

300627
2
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE

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

**“COMPORTAMIENTO BIOQUIMICO DE S. aureus
CON DAÑO TERMICO SUBLETAL”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA LUISA ALVAREZ VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS:
M. C. Consuelo Lobato Calleros

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	página
1. INTRODUCCION	
1.1 Características Generales de <u>S.aureus</u>	1
1.1.1 Clasificación	1
1.1.2 Morfología y fisiología	1
1.1.3 Crecimiento y metabolismo	2
1.1.4 Habitat	4
1.2 Factores que Alteran su Crecimiento	5
1.2.1 p.H.	5
1.2.2 Temperatura	5
1.2.3 Actividad de agua	6
1.2.4 Presión osmótica	7
1.3 Métodos de Identificación, Aislamiento y Recuento de <u>S.aureus</u>	8
1.3.1 Pruebas bioquímicas	8
a) Fermentación de hidratos de carbono	8
b) Catalasa	8
c) Coagulasa	8
d) Licuefacción de gelatina	10
e) Desprendimiento de ácido sulfúrico	11
f) Prueba de la leche con tornasol	12
g) Rojo de metilo	12
h) Reducción del nitrato	12
i) Fosfatasa	13
j) Ureasa	13
k) Reacción de Voges Proskauer	14
l) DNA-asa	14
m) Hemólisis	14
1.3.2 Medios de aislamiento	15
1.3.2.1 Agar manitol sal	15
1.3.2.2 Baird-Parker	16
1.3.2.3 Vogel Johnson	16

1.3.2.4	Agar Soya Tripticaseína	16
1.3.3	Métodos generales para cuenta <u>S.aureus</u>	16
1.3.3.1	Contaje en placas	16
1.3.3.2	Número más probable (NMP)	17
1.4	Resistencia de <u>S.aureus</u>	17
1.5	Toxinas y Enzimas Producidas por <u>S.aureus</u>	19
1.6	Enterotoxinas Estafilocócicas	24
1.6.1	Factores que influyen en la producción de enterotoxina.	26
1.6.1.1	Temperatura	26
1.6.1.2	p.H.	28
1.6.1.3	Actividad de agua	28
1.6.1.4	Presencia de otros microorganismos	29
1.6.1.5	Condiciones atmosféricas	29
1.7	Detección de Enterotoxinas	30
1.7.1	Método de difusión simple	31
1.7.2	Método de doble difusión	31
1.7.3	Prueba de hemaglutinación	33
1.7.4	Microplaca	33
1.7.5	Prueba de precipitación cuantitativa	33
1.7.6	Anticuerpos fluorescentes	35
1.7.7	Radioinmunoensayo	35
1.7.8	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	36
1.7.9	Reversed passive latex agglutination	39
1.8	Intoxicación Alimentaria por Enterotoxinas Estafilocócicas	41
1.9	Daño Térmico	43
1.10	Crema Pastelera	54
1.11	Justificación	56
2.	MATERIALES Y METODOS	
2.1	Caracterización de la Cepa FRI-100	59
2.1.1	Observación microscópica	59
2.1.2	Morfología colonial	59
2.1.3	Pruebas bioquímicas	59
2.1.3.1	Fermentación de azúcares	59

2.1.3.2 Voges Proskauer	59
2.1.3.3 Rojo de metilo	60
2.1.3.4 Prueba de coagulasa	60
2.1.3.5 Prueba de termonucleasa	60
2.2 Verificación de la Producción de Enterotoxina Tipo A	61
2.3 Determinación de la Curva de Crecimiento de <u>S.aureus</u> FRI-100	64
2.4 Estandarización del Inóculo	66
2.5 Análisis Microbiológico de la Leche Entera en Polvo	67
2.5.1 Preparación de la muestra	67
2.5.2 Mesofílicos aerobios	67
2.5.3 Coliformes	67
2.5.4 <u>S.aureus</u>	67
2.6 Tratamiento Térmico de <u>S.aureus</u>	68
2.8 Aplicación de Pruebas Bioquímicas Específicas en el Microorganismo, con y sin Daño	70
2.9 Recuperación de <u>S.aureus</u> FRI-100	72
2.10 Capacidad Productora de Enterotoxina del Microorganismo Dañado	72
2.11 Elaboración de Crema Pastelera y su Inoculación con <u>S.aureus</u> con y sin Tratamiento Térmico.	74
2.12 Extracción Simple de la Enterotoxina del Alimento	77
3. RESULTADOS Y DISCUSION	
3.1 Morfología Microscópica	81
3.2 Morfología Colonial	82
3.3 Pruebas Bioquímicas	82
3.4 Producción de Enterotoxina	82
3.5 Curva de Crecimiento	85
3.6 Estandarización de Inóculo	87
3.7 Análisis Microbiológico de la Leche	87
3.8 Tratamiento Térmico	89
3.9 Pruebas Bioquímicas de <u>S.aureus</u> con y sin	

Daño Subletal.	91
3.10 Recuperación de <u>S.aureus</u> FRI-100.	94
3.11 Evaluación de la Producción de Enterotoxina de <u>S.aureus</u> con Daño Subletal	95
3.12 Crema Pastelera	96
3.13 Producción de Enterotoxina en Crema Pastelera	99
4. CONCLUSIONES	103
5. BIBLIOGRAFIA	104

INDICE DE CUADROS

	página
Cuadro 1. Características de las especies <u>Staphylococcus</u>	3
Cuadro 2. Factores que alteran el crecimiento de <u>S.aureus</u>	9
Cuadro 3. Características generales de enterotoxinas	25
Cuadro 4. Crema pastelera	76
Cuadro 5. Morfología colonial <u>S.aureus</u>	83
Cuadro 6. Respuesta a pruebas bioquímicas <u>S.aureus</u> Cepa FRI-100	84
Cuadro 7. Análisis sensorial y microbiológico de la leche en polvo	88
Cuadro 8. Porcentaje del comportamiento bioquímico de <u>S.aureus</u> a los diferentes tiempos de tratamiento térmico	93
Cuadro 9. Enterotoxina producida por <u>S.aureus</u> en crema pastelera conservada bajo refrigeración y en temperatura ambiente	100

INDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1.	Secuencia común de aminoácidos en las enterotoxinas. 27
Figura 2.	Enlace de las moléculas de cisteína en la enterotoxina B. 27
Figura 3.	Pruebas cualitativas de precipitación 32
Figura 4.	Técnica de la microplaca. 34
Figura 5.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 38
Figura 6	Placa de microtitulación para RPLA 42
Figura 7	Producción de enterotoxina por el método de celofón. 62
Figura 8	Técnica RPLA 65
Figura 9	Método de Van Doorne 69
Figura 10	Método del tubo capilar 71
Figura 11	Respuesta a pruebas bioquímicas de <u>S.aureus</u> dañado térmicamente. 73
Figura 12	Capacidad productora de enterotoxina del microorganismo dañado. 75
Figura 13	Comportamiento de <u>S.aureus</u> con y sin daño subletal en crema pastelera durante su almacenamiento 78
Figura 14	Extracción simple de enterotoxina estafilocócica 80
Figura 15	Curva de crecimiento de <u>S.aureus</u> FRI-100 86
Figura 16	% destrucción <u>S.aureus</u> a 63°C 90
Figura 17	Daño térmico en <u>S.aureus</u> a 63°C 92
Figura 18	Crecimiento de <u>S.aureus</u> con daño subletal en crema pastelera sin refrigeración. 97
Figura 19	Crecimiento de <u>S.aureus</u> con daño subletal en crema pastelera refrigerada. 98
Figura 20	Crecimiento de <u>S.aureus</u> sin daño subletal en crema pastelera sin refrigeración. 101

Figura 21 Crecimiento de S.aureus sin daño subletal
en crema pastelera refrigerada.

102

OBJETIVOS

* Determinar el porcentaje de células dañadas en cultivos de S.aureus tratados a 63°C por periodos de 0 a 30 min.

* Analizar las respuestas bioquímicas del microorganismo con daño subletal.

* Comparar el crecimiento y producción de enterotoxina entre S.aureus con y sin daño subletal en crema pastelera almacenada bajo diferentes temperaturas.

1. INTRODUCCION

1.1. Características Generales de S.aureus

1.1.1 *Clasificación.* S.aureus pertenece a la familia Micrococcaceae. Dentro del género Staphylococcus, se encuentran las especies S.aureus, S.epidermidis, y S.saprophyticus, entre otras. Esta división se basa en sus diferentes respuestas bioquímicas.

S.aureus es la especie patógena. S.epidermidis, comúnmente conocido como estafilococo blanco, produce infecciones mínimas en la piel (28)(26).

1.1.2 *Morfología y fisiología.* Los estafilococos son organismos redondos u ovals cuyo diámetro promedio de 1 μm varía según la especie y edad del cultivo. Son inmóviles, no esporulados y gram positivos. Se disponen en grupos que parecen racimos de uvas. Sus características son más pronunciadas cuando se cultivan en medios sólidos que en líquidos. En estos últimos aparecen a menudo como cadenas cortas, pero a diferencia de los estreptococos, los estafilococos rara vez forman cadenas que contengan más de cuatro miembros. Habitualmente no son capsulados (54)(27).

Son aerobios y anaerobios facultativos. A las 24 h de incubación se observan colonias opacas grandes, de 2 mm de diámetro, redondas, convexas, de aspecto brillante, de borde entero, consistencia butirosa y fácilmente emulsionables. El color amarillo dorado de sus colonias se debe a la presencia de carotenoides, dicha pigmentación generalmente es apreciable tras 18 a 24 h de crecimiento a 37°C, pero es más pronunciada cuando los cultivos se mantienen a temperatura ambiente durante otras 24 a 48 h. Esta pigmentación también aumenta si el medio está enriquecido con monofosfato o monoacetato de glicerol. El

pigmento no es producido durante el crecimiento en medio anaerobio o en un cultivo líquido (27).

1.1.3 Crecimiento y metabolismo. Su crecimiento es en general más exuberante en condiciones aerobias que en anaerobias.

S.aureus figura entre las bacterias que no forman esporas. Permanece viable durante meses en la superficie de placas de agar selladas y almacenadas a 4°C y puede ser cultivado a partir de muestras desecadas con muchas semanas de anterioridad. Algunas cepas son termorresistentes, soportan temperaturas de hasta 60°C durante 30 min (3). Son sensibles a la acción bactericida de ciertos colorantes básicos, por ejemplo, violeta de genciana. Son resistentes a los desinfectantes tales como cloruro de mercurio y fenol. Presentan una elevada tolerancia a la sal, medios que contengan 7.5 a 10 % de cloruro de sodio (NaCl) permiten su crecimiento, mientras que inhiben otros gérmenes (27). Cuadro 1

La mayoría de las cepas crecen con facilidad en un medio químicamente definido que contenga glucosa, sales, aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico.

Forman ácido a partir de la glucosa, manitol, xilosa, lactosa, sacarosa, maltosa y glicerol. Licuan la gelatina; reducen los nitratos a nitritos; decoloran el azul de metileno y la tintura de tornasol. Producen endonucleasas termorresistentes.

En agar sangre es frecuente observar una zona clara de hemólisis (β - hemólisis) alrededor de las colonias. S.aureus puede producir cuatro hemolisinas

CUADRO 1. CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE
Staphylococcus

MORFOLOGIA	<u>S.aureus</u>	<u>S.epidermis</u>	<u>S.saprophyticus</u>	<u>S.hominis</u>
Células:				
Tamaño(mm)	0.8-1.0	0.5-1.5	0.8-1.2	1.0-1.5
Colonias:				
Elevación	R	R	L.C	C
Transmisión de luz	O	T	O	O
Diámetro(mm)	2 - 3	2 - 4	5 - 8	3 - 4
Pigmento	+	-	V	V
Fisiología:				
Crec.anaerobio	+	+	+	+
Crec.en NaCl 10%	+	W	+	W
Crec.a 45°C	+	+	V	+
Reacciones bioquímicas:				
Hemólisis	+	W	-	W
Manitol	+	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	+	+	V
Reducción de nitrato	+	+	-	-
Fosfatasa	+	+	-	-
Coagulasa	+	-	-	-
Desoxirribonucleasa	+	-	-	-
Sensibilidad a antibióticos:				
Novobiocina	+	+	+	+
Penicilina	V	V	+	V
Tetraciclina	+	+	+	V
Eritromicina	+	+	+	+

Donde:

R = Levantada L.C = Convexa baja C = Convexa
W = Débilmente positivo V = Negativo Variable
O = Opaca T = Translúcida

Fuente: W.E. Kloos and K.H. Schleiffer (1975).

distintas, con espectros líticos diferentes (alfa, beta, gama, delta) (54)(27).

Pueden producir coagulasa, son catalasa positivos. Son capaces de generar intoxicaciones alimentarias debido a que algunas cepas sintetizan enterotoxinas termoestables, que soportan la temperatura de ebullición durante 30 min (54)(36).

La patogenicidad de S.aureus se demuestra por medio de las pruebas coagulasa y DNA-asa termoestable. Anteriormente se consideraba cepas patógenas, aquellas que daban resultados positivos en la prueba de coagulasa, pero estudios recientes han demostrado que una cepa enterotoxigénica puede ser coagulasa negativa (60).

L. Reyes y L. Mota estudiaron la enterotoxigenicidad de cepas S.aureus aisladas en quesos, observando que de 165 cepas enterotoxigénicas encontradas en 100 quesos; 155 fueron coagulasa positivas y 10 fueron coagulasa negativas. Otras investigaciones demostraron que algunas cepas de S.aureus siendo coagulasa negativa son termonucleasa positivas o débilmente positivas, por lo que se realiza la prueba de DNA-asa paralelamente a la de coagulasa (60).

1.1.4 *Habitat.* S.aureus se puede aislar de una gran cantidad de fuentes, siendo el hombre y los animales las principales. Está presente en fosas nasales, garganta, cabello y piel. Su presencia es mayor tratándose de personas relacionadas con hospitales, debido a que muchas infecciones como barros y enfermedades como neumonía, son causadas por este microorganismo (19)(67).

Puede ser aislado de muchas especies animales, siendo los bovinos los más importantes a causa de la

relación de esta bacteria con la mastitis. Puede también encontrarse en el aire, polvo, agua, desechos humanos y animales (19) (67).

1.2. Factores que alteran su Crecimiento

Existen factores en el medio ambiente de los microorganismos que son letales o potencialmente letales para ellos, como los que a continuación se describen.

1.2.1 p.H. Cada microorganismo tiene un pH mínimo, máximo y óptimo en función de su crecimiento. El pH óptimo para S.aureus se considera de 7.5. Este valor próximo a la neutralidad es benéfico para la mayoría de las bacterias. El rango de los valores de pH que puede tolerar S.aureus está comprendido entre 4.5 y 9.3.

Este parámetro no afecta únicamente la velocidad de su crecimiento sino también: el grado de supervivencia durante su almacenamiento, tratamiento térmico, desecación o cualquier otro sistema de conservación. Un pH inicial adecuado se puede transformar en otro desfavorable por desarrollo del propio microorganismo o de una flora de carácter competitivo. Por el contrario un pH que en principio es insuficiente, puede modificarse como consecuencia del crecimiento de una población microbiana y favorecer la multiplicación de otros gérmenes. El pH del medio donde el cultivo va a crecer depende del tipo del medio, la concentración de cloruro de sodio, la medida del inóculo y las condiciones atmosféricas (68) (39).

1.2.2 Temperatura. Se ha informado que las bacterias sobreviven a temperaturas comprendidas entre 25 y 90°C. La temperatura mínima de crecimiento de S.aureus es de 6.3°C.

la máxima es de 45 - 47.8°C, considerando como temperatura óptima 30 - 37°C.

La influencia de la temperatura sobre el crecimiento es en realidad, una medida de su efecto sobre las actividades enzimáticas de la célula; Cuando desciende la temperatura, disminuye esta actividad y en consecuencia el crecimiento de la célula. En el punto de congelación cesa esencialmente el metabolismo debido a que también la célula queda privada de agua libre, elemento esencial para el transporte de nutrientes y eliminación de los productos de desecho. Cuando la temperatura se encuentra por encima de la óptima para el crecimiento, la actividad metabólica aumenta considerablemente, pero al mismo tiempo se incrementa la velocidad de degradación de enzimas y proteínas, por desnaturalización, provocando alteraciones y la muerte de la célula (56)(68)(13)(39).

1.2.3 *Actividad de agua.* Los microorganismos tienen una necesidad absoluta de agua. La actividad acuosa (Aw) mínima para S.aureus es de 0.83 - 0.86; la óptima es de 0.99.

Las necesidades de humedad de los microorganismos pueden variar con ciertos factores como: a). *la clase de soluto empleado para reducir la actividad acuosa:* en muchos microorganismos, la actividad acuosa mínima para el crecimiento es prácticamente independiente del soluto utilizado; otros en cambio requieren diferente Aw mínima de acuerdo con el soluto empleado, así el cloruro de potasio (KCl) suele ser menos tóxico que el NaCl y éste último menos inhibidor que el sulfato sódico; b). *el valor nutritivo del medio de cultivo:* cuanto mejor sea el medio, mas baja será la actividad acuosa límite o mínima; c). *la temperatura:* los microorganismos toleran mejor Aw bajas, si la temperatura es la óptima para el crecimiento; d). *aporte de oxígeno:* para el desarrollo de los microorganismos

aerobios se necesita una actividad acuosa mas baja en presencia de aire que en su ausencia, ocurriendo lo contrario en el caso de los anaerobios; e). *p.H.*: los microorganismos toleran actividad acuosa mas baja a valores de pH próximos a la neutralidad, que en medios ácidos o alcalinos; f). *inhibidores*: su presencia acorta el intervalo de valores de actividad acuosa que permiten el crecimiento del microorganismo.

El rango de actividad acuosa se restringe si alguno de los factores del medio no es óptimo, incrementándose este efecto cuando los elementos desfavorables son mas de uno. Una *Aw* no propicia no sólo da lugar a una disminución en la velocidad de crecimiento, sino también a un descenso en la producción máxima de células y un retraso en la iniciación del crecimiento durante la fase de latencia (56)(68)(39).

1.2.4 *Presión osmótica*. El cambio en la presión osmótica es uno de los factores que amenazan la existencia de los microorganismos en su microambiente. La sal presente en el agua afecta el crecimiento microbiano, de hecho los bacteriólogos clasifican a las bacterias según su capacidad o incapacidad para crecer en sustratos con diferente concentración de sal. Esta sustancia disuelta, altera la presión osmótica que controla de forma selectiva el crecimiento microbiano (56).

Cuando las concentraciones de sal y azúcar son elevadas, 10-15% y 50-70% respectivamente, se inhibe el crecimiento microbiano; en este caso el mecanismo de inhibición bacteriana es por plasmólisis. Las células son deshidratadas, pueden ser destruidas o permanecer viables pero en condiciones estáticas (54).

S.aureus puede desarrollarse en medios conteniendo 7.5 % de NaCl, siendo el valor máximo soportado de 18%. Cuadro 2

1.3. Métodos de Identificación, Aislamiento y Recuento de S.aureus

1.3.1 Pruebas bioquímicas. S.aureus puede ser caracterizado mediante sus respuestas bioquímicas, tales como las que se señalan a continuación.

a). *Fermentación de hidratos de carbono.* Determina la capacidad del organismo para fermentar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico produciendo ácido, este último se detecta en forma visible. El medio base que se utiliza es generalmente rojo de fenol. Una prueba positiva se observa por la formación de un color amarillo en el caldo (13)(50).

b). *Catalasa.* Comprueba la presencia de la enzima catalasa, que es producida por la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno que se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares. Una respuesta positiva consiste en la formación inmediata de burbujas de oxígeno (13)(50).

c). *Coagulasa.* Mediante esta prueba se detecta la facultad del organismo para coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza de manera específica para la diferenciación de especies pertenecientes

CUADRO 2. FACTORES QUE ALTERAN EL CRECIMIENTO DE S.aureus

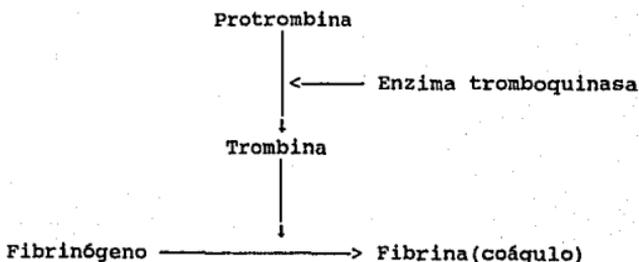
FACTOR	MINIMO	OPTIMO	MAXIMO
pH	4.0	5.5 - 7.5	9.8
Temperatura (°C)	6.3	30 - 37	45 - 47.8
Aw	0.83 - 0.86	0.99	0.99 - 1.0
NaCl (%)	0	0	15 - 18

al género S.aureus. Esta prueba es usada como índice de virulencia o patogenicidad, sin embargo, estudios hechos por Stutzenberger y San Clemente observaron que algunas cepas coagulasa negativas también producen enterotoxinas.

La coagulasa, enzima producida por S.aureus es relativamente termoestable, ya que resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos. Es de naturaleza proteica y es fácilmente inactivada por las enzimas proteolíticas. Se desconoce el mecanismo exacto y la estructura química de esta enzima, sin embargo se sabe que desempeña cierto papel en la coagulación, actuando sobre algun componente que se encuentra en el suero para producir un coágulo o trombo. In vitro, la coagulasa aumenta la velocidad de coagulación del plasma, el resultado final es la formación de un coágulo de fibrina (13)(50)(47).

Plasma $\xrightarrow{\text{coagulasa bacteriana}}$ Coágulo de fibrina

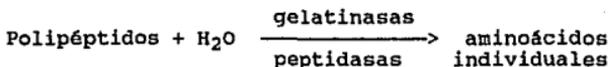
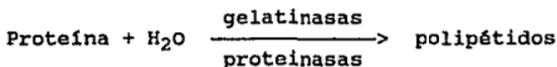
Mecanismo normal de la coagulación:



d). *Licuefacción de la gelatina*. Permite la evaluación de un organismo para producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina.

Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para penetrar en una célula bacteriana, por lo tanto para poder ser utilizadas, primero deben ser catabolizadas en componentes más pequeños a través de enzimas exocelulares de tipo proteolítico, gelatinasas que son secretadas por ciertas bacterias. Este proceso comprende dos etapas y el resultado final es una mezcla de aminoácidos individuales (50).

Una respuesta positiva se observa de la siguiente manera: las partículas libres de carbonos se depositan en el fondo del tubo, por lo que al agitarlo suavemente estas partículas vuelven a suspenderse presentándose como una nube "negra visible" (50).



e). Desprendimiento de ácido sulfhídrico.

Determina la liberación de ácido sulfhídrico, por acción enzimática sobre los aminoácidos azufrados, la reacción producida se evidencia por la formación de sulfuro ferroso de color negro (50).

La proteólisis de las proteínas genera aminoácidos individuales. Algunas especies heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimático a partir de los diferentes aminoácidos que lo contienen, produciendo el gas ácido sulfhídrico (H_2S). La enzima responsable de esta actividad es la cisteinasa. La peptona, cisteína, cistina y tiosulfato, constituyen fuentes de azufre (50).

Bacteria(medio ácido) + tiosulfato de sodio \longrightarrow H₂S (g)

H₂S + iones férricos \longrightarrow sulfuro ferroso ↓
(citrato férrico (precipitado negro)
de amonio)

f). Prueba de la leche con tornasol.
Diferencia organismos sobre la base de sus múltiples reacciones metabólicas en un medio lácteo (50).

La leche contiene lactosa junto con tres proteínas: caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina. Por lo tanto un organismo en este medio puede mostrar una o varias propiedades metabólicas características: fermentación de la lactosa, reducción del tornasol, formación de coágulo, peptonización y formación de gas (50).

El tornasol incorporado a la leche es indicador de pH y de potencial redox, permitiendo así la identificación de diversas funciones metabólicas de un organismo. S.aureus coagula la leche tornasolada (50).

g). Rojo de metilo. Comprueba la capacidad de un organismo para producir y mantener estables los productos ácidos terminales de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Es una prueba cualitativa de la producción de ácido. Se basa en el empleo de rojo de metilo como indicador de la concentración de iones hidrógeno, la cuál depende de la relación gaseosa (CO₂ y H₂) que a su vez es un índice de los diferentes ciclos del metabolismo de la glucosa que muestran diversos organismos (50).

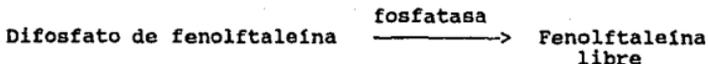
h). Reducción del nitrato. La transformación del nitrato (NO₃) en nitrito (NO₂) y gas nitrógeno (N₂), tiene lugar generalmente en condiciones bajo las cuales el

organismo obtiene oxígeno del nitrato. Esta respiración anaeróbica es un proceso de oxidación por el cuál las sustancias inorgánicas, especialmente nitrato y sulfato y raramente hidratos de carbono, proporcionan oxígeno para la obtención de energía del microorganismo (50).

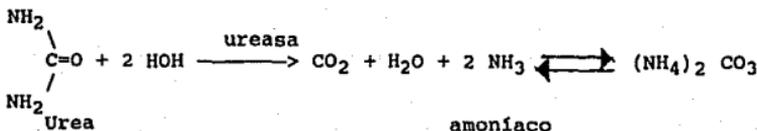
Las posibilidades del producto final en la reducción del nitrato son muchas: nitrito, amoniaco, nitrógeno molecular, oxido nítrico, etc (50).

La prueba positiva se observa por la formación de un color rosado o rojo intenso, agregando los reactivos correspondientes (50).

i). *Fosfatasa*. Detecta la producción de fosfatasa por un organismo en cantidad suficiente para desdoblar el difosfato de fenolftaleína. La liberación de fenolftaleína es detectada por un cambio de color en el medio, debido a que al reaccionar con un álcali presenta un color rojo rosado brillante (50).



j). *Ureasa*. Esta prueba permite evidenciar el desdoblamiento de la urea en dos moléculas de amoniaco, mediante la acción de la ureasa, enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos.



Una respuesta positiva consiste en la formación de un color rojo-rosado intenso en el caldo (50).

k). *Reacción de Voges Proskauer*. Determina la capacidad del organismo para producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. Este carbohidrato es metabolizado en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir de este ácido, una bacteria puede seguir muchas vías, siendo la producción de acetoína una de ellas (50).

l). *DNA-asa*. La termonucleasa es una enzima extracelular producida por las células de S.aureus patógeno que hidroliza los enlaces éster de fosfatos del DNA. Presenta dos características importantes, su termoestabilidad, ya que resiste temperaturas de 90°C durante 15 min. y su resistencia a elevadas concentraciones de NaCl. Una colonia de organismos que crece en una placa de agar y que produce esta enzima muestra una zona clara alrededor del pozo. Con ácido clorhídrico (HCL) 1N el resto de la placa, presentará un aspecto turbio.

La nucleasa de S.aureus es una fosfodiesterasa con actividad de endo y exonucleasa que desdobra el DNA y el RNA para producir tres fosfomononucleótidos. Está compuesta de una sola cadena polipeptídica de P.M. 16,800 daltons; para una actividad máxima requiere de Ca^{++} (50).

m). *Hemólisis*. El medio empleado para la realización de esta prueba es agar nutritivo, al cuál se le añade sangre entera a una concentración de 5 %. Este medio tan extremadamente rico, propicia el crecimiento de muchos microorganismos, que por sus necesidades alimentarias especiales resultan difíciles de cultivar en el laboratorio. Muchos de estos organismos producen exoenzimas denominadas

hemolisinas con efectos destructivos sobre los glóbulos rojos, algunos microorganismos sintetizan hemolisinas beta que destruyen y decoloran la hemoglobina de los glóbulos rojos, fenómeno que se observa en la caja de agar sangre, mediante la formación de áreas clarificadas alrededor de las colonias (13) (50) (34).

1.3.2 *Medios de aislamiento.* Existen varios métodos para el recuento o aislamiento de estafilococo en los alimentos; difieren principalmente en el tipo de agentes selectivos utilizados siendo éstos principalmente: concentraciones altas de NaCl, telurito sódico, cloruro de litio y azida sódica.

1.3.2.1 *Agar manitol sal.* Altamente selectivo por contener 7.5% de NaCl, factor que excluye el crecimiento de casi todas las bacterias. Sin embargo S.aureus crece fácilmente en este medio, ya que contiene un alcohol fermentable, el manitol, que las cepas patógenas de este microorganismo generalmente metabolizan. La inclusión de rojo de fenol como indicador tiene como finalidad detectar la presencia de estafilococos o micrococos no patógenos, incapaces de fermentar el manitol, por lo que ocasionan el vire del rojo de fenol a su color alcalino puro (rojo o púrpura) o no modifican el color del medio. Los organismos que fermentan el manitol producen un halo amarillo alrededor de sus colonias, siendo éste indicativo de estafilococos patógenos. Cualquier colonia roja o púrpura se clasificará como perteneciente a microorganismos no patógenos (13) (51).

Estudios realizados demostraron que el medio agar-manitol-sal, que se usaba frecuentemente, es poco eficiente para la determinación de S.aureus, ya que no reveló presencia de éste en muestras de queso inoculadas con este microorganismo (52).

1.3.2.2 *Baird-Parker*. Se ha informado que constituye un medio selectivo y diferencial en el que pueden desarrollarse células de estafilococos que han sufrido un estres o daño subletal por diversos agentes como temperatura, congelación, liofilización, etc. No obstante en algunos casos la recuperación no es posible, por lo que se recomienda a veces una revitalización antes de la siembra, en caldo infusión de cerebro y corazón o en caldo soya tripticaseína.

Las colonias positivas a este medio se observan de forma regular, brillantes de color negro u obscuro intenso, rodeadas de halos de aclaramiento circundante (13)(56). Estudios realizados en los que se compararon diferentes medios usados para la enumeración de S.aureus en alimentos, demostraron que el medio de Baird Parker fue el más satisfactorio para tal fin (52)(30).

1.3.2.3 *Vogel Johnson*. Se utiliza para la identificación de S.aureus en alimentos procesados, pudiendo desarrollarse células de este microorganismo que han sufrido un estres o daño subletal mediante la aplicación de diversos agentes (41).

1.3.2.4 *Agar Soya Tripticaseína*. Con 7.5 % de NaCl excluye el crecimiento de muchas bacterias, sin embargo S.aureus crece fácilmente en este medio (9).

1.3.3 Métodos generales para cuenta de S.aureus.

1.3.3.1 *Contaje en placas (método estándar)*. Los microorganismos se siembran por dos métodos: siembra en profundidad y siembra en superficie éste último no debe emplearse cuando se sospecha o se sabe que el alimento contiene pocos microorganismos.

Las colonias deben enumerarse en cuanto finaliza el tiempo de incubación y puede realizarse de dos maneras: a) manualmente, con ayuda de una lupa y un numerador de mano, o empleando un cuenta colonias de Quebec con numerador incorporado; b) automáticamente, empleando cuenta colonias con numeradores automáticos.

El número de colonias en las placas debe disminuir en forma inversamente proporcional a la dilución si se ha realizado una buena homogenización de la muestra.

Este método es más seguro para la enumeración de S.aureus que el método del número más probable (67) (34).

1.3.3.2 Número más probable (NMP). Se emplea para obtener una estimación de la población microbiana en los alimentos en donde se sospecha la existencia de un número bajo de microorganismos.

El método del número más probable se utiliza para la enumeración de estafilococos en alimentos crudos, cuando se presume la presencia de un número inferior a 100 UFC/g. También se emplea cuando existe competitividad entre especies (67) (39) (45) (24).

1.4 Resistencia de S.aureus.

En comparación con otras bacterias no esporuladas, es una de las más resistentes a los agentes físicos. Los cultivos en agar nutritivo pueden permanecer viables durante años. Muchas cepas son resistentes al secado y se han aislado de libros y ropas hasta 14 semanas después de la contaminación. También son bastante resistentes a los agentes químicos. Una determinada cepa de S.aureus sirve

para la valoración de los antisépticos en relación con su resistencia frente a una solución de ácido fénico al 2 % para establecer así el índice o coeficiente fenólico.

La gran mayoría de las cepas crecen en presencia de 10 % de NaCl, algunas incluso al 15 %. Esto tiene importancia en la conservación de alimentos con sal, porque S. aureus puede crecer y formar enterotoxinas en alimentos conteniendo cantidades de sal que, en otras circunstancias serían suficientes para actuar como conservador. Frecuentemente la tolerancia a la sal proporciona la base para utilizar los medios selectivos apropiados en el aislamiento de estas bacterias.

Una característica común con otros organismos gram positivos es que estos cocos son sensibles a la acción bacteriostática de los colorantes de trifetil-metano y son susceptibles a los antibióticos, eficaces contra las bacterias gram positivas, incluyendo la penicilina y muchos de los antibióticos de amplio espectro. Sin embargo son especialmente propensos a desarrollar cierta resistencia a las drogas y las generalizaciones en cuanto a la sensibilidad pueden no ser aplicables a todos los aislados corrientes.

Muchas de las infecciones estafilocócicas graves y amenazantes para la vida, se adquieren ahora en los hospitales. En estos ambientes, los individuos son más susceptibles a la infección a causa de enfermedades intercurrentes y de otros factores predisponentes. La proporción de portadores de estafilococos, tanto en los pacientes de un hospital como en los empleados, normalmente es más elevada que en la población general. Además la proporción de cepas resistentes a las drogas en estos portadores es también significativamente más alta. Así las infecciones nosocomiales producidas por estafilococos

resistentes a las drogas, especialmente en el servicio de cirugía o en unidades de quemados, constituyen un problema médico grave.

Las células de estafilococos son más resistentes al calor que las de otras bacterias. Mientras que la mayoría de las bacterias se destruyen en 30 min a 60°C, S.aureus necesita temperaturas más altas y tiempos más largos, como 80°C durante 1 h. La resistencia al calor está acompañada por temperaturas de crecimiento máximo más elevadas (28)(26).

1.5 Toxinas y enzimas producidas por S.aureus.

Algunos microorganismos producen sustancias venenosas de peso molecular elevado conocidas como toxinas. Pueden ser excretadas al medio que los rodea (exotoxinas) o retenidas dentro de la célula (endotoxinas) (26).

Las exotoxinas son difundidas y eliminadas por la célula productora al medio que la rodea o al sistema circulatorio y tejido del huésped. Son proteínas que pierden su toxicidad cuando se calientan o se tratan con ácidos. Hay datos de que su toxicidad se debe a la configuración espacial de aminoácidos en sus moléculas. Cuando este arreglo se altera se pierde la toxicidad y las sustancias resultantes se conocen como toxoides (26).

Las toxinas y los toxoides tienen la propiedad de estimular la producción de antitoxinas, las cuales neutralizan las toxinas en el cuerpo del huésped (26).

Muchos microorganismos no elaboran toxinas solubles en células vivas o intactas, pero producen

endotoxinas que se liberan cuando las células se desintegran. La presencia de sustancias tóxicas en los cultivos de tales bacterias se debe a la lisis de algunas bacterias, que ocurre durante el último período de desarrollo. Comparadas con las exotoxinas, las endotoxinas son: a) relativamente termoestables, b) no forman toxoides, c) son menos tóxicas. La composición de las endotoxinas varía de acuerdo a la especie o cepa de bacteria que las produce y de la manera que han sido extraídas y purificadas. Las endotoxinas son altamente pirógenas, es decir producen fiebre en el huésped. Algunas inhiben la fagocitosis, pero otras la estimulan (26).

La virulencia de algunos microorganismos se debe en parte a las enzimas y otras sustancias metabólicas (26).

Algunos de los metabolitos que produce S. aureus, son de acción tóxica y otros de acción enzimática. Esta toxicidad se ha sometido a investigación y se han aislado y caracterizado muchos de los principios tóxicos. Entre los más importantes están las citotoxinas, incluyendo hemolisinas y leucocidinas; las enterotoxinas; exfoliatinas; exotoxinas pirógenas y las actividades enzimáticas, que son entre otras la coagulasa, hialuronidasa y las quinasa (26).

Hemolisinas. Son sustancias que liberan hemoglobina de los glóbulos rojos. Son producidas por varias clases de bacterias. Las hemolisinas bacterianas de las diferentes especies difieren en su naturaleza química y mecanismo de acción. La virulencia e invasividad de las bacterias se incrementa por su capacidad de producir hemolisinas. Las cepas hemolíticas de bacterias patógenas son más virulentas que las cepas no hemolíticas de la misma especie. Las hemolisinas bacterianas producen cambios visibles en las placas de agar sangre. Existen cuatro tipos

de hemolisinas alfa, beta, gama y delta, las cuales se pueden separar electroforéticamente (26).

La alfa hemolisina tiene acción sobre los glóbulos rojos y los leucocitos de algunos animales, pero no del hombre. Se denomina alfa hemolisina cuando algunas bacterias reducen la hemoglobina a metahemoglobina, produciendo en las placas de agar sangre una zona verde alrededor de las colonias (26).

La beta hemolisina actúa sobre los glóbulos rojos de algunos animales. Causa lisis después de que los tubos han sido mantenidos a temperatura ambiente o de refrigeración durante 8 a 12 h. Esta es la llamada lisis caliente-fría. Se llama beta hemolisina cuando en las placas de agar sangre, las colonias de bacterias hemolíticas se rodean de una zona clara, sin color, que es donde los glóbulos rojos han sido lisados y la hemoglobina es destruida hasta perder su color. La beta lisina es antigénicamente distinta y menos tóxica para los animales de laboratorio que la alfa lisina. A diferencia de la alfa lisina, la beta lisina se forma lo mismo en condiciones aerobias que anaerobias (26).

La delta y gama hemolisina actúan sobre los glóbulos rojos y leucocitos de los humanos y de algunos animales, las producen estafilococos patógenos. La delta hemolisina es termoestable (26).

Leucocidina. Esta toxina tiene acción destructiva sobre los leucocitos humanos y de conejos; no muestra actividad sobre otros tejidos celulares. La actividad de la leucocidina, se mide determinando la cantidad de reducción del azul de metileno en un tubo de ensayo que contenga leucocitos y el cultivo específico o filtrado del cultivo. La leucocidina producida por S.aureus es neutralizada por las antitoxinas estafilocócicas (26).

Exfoliatinas. S.aureus la produce en caldo de cultivo, puede obtenerse a partir de los sobrenadantes libres de células. La toxina o las cepas de estafilococos que la originan, provocan una exfoliación generalizada de la epidermis cuando se inyecta en ratones recién nacidos; esta es una técnica que se emplea para analizar su actividad biológica. Es una exotoxina relativamente potente, 0.2 µg de toxina purificada producen la separación de la piel en el ratón recién nacido, dosis algo más elevadas son efectivas en el hombre adulto (26).

Exotoxinas pirógenas. En 1979 Schlievert y sus colegas describieron una toxina aislada de S.aureus que es similar en muchos aspectos a las exotoxinas pirógenas de los estreptococos. Esta toxina proteínica es pirógena para los linfocitos e incrementa la susceptibilidad a ciertos efectos de las endotoxinas, como shock letal y daños en el hígado. Se cree que el efecto de las toxinas está relacionado con la enfermedad de Kawasaki y con el síndrome de shock tóxico (26).

Enzimas estafilocócicas. S.aureus sintetiza varios factores enzimáticamente activos que actúan sobre sustratos asociados al huésped y a menudo producen efectos venenosos. Los factores más importantes son la coagulasa, la hialuronidasa y las estafiloquinasas (26).

Coagulasa. Algunos estafilococos virulentos producen una enzima comúnmente llamada coagulasa, que actúa con un activador en el plasma para coagular el fibrinógeno de ciertos animales. Como parte de esta acción, la fibrina cubre las paredes celulares de las bacterias y así las protege contra la acción de la fagocitosis. La coagulasa también está relacionada con la producción de coágulos (trombos) en la sangre circulante (26).

Hialuronidasa. El ácido hialurónico, sustancia fundamental de los tejidos, es despolimerizado por la hialuronidasa, una enzima producida por la mayoría de las cepas de S.aureus (26).

Estafiloquinasa. Un gran número de estafilococos son capaces de disolver coágulos de fibrina mediante una quinasa bacteriana. Esta enzima actuó en el plasma de animales, incluyendo perros y conejos (26).

Penicilasa. Es una enzima que rompe el anillo beta -lactam de la penicilina y la vuelve inactiva (26) (54) (27).

Enterotoxinas Desde 1914 se conoce la relación de estafilococo con intoxicaciones del tipo de envenenamiento de los alimentos. En 1930 Dack estableció que esta enfermedad podía deberse a la ingestión de filtrados de cultivos de cepas de S.aureus que producen enterotoxina.

Las enterotoxinas son proteínas termoestables producidas generalmente por cepas coagulasa positivas de S.aureus.

Son termoestables, este término se ve afectado por los siguientes factores: Concentración inicial de cada tipo en los alimentos, medio en el que se realiza el calentamiento, temperatura del tratamiento.

La enterotoxina inactivada a temperaturas moderadas puede reactivarse en algunos alimentos. Los tratamientos pasteurizantes (72°C, 15 seg) o los efectuados a temperaturas muy elevadas podrían ser insuficientes para

inactivar las enterotoxinas. La enterotoxina del tipo B es la más termorresistente (68).

La susceptibilidad a la enterotoxina ingerida se limita al hombre y a los monos. En el hombre a las 2 o 3 h de ingestión se produce angustia gastrointestinal aguda caracterizada por vómitos y diarrea; los síntomas cesan en pocas horas y no hay efectos secundarios. La dosis de toxina eficaz para el hombre es de 1 a 4 μg (26)(54)(27).

1.6 Enterotoxinas Estafilocócicas.

Los agentes responsables de intoxicaciones causadas por la ingesta de alimentos contaminados con estafilococos son una serie de toxinas denominadas enterotoxinas, por los efectos que causan en el tracto intestinal. Se clasifican como enterotoxinas A(SEA), B(SEB), C₁(SEC₁), C₂(SEC₂), C₃(SEC₃), D(SED), y E(SEE). Son identificadas mediante reacciones con anticuerpos específicos. Su peso molecular varía desde 28 000 a 35 000 daltons. Aunque cada una es inmunológicamente diferente, existe alguna relación antigénica cruzada entre varias de ellas. Se ha descrito un sexto tipo, denominado enterotoxina F. Cuadro 3

Las enterotoxinas son proteínas simples, que están constituidas por cadenas sencillas polipeptídicas que contienen cantidades elevadas de lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina (21)(44)(1).

CUADRO 3.

CARACTERISTICAS GENERALES DE ENTEROTOXINAS

CARACTERISTICA	ENTEROTOXINA					
	A	B	C1	C2	D	E
Peso molecular	27,800	28,366	34,100	34,000	27,300	29,600
Punto isoelectrico	6.9	8.6	8.6	7.0	7.4	7.0
Absorción máx. (nm)	277	277	277	277	278	277
Contenido de Nitrógeno (%)	16.2	16.1	16.2	16.0	-	-
Dosis emética (ED 50 µg/mono)	5	5	5	5-10	20	10

Fuente: Bergdoll and Borja. 1972 (49)

Las cadenas polipeptídicas están unidas por puentes de disulfuro para formar los enlaces de cistina, la cuál está localizada en el centro de la molécula. Sólo la secuencia de aminoácidos de SEA, SEB y SEC son conocidas. SEB y SEC tienen áreas iguales, pero estas enterotoxinas tienen sólo una área igual a la enterotoxina SEA. Esta secuencia común de aminoácidos se considera el sitio tóxico de la molécula de enterotoxina (21)(44). Figuras 1 y 2

Las cantidades necesarias para que la enterotoxina produzca un daño al individuo varían de 1 a 4 μ g (21).

Las enterotoxinas son higroscópicas, solubles en agua y solución salina; resistentes a enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, renina y papaina, pero sensibles a la pepsina a pH 2. Sus puntos isoelectricos varían de 7 a 8.6 .

Las enterotoxinas mas frecuentemente involucradas en contaminación de alimentos son de las tipos A y D, mientras que la enterotoxina B raramente se ve involucrada. Sin embargo se encontró presencia de enterotoxina B en huevos (20).

