

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

13
2ej

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA UNAM

**"COMPARACION DE LOS METODOS DE ELISA Y
RPLA EN LA CUANTIFICACION DE ENTEROTOXINA
ESTAFILOCOGICA "A" EN QUESO FRESCO"**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:
LAURA FLORES GAMIO

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.

INDICE

I. INTRODUCCION.	11
1.1 Intoxicación Estafilocócica.	12
1.2 Agente Etiológico.	14
1.2.1 Morfología y Bioquímica.	15
1.2.2 Condiciones de Crecimiento.	15
1.2.3 Habitat.	16
1.3 Enterotoxinas Estafilocócicas.	17
1.3.1 Antecedentes.	17
1.3.2 Naturaleza Química.	19
1.3.3 Estabilidad.	25
1.3.3.1 Comportamiento ante Enzimas Proteolíticas.	25
1.3.3.2 Efecto de Radiaciones.	25
1.3.3.3 Termorresistencia.	25
1.3.4 Producción de Enterotoxinas.	26
1.4 Métodos de Detección de Enterotoxinas.	30
1.4.1 Relación entre Producción de enterotoxinas con otros Productos Estafilocócicos.	30
1.4.2 Métodos Biológicos.	32
1.4.3 Métodos Serológicos.	33
1.4.3.1 Métodos de Difusión en Gel.	34
1.4.3.2 Métodos de Alta Sensibilidad para la Detección de Enterotoxinas en Alimentos.	43

1.5 Quesos Frescos.	51
1.6 Justificación	55
2. OBJETIVO.	56
3. METODOLOGIA.	58
3.1 Enterotoxina A.	59
3.2 Análisis Microbiológico de la leche entera en polvo.	59
3.3 Métodos de Cuantificación de enterotoxina.	60
3.3.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	60
3.3.2 Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA)	63
3.4 Curva Estándar.	67
3.5 Elaboración de tratamientos.	69
3.5.1 Concentraciones de Enterotoxina A Inoculadas.	69
3.5.2 Métodos de elaboración de los Quesos frescos.	70
3.6 Extracción simple de Enterotoxina en los Quesos.	73
3.7 Cuantificación de Enterotoxinas en Quesos y Sueros.	75
4. RESULTADOS.	76
4.1 Calidad Microbiológica de la Leche entera en polvo.	77
4.2 Curva Estándar.	78
4.2.1 Método ELISA.	78
4.2.2 Método RPLA.	81
4.3 Cuantificación de Enterotoxina A en los quesos y sueros.	84
4.3.1 Pesos de los quesos y Volúmenes de los sueros.	84
4.3.2 Extracción de Enterotoxina.	86

4.3.3 Cantidades de Enterotoxina detectadas en los diferentes tratamientos.	87
4.4 Distribución de Enterotoxina A en la elaboración de queso.	92
4.5 Comparación entre los métodos de ELISA Y RPLA.	96
4.5.1 Manejo de muestras.	96
4.5.2 Sensibilidad.	97
4.5.3 Reacciones de interferencia.	98
5. CONCLUSIONES.	100
6. BIBLIOGRAFIA.	103

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	Propiedades de las Enterotoxinas Estafilocócicas.	20
CUADRO 2.	Composición en aminoácidos de las Enterotoxinas Estafilocócicas.	21
CUADRO 3.	Aminoácidos terminales de las Enterotoxinas.	23
CUADRO 4.	Elaboración de Tratamientos.	69
CUADRO 5.	Tabulación de datos de la Curva Estándar por el método ELISA.	79
CUADRO 6	Características de los Quesos, Sueros y Extractos.	85
CUADRO 7.	Resultados del Método ELISA.	88
CUADRO 8.	Comparación de datos obtenidos por ELISA Y RPLA.	91
CUADRO 9.	Distribución de Enterotoxina A durante la elaboración del queso No. 1.	93
CUADRO 10.	Distribución de Enterotoxina A durante la elaboración del queso No. 4.	94

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1.	Secuencia en aminoácidos común a las enterotoxinas A, B y C ₁ .	22
FIGURA 2.	Difusión simple y doble en gel.	36
FIGURA 3.	Técnica de Difusión en placa.	38
FIGURA 4.	Placa de Optima Sensibilidad (OSP).	38
FIGURA 5.	Líneas de Precipitación en OSP.	40
FIGURA 6.	Técnica de la Microplaca.	41
FIGURA 7.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).	46
FIGURA 8.	Placas de Microtitulación para RPLA.	49
FIGURA 9.	Metodología para ELISA.	62
FIGURA 10.	Metodología para RPLA.	65
FIGURA 11.	Método de elaboración de queso fresco.	71
FIGURA 12.	Extracción simple de Enterotoxina Estafilocócica.	74
FIGURA 13.	Curva Estándar.	80
FIGURA 14.	Grados de Aglutinación del Látex.	82
FIGURA 15.	Curva Estandar por RPLA.	83
FIGURA 16.	Distribución de SEA en la elaboración del queso 1.	95
FIGURA 17.	Distribución de SEA en la elaboración del queso 4.	95

1. INTRODUCCION.

1.1 INTOXICACION ESTAFILOCOCICA.

Aunque muy diversos microorganismos son capaces de desarrollarse en los alimentos, sólo algunos pueden sintetizar toxinas en los mismos, convirtiéndolos en dañinos para la salud. Entre las bacterias de este tipo, algunas de las más conocidas son: Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum y Bacillus cerus (41).

El envenenamiento de tipo estafilocócico es uno de los más comúnmente reportados. Constituye una intoxicación de tipo entérico causada por el consumo de alimentos que contienen exotoxinas presintetizadas por cepas de S.aureus. En los Laboratorios Nacionales de Referencia de la Secretaría de Salubridad y Asistencia (ahora Secretaría de Salud), se realizó un estudio durante el periodo 1980 a 1989, con el fin de identificar los principales agentes etiológicos involucrados en intoxicaciones de tipo alimentario. En el 48.2% de los casos S.aureus fue responsable. A través del estudio antes mencionado se observó que los quesos y la leche representaron el 29.3 y 13.8% respectivamente, de los alimentos relacionados con los brotes analizados (48)(54).

Los síntomas característicos de esta intoxicación aparecen de 1 a 6 horas después de la ingestión del alimento conteniendo la enterotoxina, siendo el promedio un tiempo de 2 a 3 horas; aunque ocasionalmente pueden presentarse en menos de una o en más de seis horas (23). Su desarrollo está determinado por la cantidad de enterotoxina consumida y por la sensibilidad del individuo involucrado. El primer factor depende de la cantidad de alimento

ingerido y la distribución de la toxina dentro del mismo, variando por lo tanto en forma considerable.

Los síntomas más comunes son náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal; en casos severos se puede presentar cefalea, calambres musculares y una marcada postración, así como una drástica baja de presión arterial. Es común el desarrollo de fiebre.

La recuperación en los casos normales es rápida, de 1 a 3 días. De la severidad de los síntomas depende el periodo de recuperación, aunque la presión arterial baja puede persistir por varios días, incapacitando al individuo (23). Debido a esta recuperación relativamente rápida, rara vez se consulta al médico y muchos casos no son reportados (12). Los brotes estafilocócicos estudiados por los Laboratorios Nacionales de Salud constituyen entonces una mínima parte de los que ocurren en el país (54).

La tasa de mortalidad por intoxicación estafilocócica es extremadamente baja, aunque pueden presentarse muertes usualmente en ancianos y niños pequeños, provocada por deshidratación severa o bien por cualquier complicación provocada por otros efectos no observados (23). En algunos casos ha sido debido a un tratamiento inadecuado con antibióticos; éstos destruyen la flora normal del tracto intestinal que resulta en un crecimiento no inhibido de la cepa productora de enterotoxina ingerida junto con el alimento contaminado, provocando que el sistema absorba toxina adicional (23)(11).

1.2 AGENTE ETIOLOGICO.

Staphylococcus aureus (del griego STEPHELE , racimo de uvas y del latín AUREUS, dorado), es nombrado así por las características de distribución de sus células observables bajo análisis microscópico y el color dorado de sus colonias sobre superficies de agar.

El manual Bergey's de Bacteriología incluye al género Staphylococcus en la familia Micrococcaceae. Baird Parker (1963), propuso un sistema de clasificación del Micrococci y del Staphylococci basado en ciertas pruebas fisiológicas y bioquímicas. Dividiendo la familia Micrococcaceae en: grupo I Staphylococcus y grupo II Micrococcus. Estos se dividieron en subgrupos con base en la producción de pigmento, reacciones de coagulasa, de fosfatasa, producción de acetona y formación de ácido a partir de glucosa y de otros azúcares aeróbica y anaeróticamente. Se reconocieron 6 subgrupos del género Staphylococcus y 7 del género Micrococcus. El primero se diferencia de otros de la familia por el contenido de guanina-citosina en el DNA, composición de la pared celular y habilidad para crecer anaeróticamente y fermentar glucosa bajo estas condiciones (13)(23).

Algunas de las especies son: S.aureus, S.epidermis y S.saprophyticus. En años recientes, dos especies adicionales han sido identificadas y nombradas como S.intermedius y S.hyicus. La primera, coagulasa y termonucleasa positivas; mientras que la segunda, S.hyicus, puede presentar resultados tanto positivos como negativos en estas pruebas. Ambas especies han sido

reportadas como productoras de enterotoxina a muy bajo nivel y la frecuencia con que han estado involucradas en brotes de intoxicación alimentaria se desconoce (8)(12)(23).

1.2.1 MORFOLOGIA Y BIOQUIMICA.

Staphylococcus aureus es una pequeña célula esférica, coco gram positivo, cuyo diámetro se encuentra entre 0.8-1.0 μm . Sus células se agrupan en forma de racimos. No presenta motilidad ni formación de esporas; algunas cepas poseen cápsula o capa viscosa.

Es un microorganismo anaerobio facultativo, fermenta los carbohidratos en ausencia de oxígeno. Posee las enzimas fosfatasa y desoxirribonucleasa. También es capaz de producir ácido a partir de glucosa. Reduce el nitrato a nitrito (13)(53). En medio sólido, como agar soya tripticaseína, S.aureus produce colonias circulares, enteras, elevadas, convexas y húmedas; pigmentadas característicamente en tonos que varían del color crema al naranja (13)(53).

1.2.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Puede crecer en medios conteniendo hasta 7.5% de NaCl. La temperatura óptima de crecimiento de S.aureus bajo condiciones favorables ha sido establecida en 37°C, aunque puede desarrollarse en un rango de 10-45°C; con excepción de algunas cepas que ocasionalmente crecen a temperaturas inferiores a 10°C o superiores a 45°C. El rango de pH en el que presenta crecimiento

es muy amplio, de 4.0 a 9.8, no obstante en los extremos solo se desarrolla bajo condiciones nutricionales adecuadas (13).

Staphylococcus aureus puede crecer a valores de actividad de agua (Aw) tan bajos como 0.83, siendo el valor más favorable mayor a 0.99, pudiendo haber variaciones según el tipo de cepa y el medio en el que crezca, ya se trate de un medio de cultivo bacteriológico, en donde se buscarán las mejores condiciones para su crecimiento o en un alimento, en donde probablemente crecerá en condiciones variables según el alimento de que se trate (12).

1.2.3 HABITAT.

S.aureus es un organismo ampliamente diseminado en la naturaleza, se puede aislar del aire, aguas, suelo y heridas infectadas (53). Reside como saprófito en las secreciones mucosas de la región nasofaríngea. Es arrojado mediante expectoración. También puede residir en la piel y tracto intestinal(13).

1.3 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS.

1.3.1 ANTECEDENTES.

Los agentes causantes del envenenamiento estafilocócico son una serie de toxinas, nombradas enterotoxinas debido a su efecto en el tracto intestinal. Son sustancias tóxicas producidas por algunas cepas de S.aureus durante su crecimiento. Cuando éste se realiza dentro de un alimento, la ingestión del mismo produce envenenamiento (12)(13). Existen datos de intoxicaciones similares a las estafilocócicas desde 1830 aunque se desconocía la causa y el microorganismo responsable (13).

En 1930 el Dr. Gail M. Dack publicó los resultados obtenidos de su investigación sobre un envenenamiento con crema pastelera, en los que demostró la presencia de toxina dentro del alimento a la que dió el nombre de enterotoxina por sus efectos gastroentéricos. En esencia este fué el principio de las investigaciones de envenenamiento estafilocócico en alimentos (12).

Una vez que la naturaleza del agente responsable se determinó, los esfuerzos se concentraron en el desarrollo de métodos de prueba. El problema se incrementó al descubrir que el estafilococo producía más de una enterotoxina, como se determinó mediante reacciones con anticuerpos específicos. De esta forma los métodos desarrollados para su detección deben realizarse mediante pruebas separadas para cada toxina. Aunque se han desarrollado varias técnicas, éstas requieren mejoras o el desarrollo de nuevas para facilitar la tarea.

El método ideal a desarrollarse sería aquel específico para todas las enterotoxinas, a través del cual sea posible determinar su presencia con una sola prueba y en un día (13).

Mediante las técnicas serológicas se reconocieron las enterotoxinas estafilocócicas (SE) de tipo: A (SEA), B (SEB), C₁ (SEC₁), C₂ (SEC₂), C₃ (SEC₃), D (SED) y E (SEE) (12)(23).

En el Instituto Politécnico Nacional se realizaron estudios para identificar el tipo serológico de la enterotoxina más frecuentemente producida por cepas de Staphylococcus aureus aisladas en productos lácteos y cárnicos. En los primeros, el tipo más común fue el A en 45.09% y el D en 33.16%. En el humano se encuentran con mayor frecuencia el A y B, a diferencia de los tipos C y D que se presentan generalmente en los animales enfermos de mastitis. En productos cárnicos el C fué el más frecuentemente involucrado. Lo antes expuesto indica que la contaminación de cárnicos es generalmente de origen animal, a diferencia de la de los productos lácteos, en donde la manipulación humana es preponderante, ya que en la mayoría de los casos las cepas aisladas parecen proceder del hombre, sin hacer a un lado el riesgo de contaminación de la leche al ordeñar una vaca enferma de mastitis (2)(48). La enterotoxina A es la que se encuentra más frecuentemente involucrada en brotes de intoxicación alimentaria (11).

1.3.2 NATURALEZA QUIMICA.

Las enterotoxinas puras son de color blanco, higroscópicas, fácilmente solubles en agua y soluciones salinas. Son proteínas básicas con puntos isoeléctricos que van de 6.9 a 8.6. Algunas de sus propiedades se ilustran en el cuadro 1 (11)(13).

Son proteínas de cadena simple con pesos moleculares bajos que van de 26,000 a 34,000 Daltons. Están formadas por cadenas polipeptídicas simples, que contienen cantidades relativamente altas de lisina, tirosina, ácidos aspártico y glutámico (cuadro 2) (8)(11)(12).

Todas ellas tienen dos residuos de cisteína, que se encuentran formando un puente disulfuro, localizado en el centro de la molécula (8)(12). Se conocen las secuencias de aminoácidos de las enterotoxinas A, B y C₁. Las dos últimas tienen varias áreas de homología, pero estas dos solo tienen un área común con la SEA, que consiste en 5 residuos de aminoácidos, más 2 residuos comunes dentro de los siguientes cuatro (12).

