Mesofílicos Aerobios totales	100,000
<u>S.aureus</u>	1,000
<u>Salmonella</u>	Negativo en 25 g

---

Fuente: Norma Oficial Mexicana (1984)

## 1.5 JUSTIFICACION

Por lo antes expuesto, se asume que en nuestro país, la ingesta de productos cárnicos procesados, constituye una causa muy importante de morbilidad por intoxicaciones. Las cepas enterotoxigenicas de S.aureus, son responsables de aproximadamente un 48 % de los brotes registrados.

Por otra parte, debido a que se ha reportado que el estafilococo se destruye a las temperaturas de cocción de los embutidos, se ha estudiado que la presencia de éste microorganismo en los productos antes mencionados, se debe fundamentalmente a una manipulación sanitaria deficiente en la obtención de la carne en los rastros, durante su proceso y en la distribución del producto.

Por lo tanto, se propone un estudio de los efectos que tendra sobre el S.aureus, en cuanto a su viabilidad y capacidad productora de enterotoxina B, al realizarse operaciones térmicas deficientes en la elaboración de embutidos cocidos, como el jamón.

## C A P I T U L O    I I

### O B J E T I V O S

1.    Determinar la viabilidad de S.aureus al ser sometido bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura, empleados en la industria para la elaboración de jamón.
2.    Analizar la capacidad de producción de enterotoxina del S.aureus S-6, en jamones sometidos a diferentes temperaturas de cocción y almacenamiento.
3.    Determinar la variación de U.F.C. ( Unidades Formadoras de Colonias ) de S.aureus y la apariencia física de los jamones en el transcurso de la vida de anaquel del producto elaborado.

## C A P I T U L O    I I I

### MATERIALES    Y    METODOS

Para este estudio, se realizaron las siguientes actividades:

- Caracterización de la cepa de S. aureus S-6.
- Comprobación de la producción de enterotoxina.
- Prueba de inmunodifusión radial simple modificada para la identificación de la enterotoxina B.
- Curva de crecimiento de S. aureus S-6.
- Estandarización del inóculo.
- Análisis microbiológico de la carne.
- Formulación y proceso de elaboración de jamón troceado cocido.
- Análisis microbiológico de los jamones.
- Extracción y detección de enterotoxina.

### 3.1 Caracterización de la Cepa de S.aureus S-6.

Se empleó S.aureus S-6 productor de enterotoxina B, cepa proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Para caracterizarla, se le realizaron las pruebas que a continuación se mencionan.

3.1.1 Observación microscópica. Se tomó una asada de un cultivo de 24 horas en caldo BHI y se llevó a cabo una tinción de Gram, para observar la agrupación de cocos en racimos, Gram positivos, típicos de S.aureus (11).

3.1.2 Morfología colonial. Se sembró por la técnica de estría cruzada en agar BHI un inóculo de la cepa de S.aureus y se leyó la morfología colonial en las colonias aisladas.

3.1.3 Prueba de coagulasa. Se agregaron a un tubo de ensayo 0.5 ml de plasma humano o de conejo con 0.5 ml de un cultivo puro en caldo de 18-24 horas. La suspensión del organismo se logró girando suavemente el tubo, el que se incubó en baño de agua a 37 °C. Si al cabo de 4 horas no hay presencia de coágulo, se deja en el baño o en incubadora a 35-37 °C hasta el día siguiente (53).

3.1.4 Prueba de termonucleasa. En una caja de petri chica, se colocaron 6 ml de agar DNasa fundido. Una vez solidificado, se realizaron perforaciones de 2 mm de diámetro. Un cultivo de S.aureus en caldo BHI se calentó en baño maría a 90 °C durante 15 minutos. Con una pipeta pasteur, se tomó parte del

cultivo y se adicionó a los pozos. Se incubó en cámara húmeda a 37 °C durante 4 horas. Como revelador se utilizó una solución de HCl 1 N, que cubriera la superficie de la caja. La aparición de un halo claro alrededor del pozo se considera como prueba positiva (50)(Figura 6).

3.1.5 Prueba de catalasa. Una colonia de cultivo puro de 18-24 horas, se colocó sobre un portaobjetos limpio. Posteriormente, se adicionó una gota de agua oxigenada al 3.0 %. Una respuesta positiva es la formación de burbujas ( liberación de gas ) (53).

3.1.6 Fermentación de azúcares. A varios tubos con una asada de un cultivo de 24 horas en agar BHI, se les adicionó uno de los siguientes azúcares: manitol, glucosa, sacarosa y lactosa. Cada uno de éstos fue inoculado con una asada de un cultivo de 24 horas en agar BHI. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas. El vire de color del caldo rojo de fenol a amarillo, indica una prueba positiva (3).

3.1.7 Movilidad. Se empleó esta prueba para determinar si un organismo es móvil o inmóvil en un medio de cultivo especial (53).

3.1.8 Reacción de Voges-Proskauer. Esta prueba permitió observar la síntesis de acetilmetilcarbinol (acetoína) a partir de la fermentación de la glucosa (53).

3.1.9 Prueba de reducción del nitrato. Se implementó para evaluar la acción reductora de S.aureus sobre nitratos, a

través de la cual éstos últimos se transforman en nitritos o nitrógeno libre (53).

3.1.10 Prueba de la licuefacción de la gelatina. Para demostrar la producción de enzimas proteolíticas por S. aureus, se aplicó esta prueba observando su acción sobre la gelatina, licuándola (53).

### 3.2 Comprobación de la Producción de Enterotoxina.

Para comprobar la síntesis de enterotoxina tipo B por la cepa seleccionada, se siguió la técnica del celofán que se describe a continuación:

- a. Recortar círculos de papel celofán para diálisis y de papel filtro de un diámetro de 9 cm. Humedecerlos con agua destilada y colocarlos alternativamente en una caja petri y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- b. De un cultivo de S. aureus en BHI incubado previamente a 37 °C durante 24 horas, tomar 0.1 ml.
- c. Sembrar y distribuir homogéneamente con una varilla de vidrio estéril sobre placas de medio BHI, sobre la cual se colocó previamente una membrana de celofán estéril.
- d. Incubar la placa a 37 °C durante 24 horas.
- e. Cosechar el crecimiento con 2.5 ml de solución reguladora de fosfatos 0.01 M.

- f. Centrifugar a 3,500 rpm durante 30 minutos.
- g. El sobrenadante se utiliza para la prueba de inmunodifusión radial simple modificada (77)(Figura 7).

### 3.3 Prueba de Inmunodifusión Radial Simple Modificada Para la Detección de Enterotoxina.

Esta técnica inmunológica permite la detección de enterotoxina específica con una sensibilidad de 1.0 ug/ml.

- a. Para la preparación de las placas, se disuelven 18 g de agar purificado en 900 ml de buffer de fosfatos 0.2 M y se agregan 100 ml de solución de timerosal al 1 %. Guardar en volúmenes de 5.0 ml.
- b. Para cada prueba se preparan 10 ml de agar conteniendo la antitoxina ( 9.3 ml agar al 1.8 % fundido a 70 C + 0.7 ml de antisuero B ).
- c. De la mezcla agar-antitoxina se colocan 10 ml en cada caja petri. Las placas se refrigeran aproximadamente 20 minutos.
- d. Para la perforación de los pozos, las cajas se colocan sobre un cuadrulado de 1 cm, elaborado en papel. En el centro de cada cuadro, con la base de una pipeta pasteur se hacen perforaciones de aproximadamente 0.6 mm.
- e. Uno de los pozos se llena con la enterotoxina de referencia y los otros con los extractos de las diferentes muestras a probar.

- f. Incubar a 37 °C durante toda la noche en un ambiente húmedo.
- g. Cubrir la superficie de la caja con la siguiente solución:  
500 ml de metanol + 100 ml ácido acético + 400 ml de agua destilada.
- h. La formación de un anillo de precipitación alrededor de los pozos, se toma como evidencia positiva de la presencia de la enterotoxina correspondiente en el extracto (88)(Figura 8).

#### 3.4 Curva de Crecimiento de S.aureus S-6.

A partir de una curva de crecimiento se pueden determinar los distintos tiempos en los cuales un microorganismo alcanza las diferentes fases que comprenden su crecimiento. El método se realizó de la siguiente manera:

- a. Un cultivo de S.aureus incubado de 18-24 horas a 37 °C, en agar BHI, se cosechó con 15 ml de caldo BHI e inoculó en 500 ml de caldo BHI, homogenizando posteriormente.
- b. La calibración del espectrofotómetro (Spectronic 20), se realizó a una longitud de onda de 600 nm.
- c. En las celdillas del espectrofotómetro previamente esterilizadas, se adicionaron 5 ml del cultivo resembrado y se procedió a leer absorbancia.
- d. La alícuota antes mencionada, se regresó al matraz incubado a 37 °C. Cada hora se llevaron a cabo estas mediciones hasta obtener lecturas constantes. Para observar la curva de crecimiento, se graficaron los datos obtenidos, colocando la

absorbancia en el eje de las ordenadas y el tiempo en el de las abcisas.

### 3.5 Estandarización del Inóculo.

Para mantener constante el número de microorganismos presentes en los inóculos a utilizar, se emplearon las técnicas de espectrofotometría y vaciado en placa.

- a. En la curva de crecimiento de S.aureus S-6, se determinó el tiempo de incubación necesario para que el microorganismo se encuentre en fase logarítmica.
- b. Del período que comprende la fase logarítmica del microorganismo, se seleccionó un tiempo constante al cual se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo de S.aureus para realizar la cuenta de microorganismos por el método de vaciado en placa (69).
- c. Para realizar el método espectrofotométrico, se tomó simultáneamente una alícuota de 5 ml de cultivo y se leyó en el espectrofotómetro (Spectronic 20) la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.
- d. Se relacionaron la absorbancia y el número de microorganismos en el período establecido. Para asegurar la confiabilidad de los resultados, esta técnica se efectuó por triplicado.

### 3.6 Análisis Microbiológico de la Carne.

Para evaluar la calidad sanitaria de la carne de cerdo, materia prima fundamental en la elaboración del jamon, fue necesario someterla a análisis microbiológico, llevando a cabo para tal fin, un muestreo al azar.

3.6.1 Mesofílicos aerobios totales. En esta técnica la muestra es diluída progresivamente. Se toman alícuotas de cada dilución y se inoculan en cajas de petri, a los que se adiciona un medio de cultivo. Se incuba en condiciones definidas. Se cuentan las colonias presentes y determinan de acuerdo con la magnitud de la dilución practicada (1)(17).

3.6.2 Coliformes totales. La presencia en los alimentos de este tipo de microorganismos, constituye una evidencia de contaminación fecal. Los métodos establecidos para su detección emplean medios diferenciales con lactosa (17).

3.6.3 Aislamiento e identificación de Salmonella. Las técnicas usadas en este caso, constan de varias etapas:

- \* Pre-enriquecimiento
- \* Enriquecimiento
- \* Aislamiento en medios selectivos
- \* Identificación presuntiva mediante pruebas bioquímicas (17).

3.6.4 Aislamiento e identificación de S.aureus. Se empleó la técnica de Baird-Parker que se describe a continuación:

- a. Se pesaron 10 g de la muestra y homogenizaron con 90 ml de solución amortiguadora de pH 7.2 en un vaso de licuadora durante 90 s. A partir de esta dilución 1:10, se prepararon diluciones decimales hasta 1:10,000.
- b. Se transfirieron 0.1 ml de cada una de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , a placas de Baird-Parker.
- c. La distribución del inóculo sobre la superficie del agar se realizó con una varilla de vidrio estéril.
- d. Las cajas se incubaron a 35-37 °C durante 24-48 horas.
- e. Se realizó el recuento de colonias típicas de S.aureus (60)(Figura 9).

### 3.7 Formulación y Proceso de Elaboración del Jamón Troceado Cocido.

Se elaboraron 30 jamones de 1 Kg cada uno. Para ello, se empleó el mismo lote de carne y la formulación que se presenta en el cuadro 8 (54).