1.6.1 Factores que influyen en la producción de enterotoxina

1.6.1.1 Temperatura. la producción de enterotoxina - se encuentra dentro de los límites de temperatura de 10 a 45°C, considerándose como óptima 40°C. Estos valores pueden variar. Estudios hechos por Vandenbosh y colaboradores (17), mostraron que 40°C fue la temperatura óptima para la producción de enterotoxinas B y C, con límites de 20 y 45°C cuando la incubación no fue mayor de 24 h. Sin embargo Dietrich y colaboradores (1) reportaron que

37°C es la temperatura óptima para la producción de enterotoxina B. A menor temperatura, tanto mayor es el tiempo necesario para producir una cantidad suficiente de toxina para causar intoxicación.

1.6.1.2 p.H. El rango de pH para la producción de enterotoxina es semejante al del crecimiento de S.aureus, es decir de 5.0 a 9.0 .

Genigeorgis y colaboradores (1) demostraron que el pH más bajo que permite el crecimiento de S.aureus y producción de enterotoxina aeróbicamente es de 4.0 .

Pereira y colaboradores (1) controlaron el pH en varias fermentaciones y encontraron que el crecimiento máximo y producción de enterotoxina A (SEA) y B (SEB) fue de 7.0 y el valor límite para la producción de enterotoxinas SEA y SEC fue de 5.0 .

1.6.1.3 Actividad de agua. S.aureus puede crecer a valores de actividad de agua tan bajos como 0.83, considerándose como óptimo valores mayores a 0.99. En la producción de enterotoxinas existen variaciones en los requerimientos de Aw. SEA se produce a valores más bajos que SEB. Experimentos hechos en laboratorios con alimentos, indicaron que hubo producción de enterotoxina A a valores menores de 0.90, mientras que valores de actividad de agua mayores de 0.90 son necesarios para la síntesis de SEB.

Troller (20) demostró que NaCl es significativamente más inhibitorio para la producción de SEB que para la enterotoxina A. Esto se comprobó al realizar un experimento con S.aureus productor de enterotoxina A y B; para la producción de estos metabolitos se utilizó la técnica de cultivo en saco, utilizando como medio caseína hidrolizada enriquecida con tiamina y niacina, bajo

condiciones de 20 a 45°C, pH 4.5 a 9.0 y concentración de NaCl de 0-25 ‰. Los resultados mostraron que la mayor producción de enterotoxina se obtuvo a 39.4°C y pH 7. La síntesis de SEA y SEB fue inhibida a los 20°C y pH 4.5 con 12‰ NaCl . Esta inhibición se marcó más en el caso de SEB (52).

1.6.1.4 Presencia de otros microorganismos. Es más probable la producción de enterotoxina cuando no hay microorganismos competidores, cuando éstos son escasos o se hayan por alguna razón inhibidos. Los alimentos contaminados con estafilococo después de un tratamiento térmico, constituyen un magnífico medio de cultivo para la producción de toxina.

En el tracto intestinal de los pacientes tratados con antibióticos, los cuales han destruido o inactivado la flora competitiva, se desarrolla S.aureus y produce enterotoxina (21).

1.6.1.5 Condiciones atmosféricas. S.aureus puede crecer tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias, pero el crecimiento es más lento en condiciones anaeróbicas, por lo tanto la aereación tiene un efecto positivo en su crecimiento y síntesis de enterotoxina (21).

McLean y colaboradores (17) encontraron que la aereación con agitación a 37°C, permite que S.aureus produzca mayor cantidad de enterotoxina B. Con un 100% de oxígeno disuelto, el crecimiento del microorganismo a 37°C es máximo, pero no hay síntesis de enterotoxina B. La máxima producción de dicha enterotoxina se da con 10% de oxígeno. Sin embargo investigadores han informado que la enterotoxina puede ser producida en algunos alimentos bajo condiciones anaerobias.

Bennett y Amos (17) encontraron que sandwiches conteniendo niveles detectables de enterotoxina, fueron organolépticamente aceptables.

1.7 Detección de enterotoxinas.

La detección de enterotoxinas en los alimentos se puede lograr por el empleo de animales o por procedimientos in vitro. Entre los animales, se han utilizado perros, cerdos, palomas, ranas, gatos, monos e incluso el propio hombre. Diversos investigadores consideran que el mono es bastante susceptible a las enterotoxinas, por tal razón, el único método biológico específico es la prueba de alimentación a los monos. En este método, 50 ml de la muestra es inyectada por un catéter al interior del estómago del mono. Los animales se observan después de 5 horas para ver si se produce el vómito. Cuando hay emesis, al menos en dos de seis animales, se considera que la reacción es positiva (54).

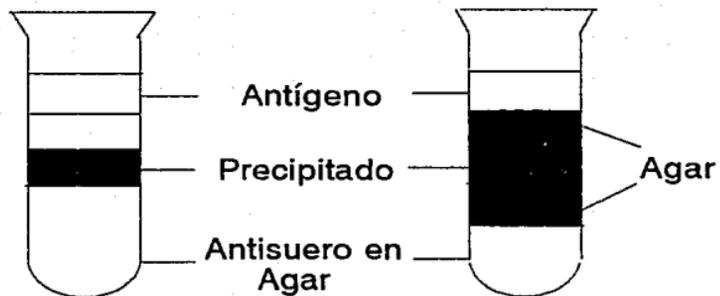
Estos métodos biológicos son muy limitados y no son altamente sensibles. Rara vez se usa por su costo elevado y por constituir una prueba cualitativa (54).

Los métodos más comúnmente empleados in vitro para la detección de enterotoxina, se basan en el uso de anticuerpos específicos para cada una de las diferentes enterotoxinas. Involucran las reacciones de enterotoxinas con su específico anticuerpo en algún tipo de gel. En éstos métodos las reacciones toxina-anticuerpo resultan en la formación de un precipitado, fácilmente visible en el agar, son altamente específicos. Algunas de ellas se mencionan a continuación (54).

1.7.1 *Método de difusión simple.* Es una prueba cuantitativa, que presenta una sensibilidad de 1-2 $\mu\text{g/ml}$. Este método fue ideado por Oudin y consiste en colocar el antígeno sobre el agar que contiene el antisuero en un tubo de ensayo de pequeño calibre. Se deja durante horas o días para que el antígeno se difunda en el agar, formándose bandas de precipitado a distintos niveles, dependiendo del número y clase de los sistemas antígeno-anticuerpo presentes. La precipitación ocurre conforme el antígeno se difunde por el gel, los anillos de precipitado aparecen primero en la parte alta del gel y van moviéndose lentamente hacia abajo. Los factores que determinan los niveles a los cuales la reacción se realiza son el tamaño molecular y la concentración relativa de los elementos de la reacción en la solución (54). figura 3a

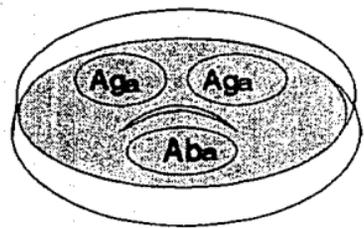
1.7.2 *Métodos de doble difusión.* Oakley y Fulthorpe (54) modificaron la técnica de Oudin poniendo el antisuero en agar, en el fondo de un tubo de ensayo, y encima una capa de gel de agar sobre la cual se coloca la solución del antígeno. Los dos reactivos se difunden el uno hacia el otro en el agar y la precipitación ocurre en el punto donde aparece la concentración óptima (54). figura 3b

Ouchtrlony ideó un método de doble difusión en dos dimensiones que tiene como ventaja la de que se puede probar simultáneamente varios antígenos y antisueros. En esta prueba los reactivos se difunden desde los pozos cortados en el agar colocado en una placa de petri. Donde se encuentran las concentraciones óptimas del antígeno y el antisuero correspondiente, entre los pocillos, se forman las bandas de precipitado. Si las bandas de precipitado formadas por dos antígenos y el anticuerpo se funden en una, en las

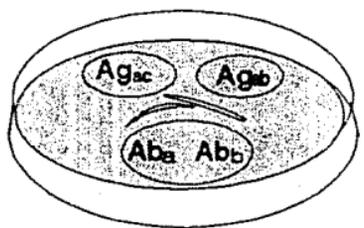


3a Difusión simple (Oudin)

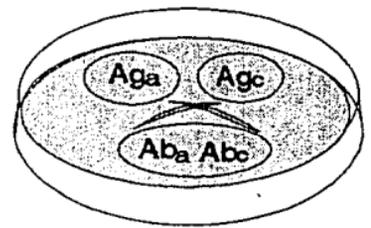
3b Doble difusión



Identidad



Identidad parcial



No hay identidad

3c Método de Ouchterlony

Fig.3 PRUEBAS CUALITATIVAS DE PRECIPITACION

dos muestras, se trata del mismo antígeno; si las bandas se cruzan, son antígenos diferentes. Este método presenta una sensibilidad de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ (54). figura 3c

1.7.3 *Prueba de hemaglutinación.* En esta técnica los anticuerpos están unidos a los eritrocitos. Este complejo se pone en contacto con la enterotoxina y si hay suficiente concentración de antígeno, se llevará a cabo la reacción de aglutinación. La sensibilidad de esta prueba es de 0.0015 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina (54).

1.7.4 *Microplaca.* Se usa para la detección de cantidades pequeñas de enterotoxina que se encuentran en extractos de comida

La prueba se realiza sobre un portaobjeto, en el cuál se colocan dos tiras de cinta negra, delimitando un área de 2 cm^2 , se adiciona una capa fina de agar (agar noble), esta debe ser lo más delgada posible, para que el método tenga la mayor sensibilidad, sobre esta se coloca una placa de acrílico con 5 orificios. Posteriormente se procede al llenado de los pozos, respetando la disposición siguiente: El pozo central se llena con la antitoxina control, el pozo superior con la toxina control, y los tres restantes con los problemas. La microplaca lista se coloca dentro de una caja de petri, que contenga esponjas húmedas, la cuál se incuba a 37°C durante 24 h. Después de este tiempo, se retira el molde de plástico, teniendo cuidado de no desprender el agar del portaobjeto y se observan las líneas de precipitado. Este método presenta una sensibilidad de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina (21). Figura 4

1.7.5 *Prueba de precipitación cuantitativa.* 0.5 ml de la solución de antígeno se mezcla con 0.5 ml de antitoxina y se incuba a 37°C por 4 h y posteriormente a 4°C por 4 días. Se observa precipitado y se analiza el nitrógeno

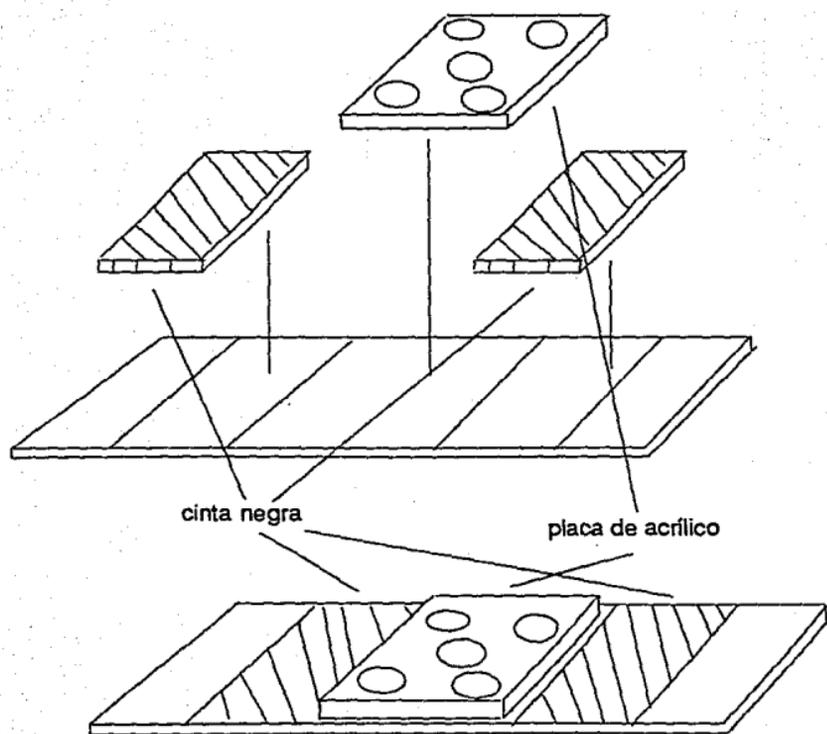


Fig.4 TECNICA DE LA MICROPLACA

total que se encuentra en esta zona por la técnica de micro-Kjeldahl. La enterotoxina contenida se calcula con una curva estándar preparada con toxina purificada y antitoxina (21).

1.7.6 *Anticuerpos fluorescentes*. Es una técnica indirecta para visualizar una reacción que ocurre cuando un anticuerpo conocido marcado con fluorocromo se combina con su antígeno homólogo. Si un cultivo mixto o una muestra se coloca en una lámina, se mezcla con suero que contenga anticuerpo fluorescente conocido y se mira por el microscopio en el campo oscuro, los microorganismos aparecen brillantes sobre un fondo negro (54).

1.7.7 *Radioinmunoensayo (RIA)*. Este método se basa en el uso de enterotoxina pura tratada previamente con un elemento radioactivo, el I^{125} . 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 que se le determina la reacción emitida mediante un contador gama, obteniéndose así la cantidad de enterotoxina iodada presente (54).

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 (54).

La sensibilidad del ensayo es de 0.3 ng/ml, utilizando 10 μ l como el mayor tamaño de muestra.

El uso de esta prueba se limita a unos cuantos laboratorios, debido a la necesidad de poseer los requerimientos básicos para el manejo de materiales

radioactivos, un contador gama, así como el uso de enterotoxinas purificadas (54).

1.7.8 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Es una de las técnicas más rápidas y específicas para detectar la presencia de toxinas estafilocócicas. La sensibilidad de éste método es de 0.25 ng/g.

El ensayo de 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 una 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. Entonces la cantidad de color desarrollado es una medida de la cantidad de toxina presente. Esto elimina la necesidad de usar enterotoxinas altamente purificadas (27).

Existen dos formas de elaborar esta prueba. La primera es sobre placas para microtitulación, de fondo redondo, en 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 microplacas y el uso de un espectrofotómetro para 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 volúmen de muestra de 10-20 ml., por lo que aumenta la cantidad de enterotoxina adsorbida por muestra y se hace posible el uso de volúmenes de sustrato de 1 ml, de esta forma el color desarrollado se puede leer en un

colorímetro, instrumento que poseen los laboratorios. Las enzimas que se utilizan en esta técnica son la peroxidasa o la fosfatasa alcalina, como sustrato se usa para-nitrofenilfosfato, el cuál después de la reacción enzimática se convierte para-nitrofenol, compuesto de color amarillo.

Freed, Evenson, Reiser y Bergdoll realizaron una investigación para el análisis de enterotoxinas en alimentos, comparando las técnicas en placa y con esferas. 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.

Saunders y Bartlett, 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 del material orgánico no interfiere con el análisis, eliminándose todos los pasos de purificación y concentración del extracto necesarios para los métodos en gel. figura 5

Kauffman realizó una comparación entre la técnica de ELISA en placa y el radioinmunoensayo. Menciona como desventaja del RIA la vida media limitada del I^{125} , factores de daño radioactivo, agregación de la proteína marcada, pérdida de inmunoreactividad; además de las licencias y requerimientos de seguridad para el uso de material radioactivo así mismo este investigador determinó que la sensibilidad de ELISA es de .2 ng y es muy útil en la detección de enterotoxinas en extractos de alimentos. El uso de una enzima para reemplazar al I^{125} en el análisis, hace del ELISA una provechosa alternativa para el RIA en cuanto a seguridad en el laboratorio y economía de operación (61).

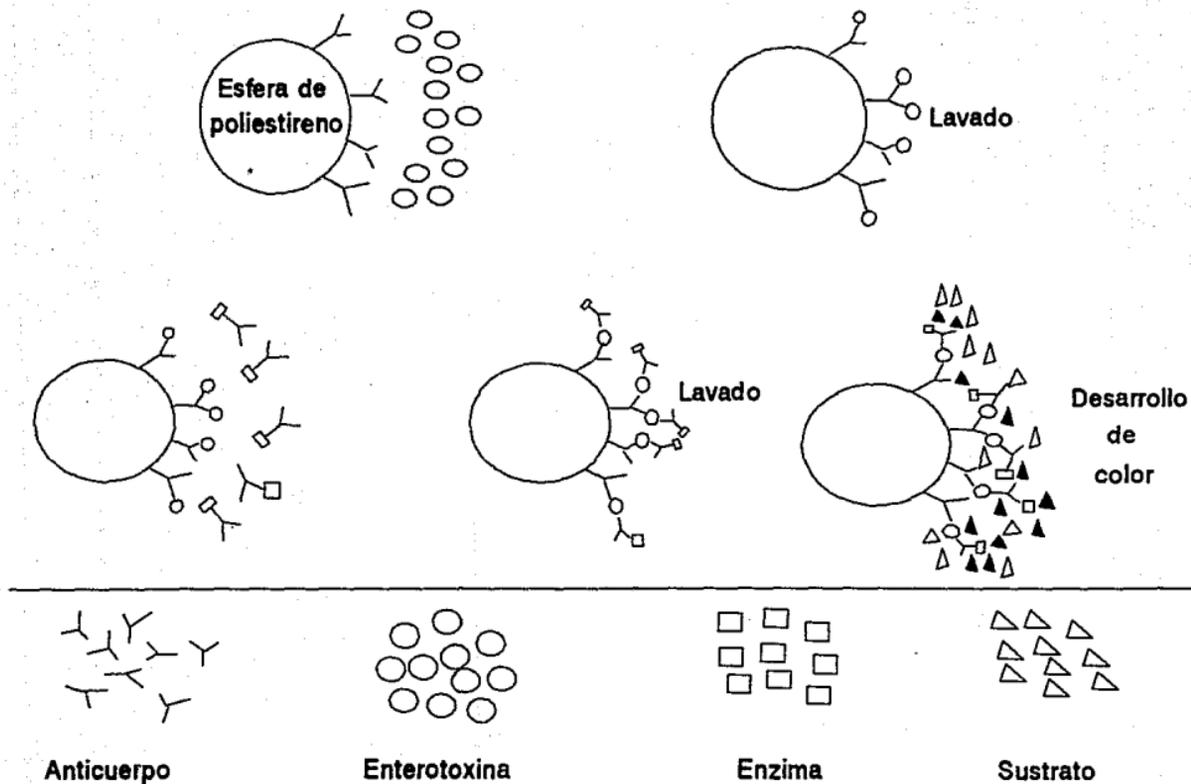


Fig.5 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1.7.9 *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 antiseros específicos. Se denomina reacción de aglutinación al fenómeno en que la mezcla de las partículas de antígeno con los antiseros específicos provoca una agrupación de dichas partículas antigénicas. Por lo general, la aglutinación puede apreciarse a simple vista (57).

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.

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 (57).

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. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la cantidad de enterotoxina presente en la muestra analizar (57).

Este método utiliza una cobertura de partículas de látex con un anticuerpo específico, seguido por la adición del extracto del alimento. Si existe presencia de toxina en el extracto, las partículas de latex se aglutinarán. Este procedimiento se realiza en microplacas, de poliestireno con fondo en V, ya que en éstas se logra observar fácilmente la reacción de aglutinación (57).

Es de sensibilidad adecuada para la detección de enterotoxinas en alimentos implicados en brotes de intoxicación. Desafortunadamente se 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. Park y Szabo 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 las enterotoxinas A,B,C,D.

El método RPLA tiene una alta especificidad y sensibilidad; la muestra solamente requiere del método de extracción simple; es rápido, debido a que se obtienen resultados en menos de 24 h; es semicuantitativo y no requiere de equipo de precisión para la lectura de resultados (54).

La especificidad del RPLA debe examinarse rutinariamente con enterotoxinas estándar y extractos libres de ellas. Rose, Bankes y Stringer, determinaron que las reacciones no específicas, cuando se obtienen resultados

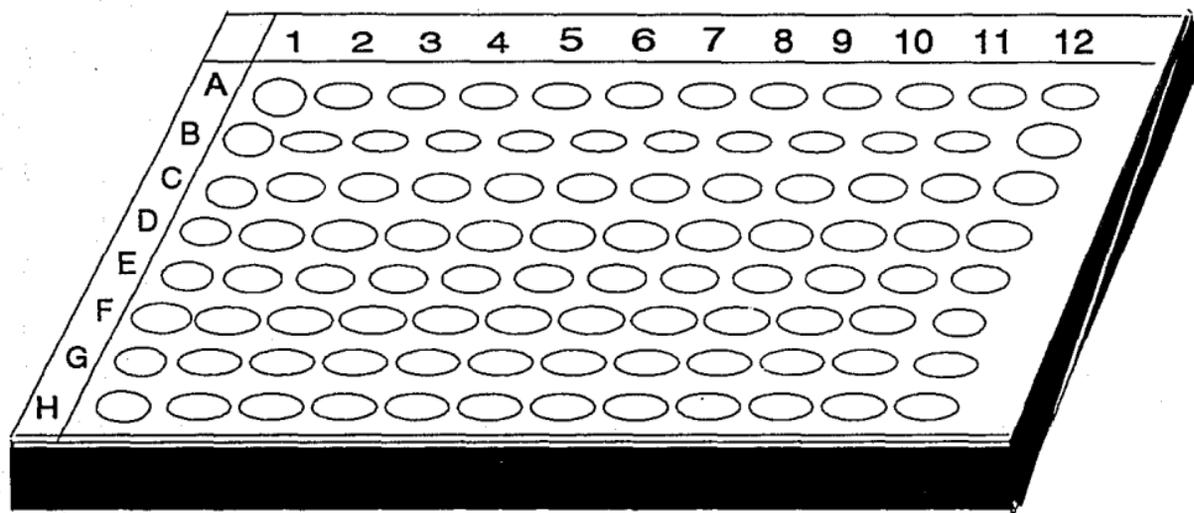
falso-positivos en los controles se pueden eliminar mediante la adición de hexametáfosfato sódico 10 mM (57) (70). figura 6

1.8 Intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocócicas.

Alimentos involucrados. Cualquier alimento que proporcione un medio adecuado para el desarrollo de S.aureus puede estar implicado en este tipo de intoxicación. Casi todos los alimentos húmedos son capaces de permitir el crecimiento de S.aureus y en consecuencia, determinar la intoxicación estafilocócica. Los productos deshidratados también pueden transmitir la toxina; se han puesto de manifiesto brotes de intoxicación estafilocócica producidos por el consumo de leche en polvo reconstituida. La pasteurización y el proceso de desecado, inactivan al microorganismo, mientras que las enterotoxinas no se ven afectadas por estos tratamientos debido a su termorresistencia (63).