La composición de la enterotoxina A es similar a la de la E, mientras que las enterotoxinas B y C son similares entre sí. En la figura 1 se muestran las áreas de homología entre las toxinas A, B y C₁ (13)(17).

CUADRO 1. PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS.

PROPIEDAD	A	B	C₁	C₂	D	E
PESO MOLECULAR (Daltons)	27800	28366	34100	34000	27300	29600
DOSIS EMETICA (ED50) (µg/mono)	5	5	5	5-10	20	10
CONTENIDO DE NITROGENO (%)	16.2	16.1	16.2	16.0	---	---
PUNTO ISO ELECTRICO	6.9	8.6	8.6	7.0	7.4	7.0
ABSORCION MAX.	277	277	277	277	278	277
FUENTE: BERGDOLL, M.S., 1979.						

CUADRO 2. COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS (g/100 proteína)

AMINOACIDO	SEA	SEB	SECs	SED	SEE
Alanina	1.9	1.3	1.7	2.0	2.4
Arginina	4.0	2.7	1.7	3.4	4.5
Acido Aspártico	15.5	18.1	18.2	16.7	15.1
Cisteina	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8
Acido Glutámico	12.6	9.5	8.6	13.2	12.2
Glicina	1.0	1.0	3.1	2.7	4.1
Histidina	3.2	2.3	2.9	2.7	3.0
Isoleucina	4.1	3.5	3.8	6.0	4.3
Leucina	9.8	6.9	6.4	9.3	10.1
Lisina	11.3	14.9	14.0	12.9	10.8
Metionina	1.0	3.5	3.5	1.1	0.5
Fenilalanina	4.3	6.2	5.4	4.8	4.5
Prolina	1.4	2.1	2.2	1.4	1.9
Serina	3.0	4.1	5.0	5.1	4.7
Treonina	6.0	4.5	5.7	4.5	6.4
Tirosina	10.6	11.5	10.1	7.2	9.8
Triptofano	1.5	1.0	1.0	0.6	1.7
Valina	4.9	5.7	6.0	4.1	4.4
Amida	1.8	1.7	1.5	1.7	1.7

FUENTE: BERGDOLL, M.S., 1990.

	TIPO DE ENTEROTOXINA	SEA	SEB	SEC ₁
	SECUENCIA DE AMINOACIDOS			
Posiciones	110	Thr	Lys	Lys
	111	Ala	Thr	Thr
	112	Cys	Cys	Cys
	113	Met	Met	Met
	114	Tyr	Tyr	Tyr
	115	Gly	Gly	Gly
	116	Gly	Gly	Gly
	117	Val	Val	Val
	118	Thr	Thr	Thr
	119	Leu	Gln	Lys
	120	His	His	His
	121	Asp	Gly	Glu
	122	Asn	Asn	Gly
	123	Asn	Asn	Asn
	124	Arg	Glu	His
	125	Leu	Leu	Phe
	126	Thr	Asp	Asp

FUENTE: BERGDOLL, M.S., 1990.

FIGURA 1. SECUENCIA EN AMINOACIDOS COMUN A LAS ENTEROTOXINAS A, B Y C₁

W

Se puede observar que un residuo de cisteína en la posición 112, se encuentra formando parte de una secuencia de 7 residuos comunes a las enterotoxinas A, B y C₁. Esta área ha sido propuesta como el sitio tóxico, debido a que es la única común a estas 3 enterotoxinas y además involucra al puente disulfuro (8)(12)(13).

Los aminoácidos terminales de las enterotoxinas se observan en el cuadro 3. Es interesante notar que el aminoácido N-terminal para B, C₁ y C₂ es el mismo y que ambos aminoácidos, C- y N- terminales para C₁ y C₂ son los mismos (11).

CUADRO 3. AMINOACIDOS TERMINALES DE LAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS.

ENTEROTOXINA	AMINOACIDO N-TERMINAL	AMINOACIDO C-TERMINAL
A	Alanina	Serina
B	Acido Glutámico	Lisina
C ₁	Acido Glutámico	Glicina
C ₂	Acido Glutámico	Glicina
E	Serina	Glicina

FUENTE: BERGDOLL, M.S., 1970, 1979.

Mediante distintos experimentos realizados para localizar el sitio tóxico y explicar la estabilidad de la molécula de enterotoxina se ha llegado a las siguientes conclusiones:

a) La enterotoxina A es completamente resistente a la acción de la tripsina.

b) Las enterotoxinas existen como moléculas muy compactas, no hidratadas en un amplio rango de pH.

c) Cuando se modifican 14 residuos de tirosina, la enterotoxina no puede retomar su conformación original.

d) Al ser modificados 6 residuos de metionina de la enterotoxina B se pierde su acción emética.

e) Al ser alterados residuos de lisina de la SEB, no se obtuvo cambio en la conformación o actividad biológica, aunque hubo una disminución en su solubilidad.

f) La neutralización de las cargas positivas de la molécula, resultó en una inactivación de la toxina. Ocurren muchos cambios estructurales serios, con pérdida de actividad, indicando que las cargas positivas son esenciales para mantener la conformación y actividad de la toxina.

Como otras proteínas biológicamente activas, la integridad estructural de las enterotoxinas estafilocócicas es esencial en su actividad biológica.

Los grupos amino pueden jugar un papel dentro de la actividad emética y en la reacción antígeno-anticuerpo, pero su principal función es la de mantener la conformación nativa (13).

1.3.3 ESTABILIDAD.

1.3.3.1 COMPORTAMIENTO ANTE ENZIMAS PROTEOLITICAS. Las enterotoxinas estafilocócicas son mucho más estables que otras proteínas. Su gran estabilidad térmica y proteolítica deriva de su estructura de cadena simple, constituida únicamente por aminoácidos. En estado activo son resistentes a enzimas proteolíticas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, renina y papaína. La pepsina destruye la actividad de la SEB a pH 2, pero es inocua a valores más elevados de pH. Lo anterior explica el hecho de que las toxinas permanezcan activas cuando son ingeridas, aún en presencia de pepsina; cabe recordar que el pH del estómago es usualmente mayor a 2 después de la ingestión de alimento (11)(12)(13).

1.3.3.2 EFECTO DE RADIACIONES. También se ha estudiado el efecto de la irradiación gamma sobre la enterotoxina B, obteniendo como resultado una reducción en la concentración. No obstante se concluye que no son suficientemente efectivos los procesos de irradiación para pasteurizar o esterilizar alimentos, debido a que la enterotoxina no se inactiva totalmente (11)(13).

1.3.3.3 TERMORRESISTENCIA. Las enterotoxinas se consideran termorresistentes. Su toxicidad no se destruye completamente después de

mantener en ebullición soluciones de enterotoxina cruda durante 30 minutos. Se ha reportado que la destrucción de la actividad de la SEB solo se logra a 99°C durante 87 minutos, mientras que para inactivar la SEA se requiere solo un minuto a 100°C. Al calentar la C₂ bajo las mismas condiciones que la A se elimina cerca del 80% de su actividad. Estos resultados muestran que la SEA es la más sensible al calor, mientras que la B es más termorresistente.

Cabe señalar que las enterotoxinas en forma cruda son más estables que de manera pura. Hilker reporta que la SEA cruda en buffer veronal (21µg/ml) requiere de un calentamiento a 100°C durante 130 minutos para reducir el contenido de toxina a menos de 1 µg/ml (11).

Bennet y Berry (6), demostraron que al calentar a temperatura de retorta (123.9°C) latas de alimento infantil y crema de apio, inoculadas con SEA y SED, las enterotoxinas se inactivaron serológicamente, pero al ser inyectadas en gatos permanecieron biológicamente activas. Concluyeron que la SEA y SED permanecen activas bajo condiciones de enlatado y son potencialmente dañinas para la salud.

1.3.4 PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS.

Se han realizado varios estudios sobre el crecimiento de S.aureus en alimentos, con la subsecuente producción de enterotoxina, mostrando que en general la producción de toxina en un alimento dado es dependiente de su composición, naturaleza física, pH y contenido de humedad, así como de las condiciones en que se lleva a cabo, tales como temperatura, tiempo y atmósfera.

Además el tipo de cepa, tamaño de inóculo y enterotoxina producida son consideraciones importantes (13).

Pereira, Salzberg y Bergdoll (42), reportaron que la temperatura óptima de crecimiento de S.aureus, 35-37°C, corresponde a la máxima producción de enterotoxina. De igual manera sucede con el pH de 7.0.

La síntesis de enterotoxina puede ocurrir en ciertos alimentos a temperaturas tan bajas como 10°C, o tan altas como 40°C, pero siempre en menor concentración que a temperatura óptima (23). Los límites de pH en los que se puede presentar producción de enterotoxinas van de 5.15 a 9.0 (12).

Staphylococcus aureus puede crecer a valores de actividad de agua (Aw) tan bajos como 0.83, siendo el valor más favorable mayor a 0.99. La producción de toxina varía, experimentos con alimentos indican que la SEA puede ser producida a valores de Aw menores de 0.90, aunque el óptimo es de 0.99 (12).

El crecimiento de S.aureus es más lento en forma anaeróbica; algunos investigadores han reportado que las enterotoxinas se pueden producir en algunos alimentos bajo estas condiciones (12). Gengioris et al. (23), encontraron que la SEB se produjo en jamones incubados a 22 y 30°C, ambos bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (53).

Debido a estos factores es imposible hacer cualquier generalización acerca de la producción de enterotoxina en alimentos, pero vale la pena

establecer que cualquier alimento que constituya un buen medio para el crecimiento estafilocócico, puede causar intoxicación alimentaria si permanece en condiciones aerobias, a temperatura ambiente por varias horas (13).

Reyes, Mota, Costarrica y Parrilla (48), indican que los quesos analizados que presentaron cuentas por debajo de la máxima permisible para esta clase de alimentos, son potencialmente peligrosos al contener cepas enterotoxigénicas, que de encontrar las condiciones adecuadas para su desarrollo y producción de enterotoxinas, pueden transformarse en un riesgo real y provocar intoxicaciones de origen alimentario. No observándose una diferencia entre productos madurados y no madurados.

Haro (26), demostró la presencia de enterotoxina B en queso fresco conteniendo menos de 10^6 UFC/g (unidades formadoras de colonias por gramo) de S.aureus S-6.

Ahmed, Moustafa y Marth (1), informaron que la contaminación por S.aureus del suero obtenido en la producción de queso Domiati, sin sal y tratado térmicamente, así como la ausencia de refrigeración adecuada, proveyeron la oportunidad de producción de enterotoxina, la cual persistió a procesamientos subsecuentes y almacenamiento del suero.

Los análogos de queso se preparan utilizando proteínas y otros derivados de leche que proporcionan un medio nutricional apto para el crecimiento del estafilococo. Bennet y Amos (5), encontraron que la producción de enterotoxina en estos productos se lleva a cabo bajo condiciones de Aw de

0.944 a 0.973 y en un rango de pH de 5.56 a 5.90. Cuando estos productos no son almacenados bajo refrigeración pueden presentar crecimiento de S.aureus y subsecuente producción de enterotoxina.

Staphylococcus presenta menor crecimiento en presencia de otros organismos, no es un buen competidor a menos que su inóculo sea mayor que la cuenta de los otros organismos. En leche cruda el número de células de S.aureus solo es mayor en el caso de provenir de una vaca enferma de mastitis. Otro factor que favorece el crecimiento de S.aureus es su tolerancia al cloruro de sodio mientras que los microorganismos competidores no crecen en presencia de este.

1.4 METODOS DE DETECCION DE ENTEROTOXINAS.

Por muchos años, después de conocer el papel que juegan las enterotoxinas estafilocócicas dentro de las intoxicaciones alimentarias, se ha tratado de desarrollar un método práctico sensitivo para su detección. El hecho de que las enterotoxinas sean proteínas elimina la posibilidad de desarrollar un método químico para su identificación, ya que cualquier método desarrollado para una proteína no sería específico para la actividad biológica de las enterotoxinas (11).

1.4.1 RELACION ENTRE PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS CON OTROS PRODUCTOS ESTAFILOCOVICOS.

Con los recursos con los que se contaba se trató de relacionar la producción de enterotoxina con la síntesis de otros metabolitos por cepas de S.aureus, tales como coagulasa y termonucleasa. La primera es una enzima proteínica capaz de coagular el plasma, con una acción semejante a la de la protrombina, transformando el fibrinógeno en fibrina, provocando así la formación de un coágulo visible. Permite la diferenciación específica entre las especies S.aureus(+) y S.epidermidis(-), pertenecientes al género Staphylococcus (12)(53).

Había sido generalmente aceptada la relación coagulasa positivo-enterotoxigénico positivo, hasta el reporte del aislamiento de cepas coagulasa negativa productoras de enterotoxina y su identificación como agentes etiológicos en algunas intoxicaciones alimentarias (11)(53).

Por lo antes expuesto se buscó otra característica fisiológica para la identificación de S.aureus enterotoxigénico. La termonucleasa es una fosfodiesterasa resistente al calor, capaz de separar el ácido desoxirribonucleico o el ácido ribonucleico para producir 3'fosfomononucleósidos. Lachica publicó un estudio en el que la prueba de termonucleasa presenta una mayor correlación que la de coagulasa con la producción de enterotoxinas (53).

Se ha informado que existe en S.aureus una alta correlación entre su producción de coagulasa y termonucleasa con la síntesis de toxinas. En un estudio realizado al respecto, se analizaron 250 cepas enterotoxigénicas, de las cuales el 93% resultaron coagulasa positivas y el 95% termonucleasa positivas (53). Se ha estudiado la relación de enterotoxina con otros productos producidos por el estafilococo, tales como hemolisinas, fosfatasa, penicilinas y nucleasa, no encontrándose correlaciones consistentes. Es posible que el 99% de las cepas enterotoxigénicas puedan producir una sustancia dada, pero es muy subjetivo utilizar esto como guía para descartar cepas no enterotoxigénicas. Si un alimento contiene una cepa coagulasa negativa, pero enterotoxigénica y no se toma en cuenta, puede provocar un brote de envenenamiento estafilocócico (11).

1.4.2 METODOS BIOLOGICOS.

Los métodos biológicos para la detección de enterotoxinas son bastante limitados y no muy sensitivos. En algunos laboratorios se utiliza la alimentación a monos rhesus (*Macaca mulatta*) y la inyección intravenosa en gatos adulto y cachorro para verificar la toxicidad de enterotoxinas purificadas y determinar el efecto de varios tratamientos sobre las mismas (13). El método más específico es el de la alimentación a monos, en éste se introducen mediante catéter 50 ml de la muestra en el estómago de un mono rhesus o cynomolgus. Los animales se observan durante 5 horas. Si se presenta vómito en ese lapso, la muestra se juzga que contiene enterotoxina. Es la única prueba para enterotoxinas no identificadas; en este caso se acepta que cualquier producto estafilocócico que produzca una reacción emética en los monos es una enterotoxina (12).