El proceso de elaboración se llevó a cabo de la siguiente manera:

a. **Salmuera.** Se preparon disolviendo los ingredientes antes mencionados en agua, a excepción de la carne.

b. **Inoculación de S.aureus en la carne.** Un cultivo de S.aureus S-6 en caldo BHI de 18-24 horas a 37 °C, con una cuenta de  $500 \times 10^6$  U.F.C./ml, se centrifugó a 2,500 rpm durante 30 minutos. Se resuspendieron las células en la salmuera empleada

**CUADRO 8. FORMULACION DEL JAMON TROCEADO COCIDO**

<u>CANTIDAD</u>	<u>I N G R E D I E N T E</u>
1 Kg	Pierna trasera de cerdo
600 ml	Agua
18 g	Sal de grano
3 g	Azúcar
15 g	Accoline
7 g	Condimento para jamón
0.3 g	Glutamato monosódico
12 g	Sal de cura

---

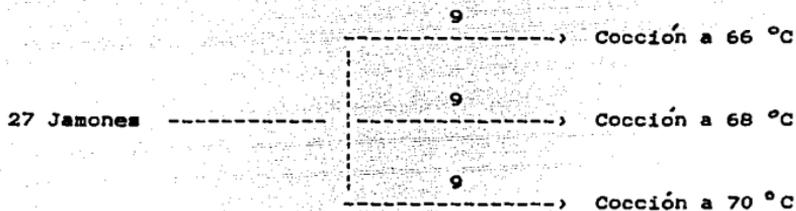
Fuente: Manuales para educación agropecuaria (1990)

en la elaboración de los jamones. Para cada Kg de producto, se emplearon 100 ml de cultivo.

c. **Masajeo y Curado.** A la pierna deshuesada se le quitaron el exceso de grasa, los tendones y ligamentos. Se cortaron piezas de carne con forma de cubos de aproximadamente 5 cm por lado. Se añadieron 500 ml de la salmuera preparada por cada 3 Kg de carne. Posteriormente, se masajeó durante 15 minutos, se dejó reposar 60 minutos a temperatura ambiente y se masajeó nuevamente por 15 minutos. Después de un reposo de 30 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron otros 500 ml de salmuera masajeando 15 minutos. Se colocó el recipiente en una cámara de refrigeración a 4 °C durante 16-24 horas.

d. **Forjado.** Dentro de los estoquinetes se incorporó 1 Kg de carne curada, tratando de presionar para evitar la presencia de aire. Se cerró el estoquinete con hilo cáñamo.

e. **Cocción.** La cocción se hizo en baño maría a 80 °C. El estoquinete se introdujo en el agua de manera que lo cubriera completamente. Para este estudio, se establecieron las siguientes temperaturas en el centro del producto durante su cocción: 66, 68 y 70 °C ( figura 10 ). Las mediciones se realizaron en diferentes puntos de los jamones con un termómetro de aguja. El tiempo aproximado fue de 50 minutos por Kg de carne o el equivalente en que la temperatura interna de la pieza alcanzara el valor establecido. Después de la cocción, se sacaron los jamones del agua y se dejaron enfriar.



**FIGURA 10. TRATAMIENTOS TERMICOS EMPLEADOS EN LA COCCION DE LOS JAMONES**

f. Almacenamiento. Las temperaturas de almacenamiento propuestas para evaluar el comportamiento de S. aureus y vida de anaquel del producto fueron 8, 20 y 37 °C. Esta última sirvió como punto de referencia para poder comparar las variaciones en cuanto a crecimiento y producción de enterotoxina de S. aureus S-6 bajo condiciones óptimas y no adecuadas ( cuadro 9 ).

Durante la vida de anaquel, se realizó un control diario de la temperatura, para lo cual se emplearon termómetros de máximos y mínimos.

### 3.8 Análisis Microbiológicos de los Jamones.

Las determinaciones que se realizaron en los jamones cocidos fueron: cuenta de mesofílicos aerobios totales y de S. aureus (1)(17)(60).

Se establecieron diferentes períodos para el muestreo de los jamones:

- Después del tratamiento térmico.
- 1a. semana de vida de anaquel.
- 2a. semana de vida de anaquel.

Al mismo tiempo que se efectuó el análisis microbiológico, se llevó un control de la apariencia física de los jamones, anotando los diferentes cambios en el aspecto y los signos de descomposición que se presentaran en los mismos durante el almacenamiento.

CUADRO 9. TEMPERATURAS EMPLEADAS EN EL ALMACENAMIENTO DE LOS JAMONES COCIDOS

<u>TEMPERATURA DE COCCION</u> ( ° C )	<u>PIEZAS DE JAMON</u>	<u>TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO</u> ( ° C )
66	3	8
66	3	20
66	3	37
68	3	8
68	3	20
68	3	37
70	3	8
70	3	20
70	3	37

---

### 3.9 Extracción y Detección de Enterotoxina.

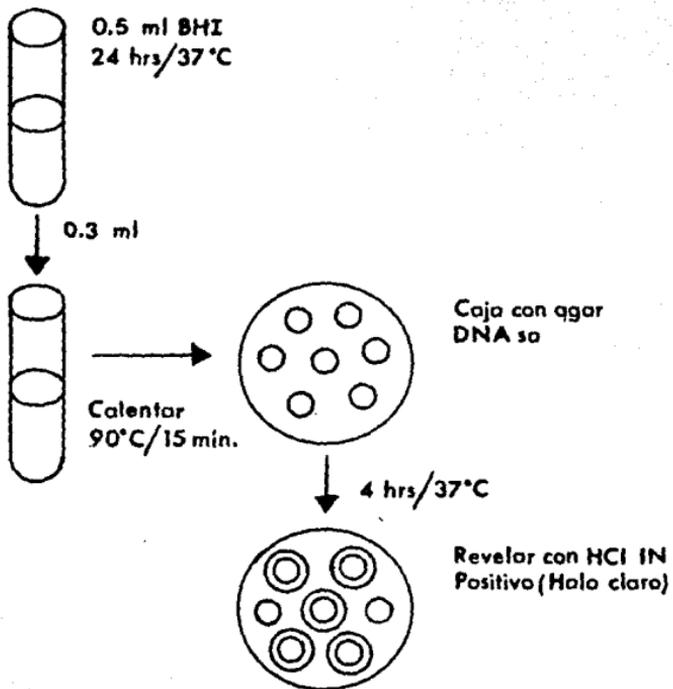
Una vez que el período de vida de anaquel finalizó, se procedió a realizar la extracción de enterotoxina de los jamones mediante la técnica que a continuación se describe:

- a. Pesar 100 g de muestra. Agregar 140 ml de agua destilada, triturar y homogenizar durante 2-3 minutos en licuadora.
- b. Agregar 10 ml de HCl 1.0 M, mezclar y llevar hasta pH final de 4.5.
- c. Centrifugar a 3,500 rpm a 4 °C durante 50 minutos.
- d. Ajustar el sobrenadante a pH 7.5 con NaOH 5 M.
- e. Agregar 15 ml de cloroformo y mezclar durante 3 minutos con agitador magnético.
- f. Centrifugar a 3,500 rpm a 4 °C durante 30 minutos.
- g. Separar el cloroformo ajustando el sobrenadante a un pH de 4.5 con HCl 1.0 M ( si la muestra precipita se centrifuga de nuevo ).
- h. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 N. Agregar 20 ml de resina Amberlite CG-50 (previamente tratada) por cada 100 ml de sobrenadante.

Tratamiento de la resina: pesar 100 g de resina y suspenderla en 1.5 l de agua destilada. Agregar NaOH 5 M hasta pH 12, agitar durante 1 hora. Lavar varias veces con agua destilada. Agregar HCl 6 M hasta pH 12. Agitar durante

- 1 hora. Lavar con agua destilada varias veces hasta que el pH se mantenga constante. Suspender la resina en solución amortiguadora de fosfatos de sodio a un pH de 5.6. El pH final de la resina debe de ser de 5.6 - 5.9.
- i. Homogenizar la muestra durante 1 hora con agitador magnético a 4 °C.
  - j. Filtrar la resina y lavar con 200 ml de una solución reguladora de fosfatos 0.015 M y pH de 5.9. Descartar el lavado.
  - k. Resuspender la resina en 30 ml de fosfato disódico 0.15 M, con una barra magnética durante 45 minutos a 4 °C.
  - l. Filtrar la resina. Utilizar el eluido y descartar la resina.
  - m. Agregar 1 g de agar purificado y agitar con barra magnética a 4 °C durante 1 hora.
  - n. Filtrar. Recolectar el filtrado descartando el agar.
  - o. El filtrado se coloca en un tubo de diálisis dentro de una solución de polietilén glicol al 30 % durante toda la noche.
  - p. Extraer el saco de diálisis del polietilén glicol, lavar con agua tibia. Dejarlo 30 minutos en agua tibia.
  - q. Colocar el extracto en un tubo de centrifuga y lavar el saco tres veces con agua destilada cuidando de que el volúmen no sea mayor a 5 ml.

- r. Al tubo de centrifuga agregar 0.5 ml de cloroformo y mezclar vigorosamente.
- s. Centrifugar a 3,500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Decantar el sobrenadante y traspasarlo a un frasco pequeño.
- t. Liofilizar la muestra.
- u. Disolver el liofilizado con 0.4 ml de tripsina al 1 %, dejando digerir durante 30 minutos a 37 °C (76)(Figura 11).
- v. Realizar la prueba de inmunodifusión radial simple modificada, señalada en 3.3.



**FIGURA 6. PRUEBA DE TERMONUCLEASA**

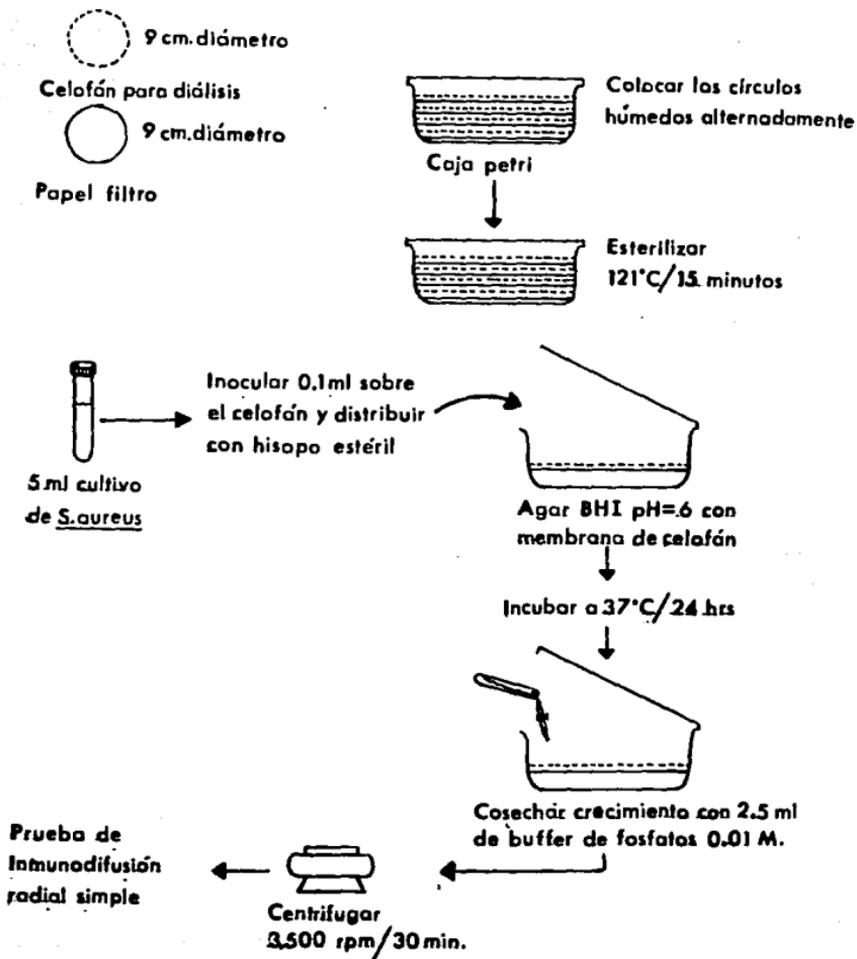


FIGURA 7. METODO DEL CELOFAN PARA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA

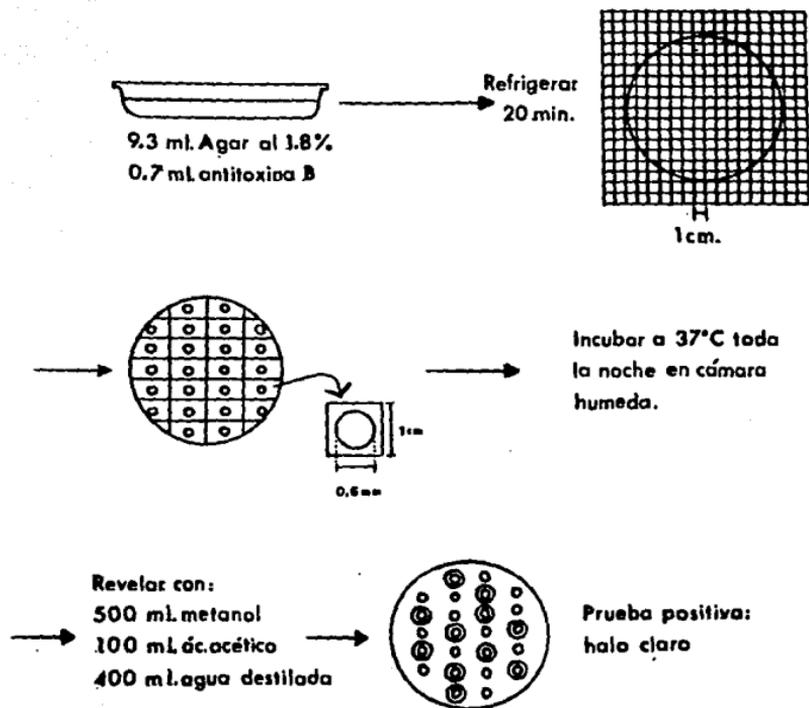
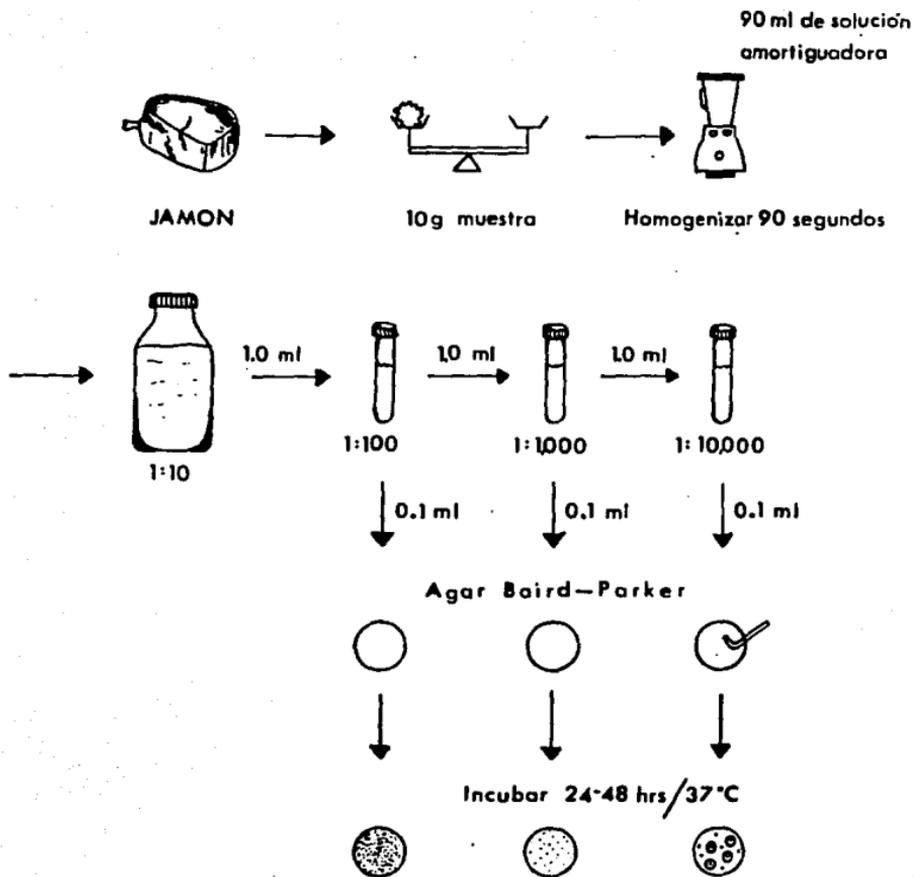


FIGURA 8. PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE MODIFICADA



**FIGURA 9. METODO DE BAIRD-PARKER PARA CUANTIFICACION DE S.aureus**

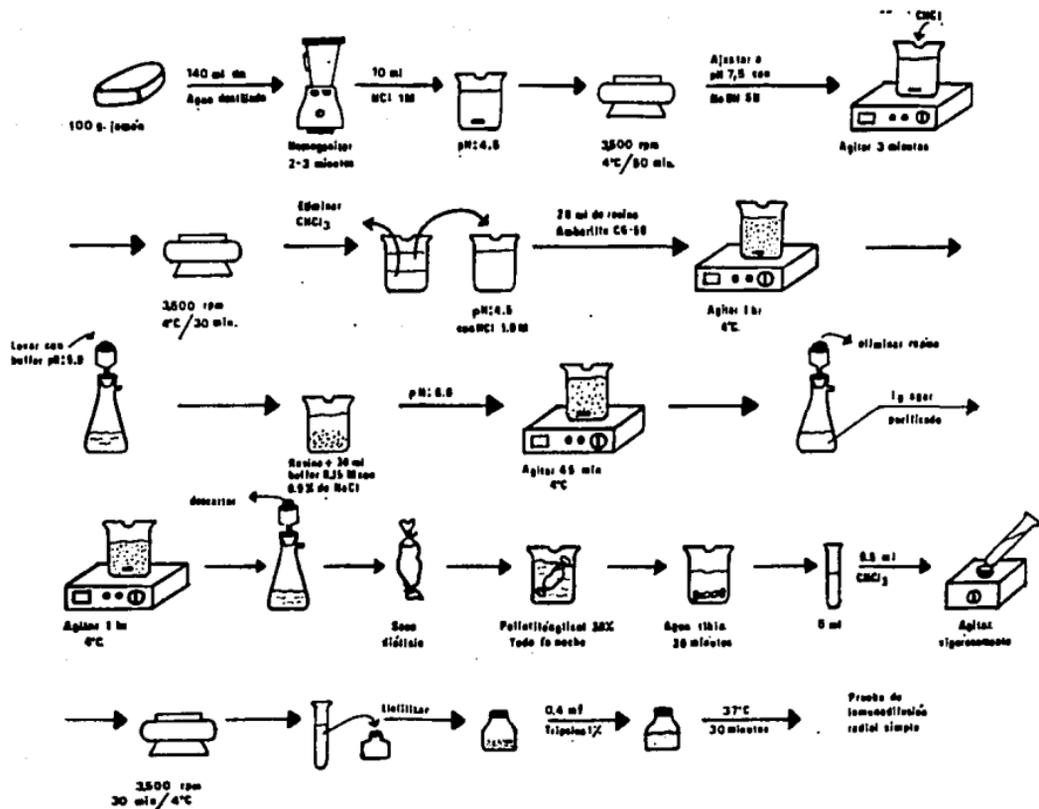


FIGURA 11. METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA DE ALIMENTOS

## C A P I T U L O    I V

### RESULTADOS    Y    DISCUSION

#### 4.1 Morfología Microscópica.

Al realizar un frotis de un cultivo de S.aureus S-6 y teñir por la técnica de Gram, se observaron células esféricas (cocos), gram positivas, cuya agrupación era semejante a racimos de uvas.

El exámen de una preparación teñida por Gram, permite estudiar tanto la morfología como la reacción al Gram de las bacterias (68).

A las formas esféricas de las bacterias se les conoce con el nombre de cocos, los que manifiestan modelos de agrupación celular característicos de especies determinadas (12). El género Staphylococci da una tinción al Gram positiva y presenta un acúmulo irregular de las células que básicamente semejan racimos (68).

La tinción de Gram está directamente relacionada tanto con la composición química como con la estructura física de la pared celular. Las paredes de las bacterias Gram positivas son muy gruesas y contienen una gran proporción de péptidoglucano, polímero formado por ácido acetilmurámico, ácido acetilglucosamida y un péptido de 4 ó 5 aminoácidos. Al realizarse la tinción, el complejo cristal violeta-Iodo queda

retenido en la pared celular después del tratamiento con etanol, debido a que se presenta una disminución en el diámetro de los poros del péptidoglucano, evitando la salida del complejo de las células (12)(68).

#### 4.2 Morfología Colonial.

Los resultados de la morfología colonial del S.aureus S-6 concuerdan con los reportados por Koneman et al. (47) (cuadro 10).

Estos datos permitieron evaluar las características descritas para las colonias de este tipo de microorganismo y establecer las pruebas bioquímicas a realizar posteriormente. Adicionalmente, las observaciones registradas fueron de utilidad para la selección de otros medios de cultivo.

#### 4.3 Pruebas Bioquímicas.

Como parte de la caracterización del S.aureus, se realizaron pruebas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica del microorganismo.

4.3.1 Coagulasa y termonucleasa. La primera que se llevó a cabo fue la de coagulasa por ser la mas simple y constituir una de las pruebas auxiliares en la identificación de S.aureus potencialmente patogénico. Está basada en la producción de coagulasa, una enzima proteica cuya actividad es semejante a la protrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Permite

diferenciar de manera específica las especies S.aureus (+) y S.epidermidis (-), pertenecientes al género Staphylococcus (68).

La cepa en estudio dió un resultado positivo (cuadro 11), sin que ello sea determinante para afirmar que éste microorganismo es capaz de producir enterotoxina, puesto que se ha reportado que algunas cepas coagulasa-negativas producen enterotoxinas o han sido agentes etiológicos en algunas intoxicaciones estafilocócicas (52).

Baird-Parker (2), realizó un estudio donde comprobó que mas del 90 % de las cepas de S.aureus producen coagulasa.

El S.aureus S-6, también presentó respuesta positiva a la prueba de la termonucleasa, enzima extracelular producida por algunas especies de estafilococos que hidroliza los enlaces éster de fosfato del DNA. Dos de sus características importantes son su termoestabilidad ( resiste temperaturas de 90-100 °C durante 15 minutos ) y su resistencia a la inactivación en medios con elevadas concentraciones de cloruro de sodio (45).

Se ha reportado que existe en S.aureus una alta correlación entre su producción de coagulasa y termonucleasa con la síntesis de enterotoxinas. En un estudio realizado al respecto, se analizaron 250 cepas enterotoxigénicas, de las cuales el 93 % produjeron coagulasa y el 95 % termonucleasa (49).

Durante mucho tiempo, la prueba de la coagulasa se tomó como criterio para la determinación de una posible enterotoxigenicidad de cepas de S.aureus. Sin embargo, debido a mutaciones, existen cepas de este microorganismo que han perdido

la capacidad de producir coagulasa como para dar una reacción positiva. En general, se aceptaba que la producción de toxinas se llevaba a cabo por cepas de S.aureus coagulasa positiva, sin embargo, se han aislado algunas enterotoxigénicas coagulasa negativas y termonucleasa positivas.

Por lo antes expuesto, se buscó otra característica fisiológica que permitiera una mejor identificación de S.aureus enterotoxigénico, como es la producción de termonucleasa. Lachica (51), publicó un estudio en el que la prueba de termonucleasa presenta una mayor correlación que la prueba de coagulasa con la producción de enterotoxinas.

4.3.2 Catalasa. Otra de las exoenzimas importantes es la catalasa, cuya identificación se usa en la diferenciación rápida y fácil de las colonias de estafilococos ( fuertemente catalasa positivas ) y estreptococos ( catalasa negativas ). Su función es la de descomponer el agua oxigenada (  $H_2O_2$  ) en oxígeno y agua (47).

Se comprobó mediante la realización de esta prueba por el método del portaobjetos ( cuadro 11 ), que la cepa de S.aureus S-6 produce esta enzima.

4.3.3 Fermentación de azúcares. En la caracterización del S.aureus, la fermentación de los hidratos de carbono juega un papel importante. En este estudio, se emplearon el manitol, la glucosa, sacarosa y lactosa. Los resultados fueron positivos en todos los casos (cuadro 11).

Se ha reportado que cada microorganismo tiene la capacidad de fermentar un determinado hidrato de carbono

incorporado en un medio básico y de esta manera se pueden obtener modelos de fermentación para una determinada especie bacteriana (53).

El manitol es un alcohol polihídrico producto de la reducción de un monosacárido. Su fermentación es una prueba altamente selectiva para la confirmación de cepas de estafilococos patógenos (59).

El S.aureus también tiene la capacidad de producir aeróbicamente ácido a partir de la glucosa, lactosa y sacarosa, propiedad que es de utilidad para el estudio del microorganismo. El ácido así formado, se detecta por el virre a color amarillo del rojo de fenol presente en el medio.

4.3.4 Movilidad. La cepa en estudio se sometió a esta prueba, obteniéndose un resultado negativo. El crecimiento fue acentuado en la línea de siembra, manteniéndose clara el area circundante (53).