Los alimentos que con más frecuencia se han relacionado con este tipo de contaminación son: jamón y productos análogos; artículos de pastelería como los bollos con crema o nata; aves, especialmente el pollo en ensalada; la ensaladilla de patatas y el queso cheddar. También se asocian con intoxicación estafilocócica, las conservas de carne en gelatina, los pasteles de carne, las salsas o jugos de carne, huevo en polvo, leche, helados, etc (68) ((63).

Una de las dificultades relacionadas con la intoxicación estafilocócica radica, en el hecho de que al crecer tales microorganismos en el alimento, no dan lugar a olores ni sabores manifiestos, presentando por tanto sabor,



**Fig.6 PLACA DE MICROTITULACION PARA
RPLA**

olor y aspecto escasamente diferente al del alimento en el que no ha existido multiplicación de organismo.

Las intoxicaciones por estafilococo ocurren durante todo el año, aunque con mayor frecuencia en el verano, por las elevadas temperaturas ambientales. En esta época todavía es mas importante conservar el alimento en refrigeración.

Con la finalidad de conocer los agentes y alimentos involucrados más frecuentemente en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, se realizó en México la revisión de intoxi infecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario, en cuyo estudio participó el Laboratorio Nacional de Salud Pública entre 1980 y 1989. Se confirmaron 58 brotes (73%) de los 79 que fueron estudiados. Los brotes ocurrieron en reuniones (24.1%), escuelas o guarderías(10.3%), restaurantes (8.6%) y hospitales(8.6%). El principal microorganismo implicado fue S.aureus, que provocó el 48.2% de los incidentes. Los alimentos involucrados fueron: quesos (29.3%), pasteles (15.5%), carne cocinada (15.1%), leche (13.8%) y pescados y mariscos (7.0%) (19).

1.9 Daño térmico

Una gran variedad de factores usados en los procesos para la elaboración de productos alimenticios causan estres o daño a las células bacterianas que se encuentran presentes en la materia prima, entre estos se encuentran el calor, frío, radiación, secado etc (40)(31)(2).

Estos tratamientos como no son lo suficientemente severos para matar al microorganismo en el

alimento, son peligrosos ya que afectan la salud pública (2).

Cuentas bajas de S.aureus son considerados como un índice de falta de sanitización en los alimentos cocinados, listos para comer. Sin embargo es conocido que cerca de 10^6 S.aureus/g en el alimento, son generalmente requeridos para causar intoxicación en el alimento (2) (51) (30).

Estos organismos resistentes al calor deberían estar ausentes o presentes en pequeñas cantidades en el alimento, ya que algunos de ellos no son calentados antes de su consumo. Por lo tanto se ha recomendado el uso de métodos para la enumeración de poco menos de 100 S.aureus/g (2).

La detección de un número bajo de S.aureus dañado es mayor después del periodo de recuperación en un medio líquido que por contaje en placa. Esto fue informado por Giolitti y Cantoni (2).

Paer y col. recomiendan la recuperación en AST conteniendo 10 % NaCl, el cuál ellos encontraron esta técnica superior al del método de Giolitti y Cantoni (51).

Stiles M. E. y P. C. Clark investigaron la fiabilidad de medios selectivos para la enumeración de S.aureus con y sin daño, ellos probaron la eficiencia de 15 medios selectivos comparándolos con el Agar Soya Trypticaseína. El agar Baird-Parker, se escogió como medio para la cuenta de células dañadas térmicamente y sin daño. El medio agar telurito polimixina yema de huevo, al igual que el agar azida yema de huevo dieron resultados favorables en este estudio. Para el caso de células no dañadas el agar Vogel Johnson y agar glicina telurito observaron resultados favorables, pero después del tratamiento térmico, y del

enriquecimiento de las células en AST para la recuperación del daño térmico, sus cuentas fueron poco fiables (2) (30).

El medio Vogel Johnson se consideraba como tóxico, sin embargo fue utilizado en el estudio por ser un medio simple y por la disminución de su toxicidad después de la recuperación de la célula. Este medio fue altamente selectivo por S.aureus pero tiene sólo el 9% del contaje del medio de Baird-Parker. En el medio agar telurito polimixina yema de huevo (TPEY), las cuentas fueron similares al medio Baird-Parker y es apreciablemente más barato. Este tiene las cuentas mas elevadas pero cultivos de típicas colonias negras mostraron que sólo el 10% de las colonias contadas fueron gram positivas. Por tal razon es menos selectivo. Estas observaciones justifican la selección de AST y Baird Parker como medio control para el estudio de S.aureus con y sin daño (2).

El tipo de medio utilizado para S.aureus se ha sido citado como el principal factor afectante de su crecimiento. El medio selectivo incrementa el grado aparente de muerte (30).

La adición de catalasa a un medio selectivo se ha propuesto para incrementar la enumeración de células dañadas, pero existe producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ocasionando un efecto bactericida, esta acumulación de H_2O_2 es debida a la parcial inactivación de la catalasa (33).

Baird-Parker y Davenport sugieren el uso de piruvato, un descompositor de H_2O_2 en la enumeración de estafilococos estresados (5) (25).

Bucker y col. observaron dos factores de importancia concernientes al daño. Primero, la bacteria

sujeta a estres subletal se vuelve hipersensible a estres secundarios, tales como los que se encuentran en un medio selectivo y segudo la bacteria sujeta a tratamiento subletal produce lesiones reparables cuando las células se transfieren a un medio con los nutrientes necesarios para su recuperación; es decir que exista en él una fuente de carbohidratos, aminoácidos y fosfatos (6)(11)(28)(26)(53).

Allwood y Rusel investigaron que al tratar células de S.aureus a 50°C o 60°C y posteriormente colocadas a un medio de enriquecimiento e incubadas a 37°C se lleva a cabo la síntesis de RNA. Aunque el porcentaje de síntesis es menor que las células no dañadas. Sorgin y Ordal demuestran que la síntesis del RNA se relaciona con el proceso de recuperación de cepas tratadas térmicamente de S.aureus (6)(11).

Publicaciones de varios laboratorios han demostrado que la composición del medio de enriquecimiento ejerce una influencia en la recuperación de células tratadas térmicamente. La presencia de extractos de levadura aumentan la recuperación de la síntesis de RNA (4)(7).

Pariza e Iandolo realizaron un estudio para determinar si las células dañadas produjeron enterotoxina en un medio de enriquecimiento y sin éste. Ellos observaron que hubo producción de enterotoxina tanto en las células que se enriquecieron como aquellas que no se colocaron en un medio edecuado de nutrientes, la producción fue mayor al colocar la célula en un medio enriquecido.

El número de células de S.aureus dañadas, en una población se puede obtener por diferencia entre el contaje en placa utilizando como medio agar soya tripticaseína (número total de microorganismos) y el obtenido en agar soya tripticaseína con NaCl

(microorganismos no dañados). Este método se basa en la disminución en halotolerancia que presentan las células dañadas (30).

El daño que sufre la célula después del tratamiento térmico ocurre en varios sitios, los cambios importantes son:

Presenta un daño en la membrana citoplasmática. Esto permite pérdida del material que se encuentra dentro de la célula como iones, aminoácidos, lípidos etc (28).

Las capacidades metabólicas de las células son alteradas. Hay una selectiva inactivación de las enzimas celulares y una parcial desnaturalización de las proteínas de las células (28).

Existe una degradación del RNA ribosomal (40).

Con S.aureus tratado a 52°C, estos cambios probablemente ocurren simultáneamente o en una secuencia rápida, así que es difícil de determinar cuál es el primero o sitio crítico del daño. El daño puede investigarse por la incapacidad de células S.aureus tratadas térmicamente de formar colonias en agar conteniendo 7.5% NaCl. El daño térmico es reversible. Las células recuperan la tolerancia a la sal durante el período en el cuál no se multiplican. La recuperación a la tolerancia a la sal es independiente de la recuperación de la actividad enzimática, síntesis de lípidos, balance de K^+ / Na^+ . (5).

Hurst y col. informan que después del tratamiento térmico subletal, la habilidad de S.aureus de formar colonias en un medio elevado de sal, esta relacionado con el nivel de Mg^{++} celular. En 1974 estos investigadores

propusieron que la pérdida de Mg^{++} celular conduce a la pérdida de la tolerancia a la sal, pero estas teorías no llegaron a fortalecerse. Sin embargo observaron que el Mg^{++} celular incrementa al principio y al final del ciclo de crecimiento. Mas tarde en 1976 informaron que el Mg^{++} es un requerimiento indispensable para la recuperación del daño térmico subletal. Realizaron varios experimentos utilizando diferentes medios de recuperación y observaron que las células dañadas mueren cuando los fosfatos o aminoácidos son omitidos del medio de recuperación, pero cuando este medio no contenía vitaminas, glucosa, Na^+ y K^+ , no hubo recuperación de la célula. Sin embargo si el medio no contiene Mg^{++} causa muerte y disminución en la recuperación de la célula (5)(3)(70)(71).

Basándose en éstos resultados realizaron un medio mínimo de recuperación, el cuál contenía sólo 3×10^{-6} M de Mg^{++} , como impureza y observaron que las células dañadas recuperaron su tolerancia a la sal. Posteriormente a este medio le agregaron 10^{-3} M de etilendiamintetracetato (EDTA), lo que impide la recuperación de la célula, pero al adicionar 10^{-2} M de Mg^{++} , permitió la completa recuperación de la célula. Esto se debe a que en un principio la afinidad de las células por el Mg^{++} , es mayor que el EDTA, esto se debe a que el ácido tecnoico captura polímeros de Mg, y las células dañadas pierden D-alanina de su complejo ácido tecnoico y por lo tanto la afinidad de ácido tecnoico con el Mg^{++} es mayor. Al continuar con la recuperación el Mg^{++} es capturado por el EDTA presente en el medio, disminuyendo el nivel de Mg^{++} , al agregar concentraciones mayores de Mg^{++} , forma éste un complejo con el EDTA, dejando Mg^{++} libres para la célula. Por ésta razón el Mg^{++} afecta la viabilidad y recuperación de la célula dañada (70)(71).

Los iones de Mg^{++} son necesarios para la actividad de las enzimas y para la integridad de ribosomas.

Tomlins y col. estudiaron el fenómeno de daño y recuperación de las enzimas deshidrogenasa oxoglutarato, deshidrogenasa malato y deshidrogenasa lactato de S. aureus. Encontraron que las enzimas son sensibles al daño térmico. Ellos realizaron varios experimentos con estas enzimas, observando que la actividad enzimática de las deshidrogenasas malato y lactato llegaron a recuperarse, Sin embargo la recuperación de la deshidrogenasa oxoglutarato no se observa su recuperación. Los estudios que realizaron no mostraron hasta que punto de la recuperación o de crecimiento se llegó a la completa actividad de las enzimas sensibles al calor (10).

Otro ion importante es el k^+ la pérdida de iones de k^+ por la célula es una de las consecuencias de daño térmico, debido al requerimiento de k^+ por ciertas enzimas y para el funcionamiento ribosomal (10)(17).

Pariza e Iandolo estudiaron el comportamiento de la coagulasa, ya que es una enzima que se utiliza como índice de virulencia o patogenicidad, observaron que suspensiones de S. aureus dañadas térmicamente a 54°C por 15 min, produjeron coagulasa durante la recuperación en el medio soya tripticaseína; éstas células estresadas térmicamente producen coagulasa despues de 2 h en la fase lag. Al iniciar la síntesis de coagulasa ésta fue rápida con un promedio de 10 a 15 unidades/ml producidas. Cuando la recuperación fue completa la síntesis de coagulasa ceso. Adicionando cloranofenicol al medio de recuperación (50 μ g/ml) inhibe la síntesis de coagulasa, pero esta no interfiere en la recuperación normal de la tolerancia a la sal (53).

La síntesis de coagulasa durante la recuperación es independiente de la cantidad molar de buffer

en el cuál las células son dañadas, de la edad de las células y el grado de daño (53).

En el medio completo de recuperación las células recobran la tolerancia a la sal en 6 h, en este tiempo la coagulasa también se detectó, pero la cantidad máxima se observó sólo cuando las vitaminas estuvieron presentes, por lo tanto las vitaminas estimulan la producción de coagulasa pero no afecta la recuperación. Sin embargo la producción de coagulasa no es necesaria para la recuperación del daño térmico de S.aureus (53).

La síntesis de proteínas fue estimulado por la regeneración ribosomal. La coagulasa es una proteína con propiedades enzimáticas, esta síntesis depende de los ribosomas dados de la célula. Las células dañadas reducen el contenido ribosomal y no pueden producir coagulasa. Durante la recuperación en un medio, la síntesis de los ribosomas ocurre rápido y la coagulasa se detecta (53).

En 1979 Hershey estudia otra alteración de daño térmico. El establece que la bacteria sobrevive a tratamientos térmicos mostrando un incremento en el período de latencia, cuando se transfiere a un medio conveniente de recuperación (6)(11).

El incremento de la fase lag depende de la temperatura a la cuál, la célula ha sido expuesta. Se ha demostrado que la prolongación de la fase es un efecto directo de daño (6)(11).

Jackson y Woodbine confirman estos comentarios, los cuales encontraron que la fase lag se prolonga con el tiempo de exposición del organismo a la temperatura letal, que fue incrementando (6)(11).

Jackson y Woodbine piensan que el término "extensión de la fase lag" debe ser sustituido por que cuando los organismos no dañados se inoculan en un medio, la fase lag se puede extender por la variación de diferentes factores tales como la cantidad del inóculo, la temperatura de incubación, edad del cultivo y los componentes del medio. Así en el caso de los organismos dañados hay un período de ajuste, después de la inoculación en un medio de nutrientes (4) (29).

Existen compuestos que protegen a las células bacterianas contra la muerte o efectos de daño que aparecen con el calor, que disminuyen o eliminan la pérdida de constituyentes celulares (4).

James L. Smith y col observaron que no existe daño o muy poco cuando S. aureus es tratado térmicamente en la presencia de NaCl y hay una marcada disminución en pérdida de constituyentes celulares (46) (49).

La pérdida de los constituyentes celulares ocurren en la ausencia de daño. El daño térmico puede estar acompañado por pérdida de materiales absorbidos por ultravioleta, pero no siempre pérdida de materiales es indicativo de daño (8) (49).

Cuando las células son calentadas en buffer de fosfatos conteniendo sal, azúcar, aminoácidos, redujeron el daño en un 5% de lo encontrado en estudios anteriores. Pero encontraron que las células perdieron más materiales cuando se calentaron en una solución buffer conteniendo polioles y fructuosa, que solamente usando buffer. No se conoce el mecanismo por el cual estos compuestos previenen el daño, pero no la pérdida de materiales (8) (49).

La elevada concentración de solutos producen una mayor protección contra el daño térmico. Smith y Benedict informaron que un incremento en la concentración de la sal, incrementa la protección a las células en el tratamiento térmico, pero existe una disminución de esta protección cuando la concentración de la sal se encuentra en un largo período de calentamiento. Las bases bioquímicas para la interacción entre la concentración de soluto y temperatura en prevención del daño celular no ha sido determinada (46).

Hurst y Hughes demostraron que estos compuestos permiten aumentar el límite máximo de temperatura de crecimiento de S.aureus esto se evidenció en los experimentos los cuales demostraron que el NaCl extendiendo la temperatura, desde 44°C a 46°C; estos investigadores se refieren a este incremento como el máximo límite de temperatura de crecimiento. Por lo tanto el NaCl actúa como termoprotector. Ellos también observaron que estos termoprotectores también incrementan la resistencia al calor (8).

Smith y col reportaron que termoprotectores son todos aquellos componentes que presentan los siguientes efectos: crecimiento por arriba de la temperatura límite, incremento en la sobrevivencia bajo condiciones desfavorables, disminución del daño térmico (8).

Hughes y Hurst observan que la morfología de las células de S.aureus que crece a 45°C en la presencia de agentes protectores (5.8% NaCl), difieren apreciablemente de células que crecen a 37°C en la ausencia de adición de NaCl. La septación de las células a elevadas temperaturas llega a ser irregulares, ellas tienen un engrosamiento de la pared celular y se forman en grupos o racimos. Mientras que células que crecen a 37°C con o sin NaCl se forman

individualmente. Las células que crecen a 45°C fueron notablemente más resistentes al calor y sobreviven mas tiempo en varios alimentos (8).

Jackson estudió que el daño de S.aureus no sólo es causado por el calor sino también puede ser ocasionado a bajas temperaturas, y así informó que al exponer el microorganismo a 5°C, se da un daño metabólico, manifestado como progresiva pérdida de capacidad de formar colonias en Agar manitol sal (MSA) . La recuperación de las células se dió al incubar a 37°C por 2 h. Demostró que el daño tiene relación con el aumento de la sesibilidad de NaCl y de los requerimientos nutricionales. Estas observaciones de daño metabólico a bajas temperaturas son continuas con los efectos, ya conocidos de la temperatura en sistemas biológicos (31)(55)(37).

Por abajo de la temperatura mínima de crecimiento, el metabolismo no cesa completamente. Ciertas funciones como la multiplicación y división de la célula pueden no ocurrir a temperaturas por debajo del límite de crecimiento, pero algunas otras actividades pueden ocurrir. A temperaturas mínimas el metabolismo es desbalanceado y esto puede ser causado por el daño metabólico (31)(55)(37).

Robert P. y col. reportaron que el concepto de daño metabólico va de acuerdo al daño de la bacteria por calor, radiación ultravioleta y tóxicos químicos. Los experimentos de Corran y Evans indican que la bacteria que sobrevive a la destrucción debida a los agentes físicos y químicos mencionados anteriormente, son exigentes en sus necesidades nutricionales que las células no expuestas (31)(37)(55).

1.10 Crema pastelera

La crema pastelera es un postre totalmente casero que puede conservarse durante 24 h en el refrigerador. Constituye una preparación dulce, más o menos fluida, de consistencia untuosa. Está hecha a base de huevos, leche, azúcar y harina, que le imparte su consistencia característica. A veces es enriquecida con mantequilla y perfumada de diferentes maneras. Puede usarse como relleno de diferentes pastas (mil hojas, croissant, etc), como guarnición (tartas, flanes) o para ciertos postres calientes (soufflés) o fríos. Por lo general se utilizan frías o tibias (35)(63).

Los alimentos que se elaboran a partir de elevadas proporciones de leche como es el caso de la crema pastelera, no sólo son nutritivos para el hombre, sino también proporcionan un buen medio para el crecimiento de microorganismos.

Estos productos se pueden contaminar muy fácilmente con S.aureus, dado su amplio habitat; se contaminan por el contacto con superficies de trabajo, utensilios y manos. Si tales alimentos se mantienen en un lugar caliente, los microorganismos crecen y en este proceso sintetizan enterotoxina. El rápido enfriamiento de tales alimentos, al menos a 10°C y preferiblemente 4°C, limita el crecimiento de éstos y muchos otros microorganismos, evitando de esta forma la producción de enterotoxina. Aún así dichos alimentos deben consumirse inmediatamente después de su elaboración. El tratamiento que se les da a éste tipo de alimentos es suficiente para destruir las formas bacilares comunes y las bacterias gram negativas, ambas responsables de la descomposición del producto, así como también para destruir las formas saprófitas comunes. Por lo tanto S.aureus tiene de nuevo la posibilidad de crecer sin

la interferencia de las bacterias competitivas. Los pasteles rellenos de crema o natilla han causado problemas de salud pública, especialmente en casos en que el personal del obrador o encargado de la venta los han manipulado en condiciones de falta de refrigeración. Esta deficiente forma de manejar los alimentos ha disminuido algo en los últimos años debido a las advertencias de los inspectores sanitarios y algunas pastelerías importantes han parado la producción de estos artículos durante los meses de verano. Sin embargo aún es fácil ver pasteles de crema o rellenos en escaparates sin refrigeración, que son vendidos (12) (60).

Las toxinas producidas por el estafilococo son termorresistentes. Cuando se encuentran en los alimentos, las bacterias no esporuladas son relativamente resistentes al calor, pero no lo son tanto como las toxinas. Considerando la termorresistencia de las toxinas en los alimentos, es posible que el brote estafilococócico tenga lugar a partir de alimentos con toxina.

1.11 JUSTIFICACION

La importancia de S.aureus en el alimento radica en la capacidad que presentan algunas de sus cepas para producir enterotoxinas, causantes de un gran número de intoxicaciones alimentarias en México; debido a que éstas proteínas son termorresistentes.

Los alimentos mas involucrados en éste tipo de contaminación son la leche y los productos cárnicos. El S.aureus encuentra en éstos los nutrientes apropiados para su desarrollo.

En los alimentos cocinados o industrializados, los estafilococos son excelentes indicadores de los cuidados higiénicos con que son manipulados.

Por lo antes expuesto, la industria alimentaria realiza análisis microbiológicos específicos para la detección de S.aureus enterotoxigénicos. Las pruebas bioquímicas se encuentran entre las más usadas por su relación con el metabolismo del microorganismo y por su costo relativamente bajo en comparación con las pruebas antígeno-anticuerpo correspondiente a cada tipo de toxina.

Cuando una bacteria es tratada térmicamente, sufriendo un daño subletal éstas pruebas pueden dar resultados falsos positivos o negativos, ya que sufre cambios en su metabolismo.

De acuerdo con lo investigado debe tomarse en cuenta que un tratamiento térmico no siempre es suficiente para destruir el S.aureus presente en un alimento, por lo tanto es importante realizar pruebas específicas fiables al

microorganismo y de esta forma asegurar un mejor control sanitario del alimento.

2. MATERIALES Y METODOS.

Para el desarrollo de este trabajo, se hicieron las siguientes actividades.