Si se sospecha de la presencia de otras sustancias biológicamente activas, es necesario inactivarlas por medio de tratamientos con tripsina o pancreatina. Es posible que algunas cepas de estafilococos produzcan sustancias biológicamente activas diferentes a las enterotoxinas, que sean resistentes a la acción proteolítica, aunque esto no ha sido reportado aún (13).

En el Instituto de Investigaciones de Alimentos de la Universidad de Wisconsin se ha utilizado el ensayo con el mono rhesus por catéter, aunque se considera caro debido al costo de los monos y su manutención, además de que se vuelven resistentes a las enterotoxinas después de varias pruebas (9).

Otro bioensayo para probar la actividad de las enterotoxinas ha sido realizado por Bennet y Berry (6), inyectaron gatitos con solución salina fisiológica conteniendo SEA y SED. Al observarse una respuesta emética se comprobó que se retuvo la actividad biológica de las enterotoxinas en alimentos enlatados sometidos a temperatura de retorta (123.9°C).

1.4.3 METODOS SEROLOGICOS.

La propiedad de las proteínas de inducir la formación de anticuerpos específicos al ser inyectadas en animales, se ha aprovechado para el desarrollo de métodos de ensayo específicos. El hecho de que se forme un precipitado al estar en contacto el antígeno con su anticuerpo específico se ha utilizado como base para un buen número de métodos de detección de enterotoxinas. Aunque la reacción antígeno-anticuerpo no necesariamente indica actividad biológica, de cualquier manera la correlación entre ellas es adecuada para justificar el uso de la reacción inmunológica en el ensayo de la enterotoxina (11).

Los anticuerpos se preparan mediante la inmunización de conejos. En el Instituto de Investigaciones de Alimentos de la Universidad de Wisconsin se realizó la producción de antisuero en conejos, inyectándoles subcutáneamente dosis de enterotoxina que se aumentó gradualmente para inducir la producción de anticuerpos. Se prepararon antisueros para las enterotoxinas A, B, C₁, C₂, C₃, D y E y se comprobó que con el método utilizado se obtuvo mayor volumen y calidad de suero producido mediante un moderado número de inyecciones, con muy poca atención especial a los animales y mucho menos toxina requerida que por otros métodos (50).

Para la identificación de las toxinas mediante su reacción con anticuerpos específicos, se ha observado que el antisuero producido contra cada enterotoxina, con excepción de las C₁, C₂ y C₃ es específico para la toxina usada en la inmunización. En el caso de las toxinas tipo C, cada una de éstas puede reaccionar con el antisuero preparado contra las otras dos; de cualquier forma las reacciones con el antisuero heterólogo muestran que cada una de ellas son ligeramente diferentes antigénicamente, de ahí la terminología C₁, C₂ y C₃.

Existe una reacción cruzada entre las enterotoxinas A y E, esto es, cada una de ellas reacciona con el antisuero heterólogo. En algunos sueros producidos contra la SEB, hay anticuerpos presentes que reaccionan con la toxina B y con las C₁, C₂ y C₃. Se han producido anticuerpos monoclonales que reaccionan con la SEB y las tres C. Otros anticuerpos monoclonales que han sido preparados reaccionan con las enterotoxinas A y E, pero aún no ha sido posible el producir anticuerpos que reaccionen con la enterotoxina A y con la B o las C (12).

El antisuero ideal, que simplificaría las pruebas de detección de enterotoxina en alimentos, sería aquel que reaccionara con los 7 tipos de enterotoxina conocidos hasta el momento (13).

1.4.3.1 METODOS DE DIFUSION EN GEL. Estos métodos han sido ampliamente usados en la determinación de la enterotoxigenicidad de cepas estafilocócicas, debido a su sensibilidad. Se basan en el uso de anticuer-

pos policlonales que al unirse con las enterotoxinas en geles, dan reacciones de precipitación, que los hace altamente específicos.

Estas técnicas al ser usadas en la determinación de enterotoxinas en alimentos, requieren de métodos de extracción-concentración. La cantidad de alimento requerida es de 100 g para obtener un volumen de extracto concentrado de 0.2 ml. Para alcanzar este volumen es necesario extraer los solutos, lo que requiere de una purificación considerable. Es difícil detectar las enterotoxinas en niveles de ng/g (nanogramos/gramo) por medio de estos métodos y el tiempo requerido para completar estos procedimientos es de cerca de 5 días (8). Los métodos serológicos en gel para el ensayo de enterotoxinas comprenden:

a. Difusión simple en gel. El método de difusión simple en tubo de Oudin se utiliza para trabajo cuantitativo. Se prepara un tubo cubierto con agar limpio, adicionando agar con antitoxina (previamente disuelta), posteriormente se le adicionan aproximadamente 0.4 ml de la solución que contiene la enterotoxina. Los tubos se sellan con parafina y se incuban a 30°C por 24 horas (19)(25)(46).

En cuanto la enterotoxina se difunde dentro del agar, se forma una banda de precipitación. Esta se difunde hacia abajo en el agar dependiendo de las concentraciones de la toxina y del anticuerpo en el agar (19). Para hacerlo cuantitativo se preparan curvas estándar con cantidades conocidas de enterotoxina cruda estandarizada o purificada y se mide la distancia de migración de la banda, en milímetros (Figura 2A) (5)(27)(46).

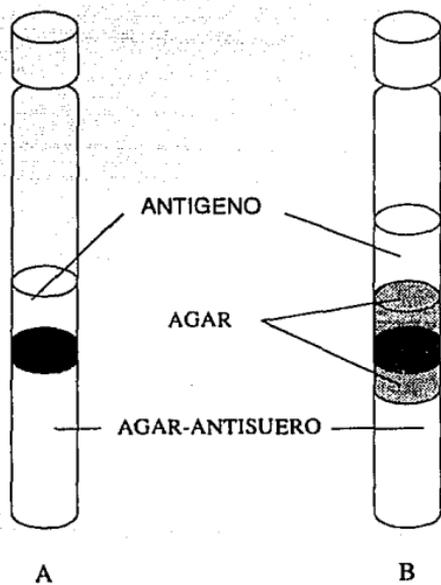


FIGURA 2. DIFUSION SIMPLE Y DOBLE EN GEL.

La sensibilidad va de 1-2 μ g (microgramos) de enterotoxina por mililitro, lo que restringe su uso al tratar de detectar cantidades menores como en el caso de alimentos (11).

b. Doble difusión en gel. En el método de doble difusión descrito por Oakley y Fulthrope (25), se prepara un tubo de forma similar a la difusión simple, excepto que se adiciona una capa de agar entre el agar-antisuero y el antígeno (25)(46). La línea de precipitado se forma en la capa de agar intermedia, previendo que la concentración de ambos esté balanceada y la posición de la línea dependerá de las concentraciones relativas de los dos reactantes (Figura 2B) (11)(19). El tiempo de incubación varía según el tamaño de la capa de agar y las concentraciones de los reactantes, pudiendo ir de 2 a 3 días si la capa de agar es delgada y las concentraciones están en el orden de 10-20 μ g/ml. Se han reportado hasta 0.05 μ g/ml de enterotoxina por este método, aunque el tiempo requerido para detectar la línea a ésta pequeña concentración es de 21 días (11).

c. Difusión en placa. La técnica de Ouchterlony en placa, se utiliza para la detección de enterotoxinas en filtrados de cultivos estafilocócicos. Se realiza en una placa con agar a la que se le hacen pequeños pozos en forma de círculo, alrededor de un pozo central en el que se coloca el antisuero y en los demás se colocan las soluciones problema (Figura 3). La presencia de una línea de precipitación después de incubar durante la noche se considera una reacción positiva (11).

aSE - ANTISUERO

1, 2, 3, 4, 5 y 6 - MUESTRAS

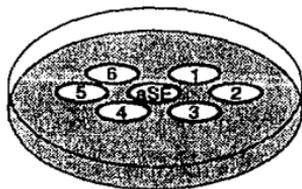
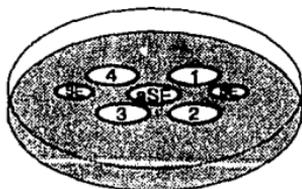


FIGURA 3. TECNICA DE DIFUSION EN PLACA



aSE - ANTISUERO

SE - ENTEROTOXINA CONTROL

1, 2, 3 y 4 - MUESTRAS

FIGURA 4. PLACA DE OPTIMA SENSIBILIDAD (OSP).

Se han realizado varias modificaciones a este método con el propósito de incrementar su sensibilidad, la cual varía de 5-10 a 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina en una modificación conocida como placa de óptima sensibilidad (OSP), en la cual los orificios se hacen como se muestra en la Figura 4. En los pozos más pequeños se colocan soluciones de enterotoxina control; en el centro se coloca el antisuero y en los 4 pozos restantes las soluciones problema (16)(51). Se formará una línea de precipitado que se unirá a la formada entre la toxina estándar y el anticuerpo específico (Figura 5). La sensibilidad de este método puede incrementarse hasta 100 ng/ml si se concentra el filtrado del cultivo de S.aureus (12).

d. Técnica de la Microplaca. Esta técnica es para la detección de cantidades pequeñas de enterotoxina en extractos de alimento concentrados o en filtrados de cultivos bacterianos producidos por estafilococos de toxicidad desconocida. La prueba se realiza sobre un portaobjetos, en él se colocan dos tiras de cinta negra, delimitando un área de 2 cm^2 , se adiciona una capa fina de agar y sobre ésta se coloca una placa de acrílico con 5 orificios (Figura 6).

El antisuero se coloca en el orificio central, la enterotoxina control y las muestras en los orificios de alrededor. La preparación se incuba a temperatura ambiente de 1 a 3 días, dentro de una caja de petri conteniendo algodón húmedo. Después de la incubación, se remueven las placas y se observan las líneas de precipitación con ayuda de iluminación oblicua y lente de aumento (11).

-  Enterotoxinas A, B y C
-  Antisueños aA, aB y aC
-  Muestras sin reacción

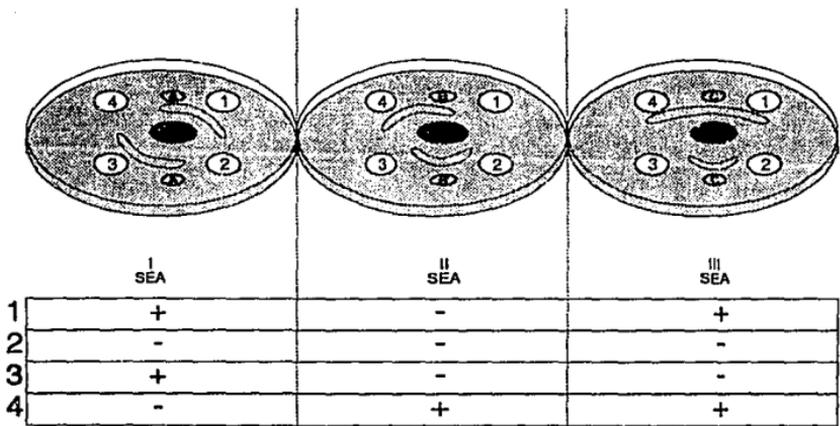


FIGURA 5. LINEAS DE PRECIPITACION EN OSP.

ch

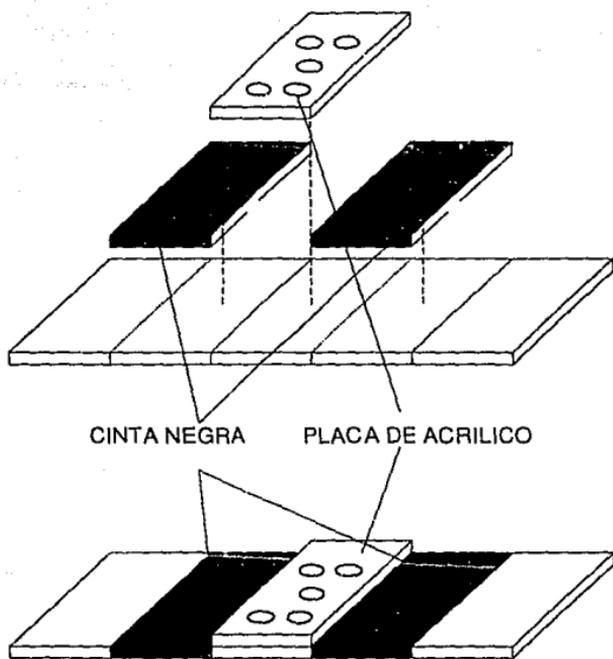


FIGURA 6. TECNICA DE LA MICROPLACA

La sensibilidad de este método puede llegar a ser de 50 a 100 ng/ml de sobrenadante de cultivo, teniendo un especial control en las concentraciones del antígeno. El uso de este método para extractos de alimentos solo es posible si existen previa extracción y concentración del mismo (12).

e. Inmunodifusión Radial Simple Modificado. Es muy útil para determinar la enterotoxigenicidad de varias cepas de S.aureus, por ejemplo cuando es necesario examinar 50 o 60 filtrados de cultivos bacterianos. Meyer y Palmieri desarrollaron el método de inmunodifusión radial simple, en donde solo 10 cepas podían examinarse al mismo tiempo. Sokari y Anozie (58), realizaron modificaciones para tener la posibilidad de analizar muchas cepas simultáneamente. Se realiza colocando en una caja de petri, agar-antisuero. Se dibuja en la base de la caja un cuadrículado de 1 cm² por cuadro. Se cortan pozos de 6-7 mm en el agar. En uno de los pozos se coloca la enterotoxina de referencia (0.5 µg/ml), mientras que los demás orificios se llenan con extractos o fluidos sobrenadantes de cultivos. La caja se incuba en cámara húmeda a 37°C durante la noche. Se revela con ácido fosfórico, formándose un halo de precipitación alrededor del pozo con evidencia positiva, al igual que alrededor de los pozos que hayan contenido enterotoxina homóloga con el antisuero presente. Mediante esta técnica Sokari y Anozie obtuvieron una sensibilidad de 0.5 µg/ml de enterotoxina y estimaron que la ventaja de este método reside no solo en la facilidad del análisis de 50 muestras al mismo tiempo, sino también en el ahorro de reactivos, ya que el análisis se realiza ocupando solo 10 ml de agar antisuero.

**1.4.3.2 METODOS DE ALTA SENSIBILIDAD PARA LA DE-
TECCION DE ENTEROTOXINAS EN ALIMENTOS.** La cantidad de enterotoxina presente en los alimentos envueltos en brotes de intoxicación puede variar considerablemente, de menos de 1 ng/g a más de 1 µg /g. Por lo que las enterotoxinas en alimentos deben ser detectadas por los métodos más sensitivos, debido a que se presentan brotes de intoxicación con alimentos que contienen menos de 1 ng/g de enterotoxina. Es esencial usar un método altamente sensitivo al determinar la seguridad en el consumo de cierto alimento, en el cual es necesario mostrar la ausencia total de enterotoxinas (8).

Estos métodos no requieren de concentración del extracto debido a su alta sensibilidad. Entre más sensitivo es el método de detección más simple será la extracción de la toxina a partir del alimento (12).