Lo anterior indica que el microorganismo en cuestión, carece de flagelo, órgano de naturaleza proteica que sirve como medio de locomoción en algunas bacterias (53)(68).

4.3.5 Voges-Proskauer. Mediante esta prueba se demostró que la cepa de S.aureus S-6 sintetiza acetyl metilcarbinol (acetoína), compuesto que se evidenció en el medio de cultivo, al agregar unas gotas de una solución de alfa-naftol e hidróxido de potasio y observar una coloración rojo rosada.

4.3.6 Reducción de nitratos. El S.aureus fue capaz de reducir el nitrato, debido a que puede obtener oxígeno a partir

del nitrato, poniéndolo de manifiesto a través de la presencia de un producto final catabólico ( por ejemplo nitrito o nitrógeno ), o bien, por la ausencia de nitrato en el medio de cultivo (53).

4.3.7 Licuefacción de la gelatina. El medio de gelatina nutritiva es muy sensible para detectar cepas de S.aureus que son fuertes productoras de gelatinasas, enzimas que son secretadas para desdoblar proteínas, provocando la digestión o licuefacción de la gelatina presente (53).

El S.aureus S-6 produjo gelatinasa al someterse a la prueba de hidrólisis de la gelatina (cuadro 11).

#### 4.4 Producción de Enterotoxinas.

Al aplicar la técnica del celofán para la producción de enterotoxina B por la cepa de S.aureus en estudio, se observó que un período de incubación de 24 horas a 37 °C, fue suficiente para la síntesis de toxina en niveles superiores a 1 µg, límite mínimo detectado por el método de inmunodifusión radial simple modificada. Se ha reportado que esta técnica ofrece como ventajas la producción de niveles relativamente elevados de enterotoxinas en poco tiempo y sin requerir grandes cantidades de cultivo ( 13 ).

Uno de los factores primordiales a considerar en la producción de enterotoxinas a nivel laboratorio, es precisamente el medio usado para el crecimiento de S.aureus. Los resultados obtenidos con BHI, fueron satisfactorios por contener los elementos nutritivos que favorecen en el microorganismo la síntesis y excreción de metabolitos como las enterotoxinas

(57).

La posterior extracción de enterotoxina se facilitó al usar en la elaboración de las membranas tubos de diálisis, impermeables a moléculas con peso molecular mayor de 12,000 D. La enterotoxina B posee un peso molecular de 28,366 D, por lo que la membrana utilizada impidió su difusión hacia el medio. Por tanto, al realizar el lavado de ésta con una solución amortiguadora, se recuperó casi la totalidad de toxina producida.

#### 4.5 Identificación de Enterotoxina.

El método de inmunodifusión radial simple modificada, permitió confirmar la síntesis de enterotoxina B por la cepa de S.aureus S-6, mediante la formación de anillos de precipitación, como resultado de la reacción inmunológica de la enterotoxina B con el antisuero específico correspondiente.

Los anticuerpos usados en los métodos de laboratorio para la detección de enterotoxinas, son aislados de animales, generalmente a partir de conejos.

Las reacciones antígeno-anticuerpo se estudian fácilmente in vitro, empleando preparaciones de antígeno y antisueros. Según la naturaleza de los mismos y de las condiciones escogidas para la reacción, pueden observarse diferentes tipos de respuestas serológicas, entre las cuales se encuentra la de precipitación (12).

Los anticuerpos presentan dos sitios de combinación, a los que pueden unirse los epítomos de 2 moléculas de antígeno, éstas últimas a su vez pueden combinarse con otras unidades de

anticuerpos, de tal manera que se forman agregados antígeno-anticuerpo que precipitan en el medio. Por lo antes expuesto, este tipo de reacciones son muy útiles en determinaciones cualitativas y cuantitativas de anticuerpos y/o antígenos (12).

En la técnica aplicada, el antisuero se agregó al agar y la muestra a analizar se colocó en las perforaciones realizadas en puntos diferentes de la placa de agar. Después de un tiempo de incubación en cámara húmeda a 37 °C, se observó la formación de anillos de precipitación alrededor de los pozos, de las muestras conteniendo la enterotoxina.

Al emplear esta técnica, Meyer y Palmieri (58) pudieron detectar niveles de enterotoxinas del orden de 0.31 µg/ml.

El método tiene las ventajas de poder llevarse a cabo de una manera sencilla y de ser muy sensible en las determinaciones de rutina a cepas de estafilococos enterotoxigénicas (88). Su limitación es el alto costo de la adquisición de las toxinas de referencia y los antisueros correspondientes en México, sin embargo, existe un proyecto del Instituto Politécnico Nacional para la producción, aislamiento y purificación de éstas.

#### 4.6 Curva de Crecimiento de S.aureus S-6

En la figura 12, se observa la curva de crecimiento del S.aureus S-6, realizada por un método espectrofotométrico a una longitud de onda de 600 nm. Las bacterias en una suspensión absorben la luz de tal manera que un cultivo con aproximadamente  $10^6$  a  $10^8$  U.F.C./ml se observa turbio. Instrumentos sensibles

como un espectrofotómetro, pueden servir para medir cambios en la masa celular de un cultivo, el cual debe ser lo suficientemente denso para que el instrumento registre alguna turbidez, dada tanto por células vivas como muertas (12). Para asegurar como células predominantes aquellas con elevada actividad biológica, se partió de un cultivo de S. aureus incubado durante 18 horas a 37 °C.

En la curva de crecimiento obtenida se pudieron identificar diversas fases:

a. Fase lag o de retraso. Se alcanzó en las primeras 2 horas posteriores a la inoculación del medio (figura 12). observó que durante este período, la tasa de crecimiento del microorganismo fue muy baja, puesto que estos necesitan una adaptación al medio de cultivo. Las bacterias se encuentran deficientes en enzimas y coenzimas que requieren sintetizar en cantidades suficientes para poder llevar a cabo la producción de metabolitos esenciales que no están presentes (68).

b. Fase log o exponencial. Las células en este período (2-7 horas) se multiplicaron a un elevado ritmo constante durante cada unidad de tiempo (figura 12). La población microbiana se encuentra realizando una actividad metabólica acelerada, que favorece su multiplicación fisiológica (12).

En general, las células durante esta fase de desarrollo, son las más uniformes y las de uso más común para estudios sobre el metabolismo (68).

Una de las razones por la que se seleccionó la fase

logarítmica del microorganismo como la adecuada a este estudio, fue el conocimiento de que aún cuando la enterotoxina B (metabolito primario) es sintetizada durante todas las fases de crecimiento, la tasa de producción en este estadio es la mas elevada (57).

c. Fase estacionaria. Se presentó a partir de las 7 horas ( figura 12 ), existiendo una tendencia hacia el cese del desarrollo, atribuyéndose principalmente al agotamiento de algunos nutrientes. Por un tiempo, la población permanece constante como resultado de una ausencia de división celular, o bien, debido a un equilibrio del índice de reproducción con el de mortalidad bacteriana (12).

d. Fase de muerte. Durante este estudio no se llegó a esta fase, porque como ya se mencionó, éste método no permite identificar las células muertas. En este período, la viabilidad disminuye lentamente al presentarse escasez de las sustancias nutritivas esenciales y acumulación de productos inhibidores, como ácidos (68).

La curva de crecimiento permitió predecir el tiempo que una población del S.aureus en estudio requiere para su desarrollo, así mismo, reconocer que durante algunas fases del crecimiento, las células son jóvenes y presentan gran actividad metabólica, mientras que en otras se encuentran en fase de muerte, de tal manera que existen enormes diferencias estructurales y funcionales entre los microorganismos que se cosechan en diferentes etapas de desarrollo (12)(47).

No es factible poder analizar una sola célula bacteriana. Sin embargo, si la totalidad de las células se encuentran en el mismo estadio de desarrollo, los resultados que se obtendrán en el análisis de toda la cosecha pueden ser equivalentes a una sola. El método común de sincronización de cultivos, se basa en el hecho de que las células mas pequeñas, en la fase logarítmica, son aquellas que acaban de dividirse. Cuando a éstas se les separa, se encuentran razonablemente bien sincronizadas entre sí (12)(68).

#### 4.7 Estandarización del Inóculo.

El inóculo a adicionar a la carne con la que se elaboraron los jamones, se estandarizó en el período en el que el microorganismo se encontraba en fase logarítmica de crecimiento, por las razones antes expuestas.

Los métodos espectrofotométrico y conteo por vaciado en placa, permitieron establecer que un cultivo en BHI de S. aureus S-6, con 18-24 horas de incubación a 37 ° C, registrando una absorbancia inicial de 0.11 a 600 nm, debía ser resembrado e incubado por 5 horas para obtener una absorbancia de 1.01, relacionada con una cuenta celular de  $490 \times 10^6$  U.F.C. / ml.

#### 4.8 Análisis Microbiológico de la Carne.

Por no existir una norma oficial para el control físico, químico y microbiológico de carne fresca, los datos obtenidos del análisis microbiológico que se realizó a la carne de cerdo, previamente congelada por 24 horas, no se pudieron

relacionar con estándares establecidos. No obstante, se han reportado en este producto cuentas de microorganismos mayores a  $10^3$  U.F.C. / cm<sup>3</sup>, condiciones en la que ya presenta mal olor y mucosidad (28). En la carne utilizada para este trabajo, se encontró un promedio de bacterias mesofílicas aerobias de  $10^2$  U.F.C. / g (cuadro 12).

En realidad, la carne constituye un excelente medio de cultivo para numerosos microorganismos, debido a su elevada actividad de agua y riqueza en proteínas y minerales. Por otra parte, contiene algunos carbohidratos susceptibles de fermentación (glucógeno) y un pH favorable para el desarrollo de gérmenes (28).

La vía de contaminación mas importante en la carne es la externa, presentándose mayor incidencia durante el sacrificio, manipulación y tratamientos posteriores a que se somete. Durante la sangría, desuello y cuarteado de los animales, las principales fuentes de microorganismos son las partes externas del animal (piel, pezuñas y pelo) y el tubo digestivo (45).

#### 4.9 Efecto del Curado sobre S.aureus.

No se observó un efecto inhibitorio de los componentes de la salmuera sobre el crecimiento de S.aureus inoculado en la carne antes del curado, aun cuando dicho proceso se realizó bajo condiciones de refrigeración a 8 °C. En el cuadro 13, se observa que la población aumentó alrededor de cuatro veces, en todos los casos. Se han reportado algunos compuestos que pueden influir en el crecimiento de S.aureus en carne durante el curado, estando

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

entre estas el nitrito de sodio; sin embargo, la cantidad aplicada en este caso fue de 4.8  $\mu\text{g/g}$ , cifra mucho menor a los 200  $\mu\text{g/g}$  que han sido estudiados como inócuos para el S.aureus. La concentración de nitrito de sodio, además se ve disminuída durante el almacenamiento y cocción de los embutidos, a través de su reducción por microorganismos y agentes químicos reductores como el ascorbato, a óxido nitroso y fijación de este último a la mioglobina, para formar el pigmento hematócromo, responsable del color rosado de los jamones cocidos (4).

El cloruro de sodio es otro factor que puede influir sobre el S.aureus, sin embargo, este microorganismo puede resistir niveles de aproximadamente 20 %. Los jamones que se elaboraron presentaron alrededor del 3 % de cloruro de sodio (37)(45).

El intervalo de temperaturas en el que el S.aureus presenta una elevada tasa de crecimiento, comprende de 6.5-45 °C, por lo que 8 °C fue una temperatura que permitió a la población incrementarse en número (7)(59).

## 4.10 Tratamientos Térmicos de Cocción.

En la figura 13, se observa que los tratamientos térmicos empleados para el cocimiento de los jamones, resultaron insuficiente para destruir todas las células de S.aureus S-6 presentes; mediante este proceso, se lograron destrucciones del 46, 78 y 88 %, valores correspondientes con temperaturas internas de 66, 68 y 70 °C, respectivamente.

Entre los principales efectos que el calor ejerce sobre las células bacterianas, se encuentran la desnaturalización de

proteínas, ruptura de la estructura del DNA y daños en la membrana citoplasmática. Se ha considerado que la causa mas importante de muerte celular es la desnaturalización de la proteínas que están implicadas tanto en la respiración como en la multiplicación celular (4).

Existen otros estudios donde se ha señalado que en aquellas células que no forman esporas, la degradación del ácido ribonucleico está muy relacionado con la muerte celular inducida por el calor (79).