- Caracterización de la cepa de S.aureus.
- Verificación de la producción de enterotoxina tipo A.
- Determinación de la curva de crecimiento de S.aureus.
- Estandarización del inóculo.
- Análisis microbiológico de la leche entera en polvo utilizada en tratamiento térmico y elaboración de crema pastelera.
- Tratamiento térmico de S.aureus. Determinaciones de destrucción celular y población dañada.
- Aplicación de prueba bioquímicas específicas al microorganismo, estando éste con y sin daño.
- Recuperación de células dañadas y evaluación posterior de su respuesta bioquímica.
- Capacidad productora de enterotoxina en el microorganismo dañado.
- Elaboración de crema pastelera y su inoculación con S.aureus con y sin tratamiento térmico.
- Determinación de S.aureus y mesofílicos aerobios en crema pastelera a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento.
- Extracción de enterotoxina del alimento.
- Detección de enterotoxina A en la crema pastelera por el método de RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination).

2.1 Caracterización de la cepa FRI-100.

Se utilizó una cepa S.aureus FRI-100 productora de enterotoxina A, la cual fue donada por el Dr. Merlin S. Bergdoll, del Food Research Institute, Wisconsin University, USA.

La caracterización de la cepa se hizo a través de diversas pruebas.

2.1.1. *Observación microscópica.* Para esta observación se tomó una asada de un cultivo de S.aureus de 24 h en caldo infusión-cerebro-corazón (BHI), y se sometió a tinción de Gram.

2.1.2. *Morfología Colonial.* Un inóculo de la cepa de S.aureus se sembró en agar BHI por la técnica de estria cruzada.

2.1.3. *Pruebas bioquímicas.* Tomando en consideración las respuestas bioquímicas características de este microorganismo, se determinó llevar a cabo las pruebas que a continuación se describen.

2.1.3.1. *Fermentación de azúcares.* Una asada de S.aureus, se inoculó en cuatro tubos, conteniendo cada uno caldo base rojo de fenol y los siguientes azúcares al 1%: manitol, maltosa, glucosa y sacarosa. Se incubaron durante 24 h a 37°C. El vire del indicador rojo de fenol a amarillo, representa la fermentación del azúcar correspondiente (50).

2.1.3.2. *Voges Proskauer.* Para su desarrollo, una asada de un cultivo puro de S.aureus de 24 h en caldo lactosado, se inoculó en un tubo conteniendo dicho medio. La incubación se realizó a 35°C durante 24 a 48 h. En forma

posterior se adicionaron 0.6 ml de solución de alfa naftol y 0.2 ml de solución de hidróxido de potasio (KOH), reactivos que fueron incorporados al medio por agitación. Después de un tiempo de reposo variable, aproximadamente de 24 h, la aparición de un halo color rosa a carmesín se tomó como prueba positiva (50).

2.1.3.3. *Rojo de Metilo.* El procedimiento comprendió la inoculación de tubos conteniendo el medio rojo de metilo-Voges Proskauer (RM/VP), con una asada de un cultivo puro de S.aureus de 24 h en caldo lactosado. Se incubó a 35°C durante 24-48 h, después de este tiempo se agregaron 0.2 ml de rojo de metilo. Una respuesta positiva se observó a través de la formación de un color rojo en el caldo (50).

2.1.3.4. *Prueba de coagulasa.* A un tubo de ensayo conteniendo un cultivo de S.aureus en caldo infusión cerebro, corazón (BHI), incubado a 37°C durante 12-24 horas, se le añadió 0.5 ml de plasma humano. Se mezcló perfectamente e incubó en baño de agua a 37°C, de 12 a 24 h. La formación de un coágulo firme, que permaneció adherido al tubo, se consideró como prueba positiva (50).

2.1.3.5. *Prueba de termonucleasa.* En general las cepas de S.aureus patógenas producen DNA-asa, enzima que actúa sobre el DNA presente en el medio usado para este ensayo. En una caja de petri, se colocaron 6 ml de agar DNA-asa fundido. Una vez solidificado, se realizaron perforaciones de 2 mm de diámetro. Con una pipeta Pasteur se tomó parte de un cultivo de S.aureus en caldo lactosado incubado a 37°C durante 12 a 24 h y se adicionó a los pozos. Se incubó a 37°C durante 24 h. Como revelador se utilizó, cubriendo la superficie de la caja, una solución de HCl 1N. Una colonia de organismos que producen esta enzima, muestra una zona clara alrededor del pozo (50).

2.2. Verificación de la producción de enterotoxina tipo

A.

Para la corroboración del tipo de enterotoxina sintetizada por la cepa seleccionada, se indujo su producción a través del método de celofán sobre agar, el que se describe a continuación.

- Se recortaron círculos de celofán para diálisis y papel filtro, con un diámetro ligeramente menor al de la caja petri (9cm). Se humedecieron con agua destilada y se colocaron alternadamente en una caja petri. Se esterilizó a 121°C, 15 min.

- De un cultivo puro de S.aureus en BHI, incubado a 37°C durante 18 a 24 h, se tomaron 0.1 ml que se sembraron y distribuyeron perfectamente con una varilla de vidrio sobre placas de agar BHI, en las que previamente se colocó una membrana de celofán. Se incubó a 37°C durante 24 h.

- El crecimiento se cosechó con 2.5 ml de solución reguladora de fosfatos 0.01 M La suspensión celular se centrifugó a 4500 rpm por 30 minutos y se investigó en el sobrenadante la presencia de enterotoxina por el método Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) (17) (60). Figura 7

El desarrollo del método de RPLA es el siguiente:

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. (figura 6) El diluyente, que funcionó como amortiguador salino, se introdujeron 25 µl en los pozos destinados a las diluciones

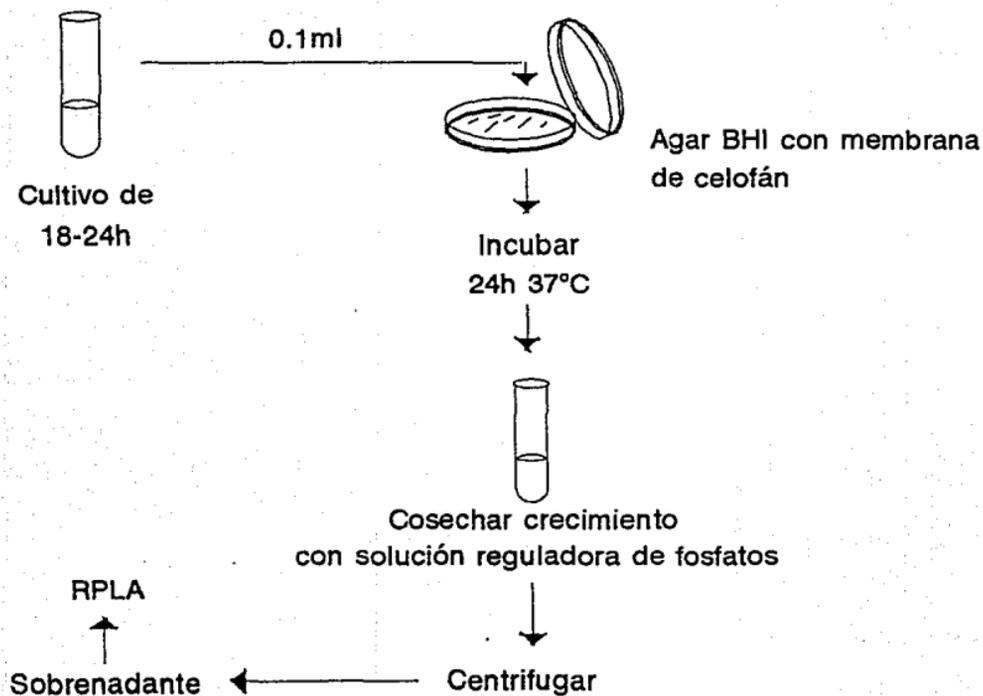


Fig.7 PRODUCCION DE ENTEROTOXINA POR EL METODO DE CELOFAN

sucesivas (pozos números 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 este 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 8

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

Además se manejaron otros 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.

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 h, considerándose como resultado positivo una aglutinación de los reactivos de látex en el seno del líquido y como negativo una sedimentación del látex (57).

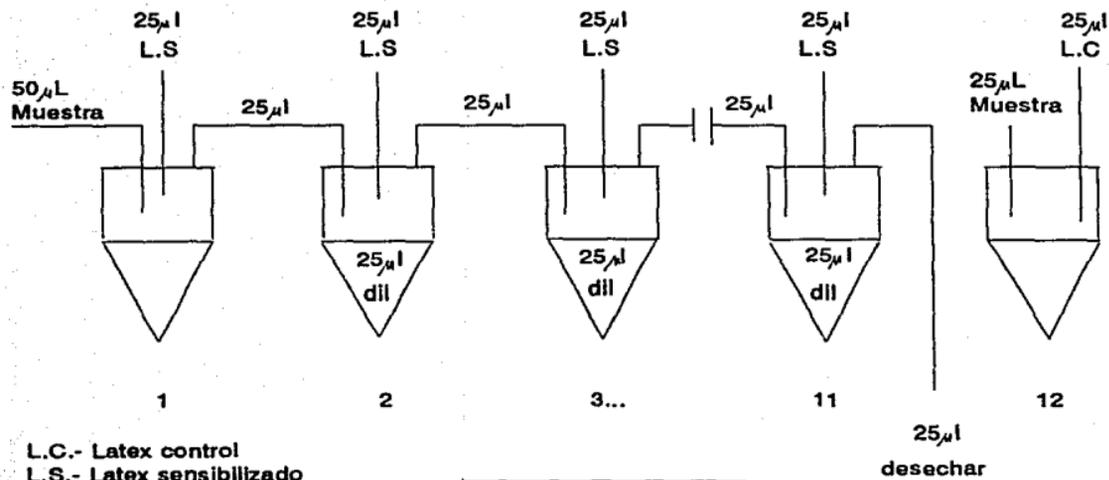
Este es un método semicuantitativo debido a que se puede observar el nivel de aglutinación de látex. A medida que va aumentando la dilución, la aglutinación va siendo menor (57).

2.3. Determinación de la Curva de Crecimiento de S.aureus FRI-100.

Al medir el crecimiento bacteriano, se puede demostrar que una población de microorganismos dada, pasa por varias fases de crecimiento en un período de 24 h o más de incubación. Esta información permite seleccionar el tiempo de incubación necesario para que el organismo en cuestión, se encuentre en la fase de crecimiento requerida, misma que en este trabajo fue la logarítmica. Además esta determinación proporciona el número de organismos viables en función del tiempo de incubación (13).

Para la realización de la curva de crecimiento se utilizaron los métodos espectrofotométrico y de placa vertida (13) (54). En ambos casos se prepararon cultivos de S.aureus FRI-100 en caldo lactosado, incubando a 37°C durante 18-24 h.

Con 3 ml de este cultivo se inocularon 100 ml de caldo lactosado. La temperatura se mantuvo a 37°C durante 12 h, período en el cual se realizaron muestreos cada hora. Para el método de placa vertida, se prepararon cajas petri estériles con 6 a 10 ml de agar Baird-Parker, en éstas se colocaron diluciones decimales consecutivas de las muestras



L.C.- Latex control
L.S.- Latex sensibilizado

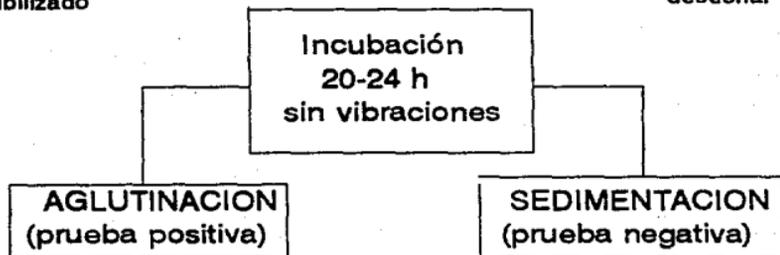


Fig.8 TECNICA RPLA

de 1 ml, tomadas cada hora. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas.

Para la determinación espectrofotométrica, se tomaron simultáneamente alícuotas de 5 ml de cultivo, a éstas se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic 20, a 600 nm. Estas mediciones se llevaron a cabo hasta la obtención de lecturas constantes (13).

2.4 Estandarización del inóculo.

De la curva de crecimiento de S.aureus FRI-100, se determinó el tiempo de incubación necesario para que el microorganismo alcanzara la fase logarítmica; de éste período se seleccionó un tiempo constante, a la mitad del mismo; en éste se tomó, una alícuota de 1ml del cultivo de S.aureus y se realizó cuenta por el método de vaciado en placa.

Para utilizar el mismo número de células como inóculo, éste se estandarizó empleando las técnicas de espectrofotometría y vaciado en placa.

Para el método espectrofotométrico, se tomaron simultáneamente alícuotas de 5 ml de cultivo, a las que se leyó su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20.

Se relacionaron la absorbancia y el número de microorganismos en el período establecido. Para asegurar la confiabilidad de estos resultados, se realizó esta técnica por triplicado (13).

2.5 Análisis microbiológico de la leche entera en polvo.

Para evaluar la calidad sanitaria de la leche que se utilizó en este trabajo, fue necesario someterla a un análisis microbiológico. Se determinaron mesofílicos aerobios, coliformes totales y S.aureus, éste último por las técnicas de Baird-Parker y Van Doorne (19).

2.5.1 *Preparación de la muestra.* Se pesaron 10 g de leche, los que se homogenizaron con 90 ml de agua estéril, de esta mezcla se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-4} .

2.5.2 *Mesofílicos aerobios.* Se realizó según el método de siembra en profundidad, preparando las diluciones con solución buffer. Se hicieron diluciones hasta 10^{-4} , como medio de cultivo se empleó agar para cuenta estandar. Las placas con las diluciones sembradas se incubaron a 37°C por 48 horas. Los resultados se expresaron en UFC/ml de leche. (34).

2.5.3 *Coliformes.* Esta determinación se realizó por el método de placa vertida utilizando el agar rojo-violeta-bilis, incubando a 35°C por 24-48 h. Los resultados se expresaron en UFC/ml (34).

2.5.4 S.aureus. Se emplearon las técnicas de Baird-Parker y Van Doorne. La primera consiste en sembrar 1 ml de las tres últimas diluciones de la muestra por el método de placa vertida, utilizando agar Baird-Parker adicionado de emulsión de yema de huevo. Las cajas se incubaron a 37°C por 24-48 h. Posteriormente se realizó el recuento de colonias típicas (19).

El método de Van Doorne varía del de Baird-Parker en el enriquecimiento en anaerobiosis, que se realiza en forma previa en el alimento a analizar, con objeto de

reactivar las células dañadas por tratamientos utilizados durante el procesado de los alimentos. El procedimiento consiste en colocar 50 g de leche en polvo en un matraz conteniendo 100 ml de caldo Baird-Parker. Incubar a 37°C por 24 a 48 horas. En caso de observar crecimiento, es decir un precipitado negro, se toman 0.1 ml de la mezcla y se siembra en superficie en cajas petri que contengan agar Baird Parker. Se incuba a 43°C durante 24 h. Las colonias características de S.aureus con o sin halo de clarificación se identifican por la prueba de termonucleasa (21). Figura 9

2.6 Tratamiento térmico de S.aureus.

Para ocasionar el daño térmico subletal en las células, se utilizó una temperatura de 63°C, la que corresponde a la de pasteurización lenta de la leche, durante 0 a 30 min. Para su aplicación se empleó el método del tubo capilar. El procedimiento que se siguió fue:

a) Con 3 ml de un cultivo puro de S.aureus en caldo lactosado de 18 a 24 h, se inocularon 100 ml de leche entera en polvo reconstituída al 12% de sólidos totales. Se incubó a 37°C durante el tiempo determinado a través de la curva de crecimiento, como el necesario para que el microorganismo alcance su fase exponencial de crecimiento.

b) Se tomaron 10 ml de este cultivo y se centrifugaron a 4500 rpm durante 1.5 h. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de leche entera en polvo reconstituída estéril.

c) Se colocaron 0.05 ml del cultivo resuspendido en siete tubos capilares de 1 mm de diámetro, número que corresponde a los intervalos de tiempo, cada 5 min, tomados de 0 a 30 min; periodo que se usó en esta prueba.

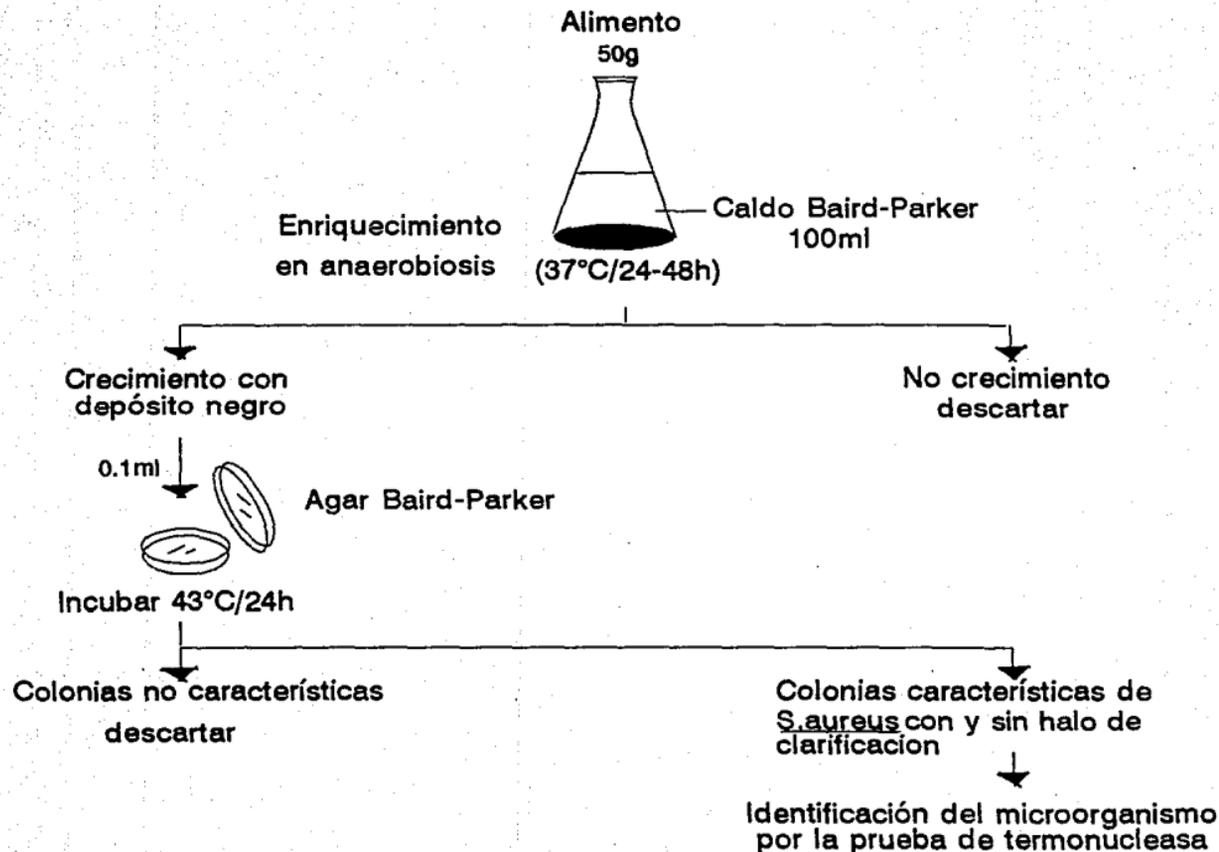


Fig.9 METODO DE VAN DOORNE

d) Los capilares con el cultivo se sujetaron a un termómetro dentro de un tubo de Thiele con agua a 63°C.

e) Inmediatamente después del tratamiento, cada tubo capilar, incluyendo un blanco, se introdujeron en un baño de agua helada y se colocaron en un tubo para dilución con 9.95 ml de agua estéril.

f) Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-4} que se sembraron por placa vertida en agar soya tripticaseína con cloruro de sodio a concentraciones de 0, 7.5, 10, 12 y 15 %. La incubación fue a 37°C durante 18-24 h. Figura 10

g) Las colonias de S.aureus se contabilizaron en ambos medios y se expresaron como UFC/ml.

h) Basándose en el principio de que células dañadas no son capaces de crecer en un medio con 7.5 % de NaCl, el porcentaje de células dañadas se calculó por la siguiente expresión:

$$\% \text{ daño} = \frac{\text{cuenta en AST} - \text{cuenta en AST+NaCl} \times 100}{\text{cuenta en AST}}$$

(23)

2.8 Aplicación de pruebas bioquímicas específicas en el microorganismo, estando éste con y sin daño.

Para determinar la respuesta bioquímica del microorganismo con y sin daño subletal, se tomaron de los cultivos sometidos a 63°C durante 0 a 30 min y que se

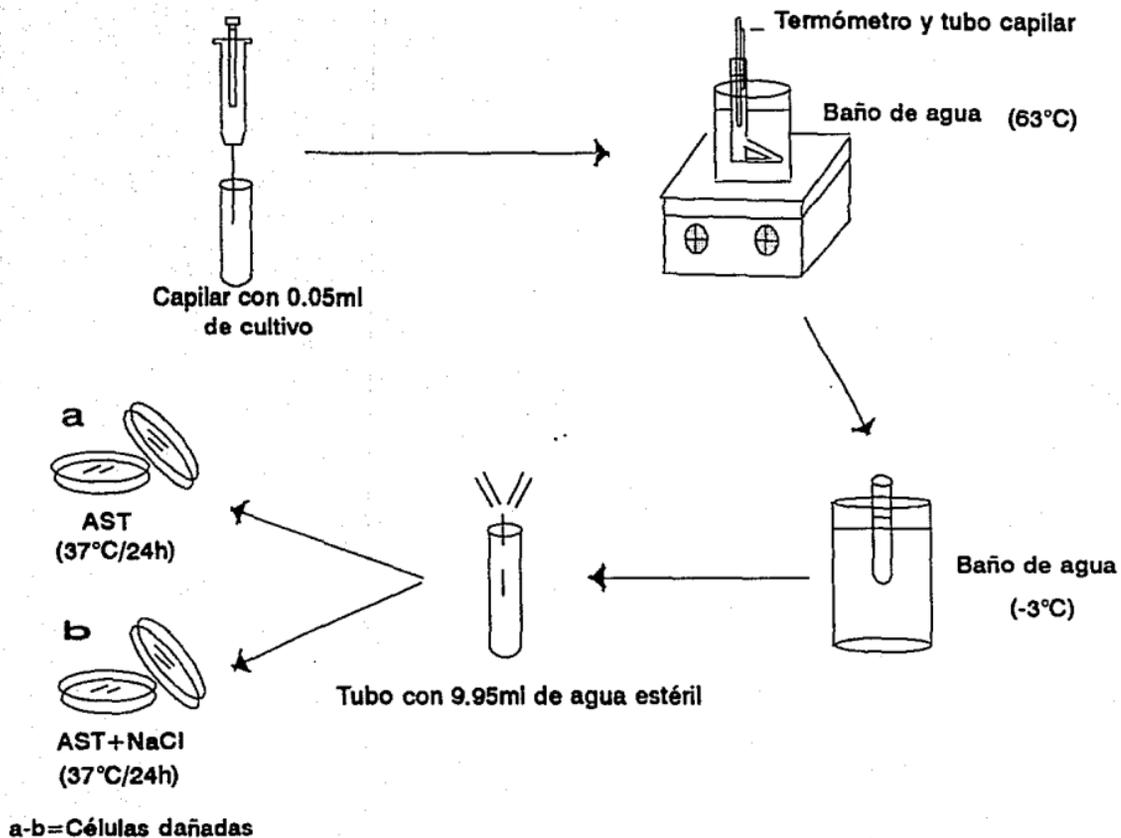


Fig.10 METODO DEL TUBO CAPILAR

incubaron en AST con NaCl y sin esta sal, tres colonias representativas que se desarrollaron en AST con NaCl y cinco colonias representativas que se desarrollaron en AST sin NaCl. Cada colonia se colocó en un tubo de ensayo con 1 ml de solución salina al 0.9%, de aquí se tomaron alícuotas de 0.05 ml para la realización de las siguientes pruebas bioquímicas: Rojo de metilo. Voges-Proskauer, coagulasa, DNA-asa y fermentación de azúcares como manitol, glucosa, sacarosa y maltosa (34)(50). figura 11 .

