

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



**ENTEROTOXINAS DE STAPHYLOCOCCOS AUREUS
DETERMINACION E IDENTIFICACION EN
ALIMENTOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a n

**JUAN FRANCISCO GARCIA IMAY
JOSE FELIPE VAZQUEZ MARTINEZ**

MEXICO, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1979
ADA H.C. 129
FECHA _____
PRGC _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: LILIA VIERNA GARCIA
VOCAL: ROSA MARIA RAMIREZ DE GAMMA
SECRETARIO: BEATRIZ LUNA MILLAN DE MAGAÑA
1er. SUPLENTE: OLGA VELAZQUEZ MADRAZO
2do. SUPLENTE: MERCEDES IRUESTE ALEJANDRE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

SUSTENTANTES:

JUAN FRANCISCO GARCIA IMAY

JOSE FELIPE VAZQUEZ MARTINEZ

ASESOR DEL TEMA:

LILIA VIERNA GARCIA

A NUESTROS PADRES POR EL APOYO
QUE SIEMPRE NOS HAN BRINDADO.

A LA QUIM.

LILIA VIERNA GARCIA

POR SU VALIOSA AYUDA.

CONTENIDO

- 1.- INTRODUCCION
- 2.- GENERALIDADES
- 3.- PRINCIPALES METODOS DE PURIFICACION DE
ENTEROTOXINAS DE S. AUREUS.
- 4.- EXTRACCION DE ENTEROTOXINAS DE S. AUREUS
DEL ALIMENTO Y DETERMINACION DE LAS MISMAS.
- 5.- DISCUSION
- 6.- CONCLUSIONES.
- 7.- BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

Entre las sustancias biologicamente activas producidas por estafilococos patogenicos, un grupo de enterotoxinas ocupa un lugar especial. Estas sustancias juegan un papel muy importante en la contaminacion de alimentos causada por estafilococo.

La intoxicacion por alimentos estafilococicos es un padecimiento comun en el mundo entero y se produce cuando un individuo propenso ingiere enterotoxinas elaboradas por STAPHYLOCOCCUS aureus. El padecimiento frecuentemente se presenta en epidemias, las cuales son debidas a la ingestion de alimentos contaminados por grandes grupos de gentes. El padecimiento puede tambien presentarse en forma esporadica y ser limitado a miembros de una familia.

Generalmente ha sido considerado que el envenenamiento alimenticio causado por estafilococo depende de dos factores principales: (a) alguna fuente anormal de contaminacion del alimento por estafilococos enterotoxigenicos, tales como infecciones de los manipuladores del alimento; y, (b) guardar el alimento bajo condiciones que permitan que se lleguen a producir cantidades peligrosas de enterotoxinas. Esto es, que el envenenamiento alimenticio causado por estafilococo ocurre cuando el alimento llega a ser contaminado con una especie de STAPHYLOCOCCUS aureus productora de enterotoxina y si tal alimento es dejado a una temperatura adecuada, en la que dicho microorganismo se multiplique rapidamente y produzca toxina, la cual es secretada e incorporada al alimento.

to; cuando éste es ingerido, el resultado es una gastroenteritis aguda. -- Los síntomas iniciales son usualmente notados 2 ó 5 horas después de la ingestión del alimento contaminado e incluye más tarde diarrea y vómito.

El alimento es usualmente contaminado por un portador enfermo ó asintomático. Una persona con una lesión estafilocócica en una mano -- puede infectar directamente el alimento. El alimento puede también ser contaminado por las manos de una persona no infectada, si dicha persona es portadora de una especie productora de enterotoxina sobre la piel, ó -- puede también ser contaminado por un portador asintomático de estafilococo en el orofaringe ó nasofaringe a través de estornudos.

Ha sido visto que el alimento puede llegar a ser contaminado bajo condiciones aparentemente normales y sanitarias (ver tabla 1) y ésto es porque un gran porcentaje de la población es portadora de STAPHYLOCOCCUS aureus en la nariz y en la piel, y por ésto mismo parece lógico -- pensar que virtualmente todos los alimentos pueden llegar a ser contaminados por éste microorganismo, aun sin tomar en cuenta el estado de -- limpieza ó ausencia de infecciones en los manipuladores del alimento.

Se ha visto que los alimentos que generalmente actúan como vehículo, son alimentos protéicos cocidos que han sido almacenados durante un período de tiempo a temperatura ambiente, particularmente carnes -- frías, pastas, ó leche, y el tiempo mínimo para que un alimento llegue -- a ser tóxico después de ser contaminado es de 4 horas, a temperatura -- ambiente. Carnes crudas y alimentos cocidos recientemente no se ha determinado que actúen como vehículo.

Seis enterotoxinas (A, B, C₁, C₂, D, y E) han sido diferenciadas

por su reacción con antisueros específicos. Se ha estimado que una cantidad tan pequeña como 1 μ g de toxina produce síntomas en humanos. A pesar de sus propiedades biológicas comunes las enterotoxinas de STAPHYLOCOCCUS aureus difieren en sus estructuras químicas, y ésto sienta las bases de su diferencia serológica.

La detección, identificación, y cuantificación, de las enterotoxinas de STAPHYLOCOCCUS aureus en filtrado de cultivo han sido demostradas por varios investigadores. Varias técnicas de difusión en gel de agar han sido empleadas con buen éxito, y éstos investigadores han demostrado -- que las sustancias en los filtrados de cultivo responsables de emesis en gatos y monos, son serológicamente detectables y son neutralizadas por antisueros específicos. Aun más, los investigadores han demostrado que enterotoxina pura, parcialmente pura, y cruda, cuando se adiciona a algún alimento, puede de manera similar ser detectada, ya sea inmediatamente ó después de incubación a 37°C por 24 horas; y que una variedad -- de alimentos inoculados con estafilococos enterotoxigénicos e incubados -- bajo una variedad de condiciones, contendrán niveles detectables de enterotoxina. Estos descubrimientos han llevado al desarrollo de diversos -- métodos para la detección de enterotoxina de estafilococo en alimentos -- involucrados en envenenamiento alimenticio.

La detección de enterotoxina en alimentos concierne a mucha gente, y el interés aumenta constantemente, particularmente en las áreas de sarrolladas del mundo. En algunos países es difícil determinar justamente cuan importante es el envenenamiento alimenticio causado por entero--

toxinas de estafilococo, porque, aparte del hecho de que otros problemas pueden ser de una importancia más inmediata, es difícil determinar cuán importante son los estafilococos en los disturbios digestivos comunes en éstos países.

Aunque el tipo de alimentos consumidos en cualquier país dado, - pueden afectar la incidencia de éste tipo de envenenamiento alimenticio, - la población en muchos países consume alimentos que soportan el desarrollo de estafilococos y la producción de enterotoxina. Por ejemplo, en Japón el arroz es el artículo alimenticio más involucrado en envenenamiento, mientras que en los Estados Unidos el jamón es uno de los artículos más involucrados y ambos son excelentes medios de desarrollo para estafilococos. Así, cada país puede tener diferentes artículos alimenticios involucrados y al mismo tiempo requerir procedimientos diferentes para la detección de enterotoxina en ellos.

TABLA 1

Sumario de factores responsables en 95 brotes de envenenamiento alimenticio por *Staphylococcus* en los EEUU, 1955-56.

Factores	Brotos		Número de Brotes reportando éste tipo de datos.
	Número	Por ciento	
Tipos de alimentos:			
Cocido con alto contenido de proteína	94	99	95
Almacenado por un tiempo	81	94	86
Mezclas de alimentos	63	67	95
Carne recientemente cocida	0	0	95
Carne cruda	0	0	95
Vegetales solos	0	0	95
Medio ambiente:			
Satisfactorio	50	70	71
Falta de limpieza	13	18	71
Método de manipulación del alimento después de cocido:			
No refrigerado o calentado			
o ambos	79	95	83
No refrigerado	74	89	83
Calentado	13	16	83

TABLA 2

**MICROORGANISMOS EN QUESOS ADICIONADOS DE CREMA
1971-1972.**

1971			1972			
ORGANISMOS COLIFORMES						
No. de muest.	Frecuen- cia acum.	% acu- mulado		No. de muest.	Frecuen- cia acum.	% acu- mulado
21	21	70.0	0	24	24	55.8
2	23	76.6	1-100	2	26	60.4
2	25	83.3	101-1,000	7	33	76.7
1	26	86.6	1,001-10,000	2	35	81.3
1	27	90.0	10,001-100,000	0	35	81.3
3	30	100.0	100,001-1,000,000	7	42	92.6
0	30	100.0	1,000,001-100,000,000	1	43	100.0
HONGOS						
(col/g)						
13	13	92.8	0	3	3	13.6
0	13	92.8	1-100	2	5	22.7
0	13	92.8	101-1,000	5	10	45.4
1	14	100.0	1,001-10,000	5	15	68.1
0	14	100.0	10,001-100,000	3	18	81.8
0	14	100.0	100,001-1,000,000	4	22	100.0
LEVADURAS						
(col/g)						
4	4	16.0	0-1,000	4	4	19.0
0	4	16.0	1,001-10,000	4	8	38.0
7	11	44.0	10,001-100,000	2	10	47.6
14	25	100.0	100,001-100,000	11	21	100.0
<u>S. AUREUS</u>						
29	29	90.6	0	36	36	81.8
1	30	93.7	1-100	2	38	86.4
1	31	96.9	101-1,000	1	39	88.6
0	31	96.9	1,001-10,000	2	41	93.2
1	32	100.0	10,001-100,000	2	43	97.7
0	32	100.0	100,001-1,000,000	1	44	100.0

TABLA 3

DISTRIBUCION DE MICROORGANISMOS EN QUESOS FRESCOS ADICIONADOS
DE GRASA VEGETAL
1971-1972

1971	ORGANISMOS COLIFORMES (col /g)	1972
198	Muestras	87
84,000,000	Valor máximo	100,000,000
0	Valor mínimo	0
100,000	Mediana	200,000
580,000	Media aritmética	1,500,000
	HONGOS (col /g)	
22	Muestras	21
12,000	Valor máximo	38,000
0	Valor mínimo	0
10	Mediana	90
730	Media aritmética	2,500
	LEVADURAS (col /g)	
122	Muestras	21
1,100,000	Valor máximo	1,500,000
0	Valor mínimo	270
35,000	Mediana	270,000
74,000	Media aritmética	400,000
	<u>S. AUREUS</u>	
208	Muestras	86
100,000	Valor máximo	100,000
0	Valor mínimo	0
10,000	Mediana	10,000
40,000	Media aritmética	47,000
	<u>SALMONELLA</u> (en 20 g)	
204	Muestras	86
4	Positivas	4

TABLA 4

**MICROORGANISMOS EN JAMONES
1971-1972**

1971			1972			
No. de muest.	Frecuen- cia acum.	% acu- mulado	MESOFILICOS AEROBIOS (co/g)	No. de muest.	Frecuen- cia acum.	% acu- mulado
11	11	14.5	0-500	10	10	12.3
4	15	19.8	501-1,000	3	13	16.1
20	35	46.0	1,001-10,000	10	23	28.4
13	48	63.2	10,001-100,000	16	39	48.1
12	60	79.0	100,001-500,000	8	47	58.0
5	65	85.6	500,001-1,000,000	5	52	64.1
8	73	96.1	1,000,001-10,000,000	16	68	84.0
3	76	100.0	10,000,001-100,000,000	12	80	98.8
0	76	100.0	+100,000,000	1	81	100.0
			ORGANISMOS COLIFORMES (col/g)			
37	37	48.7	0	41	41	47.1
14	51	67.1	1-50	18	59	67.8
14	65	85.6	51-500	6	65	74.7
2	67	88.0	501-1,000	3	68	78.1
8	75	98.6	1,001-10,000	9	77	88.5
1	76	100.0	10,001-100,000	4	81	93.1
			+ 100,000	6	87	100.0
			HONGOS (col/g)			
13	13	28.3	0	43	43	54.4
24	37	80.4	1-50	15	58	73.4
2	39	84.8	51-100	6	64	81.0
5	44	95.7	101-1,000	8	72	91.1
1	46	100.0	1,001-10,000	3	75	95.0
0	46	100.0	10,001-100,000	2	77	97.4
0	46	100.0	+ 100,000	2	79	100.0
			LEVADURAS (col/g)			
9	9	20.0	0	17	17	22.4
14	23	51.2	1-100	12	29	38.2
7	30	66.7	101-500	12	41	54.0
3	33	73.4	501-1,000	2	43	56.7
8	41	91.0	1,001-10,000	13	56	73.8
3	44	97.9	10,001-100,000	12	68	89.6
1	45	100.0	100,001-1,000,000	7	75	98.6
0	45	100.0	+ 1,000,000	1	76	100.0
			<u>S. aureus</u> (/g)			
66	66	86.9	0	55	55	64.0
1	67	88.1	10	3	58	67.4
4	71	93.4	100	14	72	83.8
4	75	98.6	1,000	9	81	94.1
4	76	100.0	10,000	2	83	96.6
0	76	100.0	100,000	3	86	100.0

TABLA 5

DISTRIBUCION DE MICROORGANISMOS EN JAMONES
1971-1972

1971	MESOFILICOS AEROBIOS (col/g)	1972
76	Muestras	81
100,000,000	Valor máximo	140,000,000
40	Valor mínimo	20
32,000	Mediana	400,000
4,900,000	Media aritmética	46,000,000
	ORGANISMOS COLIFORMES (col/g)	
76	Muestras	88
20,000	Valor Máximo	+ 1,000,000
0	Valor mínimo	0
10	Mediana	10
6,640	Media aritmética	36,000
	HONGOS (col/g)	
47	Muestras	81
3,000	Valor máximo	+ 1,000,000
0	Valor mínimo	0
10	Mediana	0
97	Media aritmética	1,400
	LEVADURAS (col/g)	
47	Muestras	76
1,000,000	Valor máximo	1,700,000
0	Valor mínimo	0
100	Mediana	380
25,000	Media aritmética	600,000
	<u>S.aureus</u> (/g)	
76	Muestras	86
10,000	Valor máximo	100,000
0	Valor mínimo	0
0	Mediana	0
190	Media aritmética	6,000
	SALMONELLA (en 20g)	
76	Muestras	88
3	Positivas	4

FIG. 1

ESTUDIOS EN LINEA DE FABRICACION DE JAMON COCIDO
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (/g)

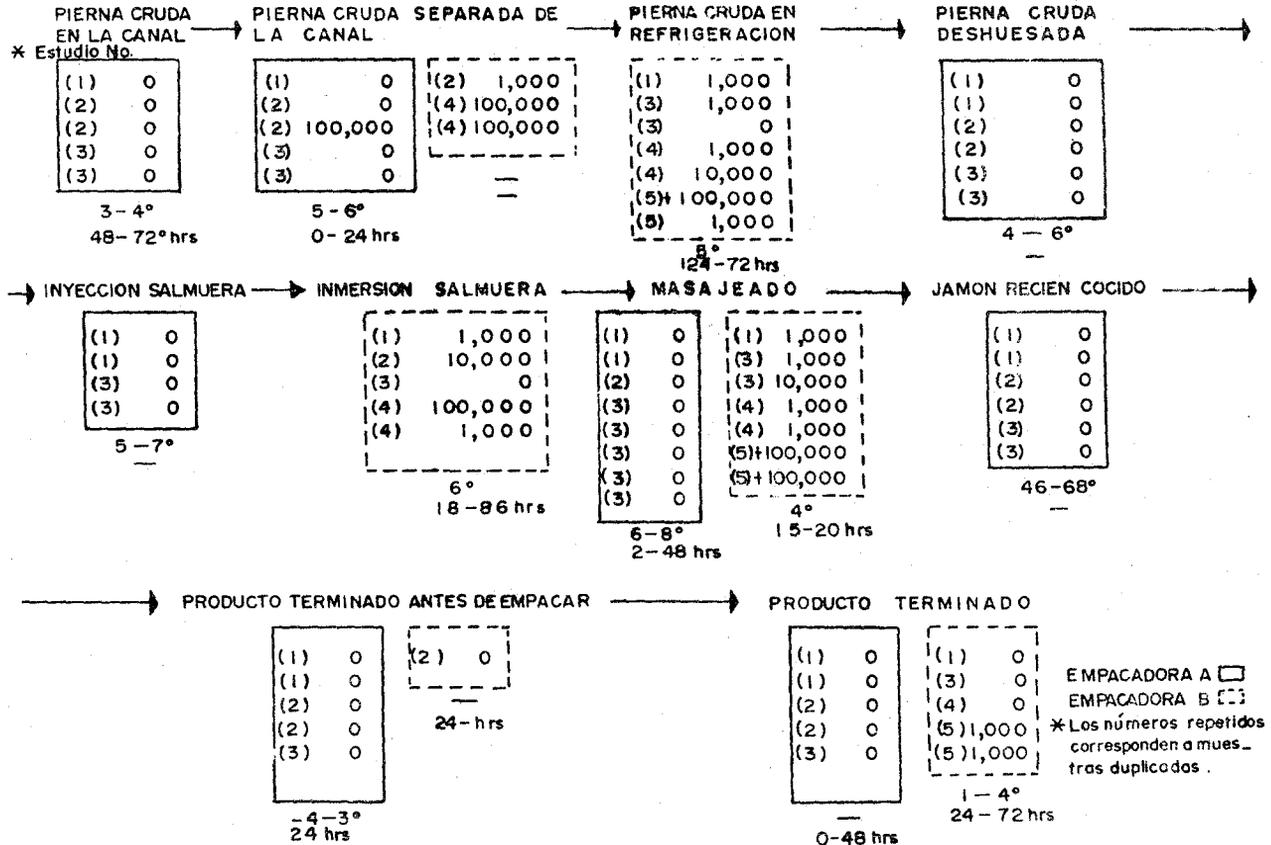


TABLA 6

PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS POR ESPECIES DE SYAPHYLOCOCCUS AUREUS
 AISLADAS DE VARIAS FUENTES. % DE ESPECIES QUE PRODUCEN ENTEROTOXINA
 A, B, C, D, 6 E.