En el S. aureus, la principal manifestación de este daño celular, consiste en la pérdida de la composición de la membrana, por lo cual, componentes celulares como ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, lípidos y iones, pasan al medio extracelular (36)(38)(41). Las células dañadas sufren una disminución en su capacidad metabólica, presentando una inactivación selectiva de las enzimas y una desnaturalización parcial de las proteínas celulares (10). Sin embargo, las células afectadas térmicamente pueden recuperarse por transferencia del microorganismo a un medio que contenga al menos una fuente de aminoácidos, glucosa, fosfato y magnesio (36)(41).

Collins-Thompson et al. (16), demostraron que al traspasar células de S. aureus dañadas por calor a un medio de cultivo adecuado, pudieron desarrollarse y sintetizar enterotoxina B.

Aunque se ha reportado que el S. aureus se destruye con las temperaturas empleadas en la elaboración de embutidos cocidos, es este estudio no se logró su total eliminación, puesto que en dicho proceso influyen los componentes del medio de

suspensión, en este caso del jamón.

El jamón presenta alrededor de 42 % de humedad. El agua facilitó la desnaturalización térmica de las proteínas celulares. El calor húmedo determina la formación de grupos -SH libres con el consiguiente aumento de la capacidad de las proteínas para captar agua. La presencia de ésta permitió la ruptura por el calor de los enlaces peptídicos (45).

Por el contrario, existen factores que desfavorecen el daño letal térmico sobre S.aureus, como es el caso de la grasa. El jamón la contiene en aproximadamente 45 % (28). Debido a su baja conductividad térmica, impide la transmisión efectiva del calor al microorganismo, actuando como barrera de protección contra factores externos. Se ha observado un comportamiento similar al de las grasas por parte de las proteínas; componente presente en 15-27 % ( 67 ).

El cloruro de sodio presente en el producto, también pudo inhibir el daño celular por calor. Un estudio sobre el efecto de los aditivos durante tratamientos térmicos de células de S.aureus, demostró que el cloruro de sodio añadido a la suspensión, protegió la integridad de las células, no así la glucosa (30).

#### 4.11 Características Microbiológicas de los Jamones.

Bajo todas las temperaturas de almacenamiento de los jamones (8, 20 y 37 °C), se observó una tendencia de incremento en el índice de crecimiento de S.aureus conforme se aumentó la temperatura en el centro del jamón durante su cocción

(cuadro 15). Células dañadas de S.aureus como ya se mencionó, en medios de cultivo adecuados son capaces de recuperarse y realizar sus funciones metabólicas normales, incluyendo la de reproducción. Además, se ha demostrado que este microorganismo al ser sometido a tratamientos térmicos consecutivos, va desarrollando una mayor termoresistencia ( 10 ). No existen informes de como influye esto en su tasa de crecimiento, posterior a la reestructuración celular. Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran una mayor velocidad de crecimiento en las células sometidas a mayores temperaturas.

En las figuras 14,15 y 16 se presentan las variaciones en el crecimiento del S.aureus S-6 durante las distintas temperaturas de almacenamiento, en éstas se puede apreciar una relación directamente proporcional entre el número de U.F.C./g con la temperatura de conservación utilizada. Este es uno de los factores que mas influyen en la proliferación de los organismos, ya que conforme la temperatura aumenta, las reacciones químicas y enzimáticas que tienen lugar para el crecimiento, se dan a velocidades cada vez mas elevadas (12).

La temperatura óptima de crecimiento del S.aureus es de 37 ° C, razón por la que bajo ésta, el microorganismo fue mas activo con la consiguiente obtención de cuentas celulares muy elevadas. Una temperatura de conservación de 20 ° C, resultó también ser adecuada para promover una buena proliferación celular, aunque a una mayor velocidad ( figuras 14,15 y 16 ).

La temperatura de refrigeración (8 ° C) que se utilizó en este estudio, al ser un valor muy cercano a la temperatura

mínima de crecimiento reportado para S.aureus de 6.5 °C, el crecimiento fue mas lento ( figuras 14,15 y 16 ).

Por lo antes expuesto, la conservación de embutidos exige primordialmente un buen manejo de las temperaturas de almacenamiento, puesto que su abuso es la principal causa de la rápida descomposición de los mismos.

Como se aprecia en los cuadros 13 y 15, la tasa de destrucción celular se elevó conforme el tratamiento térmico aplicado fue mas severo. Sin embargo, éste no fue lo suficiente como para que las cuentas celulares disminuyeran al menos un ciclo logarítmico, para lo cual se requeriría aumentar el tiempo de cocción ( 45 ).

Aparentemente, el proceso de cocción no ocasionó daños irreversibles en las células de S.aureus S-6 que no se destruyeran, ni en la flora presente, puesto que mostraron una alta tasa de crecimiento bajo las tres temperaturas de almacenamiento. Esto pudo ser el resultado de una recuperación celular al encontrarse en un medio de cultivo adecuado (jamón) que permitió un buen desarrollo y recuperación de los microorganismos ( cuadros 13 y 15 ).

Aun cuando el número de microorganismos mesofílicos aerobios totales se encontró alto, las cuentas de S.aureus fueron de alrededor de  $10^6$  U.F.C./g, por lo que se deduce que su competitividad fue limitada. Al observar los cuadros 13 y 15, se puede apreciar en los jamones sometidos a tratamientos térmicos de 66, 68 y 70 °C, una disminución progresiva de la cuenta inicial de mesofílicos aerobios, tendiendo a variar en forma inversa el número de células correspondientes al S.aureus.

En el caso de los jamones cocidos a 70 °C y almacenados bajo refrigeración, aunque el número de organismos mesofílicos fue el menor, el S.aureus representó a la primera semana solo el 40 % de la población total.

Se considera al S.aureus como un microorganismo de baja competitividad, por lo que son varias las bacterias que pueden inhibirlo o desplazarlo, como lo demostraron Peterson et al. (71) y Troller et al. (91), al realizar un estudio tanto en productos frescos como congelados.

La microflora normal en la carne y sus derivados, comprende los géneros: Aeromonas, Bacillus, Streptococcus, Lactobacillaceae, Acinetobacter y Enterobacteriaceae, microorganismos antagónicos al S.aureus, por actuar competitivamente frente a los elementos nutritivos y modificar las condiciones ambientales en forma desfavorable para el crecimiento del estafilococo (45)(62).

En este estudio, se obtuvieron cuentas muy elevadas de S.aureus, probablemente porque en general los jamones presentan concentraciones de cloruro de sodio del orden de 5-10 %, concentración a la que este microorganismo es capaz de desarrollarse, pero no así un gran número de bacterias.

#### 4.12 Aspecto y Olor de los Jamones Durante su Almacenamiento.

Debido a que la apariencia física de los alimentos es un factor determinante para su ingesta, se realizó una evaluación del aspecto y olor de los jamones durante su almacenamiento, en

forma paralela a los análisis microbiológicos. Jamones que lleguen a contener enterotoxinas por contaminación de S. aureus y que presenten signos evidentes de descomposición, difícilmente serán ingeridos, por lo que el riesgo de sufrir una intoxicación disminuye notablemente.

En el cuadro 17, se presentan los resultados de la evaluación del aspecto y olor de los jamones durante su almacenamiento.

El olor es con frecuencia el primer síntoma de alteración que se hace evidente en las carnes curadas. En los jamones, el olor predominante fue el que se conoce como "agrio", el cual puede deberse tanto a la presencia de ácidos volátiles (fórmico, acético, butírico), como al crecimiento de levaduras y bacterias pertenecientes principalmente a los géneros Achromobacter, Bacillus, Pseudomonas, Lactobacillus, Proteus, Serratia y Micrococcus. La mayor parte de los gérmenes causantes del agriado no pueden iniciar su desarrollo a temperaturas de refrigeración, pero si continuarlo una vez iniciado a temperaturas mas elevadas (28).

Las modificaciones en el color que presentaron los jamones, pueden ser consecuencia de la producción por algunas bacterias de ciertos compuestos oxidantes, principalmente peróxidos y sulfuro de hidrógeno. Del mismo modo, aparecen por la presencia de bacterias pertenecientes a especies de Lactobacillus y Leuconostoc, o bien, por las esporas verdes de algunos mohos del género Penicillium, como el P. expansium, P. asperulum y P. oxalicum (28).

Los jamones presentaron una película superficial viscosa, la cual puede ser causada por la presencia de algunos mohos, levaduras y/o bacterias, estas últimas pertenecientes fundamentalmente a los géneros Pseudomonas, Achromobacter, Streptococcus, Leuconostoc, Bacillus y Micrococcus. Cuando los productos se encuentran bajo temperatura de refrigeración, la humedad abundante favorece el crecimiento de las bacterias pertenecientes al grupo Pseudomonas y Achromobacter; a temperatura ambiente, los micrococos y otros mesofílicos entran en competencia con Pseudomonas y bacterias afines (28).

El jamón es un alimento con un elevado contenido de grasa, por lo que al encontrarse expuestos al aire, puede llevarse a cabo la oxidación de grasas no saturadas. Por otra parte, tanto bacterias lipolíticas (Pseudomonas, Achromobacter), como algunas levaduras, pueden producir lipólisis y acelerar la oxidación de las grasas (28).

#### 4.12 Extracción y Detección de Enterotoxina.

Al finalizar la vida de anaquel, se tomaron muestras de todos los jamones para llevar a cabo la extracción de enterotoxina y posteriormente, se empleó la técnica de inmunodifusión radial simple modificada para su posible identificación. Para las tres temperaturas de almacenamiento empleadas, los resultados fueron positivos en todos los casos (cuadro 18).

Aun cuando uno de los principales signos de daño celular en S.aureus, en caso de ser enterotoxigénico, es la

inhibición en la síntesis de toxinas, se ha demostrado que al transferir estas células a un medio de cultivo microbiológicamente adecuado, como puede serlo el jamón, se recuperarán presentando un buen crecimiento y producción de enterotoxina (16). Se sugiere también que el S. aureus dañado por algún proceso en la elaboración de alimentos, puede recuperarse e iniciar la síntesis de enterotoxina, sobre todo a temperaturas de almacenamiento elevadas (84).

La temperatura óptima para la producción de enterotoxina de S. aureus es de 37 °C (13). La cantidad de toxina producida decrece marcadamente conforme la temperatura disminuye, como lo demostraron McLean et al. (55) al emplear temperaturas de 16 y 20 °C. También Genigeorgis (31), observó que jamones almacenados anaerómicamente a 10, 22 y 30 °C, presentaron producción de enterotoxina B. En este trabajo se evidenció la síntesis de enterotoxina por S. aureus, a pesar de encontrarse bajo condiciones de refrigeración, en niveles mayores de 1 ug, límite de sensibilidad del método.

Se ha mencionado que bajo condiciones de refrigeración (8 °C), hay una reducción en la síntesis de toxinas, en caso de presentarse, debido a un efecto directo en la biosíntesis de toxina, o bien, como resultado de algún cambio en el estado fisiológico o nutricional del microorganismo (84).

Otro factor que también influye en la producción de enterotoxinas es el pH. La síntesis se limita a un pH de 5.15 a 9.0 ; el jamón tiene un pH de 5.5-6.0 (83). Scheusner y Harmon (83), estudiaron que la toxina estafilocócica se produjo en una variedad de alimentos cuyo rango de pH fuera de 5.5-6.6, pero no

la detectaron en aquellos cuyo pH fuera inferior a 5.0.

En los jamones, existieron zonas de aerobiosis y anaerobiosis. La aereación tiene un efecto positivo en el crecimiento y síntesis de enterotoxinas de S.aureus (84). Sin embargo, en los alimentos, el microorganismo crece y la produce bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Genigeorgis et al. (31), reportaron que la enterotoxina B se sintetizó bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas en jamones incubados a 22 y 30 °C. Mientras que el crecimiento de S.aureus puede predecirse, no se puede anticipar la producción de enterotoxina en jamones (84).