También se realizó observación microscópica mediante tinción de gram, en colonias presentes en las cajas con AST y AST con NaCl.

2.9 Recuperación de S.aureus FRI-100

Con objeto de que las células dañadas se recuperaran, de cada tubo con las colonias tomadas de las cajas petri con AST, en solución salina, referido en el punto anterior, se colocaron alícuotas de 0.05 ml que se sembraron en tubos con 3 ml de caldo soya tripticaseína. Se incubó durante 12, 24 y 72 h a 37°C. Después de cada período, los cultivos se volvieron a someter a las pruebas bioquímicas antes mencionadas (41). figura 11

2.10 Capacidad productora de enterotoxina del microorganismo dañado.

Al analizar los porcentajes de células dañadas por aplicar 63°C por diferentes tiempos, se seleccionó el período que provocó el mayor porcentaje de células con daño. Estas condiciones se aplicaron a un cultivo puro de S.aureus FRI-100 y posteriormente se indujo en el mismo cultivo la producción de enterotoxina por la técnica de celofán. La

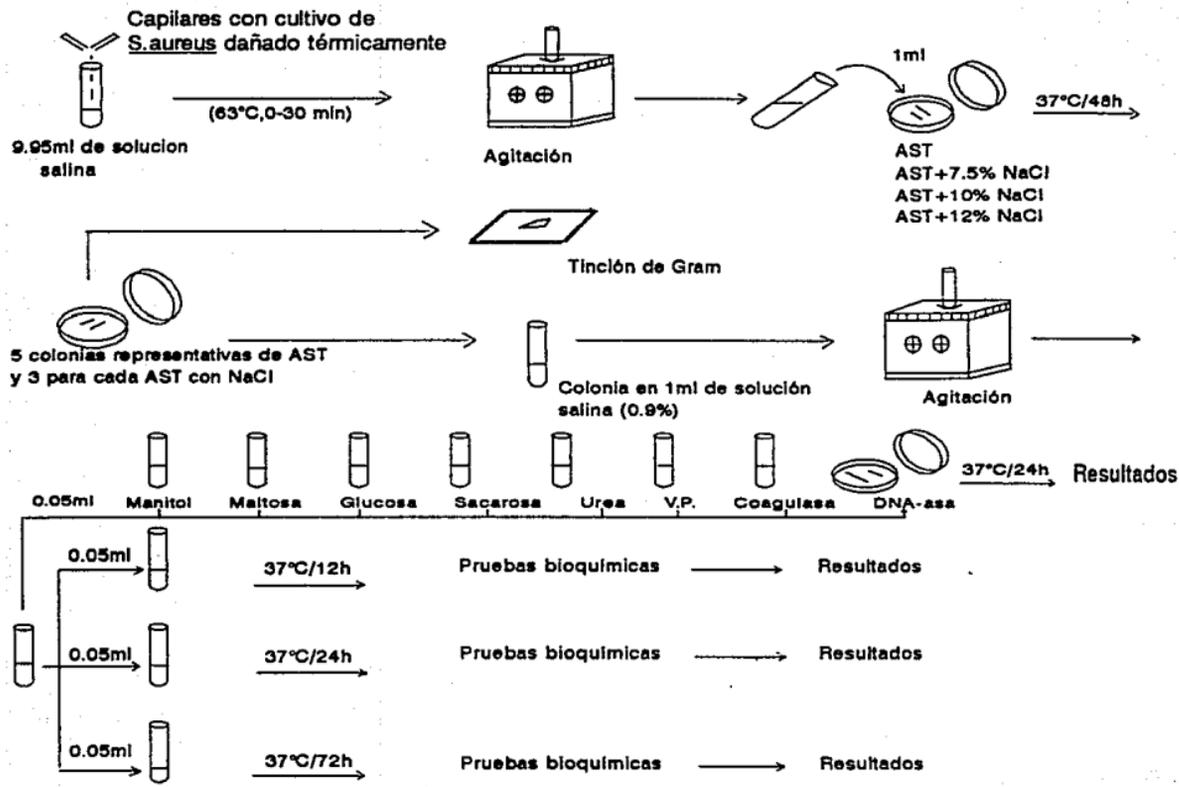


Fig.11 RESPUESTA A PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE S.aureus DAÑADO TÉRMICAMENTE

detección de este metabolito se llevó a cabo por el método RPLA. El método fue:

a) En cuatro tubos capilares se colocaron 0.05 ml un cultivo de S.aureus en leche.

b) De los cuatro tubos capilares, dos se sometieron a 63°C por 25 min y los dos restantes se consideraron como controles.

c) Los dos tubos capilares que se sometieron a 63°C por 25 min, se rompieron en un tubo de ensayo conteniendo 9.95 ml de agua estéril. El mismo procedimiento se aplicó al control. Se agitó la mezcla.

d) De cada tubo, se tomaron 0.1 ml y se sembró por el método de placa vertida en cajas petri que contenían agar BHI, sobre el cuál se colocó previamente, una membrana de celofán estéril. Posteriormente se incubó a 37°C durante 24 h.

e) El crecimiento se cosechó con 2.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.

f) Se centrifugó a 4,500 rpm durante 30 a 60 min y el sobrenadante se utilizó para la detección de enterotoxina por el método de RPLA (60). Figura 12

2.11 Elaboración de crema pastelera y su inoculación con S.aureus con y sin tratamiento térmico.

En un recipiente se mezclaron los primeros ingredientes, observados en el cuadro 4, con la raspadura del limón, la mezcla se colocó a fuego lento, moviendo constantemente para evitar la formación de grumos. Cuando

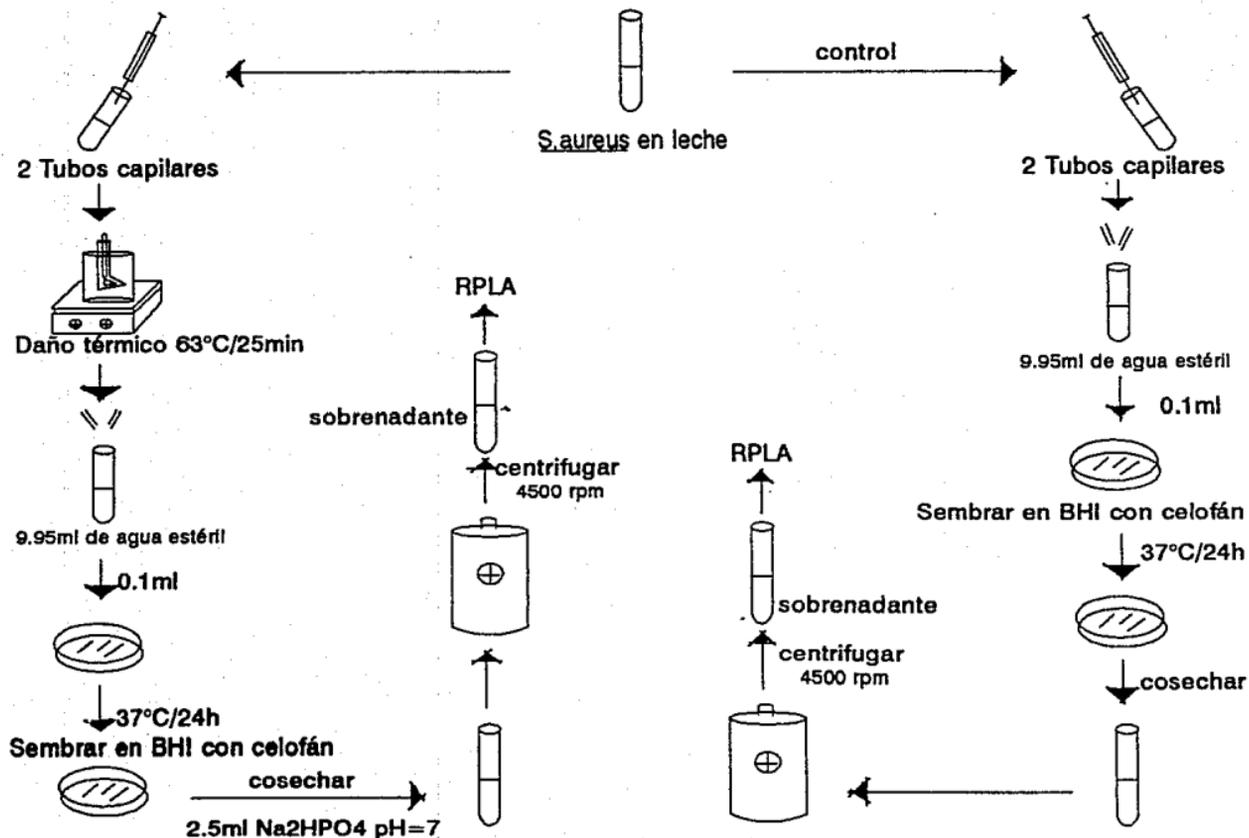


Fig.12 CAPACIDAD PRODUCTORA DE ENTEROTOXINA DEL MICROORGANISMO DAÑADO

CUADRO 4.**CREMA PASTELERA****850 g de crema pastelera**

<i>Ingredientes</i>	<i>Cantidad</i>
Leche	1 L.
Fécula de maíz	15 g
Azúcar	30 g
Raspadura de un limon	2 g

empezó en ebullición se retiró del calor. Se continuó agitando hasta su enfriamiento, para que de esta manera no se forme nata (35).

Inmediatamente después de su obtención en el laboratorio, a la crema pastelera se le determinaron S.aureus y mesofílicos aerobios, el primero por el método de Baird-Parker, haciendo diluciones hasta 10^{-6} (19).

La crema pastelera realizada en el laboratorio se dividió en ocho porciones de 10 g cada una, cuatro se inocularon con S.aureus con daño térmico, y otras cuatro con el microorganismo sin daño.

Dos lotes de cada uno de estos tratamientos se almacenaron en refrigeración (4°C) y los otros 2 lotes, a temperatura ambiente (20°C) durante 72 h.

En la crema pastelera se hicieron determinaciones de mesofílicos aerobios y S.aureus, inmediatamente después de ser inoculada y a las 24 y 72 h de almacenamiento. A las 72 h, también se realizó la extracción y detección de enterotoxina, esta última por el método de RPLA. Figura 13

2.12 Extracción simple de la enterotoxina del alimento

Se tomaron 50 g de la muestra y se homogenizaron con 75 ml de agua estéril para extraer la enterotoxina. Posteriormente se adicionó ácido clorhídrico para ajustar la mezcla a pH 4.5. Se centrifugó. 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 contraste del sobrenadante, la grasa se extrajo con cloroformo (1 ml /10 ml de extracto).

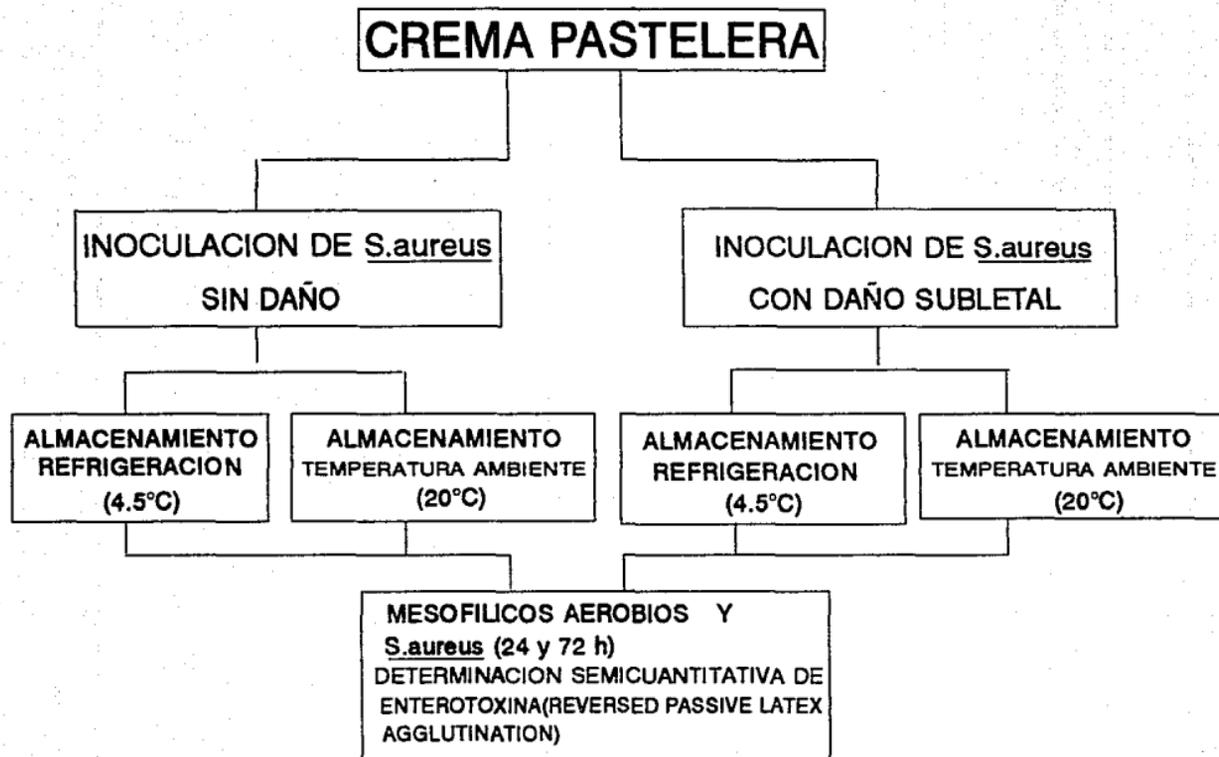


FIG. 13 COMPORTAMIENTO DE S.aureus CON Y SIN DAÑO SUBLETAL EN CREMA PASTELERA DURANTE SU ALMACENAMIENTO

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La fase acuosa obtenida, conteniendo la enterotoxina, es llamada extracto del alimento y se utilizó para la realización del método RPLA (57)(60). figura 14

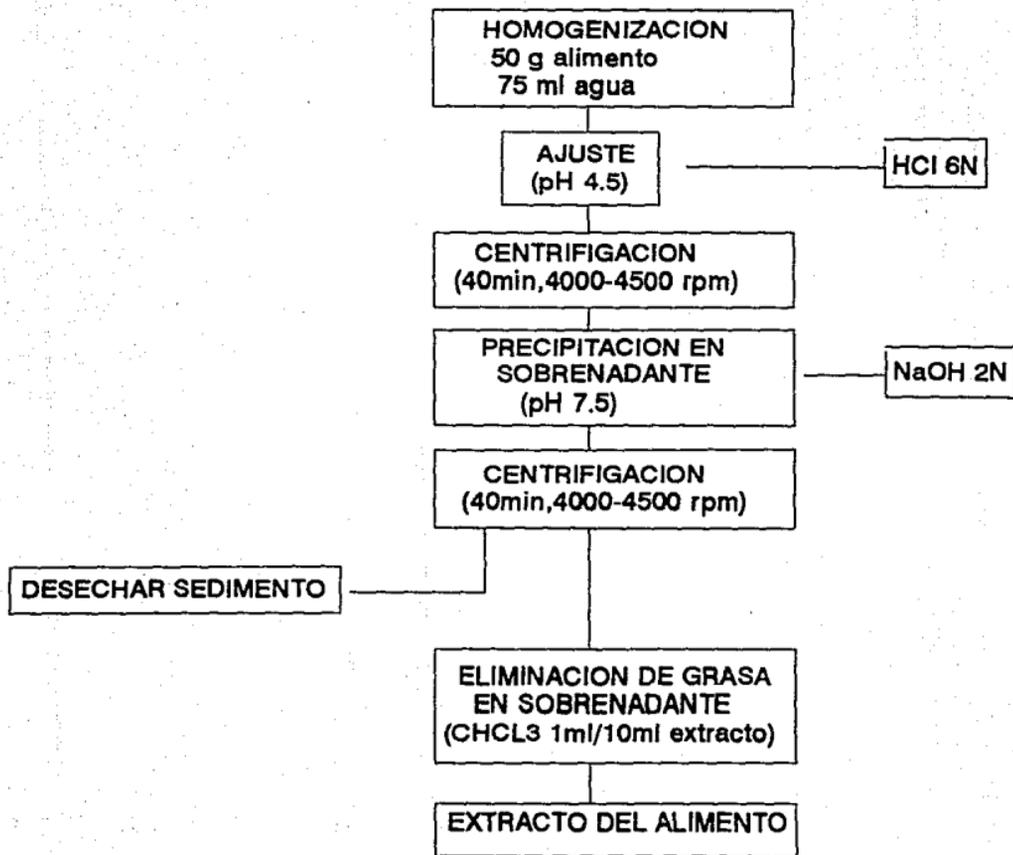


Fig.14 EXTRACCION SIMPLE DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCOGICA

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Morfología Microscópica.

Al realizar un frotis de un cultivo de S.aureus, teñido por la tinción de Gram, se observaron células esféricas agrupadas a modo de racimos, Gram positivas.

La tinción de Gram es una herramienta de gran valor taxonómico. Al aplicar la tinción, automáticamente se divide a todas las bacterias en dos categorías: Gram positivos y Gram negativos.

La tinción de Gram está relacionada con la composición química y estructura física de la pared celular del microorganismo. La pared celular de las células Gram positivas es más sensible a la deshidratación con alcohol, este compuesto actúa cerrando los poros de la pared celular. En estas condiciones el complejo yodo-violeta cristal no puede escapar hacia el exterior de la célula, lo cual resulta en la retención del colorante primario. La pared celular de organismos gram negativos es más rica en lípidos que la de los Gram positivos y aparentemente no se cierran sus poros durante el tratamiento con alcohol, por lo cual el decolorante arrastra todo el colorante primario. Por lo anterior al aplicar la tinción de Gram a una mezcla de varios tipos de bacterias, algunos aparecen morados (Gram positivos) y otros rojos (Gram negativos) (13) (21). S.aureus se tiñe fácilmente siendo éste Gram positivo.

Entre las características morfológicas más relevantes de S.aureus, está su notable tendencia a presentarse como masas de células esféricas arracimadas. La forma esférica de las células se conoce como cocos (21).

3.2 Morfología colonial.

Los resultados de la morfología colonial de S.aureus se observan en el cuadro 5:

En forma típica, en su aislamiento inicial el microorganismo produce un pigmento amarillo dorado. Sin embargo esta característica es variable, pueden verse colonias blancas o pálidas.

Su color amarillo se debe a los carotenoides presentes en la célula. La pigmentación es apreciable tras 18 a 24 horas de crecimiento a 37°C, pero es más pronunciada cuando los cultivos se mantienen a temperatura ambiente y en un medio que contenga carbohidratos (54).

3.3 Pruebas Bioquímicas.

Para la identificación de la cepa S.aureus FRI-100 productora de enterotoxina A, se utilizaron las pruebas bioquímicas antes mencionadas, dando resultado positivos en todos los casos. Cuadro 6.

3.4 Producción de enterotoxina.

Al aplicar a la cepa FRI-100, el método de celofán sobre agar para la producción de enterotoxina A, se observó que el periodo de incubación de 24 horas a 37°C fue suficiente para la producción de enterotoxina en cantidad adecuada para ser detectada por el método de RPLA, cuyo límite de sensibilidad es de 0.25 ng/ml (60).

Estudios recientes han comparado métodos de producción de enterotoxina, así como el medio utilizado para

CUADRO 5**MORFOLOGIA COLONIAL S.aureus**

<i>Características del cultivo</i>	<i>Resultados</i>
Medio de crecimiento	BHI,AST
Tamaño de las colonias	2-3 mm
Color	amarillo
Elevación	Convexa
Transmisión de luz	Opaca
Luz reflejada	brillante
Forma	circular
Borde	entero
Aspecto	Húmedo
Consistencia	Cremosa

**CUADRO 6 RESPUESTA A PRUEBAS BIOQUIMICAS S.aureus CEPA
FRI-100**

PRUEBA	RESPUESTA
Fermentación de azúcares:	
Manitol	(+)
Maltosa	(+)
Glucosa	(+)
Sacarosa	(+)
Voges proskauer	(+)
Rojo de metilo	(+)
Coagulasa	(+)
DNA-asa	(+)

(+) Respuesta positiva a la prueba

el crecimiento de S.aureus. Estos estudios llegaron a la conclusión de que el método de celofán sobre agar, es la mejor técnica para la producción de enterotoxinas A, D y E, por presentar una mayor correlación con la síntesis de enterotoxinas, tomando en cuenta que uno de los factores importantes para la producción a nivel laboratorio, es el medio usado para el crecimiento de S.aureus. Se concluyó que el medio BHI presenta los mejores resultados por contener los elementos nutritivos que favorecen la síntesis, excreción de metabolitos, así como enterotoxinas del microorganismo (56).