ESPECIES AISLADAS DE :	a	b	c	d	e	f	g	h
- Pollo crudo congelado	50	13	26	-	2.0	6.0	22	-
- Carne cruda y embutidos	62	13	21	1.6	-	1.6	19	-
- Pastel de pollo	53	17	32	7.6	1.9	17	19	1.9
- Pastel de carne	50	18	36	10	8.0	14	10	2.0
- Langosta y cangrejo	80	28	35	17	8.7	17	3.7	1.2
- Salami y Paté	16	3	19	13	-	6.3	-	6.3
- Cremas	28	9	32	7.2	7.2	11	11	3.6
- Leche cruda	50	3	6	-	-	-	6	-
- Queso	63	7	11	1.6	1.6	1.6	9.5	-
- Lesiones entre pasientes de hospital.	199	91	45	20	14	16	9.5	2.0
- Brotes de envenenamiento alimenticio.	120	113	94	73	1.7	15	40	2.5

a: número de especies probadas.

b: número de especies que producen enterotoxinas A y E

c: % de especies que producen enterotoxinas A y E

d: % de especies que producen enterotoxina A

e: % de especies que producen enterotoxina B

f: % de especies que producen enterotoxina C

g: % de especies que producen enterotoxina D

h: % de especies que producen enterotoxina E

TABLA 7

PRODUCCION DE ENTEROTOXINA POR ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DE DIFERENTES
GRUPOS DE FAGOS AISLADOS DE ALIMENTOS COMUNES

GRUPOS DE FAGOS	X	Y	Z	A	B	C	D	E	AB	AC	AD	ED	CD	CE	ACD	ACE
I	65	15	23	2	2	4	3	1	-	-	-	-	3	-	-	-
II	28	3	11	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	145	42	29	7	2	2	21	-	-	2	3	1	4	-	-	-
IV	18	2	11	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I/III	81	20	25	4	2	5	3	-	1	1	3	-	1	-	-	-
II/III	7	3		-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
I/IV																
III/IV																
I/III/IV	21	5	24	-	-	-	4	-	-	-	-	-	1	-	-	-
II/III/IV																
Miscellaneous (fago 187)	4	4	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-
Miscellaneous (fago 81)	3	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
no tipificado	80	16	20	1	5	5	1	1	-	2	-	-	1	-	-	-
Número total de especies	452	111	25	14	14	18	34	2	1	6	6	1	11	-	-	-

12

X; Número de especies probadas.

Y; Número de especies que producen enterotoxinas de la A a la E.

Z; % de especies que producen enterotoxinas de la A a la E.

TABLA 8

PRODUCCION DE ENTEROTOXINA POR ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADAS

DE VARIAS FUENTES: NUMERO DE ESPECIES QUE PRODUCEN UNA O MAS ENTEROTOXINAS.

Especie aislada de:	NUMERO DE ESPECIES QUE PRODUCEN ENTEROTOXINA										
	X	A	B	C	D	E	AB	AC	AD	BD	CD
Pollo crudo congelado	13	-	1	1	9	-	-	-	-	-	2
Carne cruda y embutidos	13	1	-	-	11	-	-	-	-	-	1
Pastel de pollo	17	-	1	4	3	1	-	1	3	-	4
Pastel de carne	18	3	4	5	1	1	-	-	2	-	2
Langosta y cangrejo	28	6	6	7	-	-	1	4	1	-	1
Salami y paté	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cremas	9	2	2	1	1	2	-	-	-	-	1
Leche cruda	3	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Queso	7	-	-	-	5	-	-	1	-	1	-
Lesiones entre pacientes de Hospital	91	12	5	9	5	4	15	3	9	1	2
Brotos de envenenamiento alimenticio	113	53	-	4	8	2	2	3	30	-	10

X: Número de especies que producen enterotoxinas de la A a la E.

GENERALIDADES

PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS.

Las enterotoxinas purificadas son proteínas como pelusa, color -- blanco, hogrosópicas y muy solubles en agua y soluciones salinas. Se ob tuvieron resultados negativos cuando se hicieron pruebas con las enterotoxinas purificadas para determinar carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, amilasa, coagulasa, fibrinolisisina y enzimas proteolíticas.

La potencia biológica de las enterotoxinas, determinada por la administración de las toxinas intragástricamente ó intravenosamente a monos rhesus jóvenes (2 a 3 kg) parece ser que es igual en todas las enterotoxinas, ésto es que 5 μ g, administrados intragástricamente son requeridos para causar émesis en 50% de los animales.

La única enterotoxina que ha sido probada en un gran número de monos es la enterotoxina B. Schantz (1965) usó más de 200 animales para inyecciones intravenosas, y aproximadamente 100 animales para administración intragástrica. El reporta que, por ruta intravenosa, se observa enfermedad caracterizada por vómito y diarrea en 50% de los animales -- (dosis efectiva, ED50) cuando se administra 0.1 μ g/Kg de peso corporal (95% de confianza, con límites de 0.4 a 0.9) por ruta oral, el ED50 es de 0.9 μ g/Kg de peso corporal (95% de confianza, con límites de 0.2 a 5).

EFFECTO DEL CALOR SOBRE LAS ENTEROTOXINAS. - La actividad biológica de enterotoxina B es mantenida después de calentar una solución de la toxina a 60°C y a pH 7.3, por un tiempo de 16 horas. Un decre-

mento del 50% en la reacción de enterotoxina A con su anticuerpo específico, es el resultado cuando se calienta una solución de dicha enterotoxina, a pH 6.85 y a 60°C por 20 minutos. El calentamiento de una solución de enterotoxina C1 a 60°C durante 30 minutos no da ningún cambio en la reacción de la enterotoxina con su anticuerpo específico, aunque después de 60 minutos la solución llega a ser turbia.

Soluciones de enterotoxina C2 llegan a ser turbias cuando se calientan a 52°C. Aproximadamente el 50% de la actividad biológica de enterotoxina B se destruye cuando la toxona se calienta a 100°C por 5 minutos, y además la toxina se desnaturaliza a ésta temperatura. La enterotoxina A no da una mayor reacción con su anticuerpo específico después de que se calienta a 80°C por 3 minutos ó a 100°C por 1 minuto. La reacción de enterotoxina C2 con su antienterotoxina se reduce a aproximadamente 20% de lo normal cuando se calienta a 100°C por 1 minuto.

Como puede verse de los anteriores resultados, la enterotoxina A es la más sensible al calor, mientras que la enterotoxina B, es la menos sensible. La sensibilidad de la enterotoxina A a la desnaturalización estorba el esfuerzo para purificar ésta enterotoxina.

Respecto al almacenamiento de las enterotoxinas, la enterotoxina B purificada fue almacenada por muchos años en un desecador a temperatura ambiente. Ocasionalmente, después de largos períodos de almacenamiento, pierde algo de su solubilidad y actividad biológica. Se ha reportado que enterotoxina B liofilizada y almacenada (en desecador) a 4°C, durante un año, no muestra pérdida alguna en actividad biológica ó cambios-

en su solubilidad en agua, pero cuando se almacena a temperatura ambiente, por éste mismo lapso de tiempo, se observa algún cambio en su solubilidad y actividad biológica. Así pues, se recomienda que las enterotoxinas purificadas sean almacenadas en desecador a temperaturas de refrigeración. La información específica acerca del almacenamiento de cada una de las enterotoxinas en solución no es accesible de cualquier modo, la enterotoxina A (10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de salina al 0.85%) ha sido almacenada en congelación por varios meses sin aparente pérdida en actividad. Este es un método conveniente para el almacenamiento de las enterotoxinas cuando sólo pequeñas cantidades son requeridas para cualquier experimento dado.

Las enterotoxinas en estado activo son resistentes a enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, renina y papaína. La pepsina destruye su actividad a un pH aproximado de 2, pero es inefectiva a valores de pH más altos.

El contenido de nitrógeno de las enterotoxinas es consistente con el de la mayoría de las proteínas, con la posible excepción de la enterotoxina A.

Algunas de las propiedades físicas y químicas de las enterotoxinas son dadas en las tablas 9 y 10.

Especulación teórica sobre el tamaño y forma de las proteínas en solución es provista por una función β dada por la ecuación de Sheraga -- y Mandelkern. De acuerdo a la tabla presentada por ellos, un valor de $\beta = 2.15 \times 10^6$ deja fuera toda la posibilidad de un elipsoide achatado en los polos. A causa de que los valores de β obtenidos para las enterotoxi-

nas ($A = 2.24$, $B = 2.14$, $C1 = 2.17$, $C2 = 2.23$) son más grandes de 2.15×10^6 , excepto para enterotoxina B, es razonable asumir que la forma de la molécula de enterotoxina es un elipsoide alargado hacia los polos: Los datos obtenidos sobre las relaciones axial y friccional para las enterotoxinas purificadas indican compactibilidad molecular.

Los puntos isoelectricos más bajos de la enterotoxina A y C2 --- afectan las condiciones para adsorción de éstas enterotoxinas por CM-celulosa, a causa de que ellas son menos fácilmente adsorbidas que la B y C1, las cuales tienen unos puntos isoelectricos más altos. La diferencia en adsorción de la C1 y C2 sobre CM-celulosa y la disimilitud en sus movilidades electroforéticas en la base para la diferenciación de éstas dos enterotoxinas.

TABLA 9

ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS.

	A	B	C1	C2
DOSIS EMETICA (ED50) (Mono) ($\mu\text{g}/\text{animal}$)	5	5	5	5-10
CONTENIDO DE NITROGENO (%)	16.5 c 16.2 a	16.1	16.2	16.0
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION (S_2° , W), S	3.04 c 3.03 a	2.89 a 2.78 b	3.00	2.90
COEFICIENTE DE DIFUSION (D_{20}° , W), $\times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$	7.94 c 9.8 a	7.72 a 8.22 b	8.10	8.10
VISCOSIDAD REDUCIDA (ml/g)	4.07	3.92 a 3.81 b	3.4	3.7
PESO MOLECULAR	34,700 c 27,800 a 27,500 a 28,000 a	35,300 a 30,000 b	34,100	34,000
VOLUMEN PARCIAL ESPECIFICO	0.726	0.743 a 0.726 b	0.732	0.742
PUNTO ISOELECTRICO	6.8 c 7.26 a	8.6	8.6	7.0
ABSORCION MAXIMA (m μ)	277	277	277	277
EXTINCION (E $\frac{1\%}{1\text{cm}}$)	14.3 c 14.6 a	14.0 a 14.4	12.1	12.1

(a) Schantz et. al., 1965

(b) Bergdoll et al., 1965 b

(c) Chu et al., 1966.

TABLA 10

ALGUNAS PROPIEDADES DE ENTEROTOXINA E.

DOSIS EMETICA (ED50) (Mono) ($\mu\text{g}/\text{animal}$)	10-20
CONTENIDO DE NITROGENO (%)	-
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	
(S_{20}° , W), S	26
COEFICIENTE DE DIFUSION	
(D_{20}° , W), $\times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$	-
VISCOSIDAD REDUCIDA (ml/g)	-
PESO MOLECULAR	$29,600 \pm 500$
VOLUMEN PARCIAL ESPECIFICO	-
PUNTO ISOELECTRICO	7.0 ± 0.05
ABSORCION MAXIMA ($\text{m}\mu$)	277
EXTINCION ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	12.5

TABLA 11.

ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS ENTEROTOXINAS

Composición de amonoácidos.

Aminoácido.	Residuos de amonoácido 1/100 g de proteína (g)			
	A	B	C1	C2
Lisina	11.32	15.25 - 14.85	14.43	13.99
Histidina	2.86	2.45 - 2.34	2.91	2.87
Arginina	3.99	2.67 - 2.69	1.71	1.75
Acido aspártico	15.75	17.93 - 18.13	17.85	18.38
Treonina	6.28	4.69 - 4.50	5.31	5.80
Serina	3.90	4.23 - 4.05	4.58	4.81
Acido glutámico	11.65	9.45 - 9.45	8.95	8.93
Prolina	1.82	2.10 - 2.11	2.16	2.23
Glicina	3.56	1.90 - 1.78	2.99	2.90
Alanina	2.19	1.37 - 1.32	1.85	1.61
Metionina	0.62	0.58 - 0.68	0.79	0.74
Valina	4.95	5.49 - 5.66	6.50	5.87
Metionina	1.11	3.70 - 3.52	3.20	3.60
Isoleucina	4.34	3.45 - 3.53	4.09	4.02
Leucina	8.68	6.37 - 6.86	6.54	6.13
Tirosina	10.09	11.20 - 11.50	9.80	10.27
Fenilalanina	5.12	6.12 - 6.23	5.35	5.25
Triptofano	1.71	1.05 - 0.95	0.99	0.84
NH ₃ amida	1.66	1.58 - 1.66	1.71	1.62
Total	99.94	100.10 - 100.15	100.00	99.99

TABLA 12

Composición de aminoácidos de enterotoxina E.

Aminoácido	Proteína μ moles/mg	*Residuos calculados	Residuos integrales más cercanos
Lisina	0.845	24.8	25
Histidina	0.222	6.5	7
Arginina	0.288	8.4	8
Acido aspártico	1.312	38.4	38
Treonina	0.626	18.4	18
Serina	0.542	15.8	16
Acido glutámico	0.941	27.6	28
Prolina	0.199	5.8	6
Glicina	0.719	21.1	21
Alanina	0.335	9.8	10
Metionina	0.075	2.2	2
Valina	0.440	12.9	13
Metionina	0.034	1.0	1
Isoleucina	0.380	11.1	11
Leucina	0.891	26.2	26
Tirosina	0.600	17.6	18
Fenilalanina	0.304	8.9	9
Triptofano	0.081	2.3	2
Amido nitrógeno	1.036	30.4	30

* Basado en el peso molecular de 29,600 y corregidos a 100% de recuperación.

TABLA 13.

Composición de Aminoácidos

Aminoácido	No. de residuos de amonoácidos.				
	A	B		C1	C2
	(35, 700)	(35, 380)	(30, 000)	(34, 100)	(34, 000)
Lisina	31	42	35	38	37
Histidina	7	6	5	7	7
Arginina	9	6	5	4	4
Acido aspártico	48	55	47	53	54
Treonina	22	16	13	18	20
Serina	16	17	14	18	19
Acido glutámico	32	26	22	24	24
Prolina	7	8	7	8	8
Glicina	22	12	9	18	17
Alanina	11	7	5	9	8
Media-cistina	2	2	2	2	2
Valina	18	20	17	22	20
Metionina	3	10	8	8	9
Isoleucina	13	11	9	12	12
Leucina	27	20	18	20	18
Tirosina	22	24	21	21	21
Fenilalanina	12	15	13	12	12
Triptofano	3	2	2	2	2
NH ₂ amida	37	35	29	36	34
Total	305	299	252	296	294

Aminoácidos N- y C- terminales de las enterotoxinas.

Enterotoxina	Aminoácido	Aminoácido
	N-terminal	C- terminal
A	Alanina	Serina
B	Acido glutámico	Lisina
C (137)	Acido glutámico	Glisina
C (361)	Acido glutámico	Glisina
D	-	-
E	Serina	Treonina

MICROORGANISMO PRODUCTOR DE ENTEROTOXINAS.

STAPHYLOCOCCUS aureus ocupa una posición única entre los patógenos microbianos. Vive en íntima asociación con el hombre, y aunque cada especie es potencialmente capaz de causar enfermedad, la relación huesped-parásito es relativamente estable, ocurriendo la infección solamente cuando hay un deterioro del mecanismo de defensa del hombre. Se conoce poco de los medios por los cuales el estafilococo ha alcanzado -- una colonización extensiva del hombre, particularmente del conducto nasofaringe y la piel, del proceso evolutivo involucrado, ó de la manera -- por la cual el hombre llega a ser contaminado sin aparente efecto de enfermedad. La ubicuidad del estafilococo en el medio ambiente del hombre, particularmente en leche y alimentos, lo hace más sobresaliente -- aún, que las infecciones causadas por dicho microorganismo. La incapacidad demostrada por estafilococo para competir efectivamente en sistemas ecológicos complejos es un factor importante que contribuye a éste equilibrio. Sin algunos de tales mecanismos que restringen biológicamente, la relación comensal-hombre, éste organismo puede que nunca se -- hubiera desarrollado. Con la sola excepción de su habilidad de producir enterotoxina, el estafilococo enterotoxigénico no difiere grandemente de los miembros de las otras especies. Consecuentemente, cualquier tratado de conducta con el estafilococo enterotoxigénico debe necesariamente ser precedido por una cuenta completa de las características y actividades de los miembros numéricamente superiores no enterotoxigénicos.

CARACTERIZACION DEL ORGANISMO.

Actualmente, solamente STAPHYLOCOCCUS aureus y STAPHYLOCOCCUS epidermis son enlistados como miembros del género STAPHYLOCOCCUS en el Manual de Bergey Edición VIII. El género se diferencia de los otros géneros de la familia Micrococcaceae sobre la base de la fermentación de manitol y producción de coagulasa. La especie tipo del género es STAPHYLOCOCCUS aureus Rosembach, el cual fermenta manitol y es coagulasa positiva, mientras que el segundo miembro del género es incapaz de fermentar manitol y no produce coagulasa. S. aureus es una especie patógena y aunque su virulencia varía, todas las especies son potencialmente capaces de causar enfermedad. Las reacciones de cultivo y bioquímicas tales como cromogénesis, producción de coagulasa, fermentación de manitol, producción de hemolisinas, estructura antigénica y licuefacción de gelatina, han sido usadas en el pasado para distinguir entre especies virulentas y no virulentas. Desafortunadamente, ninguna de las reacciones antes mencionadas, se correlacionan enteramente con la patogenicidad, aunque la producción de coagulasa es casi siempre mostrada por estafilococo después de ser aislado del hombre y animales ó sus exudados supurativos. La producción de coagulasa es generalmente aceptada como la mejor indicación de patogenicidad potencial. De otro modo, la relación, si existe, entre la habilidad para causar enfermedad infecciosa y enterotoxigénica no es completamente conocida. La producción de enterotoxina, con raras excepciones, es res

tringida a especies coagulasa positiva. De un total de 263 especies de cocos aislados de sitios clínicos y productos lácteos, Thatcher y Simon obtuvieron 7 especies coagulasa negativa que causaron emesis en gatos --- cuando fueron inyectados intraperitonealmente con 5 ml de filtrado de -- cultivo (hervido 30 minutos). De hecho, por criterio taxonómico común, algunos de éstos cultivos, deberían necesariamente ser clasificados como miembros del género *Micrococcus*.

MORFOLOGIA.

Los estafilococos típicamente se presentan como racimos de uvas aproximadamente de 0.8 a 1.0 micras de diámetro. El arreglo espacial de las células en racimos es más frecuentemente observado en medio sólido que en medio líquido, y la ocurrencia en caldos de cultivo de pares, - cadenas cortas, y racimos de pocas células es común. Los estafilococos son no móviles y no esporulados. En cultivos muy jóvenes pueden formar cápsulas, pero éstas desaparecen en pocas horas. Las células se tiñen - fácilmente con colorantes básicos de analina, pero poco con colorantes - ácidos. Son gram-positivos en un cultivo joven (18 a 24 horas), pero tien den a variar de gram tanto como el cultivo envejece. En un medio líquido nutricionalmente adecuado, *S. aureus* usualmente produce abundante de-- sarrollo, en un cultivo inmóvil caracterizado por una gran turbidez, se-- dimentación y en muchas especies, la formación de un anillo de crecimien to en la interface aire-líquido. Existe la formación de pigmento en caldo- de cultivo agitado, pero es menos frecuente en un cultivo estático. Sobre -

medio sólido, tales como agar soya tripticase ó medio de STAPHYLOCOCCUS 110, *S. aureus* produce colonias circulares, enteras, levantadas en relieve, convexas que son lisas y pigmentadas de forma característica en tintes que varían del crema al anaranjado. Tanto las colonias no pigmentadas de STAPHYLOCOCCUS aureus, así como aquellas que lo son -- ligeramente después de una incubación secundaria por unos pocos días a una temperatura ambiente ó a 30°C, llegan a presentar una pigmentación más oscura.