**CUADRO 10. MORFOLOGIA COLONIAL DEL S. aureus S-6**

<u>CARACTERISTICA</u>	<u>RESULTADO</u>
Medio de crecimiento	Agar BHI
Tamaño	2 - 3 mm
Color	Amarillenta
Consistencia	Cremosa
Borde	Entero
Aspecto	Humedo
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Luz reflejada	Brillante

---

**CUADRO 11. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE S. aureus S-6**

<u>PRUEBA</u>	<u>RESPUESTA</u>
Coagulasa	+
Catalasa	+
DNAsa	+
Glucosa	Produccion de acidez
Manitol	Produccion de acidez
Sacarosa	Produccion de acidez
Lactosa	Produccion de acidez
Movilidad	-
H S	+
Licuefacción de la gelatina 22 °C	+
Voges-Proskauer	+
Reducción nitrato	+

---

**1 Vestigios**

CUADRO 12. ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LA CARNE DE CERDO

<u>PRUEBA</u>	<u>U.F.C./g</u>
Mesofílicos aerobios totales	11 x 10 <sup>2</sup>
Coliformes totales	3 x 10 <sup>2</sup>
<u>S.aureus</u>	50
<u>Salmonella</u>	Negativa

---

CUADRO 13. CUENTAS DE MESOFÍLICOS AEROBIOS TOTALES Y SU RELACION CON S.aureus EN LOS JAMONES DURANTE SU PROCESO Y VIDA DE ANAQUEL

TEMPERATURA INTERNA DE COCCION ( ° C ) TRATAMIENTO	66		68		70	
	MAT	<u>S.aureus</u> ( % )	MAT	<u>S.aureus</u> ( % )	MAT	<u>S.aureus</u> ( % )
Carne curada	350	74.28	380	60.5	230	71.7
Carne cocida	190	73.7	100	50	30	66.7
8 ° C (1a.semána)	300	53.3	280	78.6	500	40
8 ° C (2a.semána)	650	38.5	450	55.5	750	66.6
20 ° C (1a.semána)	600	75	500	58	850	70.6
20 ° C (2a.semána)	1,500	50	1,100	63.6	2,500	60
37 ° C (1a.semána)	950	66.8	450	71.1	1,200	75
37 ° C (2a.semána)	7,500	46.7	6,500	46.1	8,500	40

MAT : Mesofílicos aerobios totales (  $10^6$  U.F.C./g )

CUADRO 14. EFECTO DE LAS SALES DE CURA SOBRE LA VIABILIDAD DE S.aureus.

T.I.C.	66		68		70	
TRAT.	<u>S.aureus</u> (10 <sup>6</sup> UFC/g)	Incremento ( % )	<u>S.aureus</u> (10 <sup>6</sup> UFC/g)	Incremento ( % )	<u>S.aureus</u> (10 <sup>6</sup> UFC/g)	Incremento ( % )
Inoculo	56		50		38	
Carne Curada	260	364	230	360	165	334

T.I.C.: Temperatura interna de cocción (°C )

TRAT. : Tratamiento

CUADRO 15. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS SOBRE LA VIABILIDAD DEL S.aureus.

TRAT.	66		68		70	
	<u>S.aureus</u> (10 <sup>6</sup> UFC/G)	Destrucción ( % )	<u>S.aureus</u> (10 <sup>6</sup> UFC/G)	Destrucción ( % )	<u>S.aureus</u> (10 <sup>6</sup> UFC/G)	Destrucción ( % )
Carne Curada	260		230		165	
Carne Cocida	140	46.15	50	78.2	20	88

TIC: Temperatura interna de cocción (°C)  
 TRAT: Tratamiento

CUADRO 16. VARIACION EN EL NUMERO DE S.aureus DURANTE LA VIDA DE ANAQUEL DE LOS JAMONES

TRAT. \ TIC	66		68		70	
	<u>S.aureus</u> 10 <sup>6</sup> UFC/g	Incremento ( % )	<u>S.aureus</u> 10 <sup>6</sup> UFC/g	Incremento ( % )	<u>S.aureus</u> 10 <sup>6</sup> UFC/g	Incremento ( % )
Carne Cocida	140		50		20	
8 °C (1a.semana)	160	14.2	220	340	200	900
8 °C (2a.semana)	250	56.2	250	13.6	500	150
20 °C (1a.semana)	450	221.4	290	480	600	2,900
20 °C (2a.semana)	750	66.6	700	141.3	1,500	150
37 °C (1a.semana)	635	353.6	320	540	900	4,400
37 °C (2a.semana)	3,500	451.2	3,000	837.5	3,400	277.

TIC: Temperatura interna de cocción ( °C )  
 TRAT: Tratamiento

CUADRO 17. RELACION ENTRE EL NUMERO DE CELULAS DE S.aureus Y LA APARIENCIA FISICA DE LOS JAMONES, DURANTE LA VIDA DE ANAQUEL.

TEMPERATURA ALMACENAMIENTO ( ° C )	Cuenta <u>S.aureus</u> ( 10 <sup>6</sup> U.F.C./g )		APARIENCIA FISICA	
	1a.Semana	2a.Semana	1a. SEMANA	2a. SEMANA
8	190	350	Color correcto. Al corte fue blando y jugoso. Consistencia satisfactoria.	Al corte presento un nucleo palido con verdeado en la superficie. Consistencia satisfactoria. Superficie mohosa y pringosa.
20	350	1,000	Color correcto. Blando y jugoso. Ligero olor a agrio.	Enmohecimiento y pringosidad en el exterior. Nucleo palido. Olor agrio. Superficie verdeada.
37	600	5,000	Nucleo y exterior palido. Blando, jugoso. Olor agrio.	Color palido. Enmohecimiento y pringosidad en la superficie. Fuerte olor agrio.

CUADRO 18. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE MODIFICADA EN LOS EXTRACTOS DE LOS JAMONES.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO ( ° C ) TEMPERATURA DE COCCION ( ° C )	8	20	37
66	a	+	+
68	a	+	+
70	a	+	+

+ Enterotoxina positiva  
a Vestigios

## CURVA DE CRECIMIENTO DE S.aureus

Longitud de onda de 600 nm

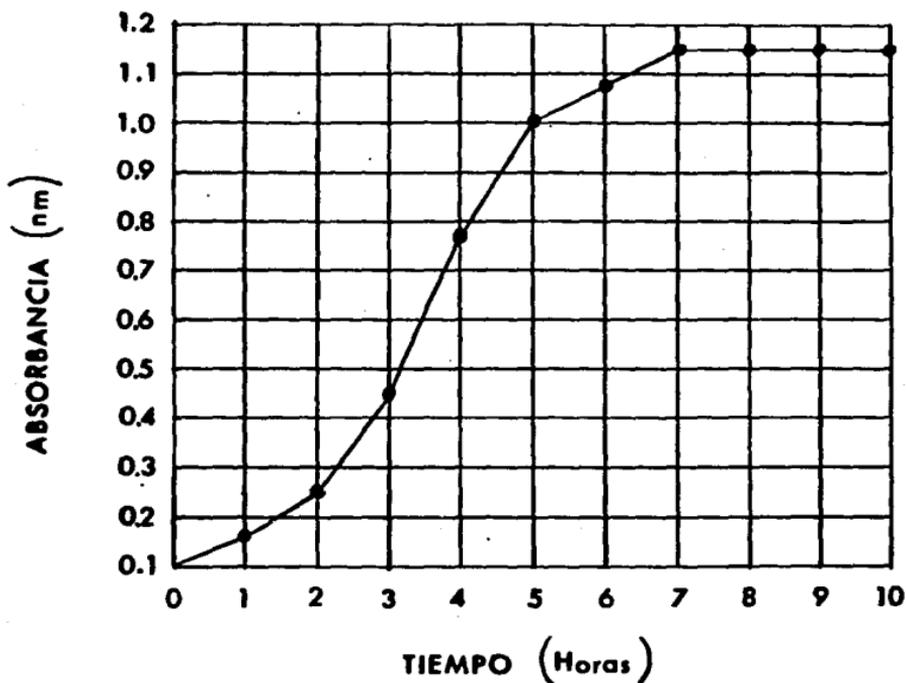


FIGURA 12. CURVA DE CRECIMIENTO DE S.aureus S-6 EN MEDIO BHI.

# CUENTA DE S.aureus

## COCIMIENTO JAMON

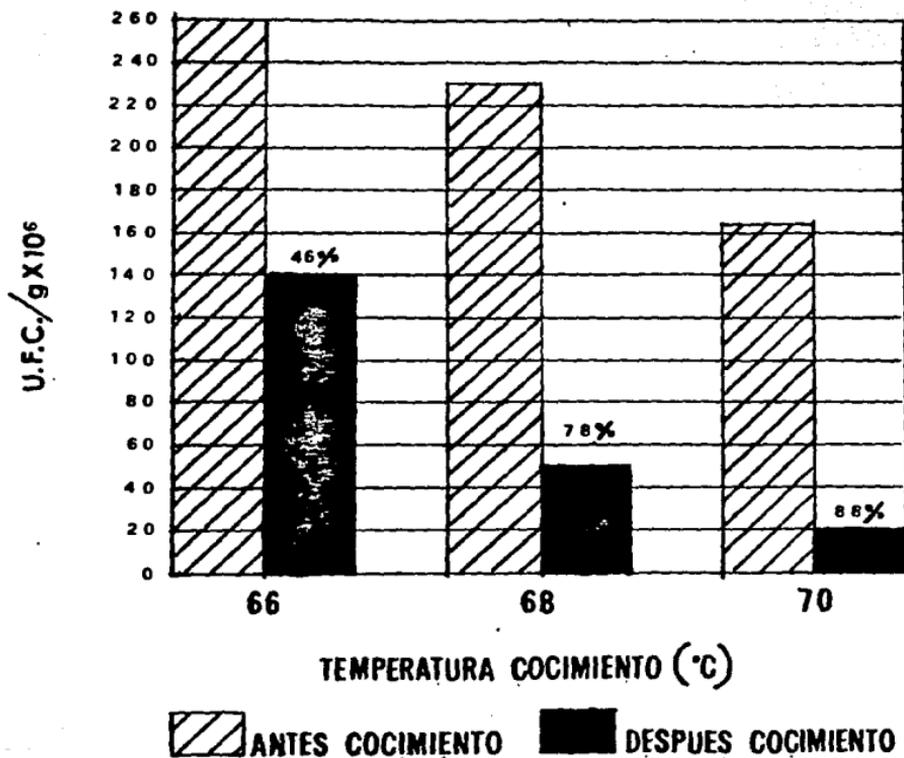


FIGURA 13. TASA DE DESTRUCCION DEL S.aureus S-6 EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS TERMICOS.

## CUENTA DE S.aureus

JAMON COCIDO A 66 GRADOS

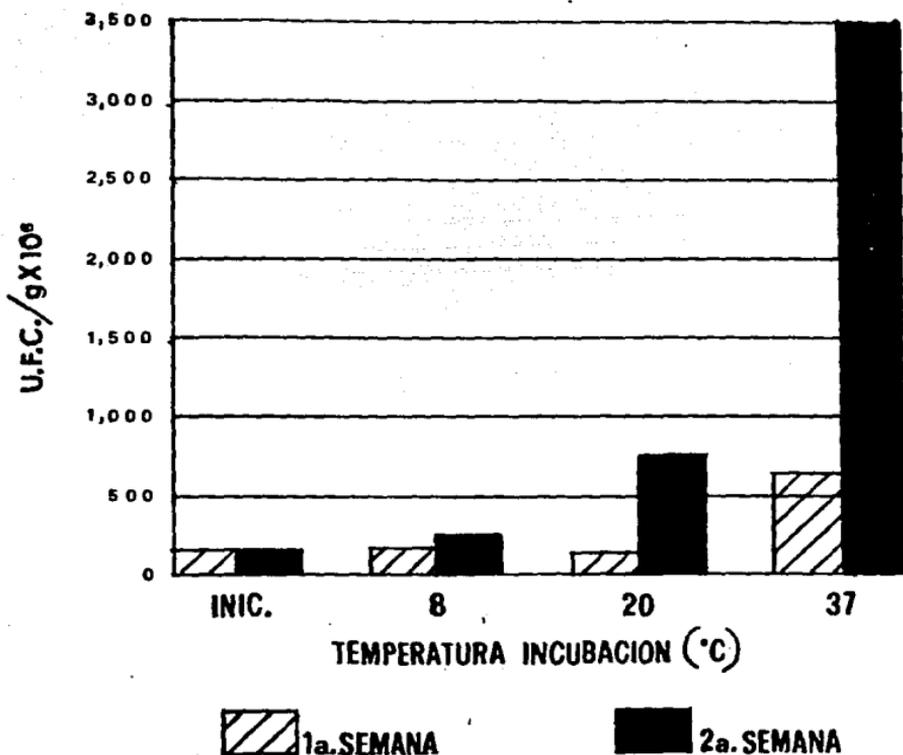


FIGURA 14. VARIACION DE LAS CUENTAS DE S.aureus EN EL JAMON COCIDO A 66 °C, DURANTE SU VIDA DE ANAQUEL.