3.5 Curva de crecimiento.

En la figura 15 se muestra la curva de crecimiento de S.aureus; a partir de ésta se seleccionó como tiempo de incubación 7.5 h para los tratamientos posteriores a que fue sometido el microorganismo.

Este tiempo de incubación que cae dentro de la fase logarítmica de la curva de crecimiento, se eligió por ser la etapa en la que el microorganismo presenta mayor actividad metabólica.

La curva de crecimiento se realizó por los métodos espectrofotométrico y de placa vertida.

Para la medición por el método espectrofotométrico, el índice más útil es el de la turbidez, la rapidez de este método permite que se siga la densidad del cultivo a medida que este crece. La mayor parte de la turbidez es debida a la dispersión de la luz, que a su vez depende del elevado índice de refracción de las bacterias (4). Este método es efectivo cuando se trabaja con cultivos que todavía no han alcanzado la parte final de su

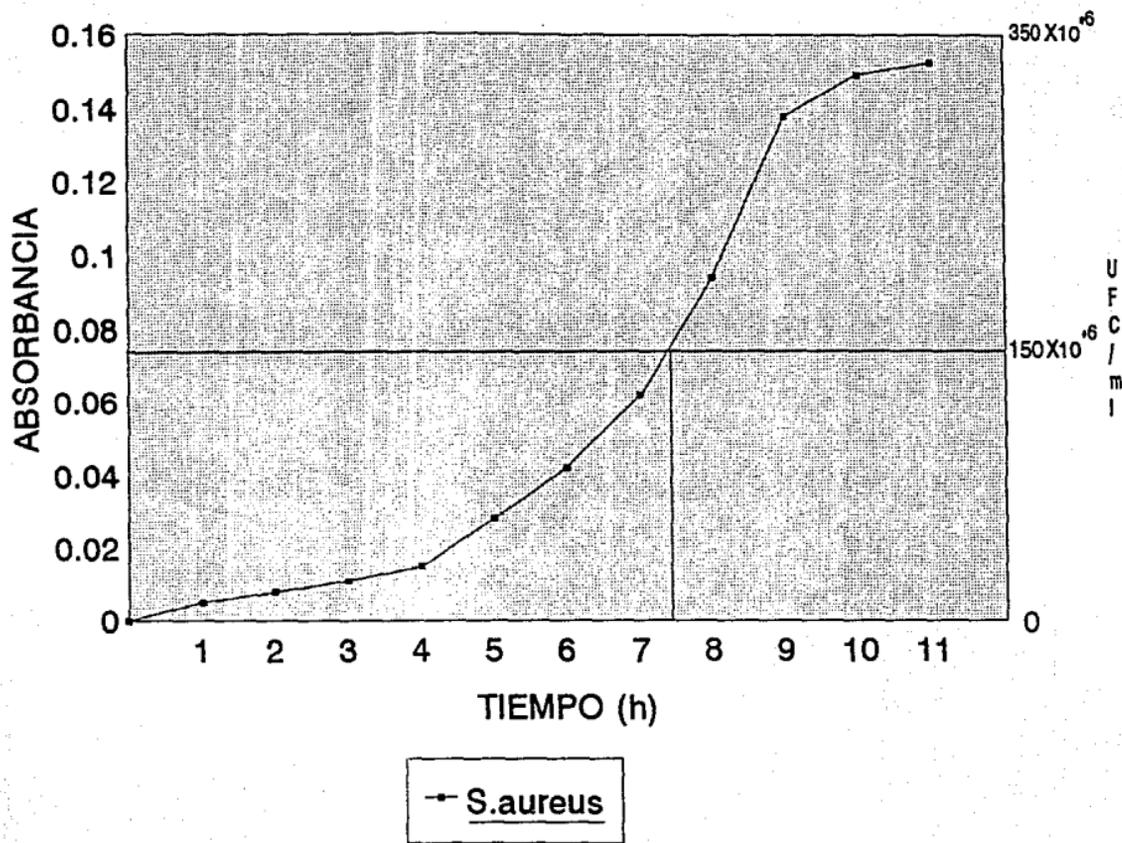


Fig.15 CURVA DE CRECIMIENTO DE S.aureus FRI-100

fase logarítmica, ya que antes de llegar a este punto, el número de bacterias muertas en el cultivo es despreciable. Sin embargo se vuelve inexacto conforme aumenta el número de microorganismos muertos durante la fase crítica del cultivo. Por lo anterior se recomienda usar el método del conteo de colonias para observar los cambios de población durante todo el ciclo (13).

En la curva de crecimiento obtenida se pudieron observar las diferentes etapas por las que pasa el microorganismo en un periodo de 24 horas de incubación (13).

3.6 Estandarización del inóculo.

Para la estandarización del inóculo se tomó la fase logarítmica, por las razones ya expuestas. Con los resultados obtenidos de los métodos de vaciado en placa y el método espectrofotométrico se pudo observar que el microorganismo, debía ser incubado por 7.5 h para alcanzar la fase logarítmica y obtener una cuenta celular de 150×10^6 UFC/ml.

3.7 Análisis microbiológico de la leche.

Las muestras del análisis microbiológico realizadas a la leche en polvo utilizada fueron concordantes con las establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM F-26-1986). La cuenta de mesofílicos aerobios fue de 300 UFC/g, no hubo presencia de Coliformes, ni de S.aureus. Cuadro 7

CUADRO 7 ANALISIS SENSORIAL Y MICROBIOLOGICO
DE LA LECHE EN POLVO

Pruebas sensoriales:

Color	blanco-amarillento.
Olor	característico
Sabor	característico
Aspecto	polvo amorfo de color uniforme.

Pruebas microbiológicas:

Mesofílicos aerobios: El número de colonias obtenidas
fue de 300 UFC/g.

Coliformes: Negativa

S.aureus: Negativa

3.8 Tratamiento térmico.

Los resultados de tratamiento térmico fueron los siguientes:

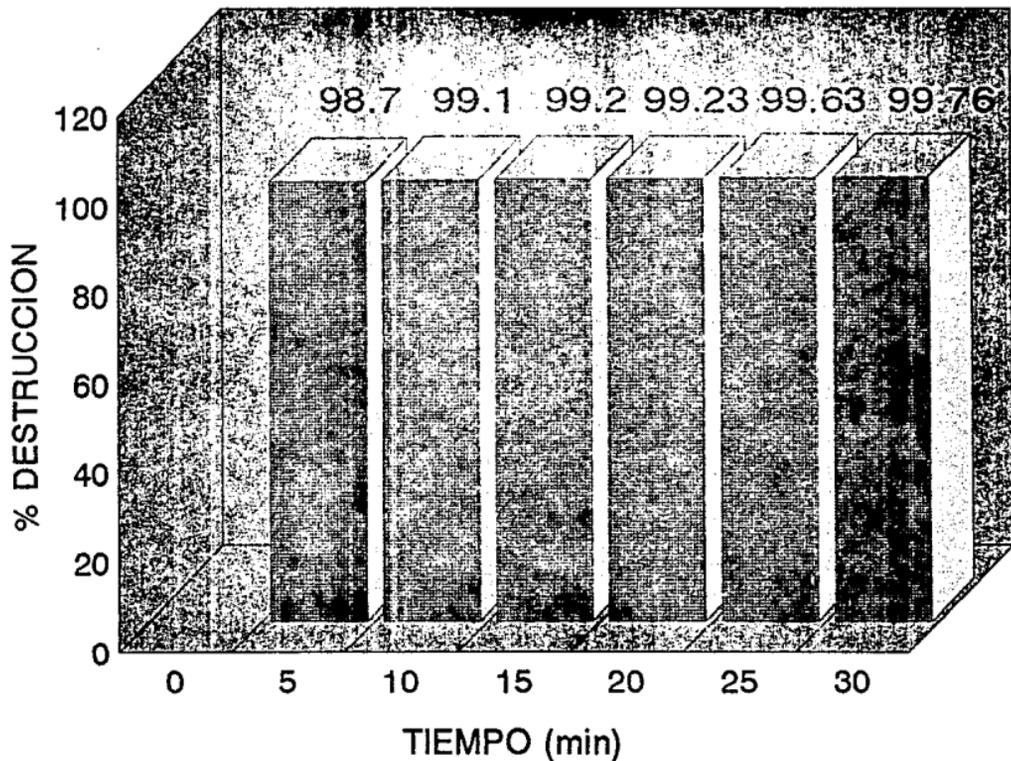
En las suspensiones de S.aureus tratadas a 63°C durante tiempos de 0 a 30 minutos, se observó una disminución drástica en el número de células viables, medida como porcentaje de destrucción celular, que varió de 98.7% a los 5 minutos de tratamiento hasta 99.76% a los 30 minutos. Figura 16

La cuantificación de los microorganismos sobrevivientes se realizó en AST en ausencia de NaCl, para asegurar el desarrollo de todas las células, es decir, las dañadas y no dañadas, ya que uno de los efectos del daño térmico subletal es la disminución de la halotolerancia del microorganismo; este fenómeno se asocia a la pérdida de iones magnesio (3)(5)(49).

Los valores de destrucción celular coinciden con lo informado con otros autores cuando indujeron lesiones aplicando calor.

El daño fue estimado por cuantificación de células desarrolladas en AST con NaCl en concentraciones de 7.5, 10, 12, 15 % de NaCl y sin esta sal, basándose en el principio de que las células dañadas subletalmente no son capaces de formar colonias cuando el agar contiene 7.5 % de NaCl. No obstante hubieron algunas células dañadas que se desarrollaron en concentraciones tanto de 7.5 % como 10 % de NaCl, por esta razón se eligió la concentración de 12 %, ya que al 15 % la inhibición fue total.

En la determinación de los porcentajes de células dañadas correspondientes a la población



**Fig.16 % DESTRUCCION S.aureus A 63°C
(AST + 12 % NaCl)**

sobreviviente de cada tratamiento térmico aplicado, se observó en forma general, un comportamiento en el que a tiempos que provocan porcentajes de daño elevado siguen periodos en los que existe una mayor destrucción celular.(figura 17). Este fenómeno es debido a la vulnerabilidad que las células dañadas presentan ante tratamientos posteriores lo cual ha sido informado por E.Bucker y colaboradores, quienes resaltan que existen dos factores de significancia general con respecto a este tipo de daño: las bacterias sometidas a tratamientos térmicos subletales presentan lesiones reparables y su conversión en organismos hipersensibles ante tipos de estres subsecuentes; debido a esto la enumeración de células dañadas no puede realizarse en forma confiable utilizando un medio selectivo (38) (63).

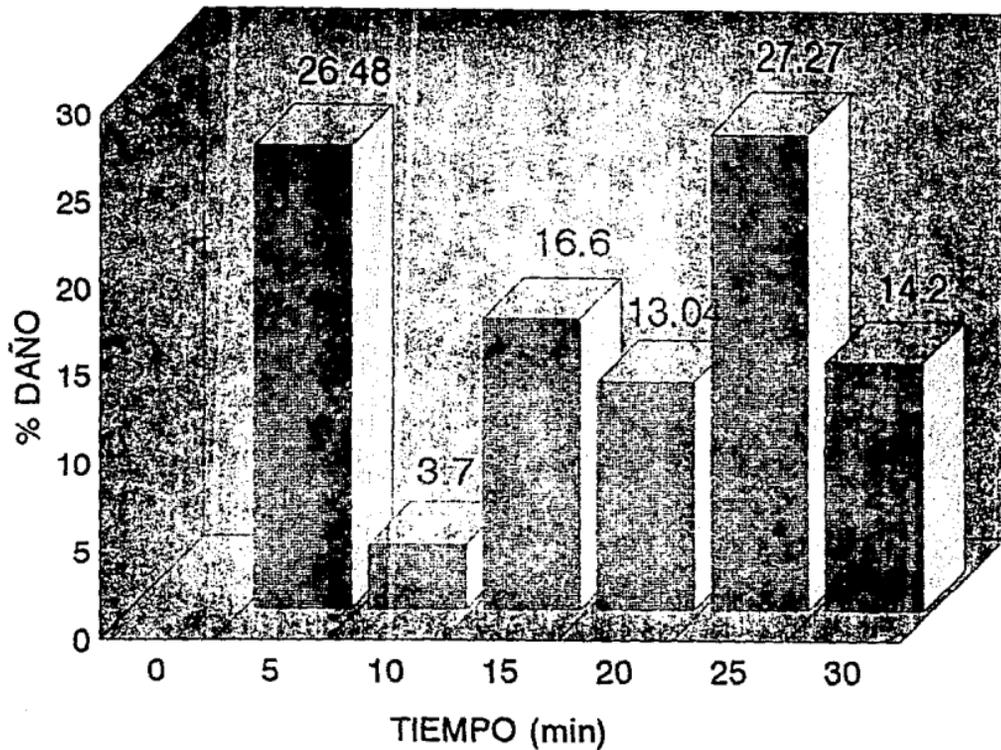
3.9 Pruebas bioquímicas de S.aureus con y sin daño subletal.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas al microorganismo se observan en el cuadro 8.

Como podemos observar todas las pruebas bioquímicas sufrieron algunos cambios después del tratamiento térmico, lo que nos sugiere que las células de S.aureus si sufren alguna modificación en su metabolismo.

Se observa que al aplicar 63°C durante 5 minutos el porcentaje de células dañadas fue de 26.48 %, en este caso la respuesta bioquímica de estas células muestra mayor cambio en la prueba de rojo de metilo.

En un porcentaje de células dañadas, 27.27 % obtenido a los 25 minutos, de exposición al calor, se



**Fig.17 DAÑO TERMICO EN S.aureus a 63°C
(AST+ 12 % NaCl)**

CUADRO 8 PORCENTAJE DEL COMPORTAMIENTO BIOQUIMICO DE S. aureus
A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO TERMICO.

PRUEBA	t DE TRATAMIENTO TERMICO (MIN)													
	(S/DAÑO) 0		5		10		15		20		25		30	
	(+)/N	%	(+)/N	%	(+)/N	%	(+)/N	%	(+)/N	%	(+)/N	%	(+)/N	%
MANITOL	15/15	100	13/15	86.6	9/15	60	12/15	80	13/15	86.6	7/15	46.6	8/15	53.3
MALTOSA	15/15	100	14/15	93.3	9/15	60	14/15	93.3	13/15	86.6	9/15	60	9/15	60
GLUCOSA	15/15	100	13/15	86.6	11/15	73.3	12/15	80	13/15	86.6	8/15	53.3	9/15	60
SACAROSA	15/15	100	14/15	93.3	8/15	53.3	12/15	80	13/15	86.6	7/15	46.6	6/15	40
COAGULASA	15/15	100	14/15	93.3	10/15	66.6	14/15	93.3	14/15	93.3	7/15	46.6	6/15	40
V.P.	15/15	100	11/15	73.3	9/15	60	12/15	80	13/15	86.6	4/15	26.6	6/15	40
R.M.	15/15	100	8/15	53.3	7/15	46.6	10/15	66.6	13/15	86.6	3/15	20	3/15	20
DNA-asa	15/15	100	15/15	86.6	15/15	100	15/15	100	15/15	100	15/15	100	15/15	100

(+) = NUMERO DE COLONIAS POSITIVAS.
N = NUMERO TOTAL DE COLONIAS.

observa nuevamente que la prueba de rojo de metilo es la mas afectada en comparación con las demás pruebas realizadas.

La baja respuesta bioquímica es debida al daño en el RNA ribosomal responsable de la síntesis de proteínas entre las que se encuentran las enzimas (40).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, observamos que la única reacción bioquímica que en todos los casos dió 100 % de respuestas positivas fue la de DNA-asa por lo que sería una referencia adecuada para la detección de cepas de S.aureus enterotoxigénicas, aún cuando sus células presenten daño subletal (19)(21).

Se han hecho experimentos en los que el daño térmico se evaluó midiendo el material celular que pasa al medio de suspensión mediante espectrofotometría, sin embargo esta pérdida de sustancias no siempre fue indicativa de daño, por lo que se considera más confiable la aplicación de pruebas bioquímicas por estar relacionadas directamente con la actividad metabólica del microorganismo (35)(46).

3.10 Recuperación de S.aureus FRI-100.

Después de que se enriquecieron las células de los cultivos con daño subletal en caldo soya tripticaseína durante 24 h, se evidenció la recuperación del microorganismo al mostrar un 100% de respuestas positivas a todas las pruebas bioquímicas ensayadas. Esto corresponde con lo informado por varios investigadores, en relación a que las lesiones de la célula que se provocan después de un daño térmico, son reestablecidas al colocar dichas células en un medio adecuado de enriquecimiento. Este medio debe tener los nutrientes necesarios que requieren las células

para su recuperación, como es una fuente de energía, como la glucosa, aminoácidos y fosfatos inorgánicos (40).

3.11 Evaluación de la producción de enterotoxina de S.aureus con daño subletal.

Por medio de la técnica de agar sobre celofán, observamos que S.aureus es capaz de producir enterotoxina aún cuando el microorganismo presente un daño subletal. Lo que se debe a la reparación en el microorganismo de las lesiones sufridas por el calor, restableciéndose también el sistema bioquímico necesario para la síntesis de toxinas.

Con la finalidad de comprender la producción de enterotoxina de S.aureus con daño se hicieron varios estudios.

Daniel Y.C. y Linda L. Vanden, realizaron estudios sobre la enterotoxigenicidad de S.aureus dañado y observaron que este produce enterotoxina B, durante el período de la fase logarítmica de crecimiento. La presencia de enterotoxina al iniciar la fase de crecimiento, lo interpretaron como toxinas pre-formadas por el microorganismo (31).

Ray y colaboradores hicieron estudios con respecto al S.aureus dañado por liofilización, los cuales reportan que células de este microorganismo, en la mitad de la fase log de crecimiento, se llegan a recuperar rápidamente del daño sufrido por liofilización cuando éstas fueron rehidratadas a temperaturas de 20°C - 50°C. A 15°C la recuperación del proceso de crecimiento fue lento, a 10°C la recuperación y el crecimiento no ocurrió. En este mismo estudio informan que hubo producción de enterotoxina B

dentro del medio de rehidratación, aproximadamente cuando los sobrevivientes iniciaron su crecimiento.

Varios estudios a cerca del metabolismo de células de S.aureus dañadas por liofilización creen que la síntesis de RNA es necesaria para la primera fase de recuperación (38).

D.L. Collins y Hurst estudiaron la producción de enterotoxina después que el microorganismo se recuperara; observaron que S.aureus una vez recuperado del estress, llega a sintetizar enterotoxina B, tan rápido como células no tratadas térmicamente. Esta observación es importante desde el punto de vista de la salud pública, ya que en el daño térmico S.aureus sobrevive a semiprocesos de alimentos ocasionando a no tener una disminución en la capacidad de síntesis de enterotoxina (10).