HABITAT.

Los estafilococos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y se encuentran en número variable en el aire y en el polvo, también en el agua, leche, alimentos, heces, y aguas negras. El principal habitat de éstos organismos, son las membranas mucosas del conducto nasofaringe y la piel del hombre y animales. La colonización por *S. aureus* del pasaje nasal del hombre es común, y una gran proporción de personas normales portan éste organismo en la nariz. Williams en su revisión de los portadores sanos de *S. aureus*, tabuló la proporción de acarreador nasal en diferentes grupos de población reportados por numerosos investigadores. Estos datos revelan que la proporción de portadores adultos normales, no relacionada con hospitales es de 30% y 50%. La incidencia de portador nasal se incrementa a aproximadamente de 60 a 80% en pacientes y personal de trabajo asociado con hospitales. Los estafilococos son aislados más frecuentemente de la nariz, pero la garganta y la piel son también fuentes importantes. Los portadores en la garganta en los Esta--

dos Unidos e Inglaterra se aproxima a 4 y 7%, una proporción mucho más alta (40 a 70%) es reportada como trabajadores escandinavos. El porcentaje de portadores en la piel en adultos varía de aproximadamente de 4 a 44%, dependiendo de los sitios de la piel examinados; la carga sobre la nariz es consistentemente alta (40 a 44%), mientras que en las manos la carga varía (14 a 46%), y solamente 4 a 16% de los individuos examinados albergaron estafilococos sobre las piernas. En relación con la frecuencia de aparición de estafilococos, no es sorprendente que estén presentes en los alimentos, particularmente esos que están en contacto íntimo con manipuladores de alimentos durante el procesado y preparación. Excepto para leche y productos lácteos, en los cuales los estafilococos están presentes como resultado de la ordeña, la principal fuente de estafilococos en alimentos es el hombre.

METABOLISMO.

El rango de temperatura para el desarrollo óptimo de estafilococos es de 35 a 37°C, aunque el desarrollo ocurre en un rango mucho más amplio de aproximadamente 10 a 45°C. Los organismos son anaerobios facultativos que crecen mejor en la presencia de oxígeno, pero no se desarrollan en ausencia de CO₂. La inhibición del crecimiento se lleva a cabo más fácilmente en un medio alcalino. A pesar de la complejidad fisiológica del estafilococo, el desarrollo ocurre en medios definidos químicamente, pero de una manera inferior en aquellos medios que contienen extractos de carne ó hidrolizados de caseína. Los requerimientos de vitaminas para -

el desarrollo de estafilococos no han sido analizados con detalle, el ácido nicotínico y tiamina son requeridos. Esas vitaminas adicionales son necesarias para estimular el desarrollo de algunas especies ó iniciar el desarrollo de otras, en subcultivos continuos en medios químicamente definidos ha sido demostrado que: biotina, triptofano y ácido pantoténico actúan como factores de crecimiento. Surgalla no pudo demostrar un efecto estimulante con biotina ó triptofano sobre el desarrollo de *S. aureus* 196, una especie enterotoxigénica, pero observó estimulación por pantotenato de calcio. La riboflavina es sintetizada por éstos. Los requerimientos de nitrógeno son complejos y varían entre las especies. En medios sintéticos, los extractos de carne, son reemplazados con una combinación de 14 aminoácidos. Los aminoácidos responsables de un rápido crecimiento son arginina, fenilalanina, ácido aspártico, cistina, leucina, valina, prolina y glicina. Por contraste, Surgalla demostró que un medio sintético compuesto de sales, glucosas, tiamina, ácido nicotínico, y 2 a 16 aminoácidos soportó el desarrollo y la producción de enterotoxina por especies de *S. aureus*. El medio más simple contuvo solamente arginina y cistina en adición a las sales, glucosa y vitaminas. El desarrollo anaeróbico en medio sintético de los tipos descritos por Fildes y colaboradores y Gladston, requieren la presencia de uracilo. Las dificultades técnicas asociadas con la obtención de constituyentes libres de metales, para preparación de medios definidos en el cual los requerimientos del ion metal para desarrollo, pueden ser estudiados, y la comodidad con la cual éstos iones son substituídos ó no por otro metabolismo microbiano ha impedido la defini-

ción de requerimientos minerales esenciales. A pesar de las dificultades técnicas involucradas, la necesidad de calcio, magnesio y potasio para el desarrollo de *S. aureus* ha sido demostrado. Por otro lado, el sodio no es requerido.

Se requiere azufre orgánico ó sulfuro para el desarrollo y es usualmente obtenido de cistina. Fildes, Richardson y Glandston demostraron -- que ditiiodoacetato de metionina y sodio podrfan ser usados como substi-- tutos de fuentes de azufre. Los estudios detallados del metabolismo de -- carbohidratos por *S. Aureus* han sido pocos. Se asume que la glucosa es - metabolizada por glicolisis y oxidación subsecuente a ácido pirúvico. Has-- ta que los estudios de Strasters y Winkler fueron reportados, la informa-- ción concerniente a sendas alternativas de agotamiento de glucosa fue esca-- sa y estuvo basada principalmente en las observaciones de Hancock y Das-- Chatterise de un ciclo activo de pentosa. Por medio de experimentos de -- Warburg, estudios de enzimas con extractos libres de células, y experi-- mentos con substratos radioactivos aplicados a 5 especies separadas de - diferentes grupos de fagos, pudieron desarrollar la ruta general del meta-- bolismo de los carbohidratos en *S. aureus*. La glucosa es transformada - por el sistema glicolítico cuantitativamente a ácido láctico L (+) bajo con-- diciones anaeróbicas. Las principales reacciones de asimilación oxidati-- va de glucosa son la producción de CO_2 y ácido acético, y una oxidación - de la glucosa ocurre por medio del ciclo de las pentosas, el cual es más-- activo en desarrollo celular en ausencia de glucosa. Las células en desa-- rrollo, ya sea en la presencia ó ausencia de glucosa, no son capaces de-

metabolizar ribosa anaeróbicamente. Los cocos en desarrollo muestran una glicólisis en avance, supresión del ciclo de Krebs, decreción en la actividad del ciclo de las pentosas, decreción en la oxidación del ácido pirúvico e inhibición de la síntesis de las enzimas del ácido cítrico.

EFFECTOS DE AGENTES FISICOS Y QUIMICOS.

Los estafilococos parecen ser más resistentes a condiciones del medio ambiente difíciles que muchos de los otros tipos no esporulados de microorganismos. Ya que ellos resisten bien la desecación, el secado sobre glóbulos de porcelana es un método común de preservación de cultivos de estafilococos. Congelación, particularmente congelación suave, usualmente reduce los miembros viables, pero los cocos en alimentos pueden resistir el almacenamiento bajo congelación por largos períodos. Se ha observado que las especies de estafilococos envenenadoras de alimentos no se multiplican en ellos a temperaturas internas abajo de 5.56°C . La temperatura más baja en la cual la producción de enterotoxina ha sido registrada es de 18°C . Aunque ellos no son tan resistentes al calor como Micrococci, su tolerancia al calor húmedo debe ser considerada alta para un organismo no esporulado. Por ejemplo, se requiere 59 minutos de exposición a 60°C para reducir 1×10^7 estafilococos envenenadores de alimentos por gramo de flan a niveles no detectables. Incluso aunque ellos persistieron a temperaturas elevadas, cesaron su multiplicación en alimentos a 46.6°C .

El estafilococo se desarrolla bien en presencia de altas concentra-

ciones de cloruro de sodio. Este hecho ha sido ventajosamente aplicado en el desarrollo de métodos de enriquecimiento para el cultivo de números -- pequeños de estafilococos de cultivos mezclados ó de situaciones ecológi-- cas complejas tales como las que prevalecen en muchos alimentos. Ocurre un abundante desarrollo en medio conteniendo 10% de cloruro de sodio. -- Además de la tolerancia al cloruro de sodio, ellos parecen resistir la des-- trucción con cloruro mercuríco ya que son requeridas soluciones al 1% pa-- ra matarlos en 10 minutos. Con ésta excepción, la mayoría de los otros -- disinfectantes de laboratorio son efectivos, particularmente las formula-- ciones de amonio cuaternario.

MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO Y ENUMERACION DE S. EN ALIMENTOS.

En muestras de alimentos, sin tomar en cuenta los que puedan pro-- venir de envenenamiento alimenticio, STAPHYLOCOCCUS coagulasa posi-- tiva representa una cantidad relativamente pequeña del total de la flora -- del alimento, a causa de ésto, los investigadores en el laboratorio han re-- currido al uso de medios selectivos para obtener el desarrollo abundante-- de estafilococos durante el cultivo primario, y aunque es necesaria ésta - práctica, ha impedido que se desarrollen métodos de detección cuantitati-- va para estafilococos en alimentos ya que los medios usados, son en algún grado, también inhibitorios al estafilococo. En el pasado los métodos di-- rectos de placa para estafilococo en alimentos han sido restringidos pri-- meramente al uso de agar sal de manitol y al medio 110 para STAPHYLO-- COCCUS, y la selectividad se atribuye principalmente a la concentracón-

de cloruro de sodio presente en el medio. Estos medios requieren un juicio subjetivo sobre morfología colonial y pigmentación. Se ha encontrado que generalmente permiten el desarrollo concomitante de muchos otros tipos bacteriales, y es necesario probar las numerosas colonias para producción de coagulasa como un procedimiento confirmatorio. Otras formulaciones fueron desarrolladas para obtener mejor diferenciación y proveer selectividad. En una de éstas formulaciones la cual contenía telurito de potasio, el estafilococo creció como colonias blancas. Después se desarrolló, una modificación al medio antes mencionado para enumerar STAPHYLOCOCCUS coagulasa positiva en carnes, el cual llegó a ser ampliamente usado no solamente en carnes, sino también en otros alimentos. Desafortunadamente la formación de colonias negras sobre medio conteniendo telurito, no es exclusiva de STAPHYLOCOCCUS coagulasa positiva; Micrococcus y ciertas especies de Proteus, particularmente Proteus vulgaris, dan colonias negras similares a las de STAPHYLOCOCCUS. Gillespies y Alder encontraron que la mayoría de los STAPHYLOCOCCUS coagulasa positiva producían opacidad cuando se desarrollaban en un medio conteniendo yema de huevo; con el propósito de mantener la característica apariencia negra de las colonias de STAPHYLOCOCCUS sobre agar telurito y la gran correlación de la reacción de yema de huevo con producción de coagulasa. La reciente evaluación comparativa de varios medios en cajas de STAPHYLOCOCCUS, condujeron a determinar los méritos relativos de cada uno, para recuperación cuantitativa de STAPHYLOCOCCUS de alimentos. Esta evaluación reveló que las formulaciones yema de huevo-telurito fueron --

superiores a aquellas en las cuales no se utiliza el telurito. Tales factores como composición del alimento, tipos y números de flora asociada, así como concentraciones de estafilococos afectaron las proporciones de recuperación obtenidas con los diferentes medios. Las formulaciones de yema de huevo-telurito produjeron resultados superiores con cierta clase específica de alimentos. El medio yema de huevo-polimixina-telurito fue menos afectado por los constituyentes del alimento y produjeron una buena diferenciación y cuantificación de estafilococo. Después de 24 horas de incubación a 35 C, STAPHYLOCOCCUS coagulasa positiva usualmente mostraron una ó más de las siguientes reacciones sobre medio TPEY: (1) una zona de precipitación alrededor de las colonias; (2) una zona clara ó halo alrededor de la colonia con precipitado debajo de la colonia; (3) ningún halo alrededor de la colonia, pero con precipitado debajo. En algunas ocasiones una incubación adicional de 12 a 24 horas puede ser necesaria para permitir que las colonias se desarrollen lo suficientemente grandes para que éstas reacciones puedan ser distinguidas. La prueba para producción de coagulasa de 5 colonias con las características anteriores de cajas conteniendo entre 30 y 300 colonias es empleado como un paso confirmativo. El número de estafilococos usualmente presente en alimentos normales es pequeño, y el medio TPEY también como otras formulaciones de yema de huevo-telurito son medios de superficie en caja. Por lo tanto, cuando las cantidades de alimento son más grandes que las contenidas en una dilución 1-8 generalmente no pueden ser pipeteados con exactitud y el volumen más grande de fluido que puede ser esparcido convenientemente sobre la superficie de un medio en-

una caja de Petri standard es aproximadamente de 0.1 ml.

Consecuentemente, el rango mínimo de estafilococos que puede ser enumerado constantemente en alimentos por tales procedimientos es aproximadamente 1×10^3 a 1×10^4 por gramo. Los alimentos involucrados en brotes característicos contienen más estafilococos que ésta cantidad ó concentración, aunque las cuentas de estafilococos asociados con el total de algunos alimentos varían muy poco para ser detectados a unos cuantos cientos por gramo. Así, para enumerar bajos niveles de contaminación de estafilococos de éste tipo se utiliza una técnica de NMP de determinación, con un medio de enriquecimiento. Un caldo de enriquecimiento selectivo se emplea con cajas sobre un medio sólido y confirmado con la prueba de colonias seleccionadas para producción de coagulasa.

El caldo más comunmente empleado de enriquecimiento selectivo es medio de carne cocida conteniendo 10% de cloruro de sodio. Una asada de cultivo de cada tubo que es positivo para desarrollo después de 24 horas de incubación es pasada sobre la superficie de uno de los medios en caja de yema de huevo telurito, y después de la incubación las colonias de estafilococos típicos son probadas para producción de coagulasa. Un medio ácido ascórbico-manitol ha sido propuesto para prueba de alimentos refrigerados por el método NMP en el cual la confirmación es obtenida sobre cajas de medio 110 de STAPHYLOCOCCUS, agar yema de huevo que son incubados a 45 C. Las temperaturas elevadas de incubación incrementaron la especificidad del medio. Aunque desde 1968 ningún medio de estafilococo ha sido reportado para que permita solamente el desarrollo de STAPHYLOCOCCUS

coagulasa positiva. Consecuentemente, si se ha de partir de un alimento, se aísla una especie de estafilococo sospechoso, ésta especie debe ser probada para producción de coagulasa antes de dar un veredicto consistente a la contaminación del alimento.

PRINCIPALES METODOS DE PURIFICACION DE ENTEROTOXINAS DE S. AUREUS.

Los estudios de purificación en los laboratorios del Food Research Institute, se llevaron a cabo suponiendo que la enterotoxina era una proteína. Métodos como precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, HCl y etanol y metanol a temperaturas bajo cero resultaron útiles en su recuperación y purificación parcial (Bergdoll et. al., 1951). Para obtener preparaciones de alta pureza se recomiendan otras técnicas de precipitación. Se hizo una prueba para purificar la enterotoxina cromatográficamente con sílica diatomea (Hyflo Super Cel) (Bergdoll et. al., 1952). La capacidad relativamente baja del Hyflo Super Cel para la enterotoxina, llevaron al uso de otros adsorbentes tales como la alumina y resinas de intercambio iónico, Amberlita-IRC-50 (XE-64) (Bergdoll et. al., 1959 a). En suma, las técnicas que emplean electroforesis en un medio de soporte como el almidón, se encontraron útiles en la obtención de preparaciones de enterotoxina de alta pureza. Con el advenimiento de la carboximetil celulosa y el sephadex, ahora se puede llevar a cabo la purificación sin emplear precipitaciones engorrosas y técnicas de electroforesis en almidón. Aunque los métodos generales -- empleados son similares, los detalles de los procedimientos son diferentes porque cada trabajo realizaron por separado diferentes investigadores. Es probable, que las enterotoxinas con puntos isoeléctricos similares como A y C₂, pueden purificarse por los mismos métodos, sin embargo la purificación de enterotoxinas con diferente punto isoeléctrico, provo

can más dificultad al emplear métodos similares. Casman y Bennett - - - (1964) intentaron purificar enterotoxina A, por modificaciones hechas a los procedimientos empleados por Bergdoll et. al., (1959a) para la purificación de la enterotoxina B. Comparando su preparación y la enterotoxina A purificada por Chu et. al., 1966 nos indica que el contenido de enterotoxina A de la preparación de Casman y Bennett tenía solamente 25--30% de lo que contenía la preparación de Chu et. al.

ENTEROTOXINA A: La purificación de enterotoxina A, la realizó Chu et. al., (1966) usando el siguiente procedimiento:

1). - Concentración del sobrenadante del cultivo 10 a 20 veces con Carbowax 20 M seguido por una diálisis con agua deionizada.

2). - Adsorción sobre carboximetil celulosa (equilibrada con fosfato de sodio 0.01 M a pH 5.7) y la subsecuente elución con Na_2HPO_4 - - - 0.02 M.

3). - Adsorción sobre carboximetil celulosa (equilibrada con fosfato de sodio 0.001 M a pH 6) de la parte eluida y dializada del paso 2. Ajuste a pH 6 y la elución subsecuente con un gradiente de buffer de fosfato que va de 0.01 M a pH 6, a 0.05 M a pH 6.6.

4). - Filtración por gel de la fracción obtenida en el paso 3 disuelta en 5 ml. de fosfato de sodio 0.05 M a pH 8 con Sephadex G-100.

5). - Filtración por gel de la enterotoxina liofilizada obtenida en el paso 4 disuelto en 5 ml. de agua destilada, con Sephadex 75, equilibrado y desarrollado con fosfato de sodio 0.005 M a pH 8.5

6). - Diálisis y liofilización.

El rendimiento de la enterotoxina A purificada es de 30-35% basado en las pruebas de difusión por gel sobre el sobrenadante del cultivo original.

ENTEROTOXINA B: La purificación de la llamado enterotoxina B fué reportada en primer término por Bergdoll et. al., (1959). La purificación se llevó a cabo por los procedimientos siguientes:

- 1). - Precipitación a pH 3.5 con H_3PO_4 .
- 2). - Adsorción sobre alumina con fosfato de sodio 0.03 M a pH 6.3 y la subsecuente elución con $Na_2H_2PO_4$ 0.2 M
- 3). - Precipitación con alcohol al 40% a $-7^\circ C$
- 4). - Adsorción sobre Amberlita IRC-50 (XZ-64) (equilibrado con fosfato de sodio 0.05 a pH 6.8) de fosfato de sodio 0.02 M a pH 6.8.
- 5). - Precipitación con etanol al 25% a $-13^\circ C$
- 6). - Electroforesis en fosfato de sodio. 0.05 M a pH 6 con almidón como medio de soporte.
- 7). - Precipitación con etanol al 30% a $13^\circ C$
- 8). - Liofilización.