# CUENTA DE S. aureus

JAMON COCIDO A 68 GRADOS

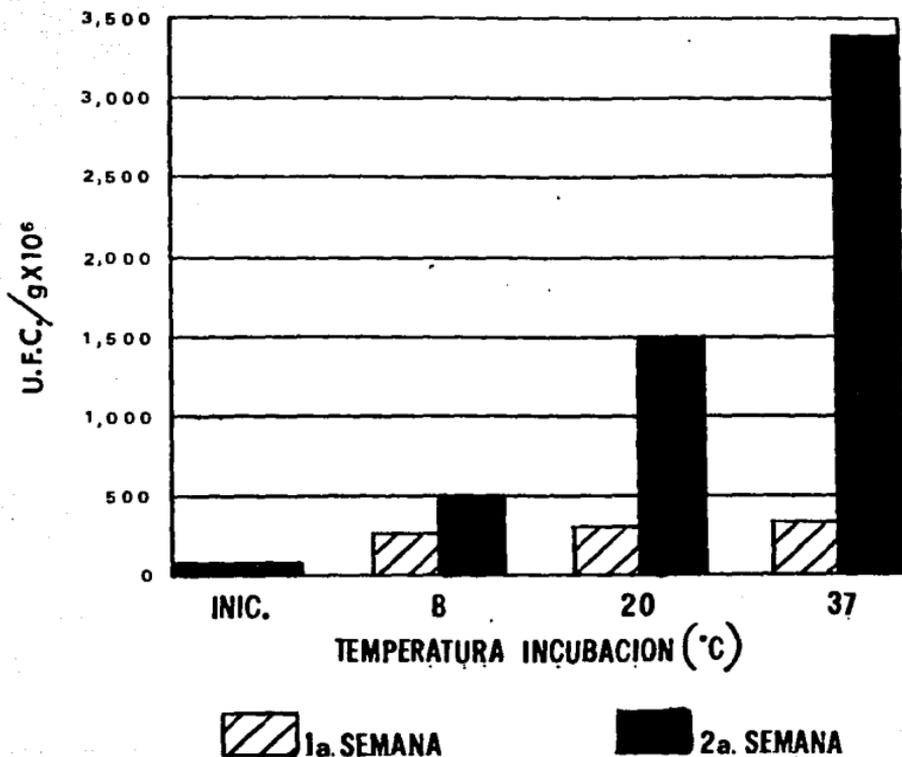


FIGURA 15. VARIACION DE LAS CUENTAS DE S. aureus EN EL JAMON COCIDO A 68 °C, DURANTE SU VIDA DE ANAQUEL.

## CUENTA DE S.aureus

JAMON COCIDO A 70 GRADOS

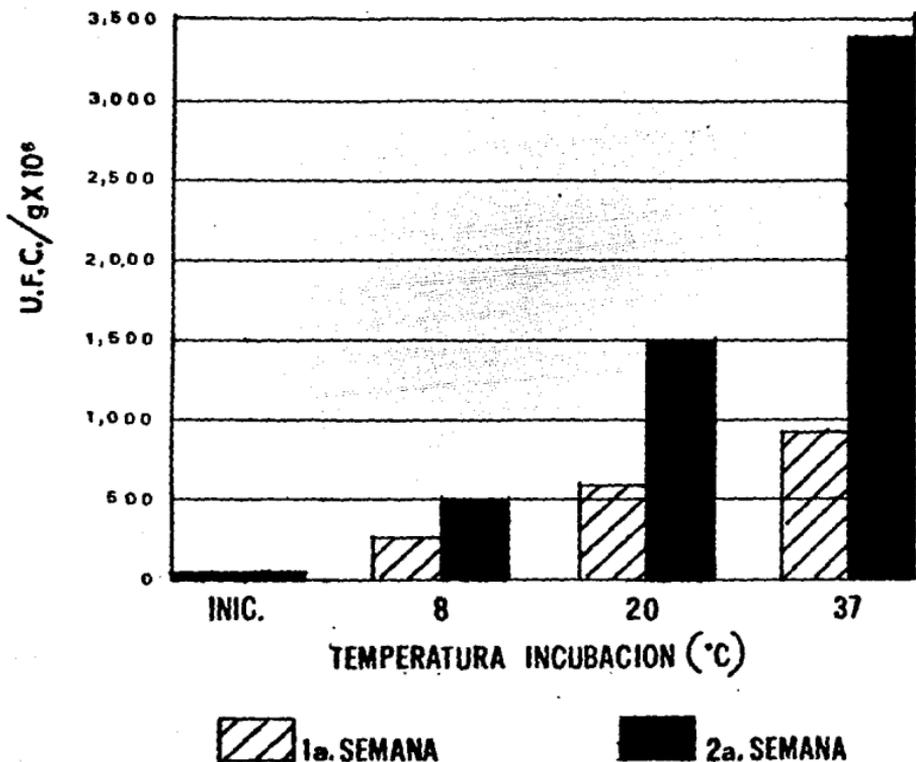


FIGURA 16. VARIACION DE LAS CUENTAS DE S.aureus EN EL JAMON COCIDO A 70 °C, DURANTE SU VIDA DE ANAQUEL.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- Al presentar la carne empleada en la elaboración de jamón una cuenta de S.aureus inicial aproximada a  $10^6$  U.F.C. / g, los tratamientos térmicos comúnmente empleados en su cocción, resultaron insuficientes para la destrucción total del microorganismo.
- Conforme la temperatura alcanzada en el centro del embutido se incremento, el indice de S.aureus viable en el producto disminuyó.
- La temperatura de almacenamiento estuvo relacionada directamente con el desarrollo de S.aureus.
- Las células de S.aureus que no fueron destruídas por el tratamiento térmico, fueron capaces de producir enterotoxina bajo las temperaturas de almacenamiento probadas.
- A pesar de que los jamones en la primera semana de almacenamiento contenían cuentas celulares elevadas, su apariencia física no se modificó considerablemente.

## C A P I T U L O   V I

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

1. Andrews, D.M. 1987. MICROBIOLOGICAL METHODS. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (1): 87.
2. Baird-Parker, A.C. 1962. AN IMPROVED DIAGNOSTIC AND SELECTIVE MEDIUM FOR ISOLATING COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI. J. Appl. Bacteriol. 25:12-19.
3. Baird-Parker, A.C. 1974. FAMILY I: Micrococaceae. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Ed. R.E. Buchanan y N.E. Giggns. 8a. edicion. Williams, Co. Baltimore, USA. pp: 478-489.
4. Banwart, J.G. 1979. MICROBIOLOGIA BASICA DE LOS ALIMENTOS. Avi Pub. Co. Inc. Westport, Conn. USA. pp: 226-250.
5. Bennett, R.W. and W.T. Amos. 1982. S. aureus GROWTH AND TOXIN PRODUCTION IN NITROGEN-PACKED SANDWICHES. J. Food Protect. 45: 157 - 161.
6. Bergdoll, M.S. 1970. ENTEROTOXINS. In " Microbial Toxins " . Vol. III. S.J. Ajl, T.C. Montie and S. Kadis (eds). Academic Press, New York. pp: 265 - 296.
7. Bergdoll, M.S. 1972. THE ENTEROTOXINS. In " The Staphylococci ". Ed. J.O. Cohen Wiley Interscience. USA.

8. Bergdoll, M.S. and R. Reiser. 1980. APPLICATION OF RADIOIMMUNOASSAY FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN FOODS. J. Food Protect. 43: 68-72.
9. Bergdoll, M.S. and Bennett, R.W. 1984. STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS. In " Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods ". Ed. M.L.Speck. Am.Public Health Assoc. Washington,D.C. pp: 428-457.
10. Bluhm, L. and Z.J. Ordal. 1969. EFFECT OF SUBLETHAL HEAT ON THE METABOLIC ACTIVITY OF S.aureus. J.Bacteriol. 97: 140-150.
11. Bradshaw, L.J. 1976. MICROBIOLOGIA DE LABORATORIO. Ed. El Manual Moderno, S.A. 3a.edicion. Mexico, D.F.
12. Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. 1987. MICROBIOLOGIA. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. 4a.edicion. Mexico, D.F.
13. Bryan, F.L., Fanelli, M.J. and Riemann, H. 1979. FOOD BORNE INFECTIONS AND INTOXICATIONS. 2a. edicion. Academic Press, N.Y.
14. Busta, F.F. 1976. PRACTICAL IMPLICATIONS OF INJURED MICROORGANISMS IN FOODS. J. Milk Food Technol. 39: 138-145.
15. Castellani, A.G. and Niven, C.F. 1975. FACTORS AFFECTING THE BACTERIOSTATIC ACTION OF SODIUM NITRATE. Appl.Microbiol. 3: 154-159.

16. Collins-Thompson, D.L., Hurst, A. and Kruse, H. 1973. GROWTH AND ENTEROTOXIN B SYNTHESIS BY S.aureus S-6 AFTER RECOVERY FROM HEAT INJURY. Can.J.Microbiol. 19: 1463-1468.
17. COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. 1976. American Public Health Ass. A.P.H.A. USA.
18. Corry, J.E. 1974. THE EFFECT OF SUGARS AND POLYOLS ON THE HEAT RESISTANCE OF Salmonella. J.Appl.Bacteriol. 37: 31-43.
19. Curso Internacional Sobre Enterotoxinas Estafilocóccicas. 1991. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Mexico, D.F.
20. Chirife, J., Vaamonde, G. and Scarmato, G. 1982. ON THE MINIMAL WATER ACTIVITY FOR THE GROWTH OF S.aureus. J.Food Sci. 47: 2054-2057.
21. Daguet, I. 1977. EXAMENES DE LABORATORIO TECNICOS EN BACTERIOLOGIA. Tomo I: Aerobios. Ed.Jims. Barcelona, Esp. pp: 93 - 102.
22. Dietrich, G., Watson, R.J. and Silverman, G.J. 1972. EFFECT OF SHAKING SPEED ON THE SECRETION OF ENTEROTOXIN B BY S.aureus. Appl.Microbiol. 24: 561-566.
23. ECOLOGIA MICROBIANA DE LOS ALIMENTOS. Vol. II. 1970. Ed.Acribia. Zaragoza, Esp.
24. Egan, H. 1988. ANALISIS QUIMICO DE ALIMENTOS DE PEARSON. Ed. CECSA. 3a. edicion. Mexico, D.F.

25. El-Banna, A.A. and Hurst, A. 1983. SURVIVAL IN FOODS OF S.aureus GROWTH UNDER OPTIMAL AND STRESSED CONDITIONS AND THE EFFECT OF SOME FOODS PRESERVATIVES. Can.J.Microbiol. 29: 297-302.
26. Fey, H. and Pfister, H. 1983. A DIAGNOSTIC KIT FOR THE DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A,B,C AND D. In "Immunoenzymatic Techniques ". Eds. Aurameos: Amsterdam,Al. pp: 345-348.
27. Fey, H., Pfister, H. and Ruegg, O. 1984. COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY SYSTEMS FOR THE DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A,B,C AND D. J.Clin.Microbiol. 19:: 34-38.
28. Frazier, W.C. 1981. MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS. Ed.Acribia. 2a. edicion. Zaragoza, Espana.
29. Frey, W. 1983. FABRICACION FIABLE DE EMBUTIDOS. Guia para el tecnico. Ed. Acribia. Zaragoza, Espana.
30. Genigeorgis, C. and Sadler, W.W. 1966. EFFECT OF NaCl AND pH ON ENTEROTOXIN B PRODUCTION. J.Bacteriol. 92: 1383 - 1387.
31. Genigeorgis, C., Riemann, H. and Sadler, W.W. 1969. PRODUCTION OF ENTEROTOXIN B IN CURED MEATS. J.Food Sci. 34: 62-68.
32. Genigeorgis, C.A. 1976. QUALITY CONTROL FOR FERMENTED MEATS. J.Am.Vet.Med.Assoc. 169: 1220-1228.