El método de extracción simple recomendado por el Dr. Merlin S. Bergdoll del Instituto de Investigaciones de Alimentos de la Universidad de Wisconsin, requiere una cantidad pequeña de alimento (5-10 g), la que se homogeniza en agua, se ajusta a pH 4.5 con ácido clorhídrico, se centrifuga y el sobrenadante se ajusta a pH 7.5. En caso de interferir la grasa, se extrae con cloroformo y se recentrifuga. De esta forma el extracto está listo para ser utilizado en los siguientes análisis de enterotoxina (12).

a. Prueba de Hemaglutinación Reversible Pasiva (RPHA). Este método es capaz de detectar 0.015 µg de enterotoxina/ml. Se basa en la sensibilización de eritrocitos de oveja con antienterotoxinas estafilocócicas.

Las células sensibilizadas se ponen en contacto con las soluciones de enterotoxina y se dejan durante 2 horas antes de determinar el grado de aglutinación (11).

Fue la primera técnica de alta sensibilidad para la detección de enterotoxinas en alimentos y parecía ser prometedora, pero es muy difícil eliminar las sustancias en los extractos de alimentos que producen hemaglutinación no específica, además no siempre es posible acoplar los anticuerpos a los glóbulos rojos (8).

b. Radioinmunoensayo. Este método se basa en el uso de enterotoxina pura tratada previamente con un elemento radioactivo, el ^{125}I . La muestra del alimento es tratada con anticuerpos específicos, seguida por la enterotoxina radioactiva (^{125}I -SEA). El complejo formado antígeno-anticuerpo se precipita adicionando células que contienen proteína A. Se centrifuga, obteniendo el precipitado que contiene el complejo, al cual se le determina la radiación emitida mediante un contador gamma, obteniéndose así la cantidad de enterotoxina iodada presente.

La cantidad de enterotoxina presente en la muestra del alimento se relaciona indirectamente con la cantidad de enterotoxina radioactiva presente, a menor radioactividad detectada, será mayor la cantidad de toxina presente (8).

Dickie y Murmtaz (18), determinaron que la presencia de una gran cantidad de material orgánico en los extractos de alimentos no interfiere con el

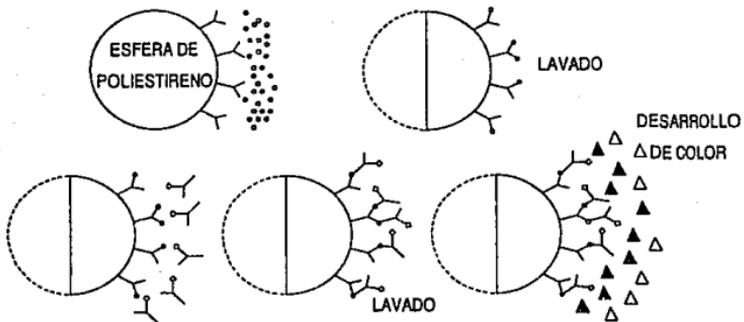
radioinmunoensayo (RIA). Esto explica el uso de un extracto libre de enterotoxina como blanco, en vez de solución buffer. La sensibilidad del ensayo es de 0.3 ng/ml, utilizando 10 µl como el mayor tamaño de muestra.

El uso de esta prueba se limita a solo unos cuantos laboratorios, debido a la necesidad de poseer los requerimientos básicos para el manejo de materiales radioactivos, un contador gamma, así como el uso de enterotoxinas purificadas (8)

c. Prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

El ensayo ELISA se basa en la preparación de un conjugado, mediante la unión de una enzima a la enterotoxina, o bien a la antitoxina, y depende del desarrollo de color por la reacción de la enzima con un sustrato adecuado. Generalmente, la enzima se une al anticuerpo, así la cantidad del conjugado enzima-anticuerpo es directamente proporcional a la cantidad de enterotoxina en el extracto del alimento (Figura 7). Entonces la cantidad de color desarrollado es una medida de la cantidad de toxina presente. Esto elimina la necesidad de usar enterotoxinas altamente purificadas (12).

Existen dos formas de elaborar esta prueba. La primera es sobre placas para microtitulación, de fondo redondo, a las cuales se adhieren los anticuerpos como fase estacionaria. Mediante esta forma de ensayo se pueden analizar muchas muestras con la facilidad de manejo de la microplaca y el uso de un espectrofotómetro para ELISA.



			
ANTICUERPO	ENTEROTOXINA	ENZIMA	SUSTRATO

FIGURA 7. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).

El segundo método desarrollado consiste en el uso de esferas de poliestireno, a las cuales se adhiere el anticuerpo. Este método es un poco laborioso si se requiere el análisis de varias muestras, ya que cada esfera se debe manejar separadamente. La principal ventaja es que se utiliza un volumen de muestra de 10-20 ml, entonces aumenta la cantidad de enterotoxina adsorbida por muestra, lo que hace posible el uso de volúmenes de sustrato de 1 ml y el color desarrollado se puede leer en un simple colorímetro, instrumento que comúnmente poseen los laboratorios (8).

Las enzimas utilizadas en este ensayo son la peroxidasa o la fosfatasa alcalina, utilizándose como sustrato para-nitrofenilfosfato, obteniendo mediante la reacción enzimática p-nitrofenol, compuesto de color amarillo (15)(28).

Freed, Evenson, Reiser y Bergdoll (21) realizaron una investigación para el análisis de enterotoxinas en alimentos, comparando ambas técnicas, en placa y con esferas. Mencionan que el sistema de esferas puede utilizar un colorímetro para medir absorbancia. Determinaron que fue más sensitivo el sistema de esferas que el de placa, por lo que lo recomiendan cuando se necesite detectar concentraciones bajas de toxina. Los límites de detección calculados en la curva estándar y en los controles positivos fueron consistentemente menores a 1 ng/g. El ELISA requiere solo del equipo estándar de laboratorio.

Kauffman (28) realizó una comparación de la técnica de EIA (Enzyme Immunoassay) en placa y el radioinmunoensayo. Menciona como desventajas del RIA la vida media limitada del ^{125}I , factores de daño radioactivo,

agregación de la proteína marcada, pérdida de inmunorreactividad. Además de las licencias y requerimientos de seguridad para el uso de material radioactivo. Determinó que la sensibilidad del EIA es de 2 ng/ml y es muy útil en la detección de enterotoxinas en extractos de alimentos. El rango de operación es de 1-100 ng SE/ml. La precisión y sensibilidad del EIA se compara favorablemente con el RIA. El uso de una enzima para reemplazar al ^{125}I sin pérdida de ventajas en el análisis hace del EIA una útil alternativa para el RIA en cuanto a seguridad en el laboratorio y economía de operación.

Saunders y Bartlett (55), reiteran la factibilidad de uso de ELISA y lo presentan como un método simple y sensitivo para la determinación de enterotoxinas. Resaltan la facilidad de elaboración del extracto del alimento, debido a que al igual que en el RIA, la presencia de material orgánico no interfiere con el análisis, eliminándose todos los pasos de purificación y concentración del extracto necesarios para los métodos en gel.

d. Técnica de RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination). El método RPLA se basa en la cobertura de partículas de látex con anticuerpos específicos, seguido de la adición del extracto del alimento. Si existe la presencia de enterotoxinas en el extracto, las partículas de látex se aglutinarán. Este procedimiento se realiza en placas para microtitulación, de poliestireno con fondo en "V". La reacción se observa visualmente (Figura 8) (12).

Es de sensibilidad adecuada para la detección de enterotoxinas en alimentos implicados en brotes de intoxicación (8). Desafortunadamente se

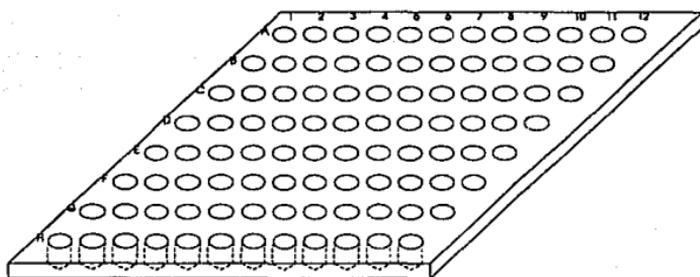


FIGURA 8. PLACAS DE MICROTITULACION PARA RPLA.

presentan reacciones de aglutinación no específicas y para poder utilizar el RPLA se debe demostrar que no existan este tipo de reacciones mediante controles positivos (12). Park y Szabo (36) evaluaron el método y determinaron que no hubo reacciones no específicas en los extractos obtenidos de varios alimentos; utilizando el SET-RPLA comercial determinaron una sensibilidad de 0.25 ng/ml para la SEA, SEB, SEC Y SED.

El método RPLA tiene una alta especificidad y sensibilidad; requiere del método de extracción simple; es rápido, debido a que se obtienen resultados en menos de 24 horas; es semicuantitativo y no requiere de equipo de precisión para la lectura de resultados (36).

La especificidad del RPLA debe examinarse rutinariamente con enterotoxinas estándar y extractos libres de ellas. Rose, Banks y Stringer (52), determinaron que las reacciones no específicas, cuando se obtienen resultados falso-positivos en los controles se pueden eliminar mediante la adición de hexametáfosfato sódico 10 mM. Encontraron este tipo de reacciones en quesos. El uso de cuajo durante su manufactura se asocia con la aparición de aglutinaciones no específicas en los extractos diluidos de queso y no en el extracto como tal.

1.5 QUESOS FRESCOS.

La leche es un alimento rico en nutrientes, posee agua aproximadamente en un 85%, sales minerales, lactosa, grasa en emulsión, vitaminas y proteínas en solución coloidal. Las proteínas presentes en la leche son la caseína, albúmina y globulina, entre otras, siendo la primera el principal constituyente y materia prima en la elaboración de quesos (32)(43).

Este alimento constituye un excelente sustrato para el desarrollo de microorganismos, pudiendo proliferar rápidamente en ella y provocar transformaciones deseables (producción de quesos madurados y leches acidificadas bajo control microbiológico) e indeseables (contaminación por proliferación de microorganismos) (32).

Los derivados lácteos comprenden varios alimentos perecederos, siendo los principales: cremas, quesos, leches acidificadas, helados y mantequillas. Los quesos son alimentos producidos a partir de leche, por la acción del cuajo; pueden ser frescos o madurados en forma natural, por adición de cultivos bacterianos o de hongos. Son alimentos que además de reunir todos los elementos nutritivos y las condiciones de humedad para el desarrollo de muchos microorganismos, generalmente se exponen a diversas fuentes de contaminación durante su producción, almacenamiento y expendio. Por lo anterior el control microbiológico de los mismos es muy importante para evaluar las condiciones higiénicas en que fueron producidos, la eficiencia de los procesos a que fueron sometidos, determinar la vida útil del producto y los

posibles riesgos al consumidor; en vista de su amplia distribución y consumo, ya que son ingeridos en forma directa y sin tratamiento previo (37).

El queso es un alimento universal, que se produce en casi todas las regiones del globo a partir de leche de diversas especies de mamíferos. Los quesos se encuentran entre los mejores alimentos del hombre, no solamente en razón de su acusado valor nutritivo (materias nitrogenadas bajo diferentes formas, materias grasas, calcio, fósforo, etc.), sino también en razón de las cualidades sensoriales extremadamente variadas que poseen.

El Laboratorio Nacional de Salud Pública, establece los procedimientos analíticos que se requieren para el control sanitario y de vigilancia epidemiológica en alimentos y bebidas, con una serie de publicaciones relativas a esta área. En el caso de los quesos establece su control microbiológico mediante las determinaciones de mesofílicos aerobios, organismos coliformes, número más probable de coliformes fecales, hongos y levaduras. Y principalmente en el caso de quesos frescos la cuenta de Salmonella y Staphylococcus aureus, determinando a éste último las pruebas de coagulasa y termonucleasa (37)(38).

Las bacterias patógenas que llegan a estar presentes proceden del hombre y del animal mismo. La mayoría de éstas no provocan modificaciones sensibles en la leche, debido a que su proliferación no es tan grande como las bacterias que producen descomposición del producto y solamente se descubren por medio de análisis bacteriológicos (32).

Bennet y Amos (5) encontraron que el S.aureus, además de poseer la capacidad de crecer en productos tipo queso, también puede producir enterotoxinas. Remarcan la importancia de manejar buenas condiciones de almacenamiento, así como indicar en las etiquetas de dichos productos que deben permanecer en refrigeración para una buena conservación.

Al ser un alimento de gran consumo en todo el mundo, una gran parte de los brotes de intoxicación estafilocócica han sido provocados por quesos manejados en condiciones sanitarias y de conservación deficientes, de ahí la importancia de la determinación de enterotoxinas en estos productos(37).

En México se realizaron estudios en el Instituto Politécnico Nacional, en los cuales Reyes y colaboradores (48), encontraron que los tipos inmunológicos de enterotoxinas producidas por cepas de S.aureus aisladas de quesos fueron el A y el D. Determinando que los manejadores de alimentos desempeñan un papel importante en las contaminaciones provocadas por este microorganismo.

Cualquier queso que haya sido contaminado con S.aureus, aún presentando cuentas muy bajas, es potencialmente peligroso, ya que al encontrar en cualquier momento las condiciones adecuadas para su desarrollo y producción de enterotoxina pueden transformarse en un riesgo real y provocar intoxicaciones de origen alimentario. O por el contrario, si la leche ha sido contaminada con S.aureus y mantenida bajo condiciones deficientes de refrigeración antes de su pasteurización y procesamiento, el queso resultante es un

alimento dañino, debido a la inminente presencia de las enterotoxinas producidas (8)(48).

Read y colaboradores (45), aplicaron los métodos de difusión simple y doble en gel, con concentración del extracto obtenido de quesos, en los cuales determinaron la concentración de enterotoxina, llegando a una sensibilidad del método de 0.02 a 0.05 μg de enterotoxinas A y B respectivamente, al trabajar con una muestra de 100 g.

Estudios de importancia realizados por Donnelly y colaboradores (19), determinaron utilizando los métodos de difusión simple y doble y la técnica de la microplaca, que la enterotoxina A es producida por un gran porcentaje de S.aureus aislados de quesos.

Zehren y Zehren (60), examinaron grandes cantidades de quesos sospechosos de contener enterotoxina A por el método de la microplaca. Encontraron en el lote de mayor toxicidad, concentraciones de aproximadamente 12 g de enterotoxina A por 100 g de queso.

1.6 JUSTIFICACION.

En el control sanitario de alimentos, cuando al investigar la posible enterotoxigenicidad de cepas de S.aureus aisladas de los mismos, resultados negativos de las pruebas de coagulasa y termonucleasa, comúnmente utilizadas para tal fin por su elevada correlación con la síntesis de toxinas, no aseguran la ausencia de éstas.

Para disminuir el riesgo de envenenamiento, es necesario detectarlas directamente en el alimento por métodos altamente sensibles como los serológicos, ya que se sabe que el ingerir un alimento con una concentración de 1 ng/g es suficiente para causar intoxicación. Sin embargo, actualmente estos métodos sólo se utilizan con propósitos de investigación.