Este método es largo y realmente no es adaptable para la preparación de grandes cantidades de enterotoxina. Este método ha sido modificado y adaptado por Schantz (1965) para la purificación de mayores cantidades de enterotoxina B, siendo su método el siguiente:

- 1). - Adsorción sobre una resina de intercambio iónico CG-50, -- del sobrenadante del cultivo diluido con dos volúmenes de agua y ajustan

do a pH 6.4, y la elución subsecuente con fosfato de sodio 0.5 M a pH 6.8 en NaCl 0.25 M.

2).- Adsorción sobre CG-50 (equilibrado con fosfato de sodio 0.05 M a pH 6.8) de la elución dializada del paso 1 y la elución subsecuente con Na_2HPO_4 0.15 M.

3).- Adsorción sobre carboximetil celulosa (equilibrada con fosfato de sodio 0.01 M a pH 6.2) de la elución dializada en el paso 2 y la elución-subsecuente con buffer de fosfato con un gradiente lineal de 0.02 M a pH 6.2 hasta 0.07 M a pH 6.8.

4).- Dialisis para reducir las sales del buffer de 2 a 3% de la concentración de proteína, centrifugar para remover algún material insoluble, y liofilizar.

El rendimiento de la toxina (liofilizada) purificada, generalmente es de 50-60% en base a pruebas de difusión de gel sobre el sobrenadante del cultivo original.

La purificación de la enterotoxina B, también ha sido reportada por Frea et. al., (1963). En éste método, la enterotoxina se aisló del sobrenadante del cultivo de bacterias (concentrado por diálisis con glicol polietileno) por el siguiente procedimiento:

1).- Precipitación con etanol al 40% a -15°C (la enterotoxina se disuelve en fosfato de sodio 0.02 M a pH 6.8)

2).- Filtración por gel de la enterotoxina (purificada) precipitada en el paso 1, en fosfato de sodio 0.02 M, a pH 6.8 con Sephadex G-100.

3).- Electroforesis con alumina de Sephadex, de la enterotoxina dia

lizada y liofilizada del paso 2 en fosfato de sodio. 0.015 M a pH 6. Se reporta que la enterotoxina purificada obtenida por éste método es casi homogénea en electroforesis de disco y solamente muestra una línea de precipitación en pruebas de difusión sobre gel.

La emesis en los monos resulta cuando la enterotoxina purificada es inyectada intravenosamente en una cantidad de 0.26 mg de nitrógeno -- por Kg de peso.

ENTEROTOXINA C: (*STAPHYLOCOCCUS aureus* especie 137). La purificación de la enterotoxina C (*Staphylococcus aureus* 137) ha sido desarrollado por Borja y Bergdoll (1967) de la siguiente manera:

1). - Concentración del sobrenadante del cultivo 10 a 20 veces con Carbowax 20 M, seguido por una diálisis con agua deionizada y liofilizada.

2). - Adsorción sobre carboximetil celulosa (equilibrada con fosfato de sodio 0.01 M a pH 5.5) de fosfato de sodio 0.01 M a pH 5.5 y la subsecuente elución con fosfato de sodio 0.02 M a pH 6.1.

3). - Filtración por gel del fosfato de sodio 0.06 M a pH 6.6 liofilizado y eluido en el paso 2, en fosfato de sodio 0.02 M a pH 6.8 con Sephadex G-75.

4). - Filtración por gel de la enterotoxina liofilizada en el paso 3 en fosfato de sodio 0.02 M a pH 6.8 con Sephadex G-50.

5). - Repetición del paso 4

6). - Diálisis y liofilización.

El rendimiento de la enterotoxina purificada es de 15-20% en base a pruebas de difusión por gel, del sobrenadante del cultivo original.

ENTEROTOXINA C (staphylococcus aureus especie 361): La purificación de enterotoxina C₂ (STAPHYLOCOCCUS aureus especie 361) la llevaron a cabo Avena y Bergdoll (1967) por medio del siguiente procedimiento:

1). - El sobrenadante del cultivo concentrado 10 a 20 veces con Carbowax 20 M es dializado con agua deionizada y liofilizada.

2). - Adsorción sobre carboximetil celulosa (equilibrada con fosfato de sodio 0.02 M a pH 5.4) de fosfato de sodio 0.02 M a pH 5.4 y la subsecuente elución con fosfato de sodio 0.06 M a pH 6.6.

3). - Adsorción sobre carboximetil celulosa (equilibrada con fosfato de sodio 0.005 M a pH 5.8) de fosfato de sodio 0.005 M a pH 5.8 seguida por una elución con un gradiente de buffer de fosfato que va de 0.005 M a pH 5.8 M hasta 0.05 M a pH 5.8.

4). - Filtración por gel de la enterotoxina dializada y liofilizada del paso 3 disuelto en fosfato de sodio 0.02 M a pH 6.8 con Sephadex G-75.

5). - Filtración por gel de la enterotoxina dializada y liofilizada -- del paso 4 disuelto en fosfato de sodio 0.02 M a pH 6.8 con Sephadex G-50.

6). - Diálisis y liofilización.

El rendimiento de la enterotoxina C₂ purificada es generalmente - de 30 a 40%, basado en pruebas de difusión de gel sobre el sobrenadante del cultivo original.

NUEVA TECNICA PARA PURIFICACION RAPIDA, SEPARACION, Y RECUPERACION DE ENTEROTOXINA A DE UNA CAMARA LIQUIDA POR-ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

MATERIAL.

Gel de Poliacrilamida.

Columna de cromatografía.

Lámpara fluorescente.

Aparato de electroforesis.

REACTIVOS

Sacarosa al 20%

KOH O. IN.

Acido acético glacial.

Solución de beta alanina.

Los discos de electroforesis en gel de poliacrilamida se han usado para separar y purificar proteínas, incluyendo la enterotoxina A. La enterotoxina A tiene un movimiento catódico, mientras que el 93% de las proteínas que la acompañan se mueven hacia el ánodo. Uno de los problemas encontrados en usar la técnica para aislar las fracciones proteicas, es que, en algunas ocasiones, el gel tiene una afinidad por la enterotoxina A y esto dificulta la elusión de la proteína en el gel. La serología se puede llevar a cabo por el uso del total de la columna de gel con la técnica -- de placa de Ouschterlony.

Se ha desarrollado una técnica simple para aislar y recuperar enterotoxina A de estafilococo en un solo paso durante la electroforesis con gel de poliacrilamida sin necesidad de usar para la elusión una columna de gel. Esta técnica consiste en atrapar la banda de enterotoxina fraccionada en una cámara líquida llena con sacarosa en medio de la columna de gel (Fig. 2). Se usa una solución densa de sacarosa (20%) porque no se mezcla pronto con la capa polimerizada. Escencialmente, el procedimiento de formación de la columna consiste en la polimerización del gel base, se adiciona la sacarosa, delicadamente se adiciona la capa superior de acrilamida y se repolimeriza la columna. Este procedimiento es muy similar al del experimento con disco standard para electroforesis, sin embargo la corriente eléctrica, se apaga cuando las fracciones proteicas llegan a la cámara líquida. La proteína contenida en la capa de sacarosa, fácilmente puede sacarse con una jeringa adecuada con tubo de polietileno. Pruebas serológicas tales como la técnica del tubo de Oudin, o la técnica del microdeslizamiento pueden llevarse a cabo fácilmente sobre este material líquido.

El siguiente procedimiento se ha usado dando una recuperación de enterotoxina A de aproximadamente 40%. La solución monomérica de la cual se deriva el gel de poliacrilamida tiene 7.5% de acrilamida, 0.2% de N, N-metilenbisacrilamida, 0.06% de N, N, N', N'tetrametilendiamina, 0.001% de riboflavina, 0.03% de persulfato de potasio y 0.3% de hidroxido de potasio, todo ésto llevado a pH 4.4 con ácido acético glacial. Un mililitro de ésta solución monomérica se introduce en la columna (77 mm. de

largo y 6.8 mm de diámetro interno), sellando el final con un pedazo de membrana de diálisis humedecida. Después se deposita cuidadosamente 1 ml. de agua destilada sobre la solución monomérica, usando una jeringa de 1 ml. que se hace con tubo de polietileno. El agua agregada sirve para formar el menisco sobre la superficie del gel. La columna se coloca verticalmente, colocada a una pulgada de una lámpara fluorescente que contiene dos bulbos G.E. F6T5, se deja por una hora. Como resultado obtenemos una foto polimerización del gel base. Después de la foto polimerización, se descarta un pequeño volumen de líquido en exceso que hay encima del gel de poliacrilamida.

Para hacer la cámara líquida con sacarosa, se agrega 0.3 ml. de la solución de sacarosa al 20% junto con el buffer de electrodo mas bajo, sobre la superficie del gel de poliacrilamida. El buffer de electrodo mas bajo se prepara titulando 120 ml. de KOH 0.1N con ácido acético glacial a pH 4.3 y aforando la solución a 1 litro con agua destilada. La pared superior de la cámara líquida de sacarosa, consiste de una columna de gel de poliacrilamida, puesta sobre la capa de sacarosa. Esto se lleva a cabo -- agregando lentamente 0.2 ml. de la solución monomérica con una ultramiropipeta, seguido por una adición más rápida de otros 0.18 ml. de la solución monomérica sobre la capa superior de la sacarosa. En ésta operación debemos tener mucho cuidado para prevenir una mezcla de la capa de sacarosa con la solución monomérica. Después se agrega 0.1 ml. de agua destilada sobre la superficie de la solución monomérica por el procedimiento -- usado para el gel base de poliacrilamida. La columna se sujeta a una segunda fotopolimerización, por una hora, de la misma forma. Al final de éste

periodo, el exceso de líquido que hay sobre el gel de poliacrilamida se descarta. Un mg. de sobrenadante fluido de bacterias conteniendo enterotoxina A liofilizada se disuelve en 0.4 ml. de sacarosa al 5% hecha con buffer de electrodo mas bajo. Unas pequeñas trazas de metil teñido de verde se mesclaron con la muestra. Después la muestra se agrega sobre la columna de gel de poliacrilamida, en seguida la columna se coloca dentro de un aparato ordinario de disco de electroforesis (como el Canalco modelo 6).

El buffer de electrodo alto (pH 5) es una dilución 1:10 de una solución que contiene 31.2 gr. de beta-alanina y 8 ml. de ácido glacial aforado a un litro con agua destilada. El buffer de electrodo bajo es previamente caracterizado con buffer de acetato de potasio (pH 4.3). El electrodo positivo es sumergido en el buffer alto y el electrodo negativo es sumergido en el buffer bajo. Varias columnas pueden correrse juntas en éste aparato, usando una corriente constante de 6 mA por columna. Para la separación de la enterotoxina A la migración de la banda de metil verde se sigue visualmente hasta que ha penetrado en la cámara de sacarosa. Cuando la banda ha emigrado 4 mm. de la orilla baja de la cámara de sacarosa, la fuente de poder se apaga. En éste punto, la banda de enterotoxina es atrapada dentro de la cámara líquida con sacarosa. La columna conteniendo los geles y la sacarosa son removidos del aparato. Después, la superficie del gel es perforada con un tubo de polietileno de 0.5 mm. de diámetro interno, unido a una jeringa de 1 ml. y el líquido contenido en la cámara es removido de la columna. La enterotoxina recuperada se analiza inmediatamente por la prueba de difusión en gel de Oudin o se guardan en un conge-

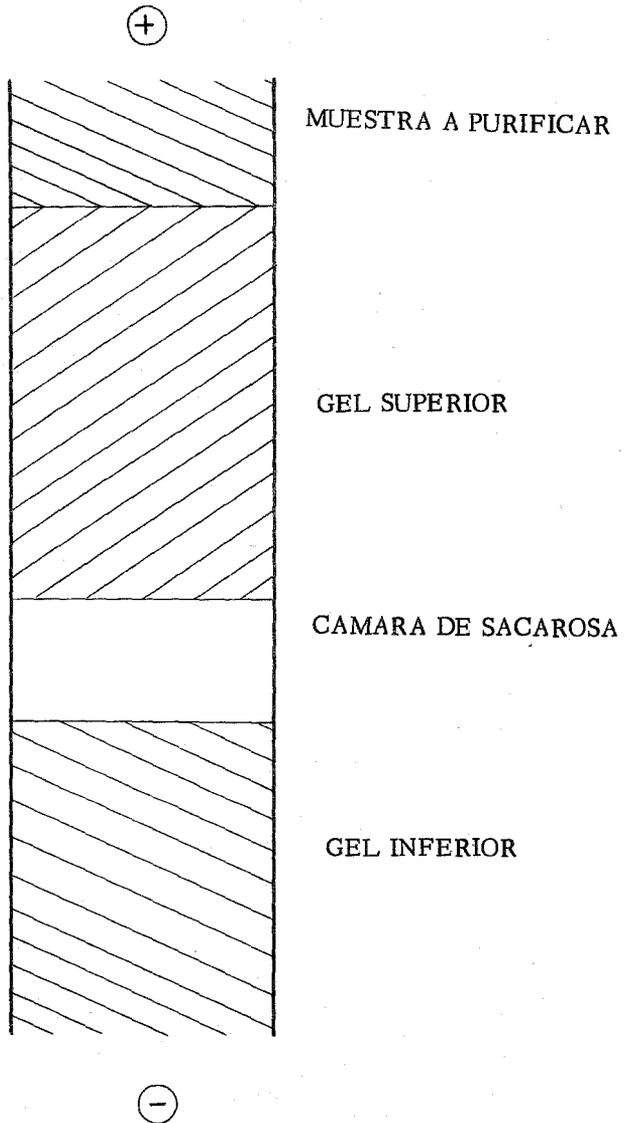


Fig. 2. - ESQUEMA DE LA COLUMNA DE GEL DE POLIACRILAMIDA.

lador o en forma liofilizada, para más tarde poder ser analizadas.

Se necesitan varias pruebas para determinar la cantidad de tiempo y movimiento de la banda necesarios para la recuperación óptima de la enterotoxina A. Una proteína aislada por éste procedimiento es concentrada, pero no necesariamente es pura. La pureza depende del grado de separación de las bandas durante la electroforesis.

PURIFICACION DE ENTEROTOXINA A

MATERIAL

Centrifuga.

Liofilizador.

Equipo de diálisis.

Biogel P - 60.

REACTIVOS.

Etanol

NaCl 0.003 M.

La toxina es producida por cultivo de *S. aureus* especie 100, por 48 hr en un medio conteniendo hidrolizado de proteínas y aminoácidos como L - cistina y L - triptofano. El medio contiene 150 - 160 amino nitrógeno.

Las células se separan por centrifugación a 6000 rpm. por 30 min. El fluido supernadante del cultivo se concentra por liofilización.

PURIFICACION.

Paso 1. - La enterotoxina se purifica con diálisis contra agua destilada por un tiempo de 36 hr. (el volumen después de diálisis es de 1/5 - del volumen del cultivo original).

Paso 2. - La enterotoxina dializada se precipita con dos volúmenes de etanol (siendo la concentración final de etanol 66,6%). La temperatura del etanol para la precipitación es de -15°C. El precipitado es centrifugado a 6000 rpm. a -10°C por 30 minutos.

Paso 3. - La enterotoxina precipitada por etanol se somete a una purificación posterior sobre una columna de Biogel P - 60. Como eluyente se usa Na Cl 0,0003 M. pH 7.0.

La pureza de la enterotoxina obtenida es de 96-97%.

La recuperación de enterotoxina es de 80%.

PURIFICACION DE ENTEROTOXINA A

MATERIAL

CM - celulosa (Selectacel, No. 77, tipo 20).

Liofilizador.

Equipo de diálisis.

Sephadex G - 100. (40-120).

Sephadex G - 75. (malla 100-270).

Carbowax 20 M, 50% acuoso.

Centrifuga.

REACTIVOS



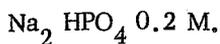
Na OH 0.1 N

H Cl 0.1 N

Fosfato de sodio 0.05 M.

Fosfato de sodio 0.005 M.

Fosfato de sodio 0.01 M.



La CM - celulosa usada en el primer y segundo pasos de la purificación es celulosa intercambiadora de iones Selectacel, No. 77, tipo 20. - Es lavado con Na OH 0.1 N, H_2O , H Cl 0.1 N, y nuevamente con agua antes de usar.

El Sephadex G-100 (40-120 μ) usado en el tercer paso en la purificación, es suspendido en fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.85, agitando por 1 hr., y dejado reposar por 24 hr. El supernadante es decantado y el Sephadex es resuspendido en la solución buffer antes de empacarlo en una columna.

El Sephadex G-75 (medio, malla 100-270), usado en el cuarto paso de la purificación, es suspendido en fosfato de sodio 0.005 M, pH 6.85 y tratado de la misma manera que el Sephadex G-100.

La toxina es producida por el cultivo de *S. aureus*, especies 196 - E, C-246-3 y 100, en un medio estéril (400 ml. en matraces Erlenmeyer de 2 l) consistente de 3% de NZ - amina NAK, 3% de hidrolizado de proteína en polvo, 0.001% de niacina y 0.00005 % de tiamina, ajustado a pH 7.6

e incubado a 37 °C por 24 hr., sobre un agitador giratorio operado a aproximadamente 275 rpm.

Las células se separan en una centrifuga que se opera a 4 000 rpm, por 45 min a 5°C. La concentración del supernadante del cultivo bacterial-conteniendo la enterotoxina se lleva a cabo por diálisis por 24 a 48 hr. contra un volumen igual de Carbowax 20 M, 50% acuoso, seguido por diálisis-contra agua corriente por 48 hr. La solución de enterotoxina cruda dializada se ajusta a pH 5.7 con H₃PO₄ y se centrifuga para remover cualquier -materi al insoluble.

PURIFICACION

Paso 1. - El supernadante del cultivo bacterial concentrado (500 ml., ajustado a pH 5.7) conteniendo aproximadamente un gramo de protefna se-transfiere a una columna de CM-celulosa (2.50 cm) la cual previamente -ha sido equilibrada con fosfato de sodio 0.01 M a pH 5.7. Después de lavar la columna con el mismo buffer que se equilibra, la enterotoxina se eluye-con Na₂ H PO₄. Las fracciones elufdas que presenten una mayor densidad-óptica a 280 mμ se conjuntan, dializadas por 4 hrs. a 5°C y liofilizadas.

Paso 2. - La enterotoxina liofilizada del Paso 1, se disuelve en apro-ximadamente 50 ml. de agua destilada y dializada contra agua destilada a --5°C por la noche. Esta solución es ajustada a pH 6 y es pasada dentro de -una columna de CM-celulosa (2.2 x 38 cm.) equilibrada con fosfato de so-dio 0.01 M, pH 6. Después se lava la columna con el mismo buffer que se equilibró, la enterotoxina se remueve por elución de gradiente de la si---guiente manera. Se pone fosfato de sodio (4000 ml. de 0.01 M), pH 6, en-

una botella de 1 lt. (con una manguera sujeta al tope de la columna) y agitando continuamente con un agitador magnético. El segundo buffer, fosfato de sodio 0.05 M, pH 6, se introduce gota a gota en el tope de la cámara de mezclado. Las fracciones que presentan una mayor densidad óptica a 280 $m\mu$ se liofilizan y se conjuntan para ser usadas en el paso tres.