3.12 Crema pastelera

Las colonias de S.aureus con alto índice subletal, obtenidas del tratamiento a 63°C durante 25 minutos y que fueron inoculadas en crema pastelera almacenada a temperatura ambiente (20°C), mostraron capacidad de desarrollarse aumentando su número en aproximadamente 3 ciclos logarítmicos después de 24 h. Figura 18

En cambio cuando la crema pastelera fue inoculada con S.aureus dañado y almacenada en refrigeración, el crecimiento del microorganismo a las 24 horas fue pobre, observándose a partir de ese tiempo una reducción en el número de células viables, que coincide con lo publicado en relación a que la temperatura de refrigeración induce pérdida de viabilidad y daño metabólico (37). Figura 19

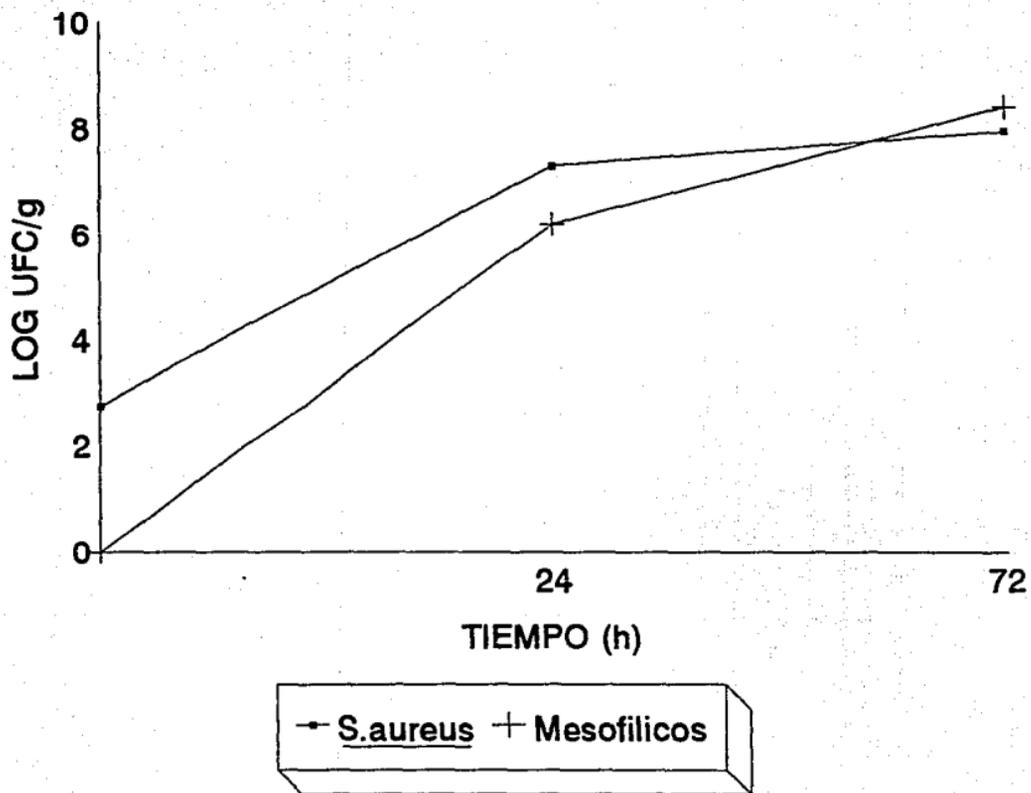
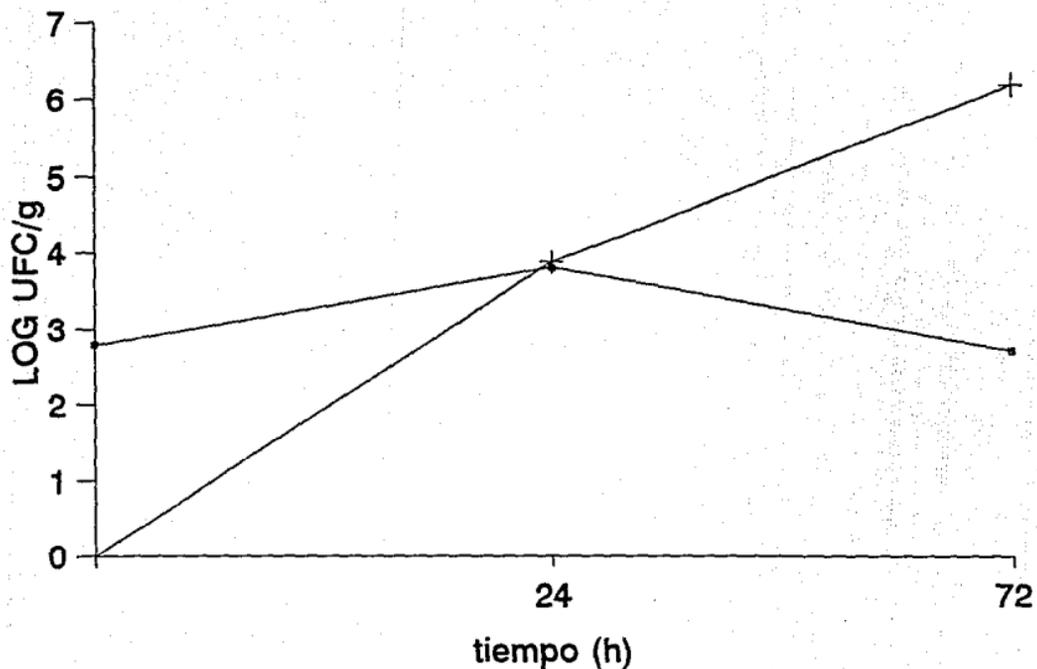


Fig.18 CRECIMIENTO DE S.aureus CON DAÑO SUBLETAL EN CREMA PASTELERA SIN REFRIGERACION



—□— S.aureus + Mesofílicos

Fig.19 CRECIMIENTO DE S.aureus CON DAÑO SUBLETAL EN CREMA PASTELERA REFRIGERADA

El mismo experimento se realizó en lotes de crema pastelera inoculados con S.aureus sin daño, los que se almacenaron a temperatura ambiente (20°C) y refrigeración (4°C), observándose el mismo comportamiento anterior. Figuras 20 y 21.

3.13 Producción de enterotoxina en crema pastelera.

Con respecto a la producción de enterotoxina en la crema pastelera inoculada con S.aureus, se obtuvieron los siguientes resultados:

De los lotes de crema pastelera almacenados 24 h bajo refrigeración, el que presentó un título menor de toxina fue el inoculado con S.aureus dañado. Dichas concentraciones no variaron a las 72 h de almacenamiento. Cuadro 9

Relacionando estos resultados con las curvas de crecimiento a 4°C, una vez más se enfatiza el efecto que la temperatura ejerce sobre la actividad metabólica del microorganismo (37).

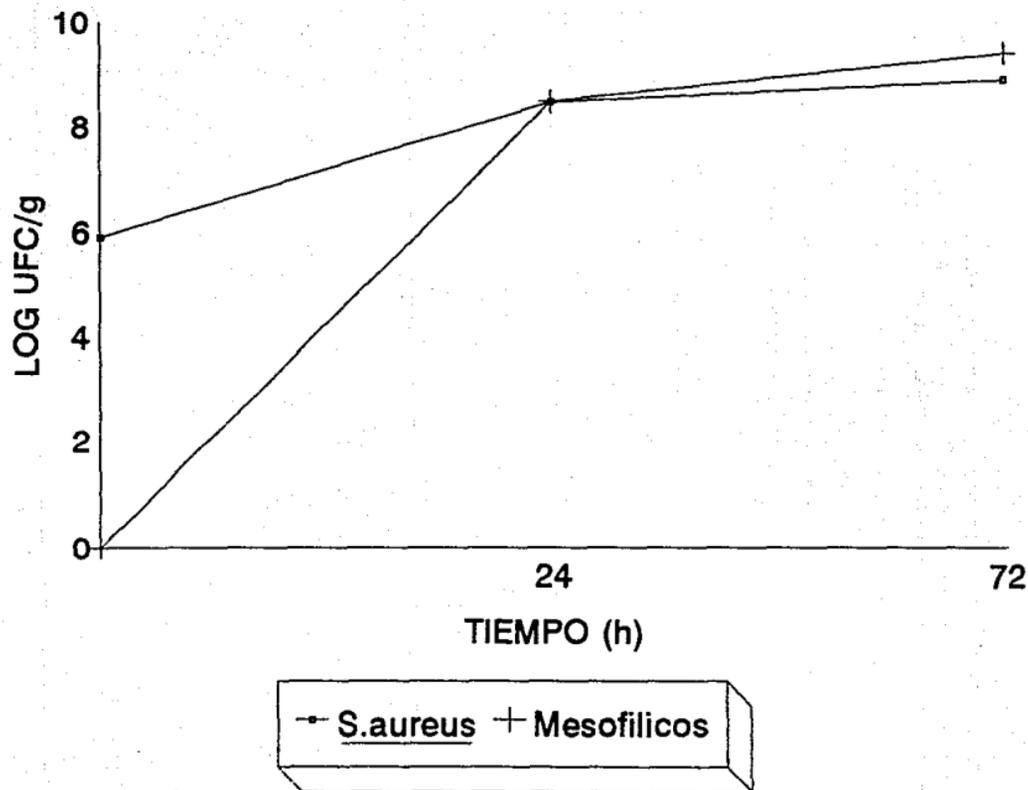
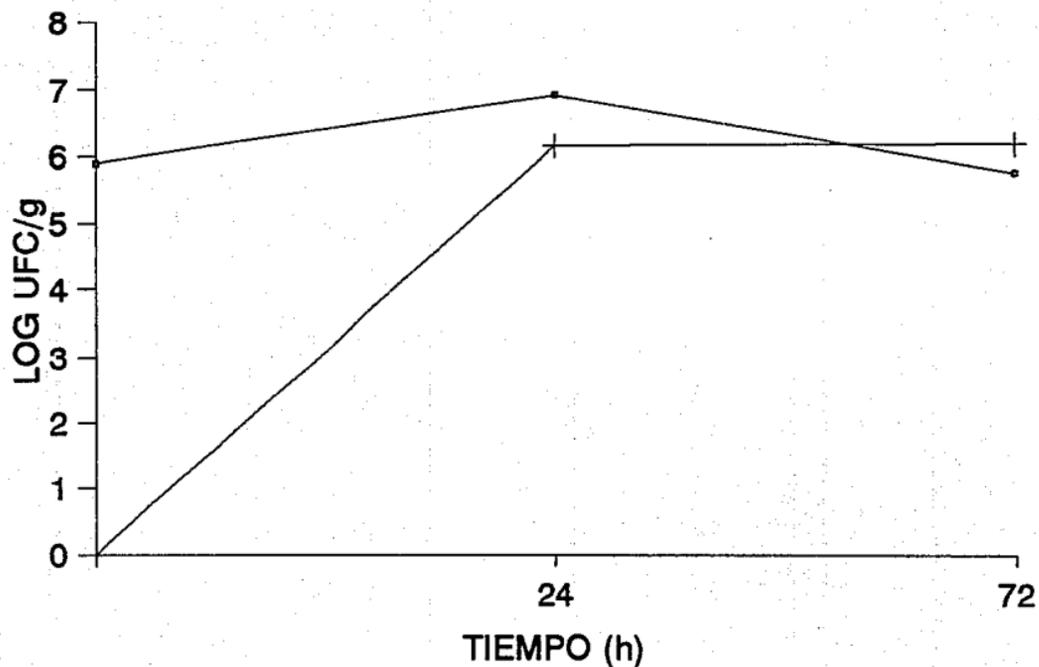


Fig.20 CRECIMIENTO DE *S.aureus* SIN DAÑO SUBLETAL EN CREMA PASTELERA SIN REFRIGERACION



—●— S.aureus + Mesofilicos

Fig.21 CRECIMIENTO DE S.aureus SIN DAÑO SUBLETAL EN CREMA PASTELERA REFRIGERADA

4. CONCLUSIONES

* La tolerancia a un 12 % de NaCl es un factor importante que nos permite poder determinar las células de S.aureus sin daño subletal.

* Las poblaciones de S.aureus con lesiones térmicas subletales presentaron mayor sensibilidad ante incrementos del tiempo de exposición al calor.

* Después del tratamiento térmico S.aureus encuentra una mayor disminución en su positividad a la prueba de Rojo de Metilo y la única prueba bioquímica que no se vió afectada por el tratamiento térmico fue la DNA-asa.

* El S.aureus con daño subletal bajo refrigeración sintetizó enterotoxina en crema pastelera, aunque en menor cantidad que el organismo sin daño.

5. BIBLIOGRAFIA

1. A.Genigeorgis;1989;"Present state of knowledge on staphylococcal intoxication";Journal of food microbiology;Vol.89;p.p.327-360
2. A.Hurst,G.S.Hendry;1976;"Enumeration of sublethally heated staphylococci in some dried foods";Can J.Microbiology;Vol.22;p.p. 677-683.
3. A.Hurst,A.Hughes;1976;"Magnesium requirement of Staphylococcus aureus for repair from sublethal heat injury";Can J. Microbiology;Vol.22;p.p. 1202-1205
4. A.Hurst,A.Hughes;1980;"Mechanism of the temperature protective effect of salts on Staphylococcus aureus";Can J.Microbiology;Vol.26;p.p. 511-517.
5. A.Hurst;1974;"Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of staphylococcus aureus";Can J.Microbiology;Vol.26:p.p. 1153-1158.
6. A.Hurst;1974;"The effect of sublethal heating on Staphylococcus aureus at diferent physiological ages";Can J.Microbiology;Vol.20;p.p. 765-768.
7. A.Hurst,A.Hughes;1983;"The protective efecct of some food ingredients on Staphylococcus aureus MF 31";Applied Bacteriology;Vol.55;p.p.81-88
8. A.Hurst, E.Ofori; 1984; "Adaptational changes in Staphylococcus aureus MF31 grown above its maximun growth temperature when protected by sodium chloride:lipid studies; Can. J. Microbiol. Vol. 30 p.p. 1424-1427.

9. A. Hurst 1977 Bacterial injury; A review Can J. Microbiology; Vol. 23; p.p. 935-944.
10. A. Hurst and H. Kruse ; 1973; "Synthesis of enterotoxin B by Staphylococcus aureus strain S6 after recovery from heat injury" Can. J. Microbiology; Vol. 19; p.p. 1463-1468.
11. Allwood M.C. 1968: "Growth and Metabolic Activities of heat treated Staphylococcus aureus; J. applied Bacteriology; Vol. 32 p.p. 79-85.
12. Ayres 1982; "Microbiologia de los alimentos"; Editorial Acribia S.A.; Zaragoza España; p.p. 233-239.
13. Bradshaw 1976; "Microbiologia de laboratorio"; Editorial Manual Moderno; Mexico,D.F.; p.p. 62-64,50-61,97-100,105-106.
14. Bergdoll S. Merlin 1990 "Analytical Methods for Staphylococcus aureus"; Journal of Food Microbiology; Vol 10; p.p. 91-100.
15. Bergdoll S. Merlin 1990 "Chemistry an Detection of Staphylococcal enterotoxin" Food Research Intitute an Department of Biochemestry; p.p. 47-53
16. Bergdoll S. Merlin 1974 "Detection of Staphylococcal enterotoxin in Foods" Applied Microbiology; Vol 25; p.p. 83-85.
17. Bergdoll S. Merlin 1974 " Detectin the Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strain" Applied Microbiology; vol 28; p.p. 46-95.
18. Bergdoll S. Merlin 1966 "Production of Enterotoxin A" Applied Microbiology; Vol 14; p.p. 966-972.

19. Bergdoll S. Merlin 1981 "Staphylococcal Intoxications"; Apuntes del curso de enterotoxinas estafilococcicas; I.P.N. E.N.C.P Mexico, D.F.; p.p. 444-490.
20. Bergdoll S. Merlin 1980 "Staphylococcal Enterotoxin B Production in hard boiled eggs"; Journal of food Science; p.p. 307-309.
21. Bergdoll S. Merlin 1981 "Staphylococcal Food Poisoning" Apuntes del curso de enterotoxina estafilococcicas; I.P.N. E.N.C.P. Mexico D.F.; p.p. 85-106.
22. Bergey's; "Manual of Determinative Bacteriology"; Editorial Williams C. Baitomore USA; 8a. edicion; p.p. 478-489.
23. B. Rosen 1977; "Death an Injury of Staphylococcus aureus During Thermal Treatment of Milk"; Canadian Journal of Microbiology; Vol 23; p.p. 1034-1037.
24. Bisciello N. 1985; "Most Probable Number Method for Isolation and Ennumeration of Staphylococcus aureus in Food"; Colaboratibe Study Food an drug adminstration; p.p. 27-31.
25. Bucker E. R. 1979; "Effect of Hydrogen Peroxide and Sodium Chloride on enumeration of thermally stressed cells of staphylococcus aureus"; Journal of food protection; Vol 42; p.p. 961-964.
26. Capella B. Antonio 1984; "Nociones elementales de Microbiologia médica"; 2a. edición Editorial Francisco Mendez Cervantes; México, D.F.; p.p. 111-121.
27. Davis B. D. 1985; "Tratado de Microbiología"; 3a. edicion; Editorial Salvat; Barcelona España; p.p. 512-517.

28. Delaat A.N.C. 1983; "Microbiologia"; 2a. Edición; Editorial Interamericana; Mexico, D.F.; p.p. 117-122.
29. E. V. Tucan 1985; "Combined effect of Sucrose and heat treatment temperature on the thermal resistant of *Staphylococcus aureus* MF 31"; Dept. of Food Science.
30. E.S. Ioziak 1980; "Enumeration of bital an thermally stressed *Staphylococcus aureus* in foods using Baird Parker Pig plasma agar"; Journal of Applied Bacteriology; Vol 48; p.p. 101-113.
31. Fung Y.C. Daniel 1975; "Repair growth an enterotoxigenesis of *Staphylococcus aureus* S-6 injured by Freeze-Drying"; Journal Milk Food Technology; Vol 38; p.p. 212-218.
32. Fosdick and Pike 1982; "Improved Radioimhunoassay of Staphylococcal enterotoxin A. Journal Association of Anal Chemistry "; Vol 65; p.p. 180-184.
33. Gail P. Andrews 1979; "Catalose activity during the recovery of heat stressed *Staphylococcus aureus* MF-31"; Applied an environmental Microbiology; Vol 38; p.p. 390-394.
34. García Rojas C.E. 1987; "Análisis Microbiológico de los alimentos"; Editorial Publicidad Grafica Leon S.R.L. Venezuela; p.p. 26-57,69-71.
35. Gran Larousse de la cocina 1988; Vol 3; Editorial Planeta de Agustini S.A. España; p.p. 705-708.
36. Hall E. Herbert 1963; "Quantitative Detection of Staphylococcal enterotoxin B in food by gel-diffussion methods; Vol 78 p.p. 1089-1097.

37. H. Jackson 1973; "Loss of Viability and Metabolic Injury of *Staphylococcus aureus* resulting from storage at 5°C"; *Journal Applied bacteriology*; Vol 37; p.p. 59-64.
38. H. Jackson 1962; "The effect of sublethal heat treatment on the growth of *Staphylococcus aureus*"; *J. Applied bacteriology*; Vol 26; p.p. 152-158.
39. H. W. Seeley 1972; "Manual de Laboratorio para microbiología"; Editorial Blume Barcelona; p.p. 60-70,83-85.
40. Hobbs B.C. 1981; "Symposium on the restoration of sublethally impaired bacterial cells in food"; *Journal Milk Food Technology*; Vol 34; p.p. 548-552.
41. Iandolo J.Jonh 1966; "Repair of thermal Injury of *Staphylococcus aureus*"; *Journal of bacteriology*; Vol.91; p.p. 134-142.
42. I.P.Pearl 1984; "Rapid Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Foods by Direct Demonstration of Enterotogenic Colonies on Membrane Filters by Enzyme Immunoassay"; *Applied and Enviromental Microbiology*; Vol.45; p.p. 1047-1053
43. International Commission on Microbiological Specification for food (ICMSF) 1978 "Sampling for Microbiological Analysis"; Segunda edición; Academic Press Toronto Can.
44. Jay J.M. 1978 "Microbiología Moderna de los Alimentos"; Editorial Acribia S.A.; Segunda Edición; Zaragoza España.
45. J.T. Peeler 1986 "Evaluation of and Improved M.P.N. Medium for Recovery of Stressed and Nonstressed *Staphylococcus aureus*"; *Journal Assoc. off Anal. Chem.*; Vol 69; p.p. 44-46

46. J.L. Smith 1981 "Protection Against Heat-Injury in Staphylococcus aureus by solutes; Journal of food Protection; Vol. 45; p.p. 54-58
47. Koneman E.W., Allen S.D. 1989 "Diagnostico Microbiológico"; Editorial Panamericana; México D.F.; p.p. 151-157.
48. Lachica Victor 1984 "Egg Yolk Free Baird Parker Medium for the Acelerated Enumeration of Foodborne Staphylococcus aureus"; Applied and Enviromental Microbiology, p.p.870-871.
49. L.Smith James, Benedict 1984 " Solutes That Protect Staphylococcus aureus Against Heat-Induced Injury and Their Effect on Cellular Leakage"; Journal of food protections; Vol.48; p.p. 600-602.
50. Mac Faddin 1990 "Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica; Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V.; México D.F.
51. M.E. Stiles 1974 " The Reliability of Selective Media for the Enumeration of Unheated and Heated Staphylococci; Can Journal Microbiology; Vol 20; p.p. 1735-1744.
52. M.K. Rayman 1978 "ICMSF Methods Studies and International Comparative Study of Four Media for the Enumeration of Staphylococcus aureus in food; Can Journal Microbiology; Vol. 24; p.p.274-281
53. M.W.Pariza 1969 "Coagulasa Production by Injured Staphylococcus aureus MF-31 During Recovery"; Applied Microbiology; Vol.17; p.p. 836-838
54. Pelczar 1982 "Microbiología"; Segunda Edición; Editorial Graw Hill; México D.F.; p.p. 106-115, 558-560.

55. P.Straka and J.L.Stokes 1959 "Metabolic Injury to Bacteria at Low Temperatures; Can Journal Microbiology; p.p. 181-185.
56. R.K. Robinson 1987 "Microbiología Lactológica"; Vol.1; Editorial Acribia S.A.; Zaragoza España; p.p. 43-44, 74-76.
57. R. A.Sally 1988 "Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Dairy Products by Reversed Passive Latex Agglitination (SET-RPLA) Kit"; Journal of food Microbiology; Vol.8; p.p. 65-72.
58. R.B. Read 1964 "In vitro Assay of Staphylococcal Enterotoxins A and B From Milk"; Milk and Food Research; p.p. 411-419.
59. R.N.Ruth "Production of Rabbit Antisero to the Staphylococcal Enterotoxins"; Journal of Food Protection; Vol.47; p.p.172-176
60. Reyes L. 1984 " Determinación de la Enterotoxigenicidad de Cepas de Staphylococcus aureus Aisladas de Quesos"; Food Microbiology; Vol.26; p.p. 277-283.
61. Sokari T.G. 1988 "Modifiel Single Radial Immunodiffusions Method for Screening Staphylococcal Isolate for Enterotoxin "; Food Microbiology; Vol.6; p.p. 45-48.
62. S.Notermans 1983 " Combined Effect of Water Activity, pH and Sub-optimal Temperature on Growth on Enterotoxin Production of Staphylococcus aureus"; Journal of food Science; Vol. 48; p.p. 1832-1835.

63. Thacher F.S. 1983 " Análisis Microbiológico de los Alimentos"; Editorial Acribia S.A.; España; p.p. 20-24, 42-48.
64. Troller J.A. 1971 "Effect of Water Activity on Enterotoxin B Production and Growth of Staphylococcus aureus; Applied Microbiology; Vol. 21; p.p. 435-439.
65. Troller J.A. and Stimon J.V. " Influence of Water Activity on Growth of Staphylococcus aureus; Applied Microbiology; Vol. 21; p.p.435-439.
66. Walker G.C. 1966 " Thermal Resistance of Staphylococcus aureus in Milk Whey and Phosphate Buffer"; Applied Microbiology; Vol.14; p.p. 584-590.
67. Wesley E.Kloos " The Genus Staphylococcus"; Apuntes del Curso de Enterotoxinas Estafilocócicas I.P.N ENCP; México D.F.; p.p. 1548-1569.
68. W.C.Frazier 1985 "Microbiología de los Alimentos"; tercera Edición; Editorial Acribia S.A.; Zaragoza España; p.p. 3-15.
69. Wilhelm Tham 1987 " A Comparison of Six Media For Isolating Staphylococcus aureus From Foods "; Food Microbiology; Vol 4; p.p. 133-146.
70. W.E.Park " Evaluation of the Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) Test Kits for Detecction of Staphylococcal Enterotoxins A,B,C,D, in Food "; Vol. 9; p.p. 23-28.