Por otra parte, por las características fisicoquímicas de las toxinas estafilocócicas, en muchos de los procesos de transformación de los alimentos no ocurre su eliminación, de ahí la importancia de seleccionar un método de detección con sensibilidad adecuada y de respuesta rápida.

La finalidad del presente trabajo es proporcionar algunos elementos necesarios para realizar la detección de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos, mediante una investigación teórico práctica de los métodos de ELISA y RPLA, en relación a tiempo de elaboración del análisis, manejo de datos, preparación de las muestras, material necesario y sensibilidad de los mismos.

2. OBJETIVO.

Evaluar dos métodos serológicos para la cuantificación de enterotoxinas estafilocócicas en queso fresco Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) y Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA), en relación a precisión y factibilidad.

3. METODOLOGIA.

3.1 ENTEROTOXINA A.

Se utilizó enterotoxina estafilocócica A en estado liofilizado, cruda, donada por el Dr. Merlin S. Bergdoll del Instituto de Investigaciones de Alimentos de la Universidad de Wisconsin.

Primeramente se elaboró una solución con 400 µg de enterotoxina A en buffer de fosfatos pH 7.4 con 0.9% de cloruro de sodio (PBS). De ésta se partió para la preparación de las soluciones de distintas concentraciones: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.1563 ng, para su utilización en la curva estándar.

3.2 ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE ENTERA EN POLVO.

Para evaluar la calidad sanitaria de la leche en polvo, materia prima fundamental en la elaboración de los quesos, fue necesario someterla a análisis microbiológico. Se realizaron determinaciones de mesofílicos aerobios totales, coliformes totales y aislamiento e identificación de S.aureus, este último por la técnica de Van Doorne (37)(38).

3.3 METODOS DE CUANTIFICACION DE ENTEROTOXINA.

3.3.1 ENZIME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).

Los anticuerpos, en este caso antitoxina estafilocócica, se adhieren a un material de soporte, usualmente por adsorción directa en una superficie plástica; se ha utilizado poliestireno, polipropileno y cloruro de polivinilo (30). En esta investigación se emplearon esferas de poliestireno, como fase estacionaria, que contenían antitoxina estafilocócica A adsorbida en su superficie (15).

Los materiales y reactivos necesarios para realizar la técnica ELISA fueron donados por el Dr. Merlin S. Bergdoll del Instituto de Investigaciones de Alimentos de la Universidad de Wisconsin.

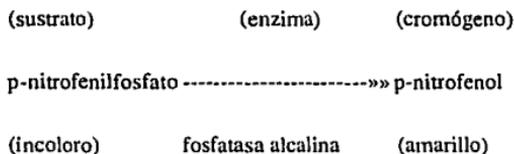
El método señala las siguientes operaciones: la muestra sospechosa de contener enterotoxina, se pone en contacto con las esferas de poliestireno (20 ml de muestra en un frasco, agregando una esfera sensibilizada con antitoxina A), incubándose a temperatura ambiente y agitación controlada (15). Períodos de incubación largos (aproximadamente 12 horas) se utilizan para asegurar una máxima sensibilidad (30).

Se realiza un lavado utilizando una solución de NaCl-tween (0.1% de tween "20" en una solución 0.14 M de NaCl). EL uso de tween "20" es para minimizar la adsorción no específica en sitios libres no cubiertos por el

anticuerpo, es entonces un agente de bloqueo, elimina las partículas no adheridas, así como las partículas no específicas que se han unido a los sitios libres en la superficie de la esfera de poliestireno (30).

Después de la unión antígeno-anticuerpo, se expone la esfera a un complejo enzima-anticuerpo (15). Las enzimas utilizadas son generalmente peroxidasa o fosfatasa alcalina, aunque también se ha empleado la β -amilasa. Las primeras dos son igualmente sensitivas para el ensayo (30). En este caso se utilizó la fosfatasa alcalina, con un período de incubación de 6 horas, a temperatura ambiente y en reposo, en el cual dicho complejo enzima-anticuerpo se une al antígeno, como se muestra en la figura 7.

En este punto el segundo lavado, realizado con solución NaCl-tween, tiene la función de eliminar el exceso de conjugado enzima-anticuerpo que no ha reaccionado con el antígeno-anticuerpo adheridos a la fase estacionaria. Posteriormente se agrega el sustrato propio de la enzima, en este caso para-nitrofenilfosfato y se permite el desarrollo del cromógeno, dejándose reaccionar durante una hora (Figura 9). La intensidad del color obtenido se mide en el espectrofotómetro (405 nm). Para detener la reacción enzimática se adicionan 100 μ l de hidróxido de sodio 2N.



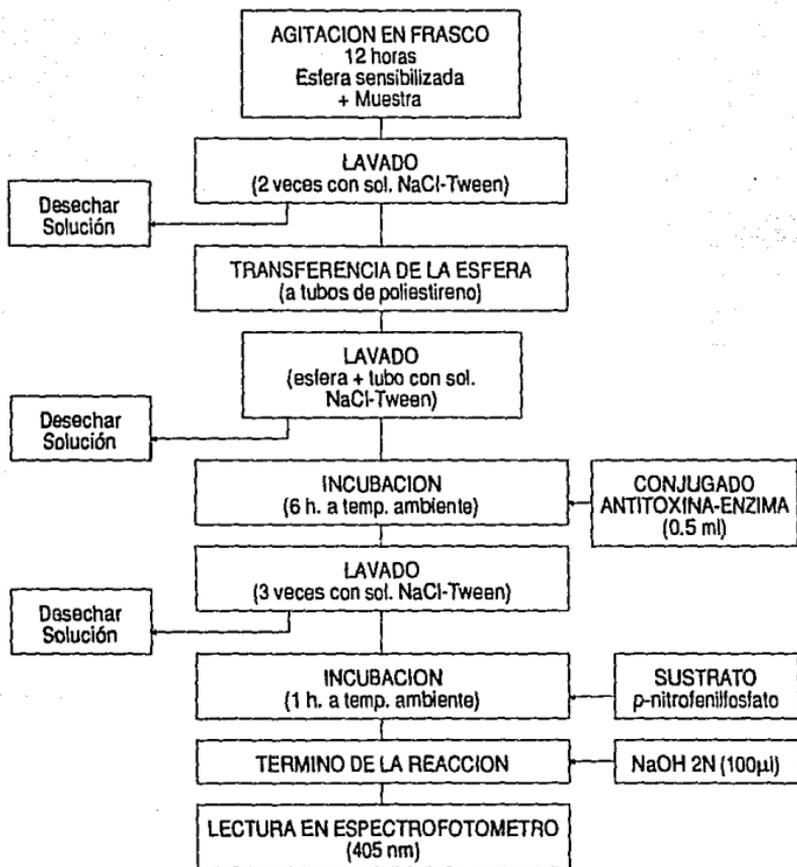


FIGURA 9. METODOLOGIA PARA ELISA.

3.3.2 REVERSED PASSIVE LATEX AGGLUTINATION (RPLA).

La reacción se basa en la capacidad de asociación de los antígenos con partículas demasiado grandes, para la formación de soluciones o suspensiones coloidales en los medios acuosos. Esas partículas (bacterias, eritrocitos, partículas de látex, etc.) pueden quedar suspendidas en una solución salina y mezclarse con antisueros específicos. Se denomina reacción de aglutinación al fenómeno en que la mezcla de las partículas de antígeno con los antisueros específicos provoca una agrupación de dichas partículas antigénicas. Por lo general, la aglutinación puede apreciarse a simple vista.

La única diferencia entre una reacción de precipitación y otra de aglutinación, radica en el hecho de que los antígenos precipitantes son moléculas pequeñas, en tanto que los antígenos aglutinantes están asociados con partículas de mayor tamaño (24).

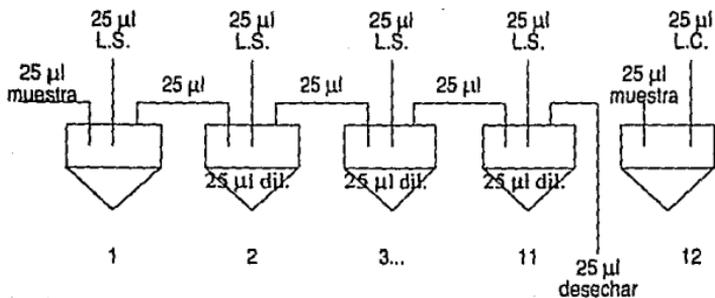
Al igual que las reacciones de precipitación, las pruebas de aglutinación requieren un pH apropiado y la presencia de amortiguadores salinos, para que sean estables los complejos formados con el antígeno y el anticuerpo. Además debe existir una proporción adecuada del antígeno respecto del anticuerpo para que ocurra la óptima combinación cruzada de la enterotoxina con su antitoxina respectiva (24).

Los reactivos de látex, así como el diluyente utilizados en esta prueba fueron donados por Denka Seiken del Japón, mediante la intervención del Dr. Bergdoll del Instituto de Investigaciones de Alimentos de la Universidad de Wisconsin.

Se utilizaron placas para microtitulación de poliestireno, con fondo en "V" para el ensayo de aglutinación. Se empleó una línea de 12 pozos para cada ensayo. El diluyente actuó como amortiguador salino, introduciendo 25 μ l de éste en los pozos destinados a las diluciones sucesivas (pozos número 2 al 11). Se adicionaron 50 μ l de la muestra en el primer pozo, del cual se tomaron 25 μ l para pasarlos al segundo pozo. Después de homogenizar, se tomaron 25 μ l del segundo pozo y se transfirieron al tercero, continuando así sucesivamente hasta llegar al pozo número 11. de éste último, después de homogenizar, se eliminaron 25 μ l con el fin de igualar volúmenes en todos los pozos. Al pozo número 12 se adicionaron directamente 25 μ l de la muestra (Figura 10).

Los reactivos de látex se agitaron para lograr una suspensión homogénea. Se procedió a agregar 25 μ l del látex sensibilizado, con antitoxina estafilocócica A, a todos los pozos conteniendo muestra, excepto al pozo número 12, en el cual se agregó el mismo volumen de látex control, no sensibilizado con antitoxina estafilocócica A, como control negativo.

También se manejaron los siguientes controles para verificar el funcionamiento de los reactivos, así como la especificidad de la prueba: Control positivo.- solución de enterotoxina A, en presencia de látex sensibilizado.



L.C. LATEX CONTROL
L.S. LATEX SENSIBILIZADO

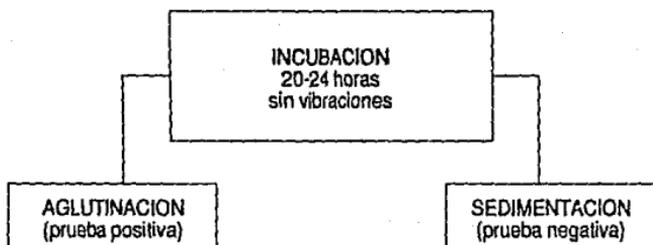


FIGURA 10. METODOLOGIA PARA RPLA.

Control negativo (1).- solución de enterotoxina A, en presencia de látex control.
Control negativo (2).- diluyente, en presencia de látex sensibilizado. Control negativo (3).- diluyente, en presencia de látex control.

Las preparaciones de la microplaca se homogenizaron al terminar de agregar los reactivos para una mejor distribución de éstos y de las muestras. Se dejaron en reposo en una superficie libre de vibraciones y a temperatura ambiente. Los resultados se leyeron a simple vista después del tiempo de incubación de 20 a 24 horas, obteniéndose como resultado positivo una aglutinación de los reactivos de látex en el seno del líquido y como negativo una sedimentación del látex (56)(52). Es un ensayo semicuantitativo debido a que se puede observar el nivel de aglutinación del látex. A medida que va aumentando la dilución, la aglutinación va siendo menor (36).

3.4 CURVA ESTANDAR.

Se preparará una curva estándar para cada método (ELISA y RPLA), para poder determinar cuantitativamente la relación entre la concentración de enterotoxina A con la lectura del espectrofotómetro en el caso del ELISA; y en el caso del RPLA, semicuantitativamente, con el grado de aglutinación del látex (45).

Las soluciones se sometieron a los mismos procedimientos ya indicados para las muestras en las Técnicas de ELISA y RPLA (15)(56).

En el caso del ELISA los logaritmos de las concentraciones conocidas y de las lecturas de absorbancia a 405 nm, tienden a presentar una correlación lineal. Ajustando los datos obtenidos por medio del método de mínimos cuadrados se obtiene la línea recta. Basándose en esta curva estándar se extrapolan los datos obtenidos con las lecturas de absorbancia de las muestras problema y así se conocen las concentraciones de enterotoxina presentes en éstas. La curva se realizó por triplicado, utilizando como blanco buffer de fosfatos con pH 7.4 y 0.9% de cloruro de sodio.

En el método RPLA los resultados se obtienen mediante lectura a simple vista. La reacción que se observa, es la aglutinación del látex. Si no hay enterotoxina presente, las partículas de látex sedimentarán sin haber reaccionado; gradualmente conforme vaya aumentando la concentración de enterotoxina, la reacción de aglutinación se va presentando, pudiendo observarse una aglutinación y enturbiamiento en el seno del líquido. Se califica como negativo

en el caso de no haber reacción alguna, con un si la reacción se encuentra entre el límite de positivo-negativo; cuando la aglutinación va aumentando gradualmente, los resultados se califican con: +, ++ y +++ cuando es totalmente positiva (56).

3.5 ELABORACION DE TRATAMIENTOS.

3.5.1 CONCENTRACIONES DE ENTEROTOXINA A INOCULADAS.

Leche entera en polvo reconstituída a 33.77% de sólidos (130g:300ml), fue inoculada con enterotoxina A (SEA) en cantidades de 2000, 700 y 200 ng. Un lote no se inoculó, para ser utilizado como blanco. A partir de esta leche se elaboraron quesos frescos por vía enzimática. Se eligió este intervalo de concentraciones de toxina para asegurar una cantidad menor de 1 ng/g de queso, en un tratamiento, cantidad que ha sido informada como suficiente para causar intoxicación (Cuadro 4).

CUADRO 4. ELABORACION DE TRATAMIENTOS.

PRODUCTO:
Queso Fresco.

TRATAMIENTO	LECHE ENTERA EN POLVO (g)	AGUA PARA LA RECONSTITUCION (ml)	INOCULACION DE ENTEROTOXINA A (ng)
1	130	300	2,000
2	130	300	700
3	130	300	200
4	130	900	2,000

Por otro lado, con el objeto de conocer la distribución de la toxina en el queso y en el suero, se hizo un tratamiento adicional, donde se inocularon 2000 ng de la toxina en la leche reconstituída a 13.20% de sólidos (130 g de leche en 900 ml de agua), así como su blanco respectivo.

Cabe señalar que se eligió la toxina A porque de acuerdo a estudios realizados por Bergdoll y colaboradores, es la que se encuentra más frecuentemente involucrada en brotes de intoxicación alimentaria (8).