Paso 3. - El material dializado, liofilizado (140 mg.) del Paso 2 disuelto en 5 ml. de fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.85, se pasa dentro de una columna de Sephadex G-100 (2.2 x 73 cm.) equilibrada con fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.85. La enterotoxina se eluye del Sephadex con el mismo buffer a una razón de flujo de 181 ml/hr. Las fracciones que presentan mayor densidad óptica a 280 $m\mu$ se conjuntan y se liofilizan sin diálisis.

Paso 4. - El material liofilizado del paso 3 se disuelve en 5 ml de agua destilada y se pasa dentro de una columna de Sephadex G-75 (2.2 x 70 cm) equilibrada con fosfato de sodio 0.005 M, pH 6.85. La enterotoxina se eluye del Sephadex con el mismo buffer a una razón de flujo de 15 -- ml/hr. Las fracciones que presentan mayor densidad óptica a 280 $m\mu$ se conjuntan y se liofilizan. La toxina liofilizada se disuelve en 5-10 ml. de agua destilada y dializada contra 8 lt. de agua destilada (agitada magnéticamente) a 5°C por la noche. La recuperación es de aproximadamente 35% con una pureza de un mínimo de 95%. Doble difusión y electroforesis en gel de almidón indican la presencia de cantidades traza de 2 antígenos con taminantes, menos de 5%.

PURIFICACION DE ENTEROTOXINA A

MATERIAL

Centrifuga.

Resina CG-50

Equipo de diálisis.

CM-celulosa.

Hidroxilapatita.

Liofilizador

Sephadex G-75.

REACTIVOS

Buffer de fosfato de sodio 0.005 M, 0.008 M, 0.03 M.

Fosfato de sodio 0.5 M, 0.01 M, 0.05 M, 0.2 M.

Fosfato monosódico, 0.01 M

Cloruro de sodio 0.08 M, 0.5 M, 0.1 M.

Na OH.

Latoxina es producida por cultivo de *St. aureus*, especie 13 N-2909, por 24 hr. en un medio conteniendo 3% de hidrolizado de proteína en polvo 3% de NZ-amina tipo NAK, 0.2% de extracto de levadura y 0.2% de glucosa adicionada asepticamente y ajustado a pH 6.8.

PURIFICACION.

Paso 1. - El cultivo fermentado al analizarse, generalmente presenta de 15-25 μ g de toxina/ml. cuando la fermentación es completa, el cultivo es enfriado y centrifugado en una centrifuga Sharples de alta velocidad para

remover las células. La solución supernadante es diluida con 4 volúmenes de agua y ajustada a pH 5.6. La toxina es separada del cultivo diluido con resina CG-50 equilibrada en un buffer de fosfato de sodio 0.005 M a pH 5.6. La resina equilibrada es mezclada y agitada en el cultivo diluido por aproximadamente 1 hr. a una temperatura de cuarto y posteriormente se dejó asentar. Esta resina (2-3 g) es suficiente para remover la toxina de 1 lt. de cultivo original. Generalmente 60 lt. de cultivo ó 300 lt. de cultivo diluido se procesan a un tiempo con 120 g de resina. La resina asentada, -- conteniendo la toxina e impurezas, es colocada en una columna hecha para acomodar un volumen de resina de 3.5 x 60 cm., después de acomodar la resina se lava con aproximadamente un volumen de columna de agua, y la toxina es fraccionalmente eluida con fosfato de sodio, 0.5 M a pH 6.2 en cloruro de sodio 0.5 M a una razón de flujo de 6 ml/min. Las fracciones -- de 15 ml cada una, conteniendo 1 mg. o más de toxina por ml, se conjuntaron para purificación posterior. En éste punto las fracciones conjuntas -- dan un volumen aproximado de 0.4% del volumen del cultivo, es decir 240 ml.

Paso 2. - El conjunto de fracciones del Paso 1 se dializan para reducir las sales por diálisis contra un buffer de fosfato de sodio 0.008 M a pH 6 en cloruro de sodio 0.08 M. Este proceso protege a la toxina en la presencia de alguno de los buffer e incrementa su estabilidad. La toxina es -- adsorbida sobre una columna de CM-celulosa usando 360 g (50-100 g/g de proteína basado en absorbancia a 277 nm) preparada humedeciéndola en -- agua destilada durante 1 hr., decantando y suspendiéndola en solución de-

fosfato monosódico 0.01 M. El pH es ajustado a 6 con Na OH, reajustado a 6 después de 1 hr., y la celulosa colocada en una columna de tal manera que la longitud del volumen de la cama (1600 ml) es un mínimo de 15 veces el diámetro. La columna es mantenida a 4°C y lavada con buffer -- (0.01 M, pH 6) a ésta temperatura. La solución de toxina es enfriada a - 4°C, pasada a través de la columna a 2 ml/min., y la columna es lavada con un volumen vacío (800 ml.) de fosfato de sodio 0.008 M en cloruro de sodio 0.08 M a pH 6. Latoxina es eluida fraccionalmente a una tempera-- tura de cuarto con un gradiente lineal de fosfato de sodio 0.01 M, pH 6 a 0.05 M, pH 6.8 (1800 ml de cada buffer) a una razón de flujo de 3 ml/min. Las fracciones (14 ml cada una) conteniendo la mayor cantidad de toxina - (basado en absorbancia a 277 nm) son seleccionadas y conjuntadas para -- purificación posterior. En éste punto, el volumen de las fracciones con-- juntadas es de 1,640 ml.

Paso 3. - Las fracciones combinadas del Paso 2 se ajustan a pH --- 5.7 y se centrifugan para remover el material suspendido si es necesario. La toxina es entonces adsorbida sobre una columna de hidroxilapatita. Un gramo es usado por cada 3.5 mg. de proteína, en éste caso 280 gr. (volumen de la cama 750 ml; columna 5 x 38 cm; longitud que debería ser un -- mínimo de seis veces el diámetro). La hidroxilapatita es preparada suspen-- diéndola en fosfato de sodio 0.008 M a pH 5.7 con agitación ocasional por - espacio de 30 min., se decanta y se vierte en la columna y se equilibra -- con un buffer de fosfato de sodio 0.03 M a pH 5.7 por un mínimo de 24 hr. con una razón de flujo de 0.5 ml/min. La columna es entonces lavada con

un volumen vacío (75% del volumen de la cama) de fosfato de sodio 0.2 M (pH 5.7). La elución es llevada a cabo con un gradiente lineal del buffer de fosfato de sodio 0.2 M a pH 5.7 a 0.4 M a pH 5.7 a una razón de flujo de 1 ml/min. Un volumen de cuatro veces el volumen de la cama para cada buffer es usado para éste gradiente. Las fracciones conteniendo la mayor parte de proteínas (fracciones de 5 ml.) se localizan por la absorbancia y la enterotoxina por pruebas adicionales de Oudin. Las fracciones -- que muestran una línea simple antígeno-anticuerpo, con solo trazas de impurezas en las pruebas de doble difusión (tubos de Oakley), son seleccionadas para cromatografía sobre Sephadex. El volumen de las fracciones conjuntas es de aproximadamente 350 ml. y contienen 450 mg de proteína por absorbancia y 441 mg por pruebas de Oudin.

Paso 4. - Las fracciones seleccionadas del Paso 3 se conjuntan y se concentran por liofilización a aproximadamente 1/10 de volumen, dializadas para remover la mayor cantidad de las sales del buffer, y liofilizadas a sequedad. La preparación seca es colocada en aproximadamente 1/30 del volumen original de agua destilada, dializada contra fosfato de sodio -- 0.05 M a pH 6.8 en cloruro de sodio 1 M, y pasada a través de una columna de Sephadex G-75 para remover una cantidad traza de material de alto peso molecular. La columna de Sephadex es ajustada en el mismo buffer. - Este buffer es usado para eluir la toxina a una razón de flujo de 0.6 ml/-- min. Las fracciones conteniendo la mayor cantidad de toxina 3 ml cada -- una, se conjuntan y dializan contra un buffer de fosfato de sodio a pH 6.8 en una concentración para llevar las sales del buffer a 3-5% de la concen

tración de proteína como es determinado por la absorbancia. El volumen de las fracciones colectadas en éste caso es de 36 ml. y contuvo 177 mg - de proteína por absorbancia y virtualmente la misma cantidad por prueba de Oudin. La pureza obtenida es de más de 99%. La solución dializada de toxina es centrifugada para remover cualquier material insoluble y liofilizada. La recuperación total de toxina purificada es de 20%.

PURIFICACION DE ENTEROTOXINA B

MATERIAL

Seohadex G-100

Equipo de electroforesis

Equipo de diálisis

Sephadex G-25

REACTIVOS

Buffer de fosfato de sodio 0.02 M.

Na Cl 0.1 M.

Buffer de TRIS-glicina 0.1 M.

Buffer de fosfato de sodio 0.045 M.

PURIFICACION

Paso 1. - La toxina cruda dializada y concentrada se filtra en gel sobre una columna de vidrio de 3.5 x 48 cm. de Sephadex G-100 en buffer de fosfato de sodio 0.02 M., pH 7.2, conteniendo Na Cl 0.1 M. La elusión se lleva a cabo a 4°C a 1.5 ml/cm²/hora. Se eluye en fracciones de 5 ml.

Paso 2. - Electroforesis preparativa en buffer de TRIS-glicina 0.1 M. pH 8.4, conductividad 0.16 mmho se usa para purificación adicional. Las fracciones de filtración en gel con actividades altas de enterotoxina se conjuntan, concentran y dializan contra el buffer de TRIS-glicina antes de la electroforesis preparativa, la cual se lleva a cabo sobre una columna vertical (50 x 2.2 cm.) empacada con Sephadex G-25. La columna se conjunta a 4°C con un refrigerante. La electroforesis se corre hacia el cátodo a 500 v. Después de 24 horas la columna se eluye a 1.5-2 ml/cm²/hr. y el efluente se colecta en fracciones de 2.5 ml.

Paso 3. - Sin concentración, el pico de enterotoxina del paso 2 se purifica por electroforesis preparativa en buffer de fosfato de sodio 0.045 M., pH 5.95, conductividad 3.14 mmho. La electroforesis se lleva a cabo como se describió en el paso 2.

La producción total es de 11% y es inmunológicamente puro.

PURIFICACION DE ENTEROTOXINA C

MATERIAL

Centrifuga

Equipo de diálisis.

CM - celulosa.

Liofilizador.

Sephadex G-75.

Sephadex G-50.

REACTIVOS

NaH_2PO_4 0.01 M.

Fosfato de sodio 0.02 M., 0.06 M., 0.005 M., 0.05 M.

PURIFICACION

Paso 1. - Elusión en gradiente de concentración sobre columna de CM-celulosa. - La preparación de enterotoxina cruda liofilizada se disuelve en NaH_2PO_4 0.01 M. y se centrifuga en una centrífuga Servall refrigerada por 30-40 min. a 15 000 rpm. Este proceso se repite y los supernatantes conjuntados se dializan contra fosfato de sodio 0.02M (pH 5.4). -- Después de 24 hs., el pH de la solución dializada es de 5.3 - 5.4. La solución dializada se diluye con fosfato de sodio 0.02 M. (pH 5.3). La solución dializada diluida (300-350 ml) se introduce en una columna de CM-celulosa (3.5 x 67 cm.) bufferada con fosfato de sodio 0.02 M. (pH 5.4) y se lava con el mismo buffer para eluir la enterotoxina. Se vuelve a lavar la columna con un buffer de fosfato de sodio 0.06 M (pH 6.6 - 6.7). La enterotoxina se encuentra en la segunda fracción eluida.

Paso 2. - Elusión con gradiente de concentración sobre columna de CM-celulosa. - La fracción conteniendo la enterotoxina del Paso 1 se liofiliza, se disuelve en agua destilada fría y se dializa contra fosfato de sodio 0.005 M. (pH 5.8 - 5.9) hasta alcanzar el equilibrio (usualmente 20--24 hrs.). El material dializado se aplica a una columna de CM-celulosa - (1.9 x 34 cm.) previamente equilibrada con fosfato de sodio 0.05 M. (pH 5.8 - 5.9) seguido por lavado con el mismo buffer. Para eluir la proteína

adsorbida 400 ml. de fosfato de sodio 0.05 M. al mismo pH se mezclan - continuamente para formar un gradiente lineal. La enterotoxina aparece en la fracción entre 0.02 y 0.039 M., la localización exacta depende de - la cantidad de proteína presente, la longitud de la columna, y el volumen de los buffers usados para producir el gradiente.

Paso 3. - Filtración en gel a través de Sephadex G-75. - Las fracciones enterotóxicas que se obtubieron por elusión con gradiente lineal - de CM-celulosa se liofilizan, se disuelven en un volumen mínimo de agua destilada y se dializan contra fosfato de sodio 0.02 M. (pH 6.8) - hasta que el equilibrio es alcanzado. La solución dializada se aplica a - una columna de Sephadex G-75 (2 x 145 cm.) la cual se equilibra previamente con fosfato de sodio 0.02 M. (pH 6.8) y la elusión es llevada a ca- - bo con el mismo buffer (Figura 3). La enterotoxina esta presenta en la - fracción C. Esta fracción se refiltra a través de una columna de Sepha- - dex G-75 bajo las mismas condiciones experimentales al paso previo.

Paso 4. - Filtración en gel a través de Sephadex G-50. - La fracción conteniendo la enterotoxina del proceso de refiltración es liofilizada y dia- - lizada contra fosfato de sodio 0.02 M. (pH 6.8), y aplicada a una columna de Sephadex G-50. Las mismas condiciones experimentales que las des- - critas para la filtración en Sephadex G-75 son usadas. La fracción de en- - terotoxina se dializa contra agua destilada por 48 hrs. se centrifuga y el - supernadante se liofiliza. La recuperación de enterotoxina es de un 40% - tomando en cuenta la cantidad que habfa en el cultivo bacterial original.

La pureza de la enterotoxina es de 99%.

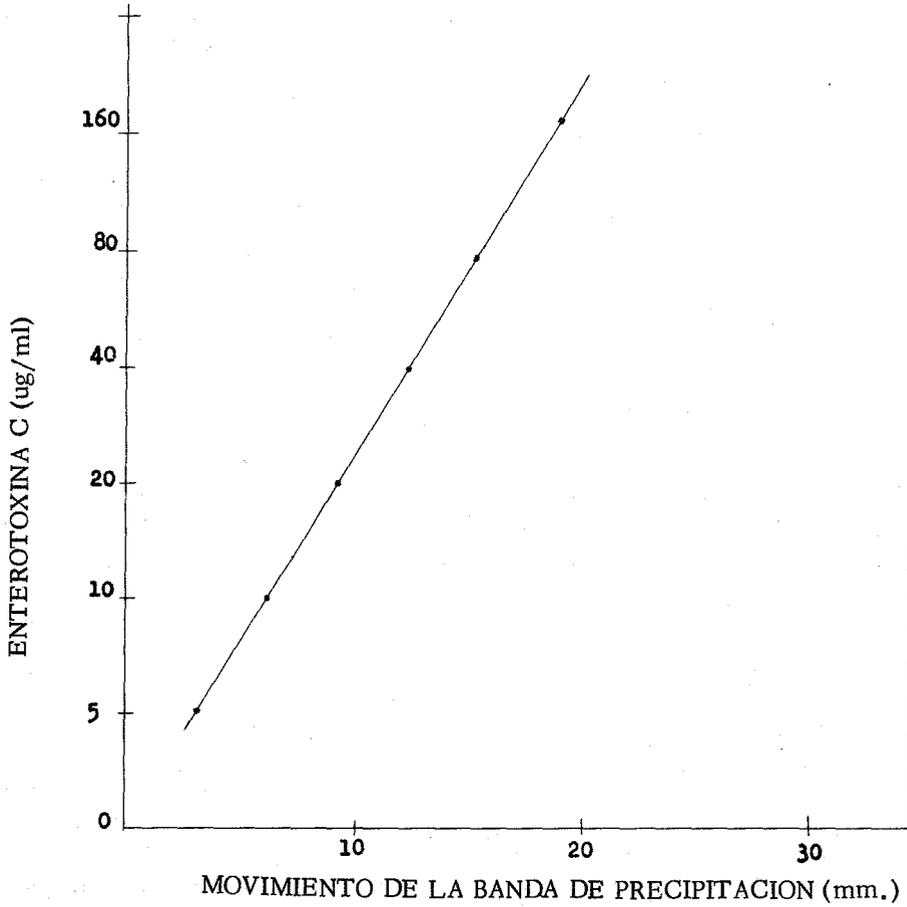


FIG. 3. - Curva estandar usada para la determinación de la concentración de enterotixina C (ug/ml.)

PURIFICACION DE ENTEROTOXINA E

MATERIAL

Centrifuga

Polietilenglicol 20 M.

CM - celulosa.

Sephadex G - 75 superfino.

Equipo de diálisis.

Liofilizador.

REACTIVOS.

Buffer de fosfato de sodio 0,02 M.

Urea 6 M.

La enterotoxina E es producida por el cultivo de *S. aureus* especie FRI-326. Este método fué desarrollado por el Dr. Bergdoll.

PURIFICACION.

Paso 1. - Concentración del fluido supernadante del cultivo bacter--
rial. Las células se separan por centrifugación, en una centrifuga Sorvall
refrigerada, operada a 10,000 rpm por 10 min. a una temperatura de ---
0-2°C., el fluido supernadante del cultivo se concentra por diálisis duran
te 24 hrs. aproximadamente contra Polietilenglicol 20 M., seguido por --
una diálisis contra agua destilada. La mezcla se liofiliza y se guarda en-
forma seca hasta ser usada para los siguientes pasos de la purificación.
El contenido de enterotoxina del supernadante del cultivo bacter--
ial es de 3-5 microgramos por mililitro. Después de la concentración con Polieti-

lenglicol 20 M., la recuperación de enterotoxina es de 60 a 70%. Para minimizar la desnaturalización de la proteína, el fluido supernadante del cultivo no se remueve completamente de los tubos de diálisis por medio de la mezcla Polietilenglicol - agua.