33. Hobbs, B.C. 1962. STAPHYLOCOCCAL AND C.welchii FOOD POISONING. In " Food Poisoning ". Royal Society of Health. London. pp: 49-59.
34. Hobbs, B.C. and Olson, J.C. 1971. SYMPOSIUM ON THE RESTORATION OF SUBLETHALLY IMPAIRED BACTERIAL CELLS IN FOODS. J.Milk Food Technol. 34(11): 548-552.
35. Hojvat, S.A. and Jackson, H. 1969. EFFECTS OF NaCl AND TEMPERATURE ON THE GROWTH AND PRODUCTION OF ENTEROTOXIN B BY S.aureus. Can.Inst.Food Technol.J. 2: 56-59.
36. Hughes, A. and Hurst, A. 1976. MAGNESIUM REQUIREMENTS OF S.aureus AFTER SUBLETHAL HEATING. Can.J.Microbiol. 22: 1202-1205.
37. Hughes, A. and Hurst, A. 1980. THE EFFECT OF NaCl ON THE UPPER TEMPERATURE LIMIT OF GROWTH OF ENTEROTOXIN SYNTHESIS BY S.aureus. Can.J.Microbiol. 26: 57-510.
38. Hurst, A., Hughes, A., Beare-Rogers, J.L. and Collins-Thompson, D.L. 1973. PHYSIOLOGICAL STUDIES ON THE RECOVERY OF SALT TOLERANCE BY S.aureus AFTER SUBLETHAL HEATING. J.Bacteriol. 91: 134-142.
39. Hurst, A. 1977. BACTERIAL INJURY: A REVIEW. Can.J. Microbiol. 23: 935-944.
40. Hurst, A. and Hughes, A. 1983. THE PROTECTIVE EFFECT OF SOME FOOD INGREDIENTS ON S.aureus. J.Appl.Bacteriol. 55: 81-88.

41. Iandolo, J.J. and Ordal, Z.J. 1966. REPAIR OF THERMAL INJURY OF S.aureus. J.Bacteriol. 91: 134-142.
42. International Commission on Microbiological Specification for Food ( ICMSF ). 1978. SAMPLING FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS. 2a.ed. Academic Press Ass. Toronto, Can.
43. Jackson, H. 1974. LOSS OF VIABILITY AND METABOLIC INJURY OF S.aureus RESULTING FROM STORAGE AT 5 C. J.Appl. Bacteriol. 37: 59-64.
44. Jamlang, E.M., Bartlett, M.L. and Snyder, H.E. 1971. Appl. Microbiol. 22: 1034.
45. Jay, J.M. 1978. MICROBIOLOGIA MODERNA DE LOS ALIMENTOS. Ed. Acribia. 2a. edicion. Zaragoza, Espana.
46. Jones, C.L. and Saleem, A.K. 1986. NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE ENTEROTOXIN B GENE FROM S.aureus. J.Bacteriol. 166(1): 29-333.
47. Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. and Sommers, H.M. 1989. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. Editorial Medica Panamericana. Mexico, D.F.
48. Kuo, J.K. and Silverman, G.J. 1980. APPLICATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN FOOD. J. Food Protect. 43(5): 404-407.

49. Lachica, F.V.R., Weiss, K.F. and Derbel, R.H. 1969. RELATIONSHIPS AMONG COAGULASE, ENTEROTOXIN AND HEAT STABLE DESOXIRIBONUCLEASE PRODUCTION BY S.aureus. Appl. Microbiol. 18: 126-127.
50. Lachica, F.V.R., Barry, A.L. and Atchison, F.W. 1973. IDENTIFICATION OF S.aureus BY SIMULTANEOUS USE OF TUBE COGULASE AND TERMONUCLEASE TESTS. Appl. Microbiol. 25: 496-497.
51. Lachica, V.F.R. 1980. ACCELERATED PROCEDURE FOR THE ENUMERATION AND IDENTIFICATION OF FOOD-BORNE S.aureus. Appl. Microbiol. 29: 17-19.
52. Lotter, P.L. and Genigeorgis, C.A. 1975. DEOXYRIBONUCLEIC ACID BASE COMPOSITION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF CERTAIN COAGULASE-NEGATIVE ENTEROTOXIGENIC COCCI. Appl. Microbiol. 29: 152-158.
53. MacFaddin, J.F. 1984. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA. Editorial Panamericana. Mexico, D.F.
54. Manuales para educacion agropecuaria.1990. ELABORACION DE PRODUCTOS CARNICOS. Ed. Trillas. 2a.edicion. Mexico, D.F.
55. McLean, R.A., Lilly, H.D. and Alford, J.A. 1968. EFFECTS OF MEAT-CURING SALTS AND TEMPERATURE ON PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCUS ENTEROTOXIN B. J.Bacteriol. 95: 1207-1211.

56. Mendoza, M.E. 1980. PRACTICAS DE LABORATORIO: TECNOLOGIA DE ALIMENTOS CARNICOS. Instituto Nacional de la Nutricion Salvador Zubiran.
57. Metzger, J.F., Johnson, A.D., Collins, W.S. and McGann, V. 1973. S.aureus ENTEROTOXIN B RELEASE UNDER CONTROLLED CONDITIONS OF FERMENTATION. Appl. Microbiol. 25(5): 770-773.
58. Meyer, R.F. and Palmieri, M.J. 1980. SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION METHOD FOR SCREENING STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FOR ENTEROTOXIN. Appl. Environ. Microbiol. 40: 1080-1085.
59. Minor, T.E. and Marth, E.H. 1971. S.aureus AND STAPHYLOCOCCAL FOODS INTOXICATIONS. A REVIEW. I.J. Milk Food Tech. 34: 557-564.
60. Minor, T.E. and Marth, E.H. 1972. LOSS OF VIABILITY BY S.aureus IN ACIDIFIED MEDIA. INACTIVATION BY SEVERAL ACIDS, MIXTURES OF ACIDS AND SALTS OF ACIDS. J. Milk Food Technol. 35: 191-196.
61. Morita, T.N., Patterson, J.E. and woodburn, M.J. 1979. MAGNESIUM AND IRON ADDITION TO CASEIN HYDROLYSATE MEDIUM FOR PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A, B AND C. Appl. Environ. Microbiol. 38: 39-42.
62. Mossel, D.A. 1975. OCCURRENCE, PREVENTION AND MONITORING OF MICROBIAL QUALITY LOSS OF FOODS AND DAIRY PRODUCTS. Crit. Rev. Environ. Control 5: 1-140.

63. Niskanen, A. and Mauri, A. 1977. COMPARISON OF SELECTIVE MEDIA FOR COAGULASE - POSITIVE ENTEROTOXIGENIC S.aureus. Appl. Environ. Microbiol. 35(6): 1233-1236.
64. Norma Oficial Mexicana. NOM-F-3s-1984; Alimentos. Jamon. Especificaciones de Calidad.
65. Notermans, S. and Heuvelman, C.J. 1983. COMBINED EFFECTS OF WATER ACTIVITY, pH AND SUB-OPTIMAL TEMPERATURE OF GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION OF S.aureus. J. Food Sci. 48: 1832-1840.
66. Olson, D.G. and Ternell, R.N. 1981. SENSORY PROPERTIES OF PROCESSED MEATS USING VARIOUS SODIUM SALT SUBSTITUTES. Proc. Meat Indust. Conf., March 26-27, 1981. Issued by: Am. Meat Institute Found, Arlington, Va.
67. Pariza, M.W. and Iandolo, J.J. 1969. COAGULASE PRODUCTION BY INJURED S.aureus MF-31 DURING RECOVERY. Appl. Microbiol. 17(6): 836-838.
68. Pelczar, M.J., Reid, R.D. and Chan, E.C.S. 1990. MICROBIOLOGIA. Ed. Mc Graw Hill. 4a.edicion. Mexico, D.F.
69. Peltier, L.G. 1946. LABORATORY MANUAL OF GENERAL BACTERIOLOGY. 1a. ed. John Wiley and Sons Inc. England.
70. Pereira, J.L., Salzberg, S.P. and Bergdoll, M.S. 1982. EFFECT OF TEMPERATURE, pH AND SODIUM CHLORIDE CONCENTRATIONS OF PRODUCTION AND STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A AND B. J. Food Protect. 45: 1306-1309.

71. Peterson, A., Black, J. and Gunderson, M.L. 1962. STAPHYLOCOCCI IN COMPETITION. I. GROWTH OF NATURALLY OCCURRING MIXED POPULATIONS IN PRECOOKED FROZEN FOODS DURING DEFROST. Appl. Microbiol. 10: 16-22.
72. Price, J.F. 1976. CIENCIA DE LA CARNE Y DE LOS PRODUCTOS CARNICOS. Ed. Acribia. Zaragoza, Esp.
73. Read, R.B. and Bradshaw, J.G. 1966. THERMAL INACTIVATION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B IN VERONAL BUFFER. Appl. Microbiol. 14: 130-132.
74. Reichert, C.A. and Fung, D.Y.C. 1975. Abstr. Annu. Meet Am. Soc. Microbiol. pp: 203 - 208.
75. Reiser, R.F. and Weiss, K.F. 1969. PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A, B AND C IN VARIOUS MEDIA. Appl. Microbiol. 18: 1041-1043.
76. Reiser, R.D., Conaway, D. and Bergdoll, M.S. 1974. DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN IN FOOD. Appl. Microbiol. 27: 83-85.
77. Robbins, R., Gould, S. and Bergdoll, M.S. 1974. DETECTING THE ENTEROTOXIGENICITY OF S.aureus STRAINS. Appl. Microbiol. 28: 946-950.
78. Robbins, R. and Bergdoll, M.S. 1983. PRODUCTION OF RABBITT ANTISERA TO THE STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS. J. Food Protect. 47(3): 172-176.

79. Russell, F.E. 1968. THE SAFETY OF FOODS. H.D. Graham Editors. Avi Publishing Co. Westport, Conn.
80. Sanchez, M.C. 1990. EFECTO DE DIFERENTES ADITIVOS Y SU CONCENTRACION EN LA VELOCIDAD DE PENETRACION DE CALOR Y PROPIEDADES SENSORIALES EN UN PRODUCTO TIPO SALCHICHA A BASE DE CARNE DE JUREL (Caranax hippos). Tesis Universidad Iberoamericana. Mexico, D.F.
81. Satterle, L.D. and Kraft, A.A. 1969. EFFECT OF MEAT AND ISOLATED MEAT PROTEINS ON THE THERMAL INACTIVATION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B. Appl. Microbiol. 17: 906-909.
82. Scheusner, D.L., Hood, L.L. and Harmon, L.G. 1973. EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION BY S.aureus. J. Milk Food Technol. 36: 249-252.
83. Scheusner, D.L. and Harmon, L.G. 1973. GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION BY VARIOUS STRAINS OF S.aureus IN SELECTED FOODS. J. Food Sci. 38: 474-476.
84. Smith, J.L., Buchanan, R.L. and Palumbo, S.A. 1982. EFFECT OF FOOD ENVIRONMENT ON STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN SYNTHESIS: A REVIEW. J. Food Protect. 46(6): 545-555.
85. Smith, J.L., Benedict, R.C. and Kalinowski, S.M. 1985. SOLUTES THAT PROTECT S.aureus AGAINST HEAT-INDUCED INJURY AND THEIR EFFECT ON CELLULAR LEAKAGE. J. Food Protect. 48: 600-607.

86. Stiebing, A. 1986. CALENTAMIENTO Y CONSERVABILIDAD DEL EMBUTIDO ESCALDADO. Ed. Fleischwirtschaft. Kulmbach, Al. pp: 34-40.
87. Stiles, M.E. 1974. THE RELIABILITY OF SELECTIVE MEDIA FOR THE ENUMERATION OF UNHEATED AND HEATED STAPHYLOCOCCI. Can. J. Microbiol. 20: 1735-1744.
88. Sokari, T.G. and Anozie, S.O. 1989. MODIFIED SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION METHOD FOR SCREENING STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FOR ENTEROTOXIN. Food Microbiology. 6(1): 45-48.
89. Sugiyama, H. 1951. STUDIES OF FACTORS AFFECTING THE HEAT RESISTANCE OF SPORES OF C. botulinum. J. Bacteriol. 62: 81-90.
90. Tatini, S.R., Stein, S.A. and Soo, H.M. 1976. INFLUENCE OF PROTEIN SUPPLEMENTES ON GROWTH OF S. aureus AND PRODUCTION OF ENTEROTOXINS. J. Food Sci. 41: 133-135.
91. Troller, J.A. and Frazier, W.C. 1963. REPRESSION OF S. aureus BY FOOD BACTERIA. II. CAUSES OF INHIBITION. Appl. Microbiol. 10: 16-22.
92. Weir, D.M. 1985. HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY. Vol. I y II. Blackwell Scientific Publications. 4a.edicion. Oxford.
93. White, D.G., Matus, J.S., Hamon, R.J. and Langlais, B.E. 1988. A COMPARISON OF SIX SELECTIVE MEDIA FOR THE ENUMERATION AND ISOLATION OF STAPHYLOCOCCI. J. Food Protect. 51: 685-690.