3.5.2 METODO DE ELABORACION DE LOS QUESOS FRESCOS.

Se utilizó un método estándar por vía enzimática para elaborar los quesos frescos. En éste se reconstituyó la leche entera en polvo, a 70°C, para facilitar su disolución (Figura 11). Con la finalidad de ayudar a la formación de la cuajada, se fijó una concentración de sólidos, 33.77% a través de la mezcla de 130 g de leche entera en polvo con 300 ml de agua, a excepción del tratamiento No. 4 en el que 130 g de leche en polvo se reconstituyeron en 900 ml de agua, obteniéndose un 13.20% de sólidos.

De las disoluciones de enterotoxina estafilocócica A mencionadas en el punto 3.5.1 se tomaron las cantidades necesarias para las inoculaciones, que se realizaron en la leche reconstituída a 40°C (10). Posteriormente se adicionó el cloruro de calcio (0.2 g) y el cuajo (0.5 ml). Después de 20 minutos, período en el que transcurrió la coagulación, se cortó la cuajada, en cubos de aproximadamente 1 cm³. El salado se llevó a cabo adicionando NaCl (3% en

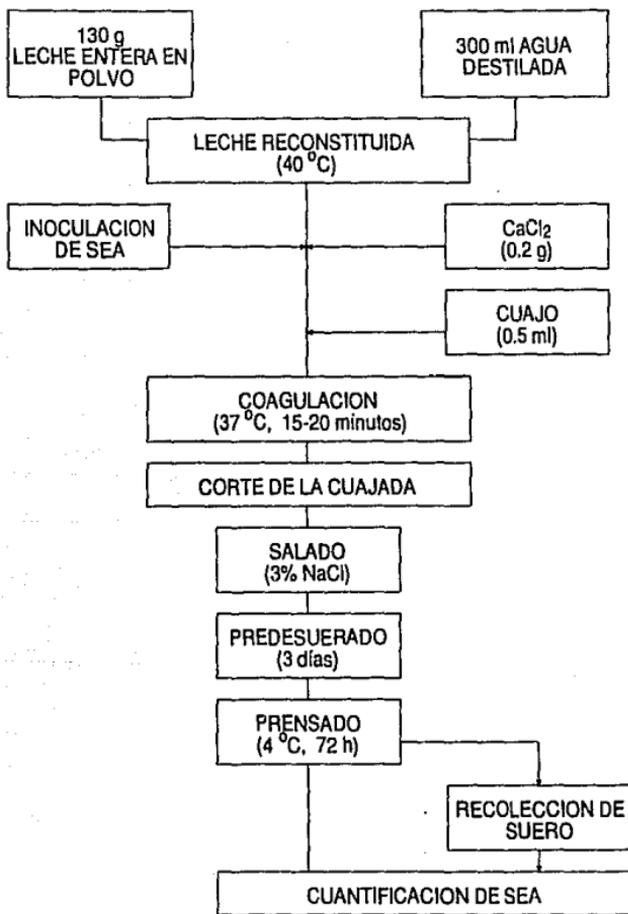


FIGURA 11. METODO DE ELABORACION DE QUESO FRESCO.

el producto). Un desuerado inicial eliminó aproximadamente el 70% del suero. Para el prensado y desuerado final, los quesos se dejaron en moldes durante 72 h, bajo refrigeración. El suero se recolectó para la cuantificación de enterotoxina A.

Las inoculaciones de SEA realizadas en la leche fueron de 2000, 700 y 200 ng. También se elaboró un queso sin inocular para utilizarse como blanco.

3.6 EXTRACCION SIMPLE DE ENTEROTOXINA EN LOS QUESOS.

La enterotoxina, hidrosoluble, se extrajo del queso homogenizando una muestra de 50 g en 75 ml de agua. Posteriormente se adicionó ácido clorhídrico para ajustar la mezcla a pH 4.5. Se centrifugó para separar la caseína precipitada. El pH del sobrenadante se ajustó a 7.5 con NaOH 2N, centrifugando una vez más en caso de formación de precipitado. Siguiendo con el tratamiento del sobrenadante, la grasa se extrajo con cloroformo (1ml/10ml de extracto) (Figura 12). La fase acuosa obtenida, conteniendo la enterotoxina, es llamada extracto del alimento y se utilizó en los métodos de cuantificación de enterotoxina. En el suero la determinación se hizo directamente. Se nombrará como muestra en general, al extracto del alimento y al suero que se sometieron a las pruebas de determinación de enterotoxina (8)(15)(56).

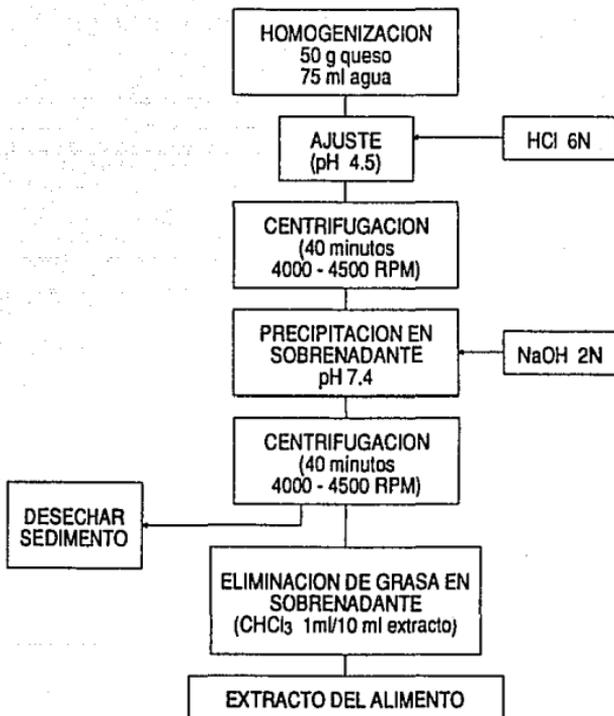


FIGURA 12. EXTRACCION SIMPLE DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCOGICA

ht

3.7 CUANTIFICACION DE ENTEROTOXINAS EN QUESOS Y SUEROS.

Esta operación se realizó por las técnicas de ELISA y RPLA, en los quesos y sus sueros respectivos. En el caso del queso, las muestras de 50 g se sometieron a extracción simple. En los sueros la toxina se cuantificó en forma directa, utilizando volúmenes de 20 ml.

Las determinaciones de toxina por el método de ELISA, se realizaron en los extractos del queso y en los sueros sin llevar a cabo diluciones. En la técnica RPLA se hicieron 11 diluciones 1:1, para fines comparativos con los estándares utilizados.

Los resultados obtenidos en la aglutinación del látex, fueron interrelacionados con los de ELISA, a través de la curva estándar y los resultados de los extractos y sueros determinados por esta técnica.

4. RESULTADOS.

92

4.1 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE ENTERA EN POLVO.

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico fueron acordes a los establecidos por la norma oficial que rige a este tipo de alimento (33).

S.aureus, microorganismo de interés en el desarrollo de este trabajo, estuvo ausente. De esta manera se aseguró la confiabilidad en los resultados de cuantificación de toxina A, por los métodos de ELISA y RPLA, altamente sensitivos. Puesto que un crecimiento de S.aureus enterotoxigénico en los quesos y sueros, hubiera interferido en dichas determinaciones.

4.2 CURVA ESTANDAR.

4.2.1 METODO ELISA.

Este ensayo se basa en la reacción de un conjugado enzima-antitoxina con el antígeno específico. Siendo este último acomplejado en forma previa con el anticuerpo adsorbido a una esfera de poliestireno. A este sistema, se une el conjugado enzima-antitoxina; es por esto que el método ELISA se conoce como "sandwich". El desarrollo de color, a través del cual se cuantifica directamente el antígeno, depende de la reacción de la enzima con un sustrato que permita la formación de un agente cromógeno, cuya detección se realiza espectrofotométricamente (8).

En este método cuantitativo, se obtuvo una recta al graficar los logaritmos de las absorbancias y las concentraciones respectivas de las soluciones de enterotoxina A preparadas (Cuadro 5) (Figura 13). Los resultados por presentar una correlación lineal, se ajustaron por el método de mínimos cuadrados, siendo el factor de correlación determinado de 0.999 (22)(49). La ecuación de la recta fue:

$$y = 1.8713 X + 0.4859$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO 5. TABULACION DE DATOS DE LA CURVA
ESTANDAR POR EL METODO DE ELISA.

SOLUCIONES DE CONCENTRA- CION CONOCIDA	ABSORBAN CIA DE LAS SOLUCIONES 405 nm	DIFERENCIA DE LA ABSORBAN CIA Y EL BLANCO (PBS 0.209)	X LOG ABS.	Y LOG CONC.
0.1563	0.456	0.2470	-0.6073	-0.8060
0.3125	0.503	0.2940	-0.5317	-0.5051
0.6250	0.640	0.4310	-0.3655	-0.2041
1.2500	0.828	0.6190	-0.2083	0.0969
2.5000	1.250	1.0410	0.0175	0.3979
5.0000	1.507	1.2980	0.1133	0.6990
10.000	1.787	1.5780	0.1981	1.0000

LOG CONCENTRACION

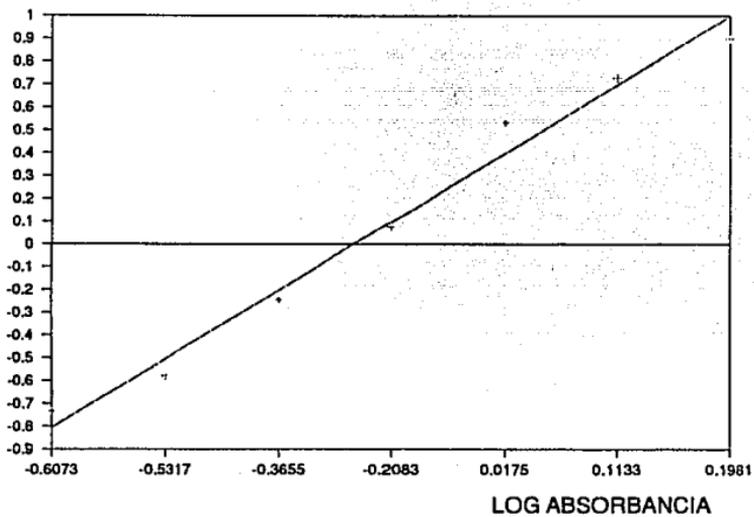


FIGURA 13. CURVA ESTANDAR
 $Y=1.8713 X + 0.4859$

4.2.2 METODO RPLA.

En un ensayo de aglutinación normal, el anticuerpo soluble reacciona con el antígeno particular, produciéndose una aglutinación. En el efecto opuesto, reacción reversible, caso del método Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA), el anticuerpo está unido a partículas de látex que no intervienen directamente, consideradas como pasivas. El anticuerpo así acompañado, reacciona con el antígeno soluble, resultando una reacción de aglutinación del látex, a través de la formación de una estructura reticular (56). El grado de aglutinación, es directamente proporcional a la cantidad de enterotoxina presente en la muestra a analizar.

Al aplicar el método de RPLA a las soluciones de concentración conocida de SEA, se apreciaron distintos grados de aglutinación de látex que, fueron calificados en un rango de: +++, ++, + y +/- (Figura 14). Esta clasificación varía en orden decreciente a la cantidad de toxina presente, siendo: - (negativo), indicativo de ausencia.

Las apreciaciones visuales se relacionaron con las concentraciones de enterotoxina correspondientes, obteniendo una gráfica de tipo tabular (Figura 15). En ésta puede observarse que diferentes soluciones estándar mostraron la misma respuesta de aglutinación: 2.5, 5.0 y 10.0 ng/ml, +++; 0.625 y 1.25 ng/ml, ++; 0.1563 y 0.3125, +. Por lo tanto, este método permitió establecer únicamente rangos de concentración de toxina. Es importante señar

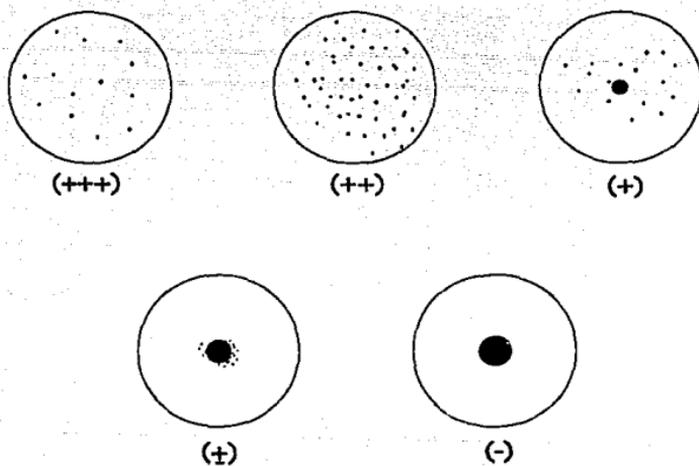


FIGURA 14. GRADOS DE AGLUTINACION DE LATEX

lar, que logró detectarse una concentración de 0.1563 ng/ml, valor inferior al informado como límite de sensibilidad (0.25 ng/ml) (36).

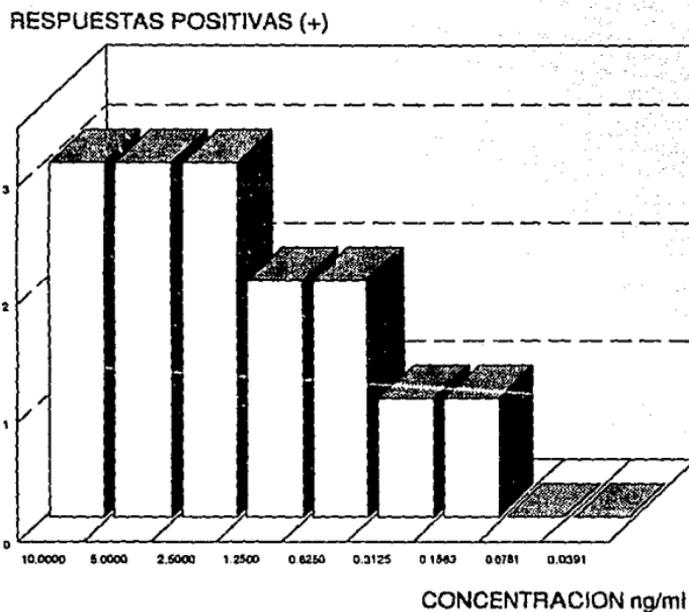


FIGURA 15. CURVA ESTANDAR POR RPLA

4.3 CUANTIFICACION DE ENTEROTOXINA A EN LOS QUESOS Y SUEROS.

4.3.1 PESOS DE LOS QUESOS Y VOLUMENES DE LOS SUEROS.

Con el fin de determinar la distribución y el índice de recuperación de la toxina en la elaboración de los diferentes tratamientos, se determinaron los pesos de los quesos correspondientes a cada uno de ellos, así como los volúmenes de sus sueros respectivos (Cuadro 6). En este cuadro, puede observarse que valores elevados de concentración de sólidos en la leche inicial, repercutieron en un aumento de rendimiento en el queso, evaluado a través del peso de producto.