Paso 2. - Cromatografía intercambiadora de iones sobre CM - celulosa. El material tóxico seco del Paso 1, obtenido de 6 lt. de cultivo original se redisuelve en aproximadamente 200 ml. de buffer de fosfato de sodio 0.02 M., pH 5.6, y centrifugando a 15,000 rpm. a 0-2°C., por 15 min. El precipitado se lava una vez con buffer y el líquido de lavado es adicionado a la porción principal de la solución. El pH de la solución es checado y reajustado a 5.6 si es necesario. Generalmente la solución llega a ser turbia después de reajustar el pH, por lo que se procede a hacer una clarificación. Después de la clarificación, la solución se divide en partes iguales y se aplican separadamente a dos columnas de CM-celulosa (2.2 x 60 cm.), previamente equilibradas con buffer de fosfato de sodio 0.02 M., pH 5.6. - La elución de las proteínas adsorbidas se lleva a cabo con incremento en concentración y pH del buffer de fosfato de sodio. El contenido de enterotoxina se determina por absorbancia a 280 m μ . En el patrón de elución se presentan cuatro grupos de fracciones que presentan una mayor absorbancia a ésta longitud de onda, el grupo de fracciones que eluyó en tercer término y que presenta mayor absorbancia es la única que produce vómito y diarrea en monos y es la elegida para proseguir la purificación. Los componentes de ésta fracción son conjuntados dializados contra agua destilada y liofilizados.

Paso 3. - Filtración en gel a través de Sephadex G-75 superfino. La fracción tóxica liofilizada del Paso 2, se redisuelve en buffer de fosfato de sodio 0.02 M., pH 6.8 (aproximadamente 1% del volumen del gel), y se centrifuga para clarificar la solución. La muestra clarificada, se vierte cuidadosamente sobre una columna de Sephadex G-75 superfino (2 x 146 cm.) previamente equilibrada con el buffer usado para elución. Como en el Paso 2 se presentan cuatro conjuntos de fracciones que presentan una mayor absorbancia, el conjunto de fracciones que eluye en tercer lugar y que presenta mayor absorbancia a 280 m μ , es la única que provoca vómito y diarrea en monos y es la elegida para proseguir la purificación. La fracción tóxica es liofilizada y guardada en seco hasta el siguiente paso.

Paso 4. - Refiltración a través de Sephadex G-75 superfino. La muestra tóxica seca colectada en el Paso 3, se redisuelve en buffer de fosfato de sodio 0.02 M., pH 6.8, además es dializada contra agua destilada para remover sales, en seguida es liofilizada. La muestra seca se redisuelve en el mismo buffer, se centrifuga para clarificar y es refiltrada a través de una columna de Sephadex G-75 superfino (2 x 146 cm.) El filtrado es liofilizado y guardado en seco.

Paso 5. - Filtración en gel a través de Sephadex G-75 superfino en presencia de urea 6M. La muestra tóxica seca del Paso 4 se disuelve en buffer de fosfato de sodio 0.02 M., pH 6.8, con urea 6 M y se deja descansar en frío por aproximadamente 45 hrs. antes de pasarla a través de la columna de Sephadex G-75 superfino, la cual ha sido previamente equilibrada con el mismo buffer. Un patrón de elución presenta tres conjuntos

de fracciones que presentan una mayor absorbancia a 280 m μ , la fracción que eluye en segundo término presentando mayor absorbancia es la que -- contiene la enterotoxina. Esta fracción se dializa exhaustivamente para remover la urea y se liofiliza.

EXTRACCION DE ENTEROTOXINAS DE S. AUREUS DEL ALIMENTO Y - DETERMINACION DE LAS MISMAS.

Hasta fecha reciente la investigación y diagnosis del envenena- -
miento alimenticio causado por estafilococo dependían de la correlación -
del periodo de incubación y de los síntomas de los pacientes, y además, -
al encuentro de STAPHYLOCOCCUS coagulasa positiva en el alimento que
había sido consumido en común. La metodología incluye el aislamiento de
la especie de STAPHYLOCOCCUS aureus y un estudio de sus característica
cas.

Los resultados positivos obtenidos con ésta aproximación provee -
una evidencia fuertemente circunstancial, pero, de cualquier manera, és
ta no puede ser considerada una prueba positiva. El hecho de que una es -
pecie produzca enterotoxinas bajo condiciones relativamente óptimas, -
ello no quiere decir que necesariamente pueda hacerlo bajo las condicio -
nes provistas por el alimento, e inversamente, un resultado negativo po -
dría ser debido a la inadvertente siembra de unas pocas colonias no ente -
rotoxigénicas en una caja Petri, sobre la cual, ambos tipos de colonias, -
enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas, estuvieran presentes. Ha sido -
observado que cajas Petri sembradas con especies productoras de entero
toxinas desarrollan muchas colonias que no producen niveles demostra -
bles de enterotoxinas.

Con el transcurso del tiempo han sido desarrollados otros méto -
dos para la determinación de enterotoxinas en alimentos, entre los cua -

les se pueden contar los métodos biológicos y más recientemente, los mé todos serológicos.

Los métodos biológicos fueron descartados para la determinación de enterotoxinas en alimentos, a causa de que el costo de compra y mante nimiento de los animales, así como la variación individual en susceptibili - dad y la posibilidad siempre presente del desarrollo de inmunidad (los - - animales, en éste caso, monos rhesus jóvenes, que son los más adecua - dos para la determinación de enterotoxinas en alimentos, sólo pueden ser utilizados como máximo para dos determinaciones) los hacen practica - mente inaccesibles para uso de rutina.

Los métodos serológicos desarrollados son los más accesibles pa - ra uso rutinario, y además, pueden proveer una evidencia directa de la - presencia de enterotoxina en alimentos.

Los métodos serológicos empleados deben ante todo ser lo suficien - temente sensibles para captar las pequeñas cantidades de enterotoxina - que han sido encontradas en los alimentos involucrados en envenenamien - to alimenticio (aproximadamente 0.1 μ g de enterotoxina/100 g de alimen - to).

A continuación se describen los métodos que han sido empleados - para la determinación de enterotoxinas en alimentos (incluyendo las técni cas de extracción de la enterotoxina, que complementan dichos métodos) - y además se describen otros que por su sensibilidad pueden ser emplea - dos para dicho propósito.

METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA DE CASMAN Y BENETT (1965).

Este método de extracción es útil para alimentos tales como carnes cocida y cruda, y flanes y cremas pasteleras.

Método de determinación de enterotoxina usado: métodos de difusión en gel (microplaca y doble difusión en tubo).

METODOLOGIA.

a). - Separación de la enterotoxina de los constituyentes insolubles del alimento. - 20 g de alimento se homogeneizan (en un homogeneizador a alta velocidad) por 3 minutos en 100 ml de NaCl 0.2 M y, después de ajustar la mezcla a pH 7.4-7.5, se centrifuga por 10 minutos a 32,800 x g. El sobrenadante se pasa a un recipiente. El alimento sedimentado se vuelve a suspender por homogeneización en 50 ml de NaCl 0.2 M a pH 7.4-7.5 y se centrifuga nuevamente a 32,800 x g por 10 minutos. Se separan las partículas flotantes de material lipoidal. Los dos extractos se conjuntan y se procede a dialisar.

b). - Diálisis y separación de la enterotoxina del material extraído soluble. - Los extractos conjuntados se dialisan contra polietilen glicol 20,000(PEG) al 30% (W/W) en bolsas de diálisis de celofán. Se concentran a aproximadamente 1/4 de su volumen original. Las bolsas de diálisis se lavan y vacían dos o tres veces con cantidades de 2 ml de NaCl 0.2 M. Se conjunta todo y se ajusta a pH 7.4-7.5 con NaOH 1.0 N.

Se centrifuga a 32.000 x g por 10 minutos para remover cualquier

precipitado que aparezca sobre el concentrado. Este es posteriormente diluido con 20 volúmenes de agua destilada y 20 volúmenes de fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.0). Se ajusta a pH 6.0 con H_3PO_4 0.01 M y se pasa a través de una columna de CM-celulosa.

La columna se prepara de la manera siguiente: 1 gr. de CM-celulosa se suspende en aproximadamente 100 ml de fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.0). La suspensión se ajusta a pH 6.0 con NaOH 1 N.

A un tubo para cromatografía de 2 cm de diámetro y 40 cm de largo se le coloca un tapón de lana de vidrio en la punta. Se vacía la suspensión de CM-celulosa en el tubo hasta que el absorbente alcanza una altura de aproximadamente 2 cm. Se coloca un tapón de lana de vidrio en la parte superior de la CM-celulosa (sin apretarlo) para evitar disturbios de la columna. Se lava la columna con 100 a 200 ml de fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.0). Después de esto, la columna se coloca en un cuarto frío, y el concentrado diluido se hace pasar a través de la columna a una razón de flujo de aproximadamente 1 a 2 ml/min., principalmente a causa de que es conveniente hacer éste paso por la noche.

Cuando lo último del concentrado diluido entra a la cama absorbente, la columna se lava con 100 ml de fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.0).

Cuando el paso a través de la columna se completa prematuramente, resultando en un secado de ésta, la columna se hidrata pasándole de 25 a 50 ml de agua destilada y lavándola con 100 ml de fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.0).

La enterotoxina se eluye de la columna con 150 ml de NaCl 0.2

M en fosfato de sodio 0.2 M (pH 7.4).

c). - Concentración del eluato. - La toxina eluída se concentra por diálisis contra PEG a 5 C. Los 150 ml de eluato de la columna de CM-celulosa se colocan en una bolsa de diálisis de celofán de 75 a 80 cm (2.9 cm de ancho plano) y se sumergen durante la noche en 100 ml de PEG. El concentrado se colecta en una porción final (aproximadamente 10 cm) de la bolsa de celofán. La porción restante (65 a 70 cm) de la bolsa, se lava varias veces con cantidades de 2-3 ml de solución salina, las cuales se adicionan a la porción de 10 cm que contiene el concentrado. La concentración se continúa por inmersión de la porción final de la bolsa en PEG recién preparado, hasta casi completar la deshidratación. La bolsa se sumerge brevemente en solución salina para hidratar el contenido. Después de ésto, la muestra está lista para ser analizada.

La eficiencia de recuperación, de enterotoxina del alimento, del método de extracción es de:

Alimento	enter. A(%)	enter. B(%)
Flan de coco	69	72
Carne de res cocida	38	48
Carne de res cruda	25	40
Pavo cocido	80	-
Camarón cocido	60	-

Para carne cruda, la elusión de la columna de CM-celulosa se debe hacer a pH 6.5.

METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA DE STOJANOW -
(1965).

Método de determinación de enterotoxina usado: metodos de difu-
sión en gel (microplaca y doble difusión en tubo).

METODOLOGIA.

Se extrae la enterotoxina del alimento con un buffer de Na_2HPO_4 -
. $12\text{H}_2\text{O}$, a pH 4.0-7.5.

Se calienta el extracto durante 30-60 minutos a una temperatura -
de 80-100°C.

Se agrega ácido (ácidos pícrico y cítrico) (Reactivo de Esbach - -
0.5 M), para precipitación. Después de que se a formado el precipitado, -
se enfría a 4°C y se separa la grasa solidificada.

Se ajusta el pH a 5.0-7.0 con NaOH y se centrifuga a 10,000 rpm -
durante 20 minutos.

El sobrenadante se dialisa contra dextrana (peso molecular - - -
5 000-20 000) para concentrar.

El concentrado se filtra a través de dextrana(peso molecular - - -
20 000-150 000), y se reconcentra por medio de diálisis contra dextrana -
(peso molecular 5 000-20 000).

Este último concentrado es el que se utiliza para la determinación
de la enterotoxina.

El tiempo para llevar a cabo la extracción de la enterotoxina es de
8-10 horas.

METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA DE HALL, ANGE
LOTTI Y LEWIS (1965).

Este método de extracción es útil para alimentos tales como pollo, jamón, flan, camarón, pescado, tocino, carne de res.

Método de determinación de enterotoxina usado: metodos de difu-
sión en gel (microplaca y doble difusión en tubo).

METODOLOGIA.

Se prepara una suspensión por homogeneización de 30 g de alimen-
to con 60 ml de buffer de fosfato 0.02 M, pH 6.2 a 6.4.

La suspensión se vierte en tubos de centrifuga de plástico, los cua
les se colocan en un baño de agua a 50 C por 30 minutos y después se de
jan a temperatura ambiente por otros 30 minutos. Este tratamiento acele
ra la precipitación de ciertos fosfatos insolubles que se forman en la sus
pensión del alimento.

Se procede a centrifugar a 15,000 x g por 30 minutos a 5°C. El so
brenadante se vierte en un matraz a través de una capa simple de papel
absorbente, el cual separa la grasa consolidada. El sobrenadante filtrado
se diluye 1:3 con agua destilada y se pasa a través de una columna de cro
matograffa empacada con 4 cm de resina Amberlita CG-50 (pretratada
con aproximadamente 200 ml de buffer de fosfato 0.02 M hasta que el elua
to esté a un pH de 6.2 a 6.4). Se lava la columna con 10 ml de agua desti
lada, y la enterotoxina se remueve por elusión con 30 ml de buffer de fos
fato 0.2 M, pH 6.4-6.8. Este eluato se concentra 20 x por diálisis contra-

polivinilpirrolidona al 30%. Este concentrado 20x es el que se usa como antígeno en las pruebas de determinación de enterotoxina.

La recuperación de enterotoxina del alimento es de 27% para enterotoxina A y de 42% para enterotoxina B.

METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA DE READ, - - -
BRADSHAW, PRITCHARD, Y BLACK (1965 a, b).

Estos métodos de extracción son específicos para leche y queso.

Métodos de determinación de enterotoxina usados: métodos de difusión en gel (microplaca y doble difusión en tubo) y hemaglutinación pasiva-invertida.

METODOLOGIA.

1). - Método de extracción de enterotoxina de queso.

a). - Se mezclan 100 g de queso con una cantidad igual (W/V) de buffer de veronal 0.04 M a pH 7.2, se ajusta el pH a 4.5 con HCl 6 N, y se centrifuga (todas las centrifugaciones se hacen a 23,500 rpm por 20 minutos, a 5 C).

b). - Se filtra el sobrenadante a través de papel Whatman No. 42, usando un embudo Buchner y a vacío, se adiciona una parte de CHCl_3 a cada 4 partes de filtrado, se mezcla y se centrifuga.

c). - Repetir la adición de CHCl_3 y el paso de centrifugación.

d). - Se adiciona la fase acuosa del paso de extracción con CHCl_3 a una bolsa de diálisis de porosidad de 48 A° (5/8 de pulgada de diámetro) y se concentra ésta fase 20 veces en polivinilpirrolidona a 40°F (requiere

de 16 a 24 horas).

e). - Se saca el material concentrado de la bolsa de diálisis (se --
adiciona buffer de veronal si el material ha sido concentrado más de 20 -
veces), se ajusta el pH a 4.5 con HCl 6 N, y se centrifuga.

f). - Se separa el sobrenadante y se ajusta a pH 7.2 con NaOH 3 -
N, se calienta a 50°C por 10 minutos, y se centrifuga.

g). - Se separa el sobrenadante, y se adiciona un volumen igual de
CHCl₃, se centrifuga, y el sobrenadante obtenido se usa como antígeno pa
ra la determinación de enterotoxina. Si el sobrenadante no es claro, se -
repite el paso de extracción con CHCl₃ previo a la adición del sobrenadan
te al sistema de análisis.

II). - Método de extracción de enterotoxina de leche.

a). - 100 ml de leche se acidifican a pH 4.5 con HCl 6 N y se cen
trifuga (a 23,500 rpm por 20 minutos y a 4°C se hacen todas las centrifu
gaciones).

b). - El sobrenadante se filtra a través de papel Whatman No. 42,
usando un embudo Buchner y al vacío, se adiciona una parte de CHCl₃ a 4
partes de suero filtrado, se agita vigorosamente, se centrifuga, se sepa
ra la fase acuosa, y se repite la extracción con CHCl₃ y la centrifugación
de la fase acuosa.

c). - La fase acuosa se coloca en una bolsa de diálisis de porosi
dad promedio de 48 A°(5/8 de in. de diámetro) y se sumerge en polivinil
pirrolidona (1 libra de polivinilpirrolidona en 1 litro de agua destilada) a -
5°C hasta que el volumen en las bolsas de diálisis sea reducido a 95% (tiem

po promedio 18 hrs.).

d). - El líquido concentrado se separa de la bolsa de diálisis, se ajusta a pH 4.5 con HCl 6 N, se centrifuga, y el sobrenadante se separa, se ajusta a pH 7.2 con NaOH 0.1 N, y se calienta a 50°C por 10 minutos.

e). - El fluido caliente se centrifuga, y se adiciona un volumen igual de CHCl_3 , se agita vigorosamente, se centrifuga, y el sobrenadante (fase acuosa) se usa como antígeno en las pruebas de determinación de enterotoxina.

aII). - Aplicación del método de extracción de enterotoxina a leche en polvo y leche condensada. - Para leche en polvo y leche condensada (40% de sólidos), el procedimiento fue modificado en el primer paso por la dilución de éstos productos con buffer de veronal 0.04 M a pH 7.2, para dar aproximadamente 25% de sólidos totales.

METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA DE REISER, CONAWAY, Y BERGDOLL (1974).

Este método de extracción es útil para alimentos tales como queso, salchicha fermentada, y jamón.

Metodos de determinación de enterotoxina usados: métodos de difusión en gel (método de microplaca, y doble difusión en tubo), y hemaglutinación pasiva invertida.

Preparación de la resina intercambiadora de iones CG-50. La resina se suspende en agua destilada (100 g/1.5 lt) y la suspensión se ajusta a pH 12 con NaOH 5 N y se agita por 1 hr. La resina se lava varias ve-

ces con agua destilada y se suspende nuevamente en agua, y la suspensión se ajusta a pH 2.0 con HCl 6 N y se agita por 1 hr. . La resina se lava varias veces con agua destilada y se equilibra en un buffer de fosfato de sodio 0.005 M a pH 5.6 Si el pH queda abajo de 5.4, se ajusta con NaOH 5 N agitando hasta que el pH permanezca constante. Normalmente, se ajusta a pH 5.8-5.9, ya que un reposo prolongado hace que el pH decrezca.

METODOLOGIA.

Una muestra de 100 gr de queso se corta en cubos, se coloca en un vaso de centrifuga de acero inoxidable de 285 ml. conteniendo 140 ml de agua destilada, se pica ó corta a una consistencia uniforme con un Omni Mixer(Sorvall). Diez ml de HCl 1.0 M se mezclan con la suspensión y se centrifuga a 27,300 x g por 20 minutos a 4°C(pH 4.5-5.0). El sobrenadante se ajusta a pH 7.5 y se extrae con CHCl_3 al 10% usando un agitador magnético por 3 a 5 minutos. Se centrifuga como la primera vez. El estrato acuoso se separa, se ajusta a pH 4.5, y se recentrifuga, el sobrenadante se ajusta a pH 7.5.

La enterotoxina se extrae del sobrenadante agregando a éste 20 ml de resina intercambiadora de iones CG-50(pH 5.4-5.9) por cada 100 ml y se deja todo esto durante 1 hr a 4°C con un agitador magnético.

La resina se separa filtrando en un embudo Buchner y lavando la resina en el embudo con 200 ml de buffer de fosfato de sodio 0.015 M(pH 0.9) conteniendo 0.09% de NaCl.

La enterotoxina se separa de la resina de la manera siguiente: se -

pasa la resina a un recipiente y se agregan 30 ml de fosfato de sodio dibásico 0.15 M conteniendo 0.9% de NaCl y se ajusta el pH a 6.8. Se deja todo en agitación a 4°C por 45 minutos. La resina se separa por filtración a través de un embudo Buchner, y el filtrado se usa para análisis.

El filtrado así se puede usar para determinación de enterotoxina por medio del método de hemaglutinación pasiva invertida.

Para utilizar el método de microplaca se hace lo siguiente: el filtrado resultante del tratamiento con la resina se mezcla con 1 g de agar purificado y se agita durante 1 hr a 4°C. El agar se separa por filtración a través de un embudo Buchner, y el filtrado se pone en una bolsa de diálisis y se concentra en Carboxymethyl 20-M al 50% durante la noche a 4°C. Después se remoja la bolsa en agua caliente por 10 a 20 minutos para desprender la toxina adherida a las paredes, y el contenido se separa lavando la bolsa por tres veces con agua destilada, el volumen total no excede los 5 ml. El extracto se mezcla vigorosamente con 0.5 ml de CHCl_3 en un tubo de centrifuga y se centrifuga a 34,800 x g, y el extracto acuoso se liofiliza. La muestra seca se disuelve en 0.2 ml de tripsina al 1% en agua destilada y se deja descansar por media hora antes de ponerlo en las microplacas.

Para salchicha fermentada y jamón se sigue el mismo procedimiento excepto que solo se adicionan 5 ml de HCl 1.0 M al extracto para mantener el pH del goteo abajo de 4.5. La digestión con tripsina cruda al 0.1% es necesaria antes del análisis con la técnica de hemaglutinación pasiva invertida.

METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA DE GENIGEOR- GIS Y KUO (1976).

Este método de extracción es útil para alimentos tales como salami, queso, y leche.

Métodos de determinación de enterotoxina usados: métodos de difusión en gel (microplaca y doble difusión en tubo). Es posible utilizar la hemaglutinación pasiva invertida, si se logra obtener un antígeno totalmente libre de hemolisinas.

METODOLOGIA.

Preparación de Inmunoglobulina G pura. - Se obtiene de antisuero específico de conejo, y se prepara por calentamiento de 5 ml de antisuero por 30 minutos a 56°C, se centrifuga, y el sobrenadante se filtra a través de una columna de Sephadex (2.5 por 85 cm). El Sephadex se equilibra previamente con buffer de Tris (hidroximetil) aminoetano (Tris) 0.1 M, pH 8.1, conteniendo NaCl 0.2 M. Todas las fracciones de 5 ml del pico de proteína a una densidad óptica de 280 nm con actividad anticuerpo, determinada por el método de difusión de microplaca de gel, contra enterotoxina fueron conjuntadas. La IgG de las fracciones conjuntadas se precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% por la noche, y el precipitado se redissuelve en 5 ml de buffer Tris y se filtra a través de la columna de Sephadex. Las fracciones principales del pico de anticuerpo se conjuntan y se almacenan a congelación hasta ser necesarias.

Combinación del anticuerpo con la Sepharosa. - 10 ml de Sepharo-



sa 4 B activada con CNBr se lavan con 15 volúmenes de buffer de combinación helado (buffer de carbonato 0.1 M, pH 8.5, conteniendo NaCl 0.5 M) en un embudo Buchner. Tres ml de la solución de anticuerpo se adicionan al embudo y se mezclan con la Sepharosa húmeda, y la suspensión se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 25 ml. El matraz se coloca sobre un agitador en baño de agua (140 rpm) y se incuba por 2 hr a temperatura ambiente. Al final de la incubación, la Sepharosa combinada se lava con buffer de carbonato y con buffer de glicina (HCl-glicina 0.2 M, pH 2.8, conteniendo NaCl 0.5 M) alternativamente hasta que la DO 280 de los lavados no sea medible. La Sepharosa lavada, finalmente se equilibra con buffer salino (buffer de fosfato 0.02 M, pH 7.2, conteniendo NaCl 0.15 M y mercuriolate 1:10,000) y se almacena a refrigeración hasta ser necesitada.

Previo al procedimiento de combinación, para aumentar la eficiencia del método se debe dialisar el anticuerpo inicial contra el buffer de combinación. Así, pueden ser combinadas cantidades tan altas como 7.5 mg de anticuerpo a 1 ml de Sepharosa.

Se determinó que 1 ml de Sepharosa conteniendo 500 μ g de anticuerpo pueden combinar arriba de 30 μ g de toxina pura.

Para la elusión de la enterotoxina de la columna se usan de 2 a 4 ml de buffer de glicina (pH 2.8) por cada ml de Sepharosa.

Separación de la enterotoxina del alimento. - 100 g de alimento sólido se homogeizan con 400 ml de agua destilada. El pH del homogeneizado ó la leche se lleva a 4.6 con HCl 1.0 N antes de centrifugar a 20,000 x g por 30 minutos a 4°C. El pH del sobrenadante se ajusta a 7.2, se cen-

trifuga si existe alguna turbidez, y se mezcla con tres ml de conjugado de Sepharosa-anticuerpo húmedo en un vaso de precipitados por 2 hr a 4°C. - La suspensión se coloca en una columna (2 cm de diámetro) con un filtro de vidrio incrustado, se drena y se lava con 50 ml de buffer salino. La enterotoxina se eluye de la columna con buffer de glicina (12 ml para 75 µg de enterotoxina aproximadamente). Cada fracción de 3 ml se ajusta inmediatamente a pH 7.2 con NaOH 1 N y se procede a la determinación de la enterotoxina.

Se recupera el 75% de la toxina.

Aproximadamente el 95% de la toxina se encuentra en los primeros 9 ml de eluato.

MÉTODOS USADOS PARA LA DETERMINACION DE ENTEROTOXINA EN ALIMENTOS.

I. - DOBLE DIFUSION EN GEL EN TUBO.

El método descrito ha continuación es el que utilizó Read (1965 a, - b) para la determinación de enterotoxinas (A y B) en leche y queso.

METODOLOGIA.

A tubos de ensaye de vidrio Borosilicato (50 por 6 mm) completamente limpios y secos, se les adiciona 0.3 ml de Ionagar al 0.3% (fundido) en buffer de veronal 0.04 M (pH 7.2) conteniendo 0.85% de cloruro de sodio, antisuero para enterotoxina a una dilución final de 1:50, y mertiolate (1: 10,000). Ya que solidificó se le adiciona una preparación igual a -

la anterior de Ionagar pero sin antisuero. Se deja solidificar y se agregan 0.3 ml del material que va a ser analizado. Los tubos se incuban a 30°C.

La sensibilidad es mayor si la capa de agar bufferado sin antisuero es colocada sobre la capa de agar antisuero, aproximadamente 20 hr antes de que los tubos sean usados.

Para concentraciones muy bajas de enterotoxina se requieren hasta 11 días de incubación.

Sensibilidad: en leche 0.015 y 0.03 µg/ml de enterotoxinas A y B respectivamente.

En queso: 0.02 y 0.05 µg de enterotoxinas A y B respectivamente, cuando se partió de 100 g de queso.

Para el extracto de otros alimentos puede usarse el método que utilizó Hall (1965) para la determinación de enterotoxinas A y B en alimentos.

Hall (1965) utilizó el método de Oakley y Fulthrope (1953) que se diferencia del usado por Read (1965) en los reactivos empleados. Las diferencias son las siguientes:

Agarosa al 0.5% se disuelve en NaCl 0.145 M. Amortiguador de fosfatos 0.04 M a pH 7.2, conteniendo antisuero, y mertiolate (1:10,000) se adiciona al agarosa. Los tubos se incuban a 25°C, durante el tiempo que sea necesario.

Cuando la enterotoxina se encuentra a una concentración de 0.1-10.0 µg/ml se obtienen buenas lecturas en aproximadamente 1 semana. Después de éste período de tiempo se puede opacar el agar y enmascararse la reacción. A concentraciones más bajas se requiere un período

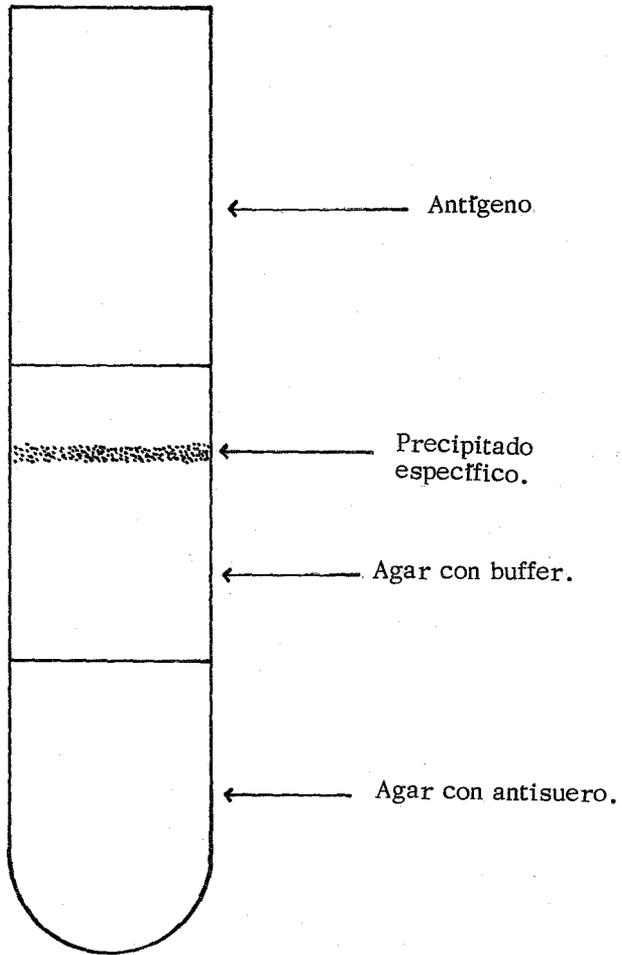


Fig. 4. - Análisis en tubo de doble difusión en gel.

de tiempo mayor.

Hall (1965) reporta una sensibilidad de 0.05 μ g de enterotoxina/ml de antígeno cuando el antisuero se usa a diluciones altas, y una incubación de los tubos de 2 a 3 semanas.

VENTAJAS. - No se requiere una gran manipulación de material, los tubos se preparan con rapidez, y no presenta reacciones cruzadas con los extractos del alimento.

DESVENTAJAS. - Tiene una sensibilidad un poco baja, los resultados se obtienen después de un período largo de tiempo.

II. - DOBLE DIFUSION EN GEL EN MICROPLACA.

El método citado a continuación es el que describen Bennett y McClure (1976), y es una modificación hecha por Wadsworth y Crowl al método desarrollado por Ouchterlony.

Gel de agar de difusión. - Se adiciona 1.2% de agar purificado al fluido base hirviente (0.85% de NaCl-0.80% de barbital de sodio, con una concentración final de 1:10,000 de mertiolate) ajustado a pH 7.4. Se filtra el agar caliente a través de dos capas de papel grado analítico y se almacena en porciones de 15 a 25 ml en botellas de tapa de rosca hasta que sea utilizado.

Solución colorante. - Colorante rojo de tiazina R al 0.1% en HOAc al 1%.

METODOLOGIA.

Preparación de las placas (portaobjetos de 7.5 x 2.5 cm). Se envuelve con una doble capa de cinta de aislar el portaobjeto (perfectamente limpio y seco), dejando un espacio de 2 cm en el centro, de la manera siguiente: se toma la punta de la cinta y se coloca a aproximadamente 0.5 cm del borde de la superficie inferior de la placa y enrollar herméticamente alrededor de la placa 2 veces. Se limpia el área entre las cintas con un algodón embebido en alcohol, y se seca con un algodón seco.

Se cubre la superficie del área entre las cintas con agar grado bacteriológico al 0.2%, de la manera siguiente: se funde el agar al 0.2% (preparado con anterioridad), y se mantiene a 55°C ó más, en una botella de tapa de rosca. Se coloca la placa sobre un vaso de precipitados ó sobre una placa caliente ajustada a 65-85°C, y se vierte el agar 0.2% sobre la placa entre las dos piezas de cinta. Se deja escurrir el exceso de agar, se limpia la superficie inferior de la placa, y se colecta el agar en un vaso de precipitados para volverlo a usar. Se coloca la placa sobre una superficie nivelada y se deja secar en una atmosfera libre de polvo. Si las placas no se encuentran completamente limpias, el agar no las cubrirá uniformemente.

Preparación de las placas ensambladas. - Se prepara la plantilla de plástico de acuerdo a las especificaciones en la fig. 5. Se extiende una fina película de grasa de silicón sobre el lado de la plantilla que se va a colocar pegado al agar (el lado con los agujeros más pequeños). Se vierte 0.4 ml de agar de difusión 1.2% fundido (mantenido a una temperatura de

55 - 60°C) entre las cintas. Inmediatamente se pone la plantilla (del lado cubierto de silicón) sobre el agar fundido y los bordes de las cintas, es decir en la parte central de la placa. Se coloca primero uno de los bordes de la plantilla sobre una de las cintas, y luego se coloca el borde opuesto sobre la otra cinta. Se saturan tiras de esponja sintética (1.5 x 1.5 x 6.5) con agua, y se colocan dos tiras sobre la periferia de una caja Petri de 20 x 150 mm. Se ponen las placas en la caja Petri preparada (2-4 placas ensambladas) tan pronto como el agar se endurezca, y se rotulan las placas.

Prueba de difusión. - Para llevar a cabo el análisis, se vierte una dilución adecuada de antisuero en el agujero central, la enterotoxina de referencia homóloga en los agujeros de la periferia, y el material bajo exámen en el agujero adyacente al que contiene la enterotoxina de referencia. (fig. 6). Se prepara una placa control con solamente toxina de referencia y suero antienterotoxina para determinar la reactividad propia de los reactivos. Se llenan los agujeros a convexidad con los reactivos, usando pipetas Pasteur ó pipetas de 30 ó 40 µl. Se llena parcialmente la pipeta capilar con solución y se remueve el exceso de líquido haciendo que la punta de la pipeta toque el borde del tubo con muestra. Se mete la pipeta poco a poco dentro del agujero hasta que toque la superficie del agar, y se llena a convexidad. Se remueve el aire atrapado en burbujas de todos los agujeros por medio de un desburbujador, cuidando de que no quede ninguna burbuja. Se dejan las placas en incubación durante 48-72 hr a temperatura ambiente, en cajas Petri cubiertas conteniendo tiras de

esponja húmedas.

Después de la incubación se separa la plantilla cuidadosamente - -
deslizándola hacia un lado. Si es necesario, se limpia la placa humede - -
ciéndola con agua ó sumergiéndola en agua y limpiando la parte inferior - -
de la placa. Para mejorar las líneas de precipitación, se sumerge la pla - -
ca en solución colorante durante 5-10 minutos. Para preservar la placa - -
como un registro permanente, se lava cualquier líquido remanente sobre - -
la placa sumergiéndola en agua y luego se sumerge la placa en cada uno - -
de los siguientes baños durante 10 minutos: solución colorante, HOAc al 1%,
HOAc al 1%, y HOA C al 1% conteniendo 1% de glicerol. Se drena el exce - -
so de fluido de la placa y se seca en incubadora a 35°C. Después de un al - -
macenaje prolongado, las líneas de precipitación puede ser que no sean vi - -
sibles hasta que la placa sea sumergida en agua.

Para el exámen de las placas para observar las líneas de precipita - -
ción se deben colocar éstas en un ángulo oblicuo con respecto a la fuente - -
de luz, contra un fondo obscuro. La coalescencia de líneas de la muestra - -
problema de precipitación con líneas de referencia de precipitación indica
reacción positiva.

En el lugar donde se encuentran ambos reactivos, se formará una
línea de precipitación como resultado de la interacción entre ambos. - -
Cuando se prueba una mezcla de antígenos con sus respectivos anticuer - -
pos, se obtendrán tantas líneas de precipitación como sistemas antígeno - -
anticuerpo esten presentes.

En el exámen de ciertos alimentos tales como carne de res no coci

da, fue necesario adicionar glicina 1 M al agar, y bajar la concentración de barbital de sodio a 0.02 M para reducir la turbidez que obscurece la línea de precipitación. La turbidez no desaparece por completo.

La sensibilidad reportada es de 0.1 a 0.01 μg de enterotoxinas A ó B/ml de antígeno, y 0.005 μg de enterotoxina A/g en queso.

Reiser, Conaway y Bergdoll (1974), hacen una modificación al método que consiste en incubar las microplacas por 24 horas a 37°C y el procedimiento para teñir las microplacas es como sigue: un gramo de rosa RL de secado rápido se disuelve en una solución conteniendo 5% de ácido tricloroacético, 1% de ácido acético glacial, y 25% de etanol. Las placas se remojan en agua destilada por 0.5 horas antes de colocarlas en la solución colorante por 20 minutos. Posteriormente las placas se lavan con agua, y el exceso de tintura se remueve enjuagando en agua destilada por aproximadamente 0.5 horas. Si las placas son hechas para una referencia futura, es decir que se tengan que almacenar, simplemente se secan con aire.

VENTAJAS. - La preparación de las placas es rápida y sencilla, se requiere una cantidad mínima de antisuero para la determinación y no se presentan reacciones que puedan enmascarar los resultados. Respecto a la dificultad que se presenta en la determinación de enterotoxina en extractos de alimentos tales como carne de res cruda no puede considerarse como una desventaja, ya que dichos alimentos difícilmente pueden presentarse como causantes de envenenamiento alimenticio.