Lo anterior puede apreciarse en los dos tratamientos en los que se inocularon 2000 ng de toxina en la leche inicial. En el primer caso, 130 g de leche en polvo se reconstituyeron en 300 ml de agua, obteniéndose 264.6 g de queso; en el segundo caso, la reconstitución se realizó en 900 ml de agua, presentando el producto un peso de apenas 163.0 g. Este fenómeno se debe al favorecimiento de las fases que conllevan a la coagulación de la caseína, a través de la acción de una enzima proteolítica, como la quimosina. En la primera etapa se realiza una hidrólisis de esta proteína y la segunda involucra la agrupación de moléculas de las diferentes clases de caseína, con la formación de una estructura reticular, dentro de la cual se encuentran atrapados grasa y lactosuero. La existencia de menor proporción de medio de suspensión, propi-

cia ambas fases, además de prevenir la disolución de una fracción de esta proteína (32).

CUADRO 6. CARACTERISTICAS DE LOS QUESOS, SUEROS Y EXTRACTOS.

INOCULACION INICIAL EN LECHE (ng SEA/ml leche)	MUESTRA	PESO (g)	VOLUMEN (ml)
000-BLANCO	QUESO	272.5	
	SUERO	106.1	99.0
	EXTRACTO	79.3	78.0
2,000	QUESO 1	264.6	
	SUERO	136.0	129.0
	EXTRACTO	60.5	60.0
700	QUESO 2	275.8	
	SUERO	117.3	110.9
	EXTRACTO	73.9	72.9
200	QUESO 3	248.8	
	SUERO	121.0	119.0
	EXTRACTO	74.1	73.0
2,000	QUESO 4	163.0	
	SUERO	598.3	597.5
	EXTRACTO	94.2	94.0

4.3.2 EXTRACCION DE ENTEROTOXINA.

Para la detección de enterotoxina A en los quesos obtenidos en cada tratamiento, se aplicó en forma previa el método de extracción simple de enterotoxina, establecido por Bergdoll y Cols (12). La implementación de este método representa un considerable ahorro en reactivos y tiempo, siendo necesarias únicamente 3 h para su desarrollo. Esto contribuye en gran medida, a acortar los tiempos de análisis en la determinación de enterotoxinas estafilocólicas.

Por el contrario, el método propuesto por Reiser y Cols (47), tradicionalmente usado en la detección de toxina por las técnicas de difusión en gel, requiere de un proceso complicado que involucra varias centrifugaciones a 4°C, extracciones, ajustes de pH, tratamiento con resina, filtrados, diálisis y liofilizado.

En esta investigación fue posible aplicar el método de extracción simple en las muestras del alimento, debido a la elevada sensibilidad de las técnicas, de ELISA y RPLA, usadas en la detección de enterotoxina. Se ha informado que en estos casos no es necesaria la realización de operaciones consecutivas de concentración y purificación de los extractos (12).

4.3.3 CANTIDADES DE ENTEROTOXINA DETECTADAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

La aplicación del método de ELISA en las muestras, no requirió de diluciones para caer dentro del rango que comprendió la curva estándar, se realizó directamente en los sueros y extractos de los quesos obtenidos de cada tratamiento. Las concentraciones de enterotoxina A detectadas estuvieron dentro de las utilizadas en la determinación de la curva estándar (Cuadro 7).

Al comparar las concentraciones de toxina encontradas en los quesos de los tres primeros tratamientos, se observa una disminución progresiva en las mismas: 2.4881 ng/g en el primero, 1.6368 ng/g en el segundo y 0.1768 ng/g en el tercero. Esta reducción no siguió el mismo patrón determinado por las cantidades inoculadas en la leche (2000, 700 y 200 ng), puesto que en la elaboración del queso ocurren varios fenómenos que no son totalmente repetitivos, uno de ellos es precisamente la estructuración y reacomodo de la matriz proteínica, influyendo en gran medida sobre la retención del lactosuero y sus constituyentes.

CUADRO 7. RESULTADOS DEL METODO ELISA.

MUESTRA	INOCULACION INICIAL (ng)	CONCENTRACION DE SEA (ng/ml o g)	CANTIDAD DE SEA (ng)	PORCENTAJE DE SEA DETECTADO
QUESO 1	2,000			
Extracto		2.0734		
Queso		2.4881	658.3460	32.92
Suero		9.8360	1,268.8440	63.44
Total				96.36
QUESO 2	700			
Extracto		1.1226		
Queso		1.6368	451.4159	64.49
Suero		2.2285	247.1407	35.31
Total				99.80
QUESO 3	200			
Extracto		0.1211		
Queso		0.1768	43.9893	21.99
Suero		1.3047	155.2593	77.63
Total				99.62
QUESO 4	2,000			
Extracto		0.1436		
Queso		0.2700	44.0858	2.20
Suero		2.8802	1,720.9195	86.05
Total				86.25

Los sueros correspondientes a estos tratamientos mostraron una situación similar: 9.8360 ng de toxina A/ml en el primero, 2.2285 ng/ml en el segundo y 1.3047 ng/ml en el tercer caso. Apreciándose que en general, el suero presentó una mayor retención de toxina, debido al carácter hidrosoluble de esta proteína.

El porcentaje de toxina recuperada varió de 88.25 a 99.8%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Read y Cols (45), quienes al realizar un estudio sobre recuperación de enterotoxina estafilocócica en quesos, utilizando métodos de difusión en gel, lograron detectar en los productos el 97.9% de la toxina adicionada.

Para el desarrollo de la técnica de RPLA se hicieron de cada muestra 11 diluciones 1:1, con el fin de obtener a partir de alguna de ellas, una proporción adecuada entre las concentraciones del antígeno y el anticuerpo. Se ha informado que en este método esta relación es importante para el logro de una óptima combinación cruzada de las partículas reactivas. Dado que la cantidad de antisuero que cubre las moléculas de látex es constante, el uso de diluciones consecutivas en la muestra, la cual contiene el antígeno, regula la relación antes mencionada. Una igualación en las cantidades de anticuerpo y toxina se manifestó, en una disminución progresiva en el grado de aglutinación del látex. Este procedimiento permite una mejor aproximación a la cantidad real de enterotoxina presente, ya que asegura su reacción completa con una cantidad equivalente de antitoxina.

Al igual que las reacciones de precipitación, las pruebas de aglutinación requieren de un pH apropiado y la presencia de amortiguadores salinos, que coadyuven a la estabilidad de los complejos formados. Por lo anterior, en todos los casos se utilizó un buffer de fosfatos con pH 7.4.

Dado que los sueros y extractos de los quesos fueron sometidos a las técnicas de ELISA y RPLA, los valores obtenidos mediante la utilización de la primera, se compararon con el grado de aglutinación del látex, presentado en la determinación semicuantitativa de enterotoxina A por RPLA. Al utilizar como herramienta estadística los valores de la media más, menos tres veces la desviación estándar, se establecieron rangos de concentraciones de SEA correspondientes a los diferentes grados de aglutinación del látex (Cuadro 8). Aunque por la técnica de RPLA, no se pudo realizar la cuantificación de toxina en términos de valores puntuales, sí permitió establecer intervalos de concentración de este metabolito en los quesos y sueros.

CUADRO 8. COMPARACION DE DATOS OBTENIDOS POR ELISA Y RPLA

SEA INOCULADA (ng)	MUESTRA	ELISA	RPLA	RPLA RANGOS RELACIONADOS (ng/ml)
2,000	Queso 1	2.4881	++	0.5637-2.9782
	Suero 1	9.8360	+++	10.0000-3.0000
700	Queso 2	1.6368	++	0.5637-2.9782
	Suero 2	2.2285	++	0.5637-2.9782
200	Queso 3	0.1768	+	0.1211-0.5571
	Suero 3	1.3047	++	0.5637-2.9782
2,000	Queso 4	0.2700	+	0.1211-0.5571
	Suero 4	2.8802	+++	10.0000-3.0000

4.4 DISTRIBUCION DE ENTEROTOXINA A EN LA ELABORACION DE QUESO.

La cantidad de agua empleada en la reconstitución de la leche en polvo afectó la proporción de enterotoxina retenida en el queso. Al comparar la concentración de ésta en los quesos 1 (300 ml de agua) y 4 (900 ml de agua), se observa que en el primero se retuvo el 32.92% de SEA del total de toxina recuperada (Cuadro 9); en cambio en el segundo tratamiento, este valor disminuyó en forma drástica a 2.2% (Cuadro 10) (Figuras 16 y 17). Las cantidades de enterotoxina presentes en el suero variaron en forma inversa: 63.44 % de SEA para el primer caso y 86.05 para el segundo. Este fenómeno pone de relieve la elevada solubilidad de la toxina A en agua.

Los resultados anteriores concuerdan con lo informado por Read y Cols (45), quiénes estudiaron la distribución de enterotoxina B durante la elaboración de queso, obteniendo 7.78% en el producto y 87.36% en el suero.

**CUADRO 9. DISTRIBUCION DE ENTEROTOXINA A
DURANTE LA ELABORACION DEL QUESO No. 1**

MUESTRA	CARACTERISTICAS (pesos y volúmenes)	CONCENTRACION DE SEA (ng/ml o ng/g)	TOTAL DE SEA (ng)
Leche inicial	385.0 ml	5.1948	2,000.00
Suero	136.0 ml	9.8360	1,268.84
Queso	264.6 g	2.4881	658.35

	TOTAL de enterotoxina A detectada		1,927.19
	TOTAL de enterotoxina A inoculada en la leche inicialmente		2,000.00
	TOTAL de enterotoxina A no detectada		72.81
	Porcentaje de pérdida		3.64

**CUADRO 10. DISTRIBUCION DE ENTEROTOXINA A
DURANTE LA ELABORACION DEL QUESO No. 4**

MUESTRA	CARACTERISTICAS (pesos y volúmenes)	CONCENTRACION DE SEA (ng/ml o ng/g)	TOTAL DE SEA (ng)
Leche inicial	985.0 ml	2.0305	2,000.00
Suero	597.5 ml	2.8802	1,720.92
Queso	163.0 g	0.2700	44.09

	TOTAL de enterotoxina A detectada		1,765.01
	TOTAL de enterotoxina A inoculada en la leche inicialmente		2,000.00
	TOTAL de enterotoxina A no detectada		234.99
	Porcentaje de pérdida		11.75

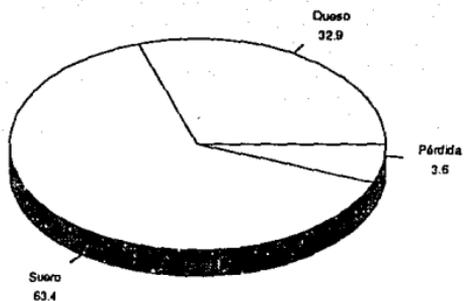


FIGURA 16. DISTRIBUCION DE SEA EN LA ELABORACION DEL QUESO 1

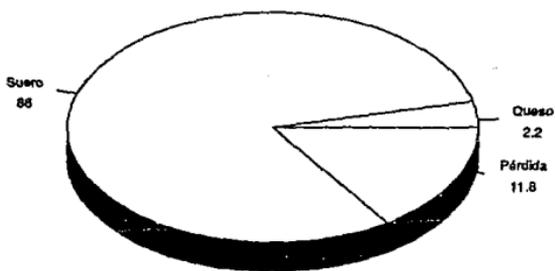


FIGURA 17. DISTRIBUCION DE SEA EN LA ELABORACION DEL QUESO 4

sb

4.5 COMPARACION ENTRE LOS METODOS DE ELISA Y RPLA.

4.5.1 MANEJO DE MUESTRAS.

En relación al volumen de las muestras, la técnica de RPLA requiere, para su desarrollo, de volúmenes muy pequeños, de apenas 25µl; en cambio en la técnica de ELISA se pueden usar volúmenes relativamente elevados, de alrededor de 20 ml.

Por lo antes mencionado, en el método de RPLA es necesario el uso de micropipetas o microjeringas, así como un minucioso manejo de los pequeños volúmenes de muestra, disolvente y reactivos de látex. No obstante esto permite el desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo en placas para microtitulación de fondo en "V" elaboradas con poliestireno, que facilitan el tratamiento simultáneo de un buen número de muestras, aproximadamente 8 por microplaca (56). Una vez que se tienen las soluciones problema y los reactivos de látex en la microplaca sólo resta esperar a que transcurra la fase de incubación, aproximadamente 20-24 h, para la lectura de los resultados.

En el método de ELISA, el utilizar un volumen elevado de muestra, permite la adsorción de una mayor cantidad de toxina a las esferas, siendo de esta manera más fácil su detección, aún cuando existan concentraciones muy bajas. Además, el volumen de muestra manejado en este método, es el adecuado para que al final de la reacción se pueda adicionar 1 ml del sustrato de la enzima, p-nitrofenilfosfato, volumen suficiente para que la intensidad del color desa-

rollado pueda ser registrado por un simple colorímetro y no a través de una lectora espectrofotométrica para microplaca (8).

En el método ELISA utilizado en esta investigación, es necesario el manejo de cada esfera por separado, por lo que el tratamiento de muestras es unitario y repercute en un mayor tiempo de preparación, aún cuando la lectura de resultados puede hacerse en 20-24 h como en el RPLA. También debe tomarse en cuenta que esta técnica comprende la realización de varios lavados e incubaciones sencillas.

4.5.2 SENSIBILIDAD.

Los límites de sensibilidad de los métodos de ELISA y RPLA han sido establecidos en 0.1 ng/g y 0.25 ng/g, respectivamente. Cabe resaltar el hecho de que mediante la utilización de la técnica RPLA, pudo detectarse en el extracto del queso No. 3, una aglutinación del látex calificada como +. En este extracto, al realizar la cuantificación de enterotoxina por el método de ELISA, se encontró una concentración de 0.1211 ng de enterotoxina A/ml, correspondiente a 0.1768 ng/g de queso. Por lo tanto la cantidad detectada por el método RPLA, fue menor a la establecida como límite inferior (15)(56).

En el caso del método de ELISA, la concentración mínima de enterotoxina cuantificada fue la misma, debido a que el queso No.3, constituyó la muestra con menor cantidad de este metabolito. Por lo tanto, la concentración más baja detectada fue superior a la informada como límite.

Al considerar que una cantidad tan pequeña como la de 1 ng de enterotoxina/g de alimento es suficiente para causar intoxicación, la sensibilidad de ambos métodos mostró ser adecuada para descartar un alimento que represente un riesgo sanitario potencial (8).

Aunque la aplicación del método de RPLA no permitió la obtención de valores puntuales de concentración de toxina, a través de éste sí se logró comprobar la presencia de enterotoxina A, aún en cantidades menores a las informadas como suficientes para causar una intoxicación alimentaria. Este método puede entonces ser útil en la inspección sanitaria de productos.

4.5.3 REACCIONES DE INTERFERENCIA.

En la cuantificación de enterotoxina A en los extractos de los quesos y los sueros, no se observaron resultados falso-positivos en los controles, los que consistieron en: a) extractos de los quesos y los sueros de los tratamientos en los que se inoculó toxina A, en presencia de látex control o una esfera de este tipo, de acuerdo al método aplicado; b) extracto y suero del queso control, sin enterotoxina, en contacto con látex o esfera sensibilizados con antitoxina A. En todos los casos la respuesta fue negativa. Esto indica que no hubo presencia de Proteína A en los extractos de los quesos y sueros, que interfiriera en la cuantificación de la toxina. Se ha informado que la Proteína A presenta una unión no específica con antitoxina estafilocócica, provocando un resultado falso-positivo. La presencia de esta proteína ha sido evidenciada por Koper y Cols. y por Rose y Cols. en filtrados obtenidos de cultivos de S.aureus (29)(52).

En el método RPLA, cuando los resultados del pozo que contiene látex control en presencia de muestra sospechosa de ser enterotoxigénica dan positivos, la reacción debe ser invalidada debido a la sospecha de una aglutinación no específica (52)(56).

De igual modo en el método de ELISA para detectar reacciones de interferencia, se efectúan controles, en los cuales los sueros y extractos de los quesos, inoculados con SEA, en presencia de esferas control deben dar resultados negativos (15).

5. CONCLUSIONES.

cel

1. Por su carácter hidrosoluble, la enterotoxina durante la elaboración de los distintos tratamientos mostró pronunciada tendencia a permanecer en el suero (35.31% al 77.63%); acentuándose este fenómeno al incrementar el volumen de agua utilizado en la reconstitución de la leche en polvo (86.05%).

2. Se obtuvieron porcentajes elevados de recuperación de la toxina inoculada, variando de 88.25% a 99.80%.

3. Al relacionar entre sí los resultados obtenidos por los métodos de ELISA y RPLA se lograron establecer rangos de concentración de enterotoxina A, acordes al grado de aglutinación del látex.

4. Por el método de RPLA se detectó la presencia de 0.12 ng de toxina A/ml de extracto, cantidad menor a 0.25 ng/ml, informada como límite de sensibilidad.

5. Los dos métodos, ELISA y RPLA, probados en este estudio, permitieron evidenciar la enterotoxina A en una concentración de 0.1768 ng/g de queso, valor más bajo de 1 ng/g de alimento indicado como suficiente para provocar intoxicación alimentaria.

6. Las ventajas más representativas del método ELISA fueron la determinación de valores puntuales de concentración de enterotoxina, lectura instrumental de los resultados y elevada sensibilidad. Su aplicación requiere del tratamiento unitario de las muestras.

7. El método RPLA resultó tener una adecuada sensibilidad y pudo implementarse en varias muestras simultáneamente. La lectura de los resultados, por basarse en apreciaciones visuales, requiere de la preparación de estándares y entrenamiento del personal a cargo. No obstante, puede ser útil en el control sanitario de alimentos, realizado en forma rutinaria.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ahmed, A-H A., Moustafa, K.M. and Marth, E.H. GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION BY Staphylococcus aureus IN WHEY FROM THE MANUFACTURE OF DOMIATI CHEESE. Journal of Food Protection, Vol. 46:3, pp. 236-237. 1983.

2. Amador, R., Costarrica, L., Parrilla, C. y Mota, L. DETERMINACION DE LA ENTEROTOXIGENICIDAD DE CEPAS DE Staphylococcus aureus AISLADAS DE PRODUCTOS CARNICOS. Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 28, pp. 127-133. 1986.

3. Barradas, H., Leonidez, P., Schulze, E., Pérez, J.E. CONTROL FISICOQUIMICO DE LECHE PASTEURIZADA. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, 1989.

4. Barradas, H., Leonidez, P., Schulze, E., Pérez, J.E. CONTROL FISICO-QUIMICO DE PRODUCTOS LACTEOS. Parte I y II, Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, 1989.

5. Bennet, R.W. and Amos, W.T. Staphylococcus aureus GROWTH AND TOXIN PRODUCTION IN IMITATION CHEESES. Journal of Food Science, Vol. 48, pp. 1670-1673, 1983.

6. Bennet, R.W. and Berry Jr, M.R. SEROLOGICAL REACTIVITY AND IN VIVO TOXICITY OF Staphylococcus aureus ENTEROTOXINS A AND D IN SELECTED CANNED FOODS.

7. Bennet, R.W. and Mc Clure, F. EXTRACTION AND SEPARATION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN IN FOODS: Colaborative study. Journal Association of Official Analytical Chemists, Vol. 63:6, pp. 1205-1210, 1980.

8. Bergdoll, M.S. ANALYTICAL METHODS FOR Staphylococcus aureus. International Journal of Food Microbiology, Vol. 10, pp. 91-100, 1990.

9. Bergdoll, M.S. CHEMISTRY AND DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN. Reprinted from proceedings of the fourteenth Research Conference, USA, 1962.

10. Bergdoll, M.S. DIRECTIONS OF USE OF ENTEROTOXIN A REAGENTS. Food Research Institute, University of Wisconsin, 1991.

11. Bergdoll, M.S. ENTEROTOXINS. In Microbial Toxins, Vol. III, S.J.Ajl, T.C.Montie and S. Kadis (eds.). Academic Press Inc. pp.265-321, 1970.

12. Bergdoll, M.S. STAPHYLOCOCCAL FOOD POISONING. Food Borne diseases, Chapter 5, Academic Press Inc. 1990.

13. Bergdoll, M.S. STAPHYLOCOCCAL INTOXICATIONS. Food Borne Infections and Intoxications, Academic Press Inc. 2nd edition, Chapter IX, 1979.

14. Bergdoll, M.S. THE ENTEROTOXINS. In the Staphylococci, Ed. J.O. Cohen Wiley Interscience, USA, 1972.

15. Brommeli, A.G. STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN SET-EIA, Detection Kit. Toxin Technology, USA, 1991.

16. Casman, E.P. FURTHER SEROLOGICAL STUDIES OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS. Journal of Bacteriology, Vol. 79, pp. 849-856, 1960.

17. Curso Internacional sobre Enterotoxinas Estafilocóccicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México, 1991.

18. Dickie, N., Mumtaz, A.S. IMPROVED RADIO IMMUNOASSAY OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A. Journal of Association of Official Analytical Chemists, Vol. 65:1, pp. 180-184, 1982.

19. Donnelly, C.B., Leslie, J.E., Black, L.A. and Lewis, K.H. SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIGENIC STAPHYLOCOCCI FROM CHEESE. Applied Microbiology, Vol. 15:6, pp. 1382-1387, 1967.

20. Flowers, S.R., Klatt, M.J. and Keelan, S.L. VISUAL IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF SALMONELLA IN FOODS: Colaborative study. Journal Association of Analytical Chemists, Vol. 71:5, pp. 973-980, 1988.

21. Freed, R.C., Evenson, M.L., Reiser, R.F. and Bergdoll, M.S. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN FOODS. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 44:6, pp. 1349-1355, 1982.

22. Fritz, James S. y Schenk, G.H. QUIMICA ANALITICA CUANTITATIVA. Editorial Limusa, México, 1979.

23. Gengioris, C.A. PRESENT STATE OF KNOWLEDGE ON STAPHYLOCOCCAL INTOXICATION. International Journal of Food Microbiology. Vol. 9, pp. 327-360, 1989.

24. Gordon, B.L. LO ESENCIAL DE LA INMUNOLOGIA. Editorial El Manual Moderno, segunda edición, México, 1990.

25. Hall, H.E., Angelotti, R. and Lewis, R.H. QUANTITATIVE DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B IN FOOD BY GEL DIFUSION METHODS. Public Health Reports, Vol. 78:12, pp. 1089-1098, 1983.

26. Haro, R. Adriana. VIABILIDAD Y CAPACIDAD PRODUCTORA DE ENTEROTOXINA B, DE Staphylococcus aureus CON DAÑO SUBLETAL EN QUESO FRESCO. Tesis Profesional, México, 1992.

27. Kato, E., Khan, M., Kujovich, L. and Bergdoll, M.S. PRODUCTION OF ENTEROTOXIN A. Applied Microbiology, Vol. 14:6, pp. 966-972, 1966.

28. Kauffman, P.E. MICROBIOLOGICAL METHODS, ENZYME IMMUNOASSAY FOR STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A. Journal Association of Official Analytical Chemists, Vol. 63:5, pp. 1138-1143, 1980.

29. Koper, J.W., Hagenars, A.M. and Notermans, S. PREVENTION OF CROSS-REACTIONS IN THE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR THE DETECTION OF Staphylococcus aureus TYPE B IN CULTURE FILTRATES AND FOODS. Journal of Food Safety, Vol. 2, pp. 35-45, 1980.

30. Kuo, J.K.S. and Silverman, G.J. APPLICATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN FOOD. Journal of Food Protection, Vol. 43:5, pp. 404-407, 1980.

31. Lin, H.H. and Cousin, M.A. EVALUATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF MOLDS IN FOODS. Journal of Food Science, Vol. 52, pp. 1089-1094, 1987.

32. Manuales para la Educación Agropecuaria. ELABORACION DE PRODUCTOS LACTEOS. Editorial Trillas, México, 1987.

33. Norma Oficial Mexicana. NOM-F-26-1986; Alimentos. Lácteos. Leche en polvo. Especificaciones de Calidad.

34. Notermans, S., Boot, R., Tips, P.D. and Denooij, M.P. EXTRACTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS (SE) FROM MINCED MEAT AND SUBSEQUENT DETECTION OF SE WITH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA). Journal of Food Protection, Vol. 43:3, pp. 238-241, 1983.

35. Notermans, S. and Heuvelman, C.J. COMBINED EFFECT OF WATER ACTIVITY, pH AND SUBOPTIMAL TEMPERATURE ON GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION OF Staphylococcus aureus. Journal of Food Science, Vol. 48, pp. 1832-1835, 1840, 1983.

36. Park, C.E. and Szabo, R. EVALUATION OF THE REVERSED PASSIVE LATEX AGGLUTINATION (RPLA) TEST KITS FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A, B, C AND D IN FOODS. Canadian Journal of Microbiology, Vol. 32, pp. 723, 726, 1986.

37. Parrilla, C., Saldade, O. y Nicoli, M. MANUAL DE TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA ANALISIS MICROBIOLOGICO DE PRODUCTOS LACTEOS. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, 1989.

38. Parrilla, C., Saldate, O. y Nicoli, M. MANUAL DE TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LECHE. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, 1989.

39. Parrilla, O., Saldate, O. y Nicoli, M. MANUAL DE TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA ANALISIS MICROBIOLOGICO DE PRODUCTOS CARNICOS. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, 1989.

40. Patee, P.A. and Glatz, B.A. IDENTIFICATION OF A CHROMOSOMAL DETERMINANT OF ENTEROTOXIN A PRODUCTION IN Staphylococcus aureus. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 39:1, pp. 186-193, 1980.

41. Pelczar, M.J., Reid, R.D. y Chan, E.C.S. MICROBIOLOGIA. Editorial Mc Graw-Hill, México, 1985.

42. Pereira, J.L., Salzberg, S.P. and Bergdoll, M.S. EFFECT OF TEMPERATURE, pH AND SODIUM CHLORIDE CONCENTRATIONS ON PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A AND B. Journal of Food Protection, Vol. 45:14, pp. 1306-1309, 1982.

43. Pérez G. Jorge y Pérez G. José Pablo. BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA LECHE. Editorial Limusa, México, 1984.

44. Peter Kin, P.I. and Sharpe, A.N. RAPID ENUMERATION OF Staphylococcus aureus IN FOODS BY DIRECT DEMONSTRATION OF ENTEROTOXIGENIC COLONIES ON MEMBRANE FILTERS BY ENZYME IMMUNOASSAY. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 47:5, pp. 1047-1053, 1984.

45. Read, R.B., Bradshaw, J., Pritchard, W.L. and Black, L.A. ASSAY OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN FROM CHEESE. Journal of Dairy Science, pp. 420-424, 1964.

46. Read, R.B., Pritchard, W.L., Bradshaw, J. and Black, L.A. IN VITRO ASSAY OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS A AND B FROM MILK. Journal of Dairy Science, Vol. 48, pp. 411-419, 1964.

47. Reiser, R., Conaway, D. and Bergdoll, M.S. DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN IN FOODS. Applied Microbiology, Vol. 27:1, pp. 83-85, 1974.

48. Reyes, L., Mota, L., Costarrica, L. y Parrilla, C. DETERMINACION DE LA ENTEROTOXIGENICIDAD DE CEPAS DE Staphylococcus aureus AISLADAS DE QUESOS. Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 26, pp. 277-283, 1984.

49. Ritchie, D.G., Nickerson, J.M. and Fuller, G.M. TWO SIMPLE PROGRAMS FOR THE ANALYSIS OF DATA FROM ENZYME-LINKED

IMMUNOSORBENT (ELISA) ASSAYS ON A PROGRAMMABLE DESK-
TOP CALCULATOR. *Analytical Biochemistry*, Vol. 110, pp. 281-290, 1981.

50. Robbins, R.N. and Bergdoll, M.S. PRODUCTION OF RABBIT
ANTISERA TO THE STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS. *Journal of
Food Protection*, Vol. 47:3, pp. 172-176, 1984.

51. Robbins, R., Gould, S. and Bergdoll, M.S. DETECTING THE
ENTEROTOXIGENICITY OF Staphylococcus aureus STRAINS. *Applied
Microbiology*, Vol. 28:6, pp. 946-950, 1974.

52. Rose, S.A., Bankes, P. and Stringer, M.F. DETECTION OF
STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN DIARY PRODUCTS BY THE
REVERSED-PASSIVE LATEX AGGLUTINATION (SET-RPLA) KIT. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 8, pp. 65-72, 1989.

53. Salas Pérez, M.C. VIABILIDAD Y CAPACIDAD PRODUCTORA DE ENTEROTOXINA B DE Staphylococcus aureus S-6 EN JAMONES, AL SER SOMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE COCCION Y ALMACENAMIENTO. Tesis Profesional, ULSA, México, 1991.

54. Saldate Ofelia, E. BROTOS DE INTOXICACION ESTAFILOCOCCICA. Participación del Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, 1980-1989.

55. Saunders, G.C. and Bartlett, M.L. DOUBLE-ANTIBODY SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 34:5, pp. 518-522, 1977.

56. SET-RPLA, Staphylococcal Enterotoxin Test Kit, Denka Seiken, Ltd. Japan, 1991.

57. Sperber, W.H. THE IDENTIFICATION OF STAPHYLOCOCCI IN CLINICAL AND FOOD MICROBIOLOGY LABORATORIES. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, pp. 121-164, 1977.

58. Sokari, T.G. and Anozie, S.O. MODIFIED SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION METHOD FOR SCREENING STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FOR ENTEROTOXIN. Food Microbiology, Vol. 6, pp. 45-48, 1989.

59. Tatini, S.R. Cords, B.R. and Gramoli, J. SCREENING FOR STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS IN FOODS. Food Technology, PP. 64-74. 1976.

60. Zehren, V.L. and Zehren, V.F. EXAMINATION OF LARGE QUANTITIES OF CHEESE FOR STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A. Journal Dairy Science, Vol. 51:5, pp. 635-644, 1968.