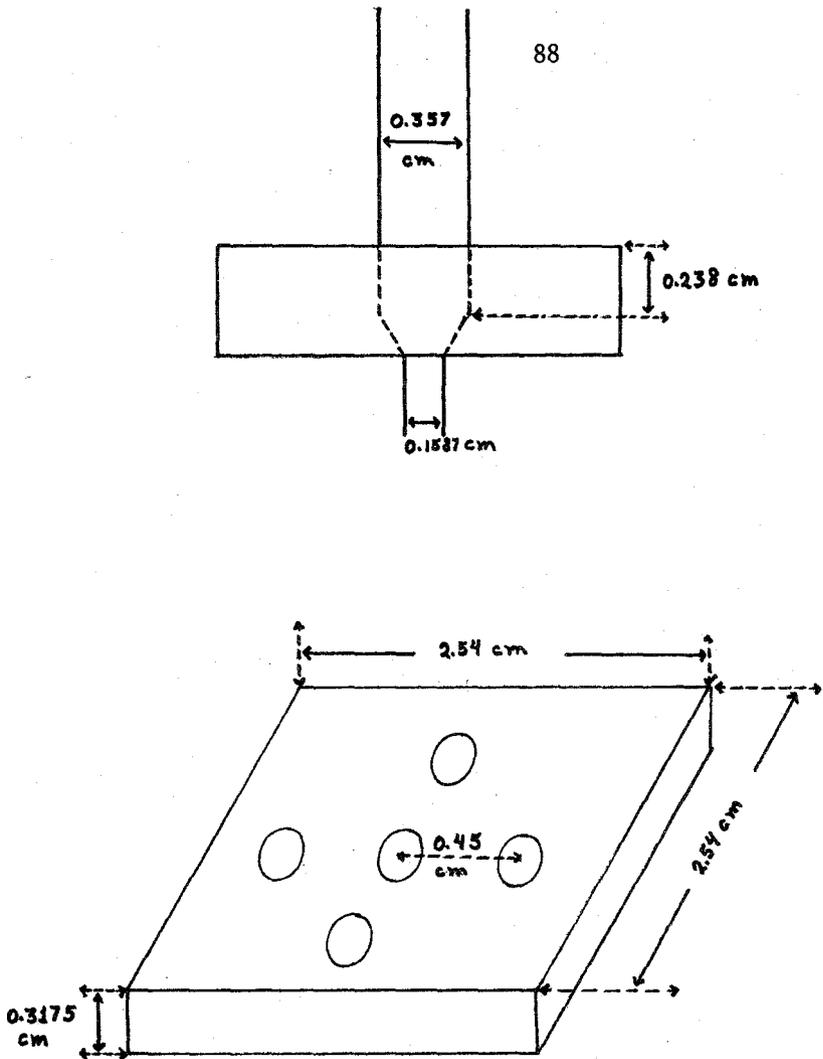
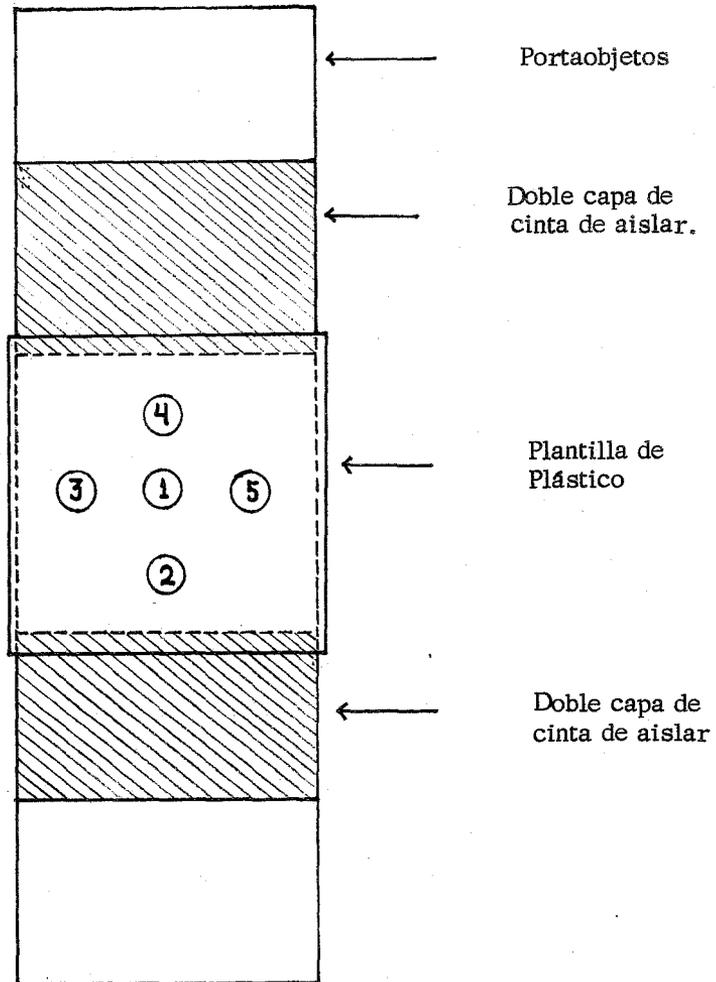


Fig. 5. - Plantilla de plástico para la prueba de microplaca.

FIG. 6. - Placas ensambladas para el análisis de microplacas.



- Sist. Bivalente

1. - Combinación de antisueros.
(ejem. anti A y anti B)
2. - Problema.
3. - Enterotoxina de referencia.
(ejem. A)
4. - Problema.
5. - Enterotoxina de referencia.
(ejem. B).

Sist. Monovalente.

1. - Antisuero (ejem. anti A)
2. - Dilución de problema.
3. - Enterotoxina de referencia.
4. - Dilución de problema.
5. - Dilución de problema.

DESVENTAJAS. - El periodo de tiempo para obtener resultados es relativamente largo, la sensibilidad del método es un poco baja.

III. - HEMAGLUTINACION PASIVA INVERTIDA.

El método que se describe a continuación es el que usaron Silver - man, Knott y Howard (1968) para la determinación de enterotoxinas en alimentos, y es el método que se utiliza para dicha determinación después - de la extracción de la enterotoxina por los métodos anteriormente descri- tos.

También se incluye un método de extracción de enterotoxina que es útil para alimentos tales como pollo cocido, flan, atún, carne de res cocida y salami.

METODOLOGIA.

Extracción de la enterotoxina del alimento. - El alimento se homogeneiza con una cantidad igual de agua destilada (v/V) y posteriormente se diluye con un volumen igual de buffer de fosfato salino 0.02 M (pH 6.4) y - se calienta a 50°C por 15 minutos. Se deja a temperatura ambiente por 45 minutos, y luego se centrifuga a 15,000 x g por 20 minutos a 4°C.

La porción líquida clara entre el sedimento y la capa de grasa de - arriba se saca con una jeringa que tenga una aguja de medida 18 y se filtra a través de una capa simple de papel absorbente.

Preparación de salami. - 20 g de salami se mezclan con 20 ml de - buffer de acetato 0.15 M salino (relación 1:1), pH 4.6, y se homogeneiza - por 3-4 minutos. La muestra homogeneizada se calienta por 15 minutos -

a 50°C y se centrifuga por 20 minutos a 10,000 x g a 4°C. El extracto resultante se filtra a través de papel absorbente y el filtrado se ajusta a pH 6.4 con NaOH 2 N.

El extracto así obtenido se utiliza para la determinación de enterotoxina.

Determinación de enterotoxina.

Preparación de eritrocitos. - Eritrocitos de oveja preservados en formalina (SRBC) (Difco) se lavan una vez con NaHSO₃ 0.038 M en salina al 0.85% y luego dos veces con salina. El lavado con NaHSO₃ es para neutralizar el aldehído libre que hace decrecer la actividad serológica de la enterotoxina B.

Se pueden usar eritrocitos tratados con aldehído pirúvico pero es mejor usar los preservados en formalina ya que se pueden almacenar mejor a 4°C. Aquellos duran 1 mes y éstos 4 meses.

Tanización y sensibilización de los eritrocitos. - Los eritrocitos se lavan tres veces con solución salina y se suspende 1 ml de glóbulos sedimentados en más ó menos 40 ml de solución salina ajustada a pH 7.2 - - (100 ml de solución salina, 23.9 ml de KH₂PO₄, 0.15 M, 76 ml de Na₂ - - HPO₄ 0.15 M). Se mezclan volúmenes iguales de la suspensión de eritrocitos al 2.5% y de ácido tánico al 1:20 000 en la solución salina buffer y se incuba a 37°C durante 10 minutos, se centrifuga, se lava con la solución salina ajustada a pH 7.2 y se suspende en solución salina al volumen original de los glóbulos rojos. Estos glóbulos deben mantenerse a 5°C y usarse dentro de las 18 hrs. siguientes.

Globulina antitoxina diluida con solución salina pH 6.4 (100 ml de solución salina, 32.2 ml de Na_2HPO_4 0.15 M, 67.7 ml de KH_2PO_4 0.15 M) para contener 50.0 μg de nitrógeno de anticuerpo por ml se usa para sensibilizar una suspensión al 2.5% de SRBC ó una suspensión al 1% de SRBC -- para uso en pruebas de microtitulación. La dilución de la globulina fue 1:8.

Preparación de globulina antienterotoxina. - Se prepara de antígeno de conejo por saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%. El precipitado se lava varias veces con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado al 50%, se dializa contra buffer salino de borato 0.15 M (pH 8.4) hasta que quede libre de iones SO_4^{-2} , se liofiliza y se almacena a 4°C.

METODOLOGIA.

Se hacen diluciones seriadas del extracto de alimento con buffer salino de fosfato 0.02 M conteniendo suero normal de conejo al 1%. Se hacen diluciones seriadas 1:2.

Para análisis en tubo: 0.5 ml de la dilución del extracto de alimento se adicionan a tubos de ensaye y luego se agrega 0.05 ml de SRBC tratados con globulina antitoxina. Se dejan a temperatura ambiente por 2 hr y el grado de aglutinación se determina por el patrón de células sedimentadas.

Para prueba de microtitulación: en los manantiales para prueba de las cajas de plástico se ponen 0.025 ml de la dilución del extracto de alimento, y se agregan 0.025 ml de SRBC al 1%. se dejan 2 hr a temperatura ambiente y se ven los resultados. La concentración de toxina en la mues -

tra se calcula por la multiplicación del recíproco de la dilución más grande de muestra que reaccionó por la cantidad más pequeña de enterotoxina-standard purificada que dió un resultado positivo en la prueba de control.

Puede ser introducido un cierto error por las series largas de diluciones necesarias para obtener un punto final, y los valores desmedidamente grandes de dilución pueden también introducir un error considerable. El método no es recomendable para concentraciones grandes de enterotoxina, por ejemplo en filtrados de cultivo.

La toxina standard que se usa se almacena a una concentración de 25 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y a -20°C , para evitar deterioración de ésta. La sensibilidad del método es de 0.0015 μg de enter. B/ml de extracto de alimento. (0.0007 μg de toxina).

VENTAJAS. - La sensibilidad del método es muy adecuada para las bajas concentraciones de enterotoxinas encontradas en alimentos, se obtienen resultados en unas cuantas horas.

DESVENTAJAS. - Una gran desventaja que tiene éste método es que presenta reacción con las hemolisinas que contaminan a las enterotoxinas, y que enmascaran en cierto grado la reacción. El método de extracción de la enterotoxina del alimento desarrollado por Reiser (1974), específicamente el tratamiento con tripsina, disminuyó en un gran porcentaje ésta reacción, pero no la eliminó completamente. Este tipo de reacción se presenta aún en enterotoxinas purificadas, ya que no se ha logrado obtener una enterotoxina 100% pura y las hemolisinas siempre se encuentran

como contaminantes.

IV. - RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA.

Principio del radioinmunoanálisis en fase sólida. - El primer paso es la combinación del anticuerpo (en éste caso antisuero de enterotoxina), a la superficie sólida (en éste caso se trata de un tubo de poliestiereno). - El antígeno marcado radioactivamente (enterotoxina) se adiciona después del paso anterior, y después de un tiempo de incubación para permitir la combinación con su anticuerpo, se separa por lavado. La cantidad de antgeno combinado con el anticuerpo puede ser medida por un contador de radioactividad.

Si se adiciona antígeno no marcado al tubo, antes del antgeno marcado, aquel ocupará algunos de los sitios de unión al anticuerpo, y por lo tanto decrecerá la unión subsecuente de antgeno marcado. El decrecimiento en la combinación de antgeno marcado medido por cuenta radioactiva, - es una medida de la cantidad de antgeno no marcado aplicado en primer - lugar.

METODOLOGIA.

Preparación del alimento para el radioinmunoanálisis.

Se colocan 10 g de jamón en un homogeneizador, se agregan 10 - - ml de seroalbúmina de Bovino (BSA) al 1% en anticuerpo purificado por - - precipitación con sulfato de sodio en buffer de fosfato salino (PBS), pH - - 7.2 (NaCl 0.07 M, fosfato 0.07 M) (con azida de sodio al 0.1% y conte- - niendo aproximadamente 10 a 20 μ g de proteína por ml). Se homogeneiza -

a alta velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga - - por 15 minutos a 20, 000 rpm a 25°C. Se colecta el sobrenadante y el pH se ajusta a 7.4-7.5 con NaOH. El sobrenadante se recentrifuga a 20,000-rpm por 30 minutos, se separa el sobrenadante, se filtra a través de un papel absorbente y se almacena a congelación hasta ser usado.

Los extractos de queso cheddar se preparan de la misma manera que para el jamón, excepto que se adicionan 20 ml de BSA al 1% a 10 g de queso.

Los extractos de flan se preparan como se describió para jamón, - excepto que la mezcla se homogeneiza por 1.5 minutos en lugar de 3 minutos.

Para leche condensada o en polvo (se diluyen para contener 25% de sólidos totales con agua destilada): 10 ml de leche se ajustan a un pH de - 4.5 con HCl 4 N para precipitar las proteínas de la leche. La leche se - centrifuga por 30 minutos a 15,000 rpm a 25°C. Se separa el sobrenadante y el pH se ajusta a 7.4-7.5 con NaOH, se centrifuga a 15,000 rpm por 15 minutos. Se colecta el sobrenadante y se pasa a través de un papel - - absorbente y se almacena en congelación hasta ser usado.

Los extractos de salami de puerco y res se preparan como se describió para queso cheddar, excepto que el extracto se dialisa contra PBS - a 4°C, hasta que el dialisado no muestra absorción a 215 nm en un espectrofotómetro Spectronic 600. Sustancias aromáticas tienen una alta absorptividad a ésta longitud de onda.

RADIOINMUNOANALISIS.

Preparación de los tubos de poliestireno. - Los tubos de poliestireno (Falcon), 10 por 75 mm, se sensibilizan con anticuerpo purificado por medio de precipitación con sulfato de sodio y filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-200. Un ml de anticuerpo en buffer de fosfato-salino (PBS), pH 7.2 (NaCl 0.07 M, fosfato 0.07 M), conteniendo aproximadamente 10 a 20 μ g de proteína por ml, se adiciona cuidadosamente a los tubos de poliestireno con una pipeta volumétrica. Después de 2 hr a temperatura ambiente, el anticuerpo se separa y los tubos se lavan una vez con 2 ml de BSA al 1% en PBS al cual se le ha adicionado azida de sodio como preservativo a una concentración final de 0.1%. Los tubos se llenan entonces con BSA al 1% y se dejan durante la noche a temperatura ambiente. -- Después de éste período de tiempo se separa el BSA, y los tubos se lavan una vez con PBS y se almacenan invertidos a 4°C hasta ser usados.

Yodinación. - Todos los reactivos químicos para yodinación fueron reactivos grado cualitativo. Las soluciones de cloramin-T, metabisulfito de sodio, y yoduro de potasio se preparan el mismo día de yodinación en salina 0.15 M en buffer de fosfato (PBS), pH 7.5.

Portador libre NaI²⁵¹, libre de preservativos ó agentes reductores fue obtenido en hidróxido de sodio 0.1 M de New England Corp., Boston, - Mass., en concentraciones en un rango de 5 a 250 mCi por ml.

Con micropipetas Eppendorf (10 y 50 μ litros), los siguientes reactivos se adicionan en sucesión, con agitación después de cada adición, a un tubo de vidrio de 3 ml: (I) 10 μ l de I²⁵¹, 2 mCi en hidróxido de sodio -

0.1 M; (II) 10 μ l de ácido fosfórico 0.06 M; (III) 50 μ l de yoduro de potasio, 0.2 a 0.4 μ g; (IV) 130 μ l de PBS; (V) 50 μ l de SEB, 1 mg/ml en PBS; (VI) 50 μ l de cloramin-T, 3 a 25 μ g. Después de 1 a 9 minutos, la yodina se detiene con la adición de 50 μ l de metabisulfito de sodio igual al peso de cloramin-T adicionado. Yoduro de potasio (1 mg) y seroalbúmina de bovino (BSA; 10 mg), en 0.1 ml de PBS cada uno se adicionan a la mezcla en reacción como portadores. La muestra se transfiere a una columna de Sephadex G-25 para separación de SEB marcada con 125I de 125I que no reaccionó. La columna consiste de 5 g de Sephadex G-25 equilibrada con PBS y contenida en un biuret de 25 ml. La SEB yodinada se eluye con PBS y se almacena o congela en PBS conteniendo una concentración final de 1% de BSA y 0.1% de azida de sodio. La proteína combinada al 125I fue determinada sobre una muestra de la mezcla en reacción antes de la filtración en gel y sobre una muestra de la fracción de proteína de la columna. Una modificación de una prueba de precipitación con ácido tricloroacético fue usada para esta determinación. El reactivo preparado de esta manera tiene una vida útil de tres meses.

Radioinmunoanálisis. - Porciones de 1 ml de extracto de alimento se adicionan a los tubos sensibilizados con anticuerpo. Se agitan los tubos 10 veces y se incuban a 37°C por 18 hr. Después de este lapso de tiempo, a cada tubo se le adiciona, después de vaciar los extractos, 1 ml de BSA al 1% y 0.001 μ g de enterotoxina marcada con 125I (en 0.1 ml de BSA al 1%). Los tubos se agitan 10 veces y se incuban a 37°C por 4 hr, se lavan una vez con 2 ml de PBS, y se procede a registrar la cuenta radioacti

va. La inhibición de enterotoxina marcada se determina por la comparación de la radioactividad de los tubos conteniendo extractos con aquellos tubos que contienen solamente BSA al 1% en la incubación durante 18 hr.

Construcción de la curva standard. - La cuenta radioactiva de un tubo conteniendo solamente enterotoxina marcada se toma como 100%, y posteriormente se adicionan diferentes cantidades de enterotoxina no marcada y la cuenta registrada de éste modo se toma como por ciento de asimilación. La gráfica se traza colocando los valores del por ciento de asimilación en el eje de las ordenadas y en el eje de las abcisas el logaritmo de la concentración de enterotoxina no marcada.

Johnson (1971) obtuvo una respuesta lineal de 67 a 50% de asimilación que corresponden a 0.0025 y 0.005 μg de enterotoxina B por ml. Jarvis (1974) obtuvo una respuesta lineal de 92 a 24% de asimilación que corresponden a 0.003 y 0.3 μg de enterotoxina B por ml respectivamente.

Jarvis (1974) trazó su curva standard con los datos referidos en la tabla 20. La curva standard es la representada en la fig. 8. Los datos obtenidos por Johnson (1973) en la determinación de enterotoxinas A y B en diversos alimentos son enlistados en las tablas 14, 15, 16, 17, 18.

De los datos obtenidos, Johnson (1973) reporta la siguiente sensibilidad del radioinmunoanálisis para los diversos alimentos:

Para queso: 0.0025 μg de enterotoxina A/g, y 0.001 μg de enterotoxina B/g.

Para ensalada de jamón: 0.001 μg de enterotoxina A/g, y 0.001 μg de enterotoxina B/g.

Para flan: 0.0025 μg de enterotoxina A/g, y 0.001 μg de enterotoxina B/g.

Para leche condensada: 0.001 μg de enterotoxina A/ml, y 0.001 μg de enterotoxina B/ml.

Para salami: 0.005-0.01 μg de enterotoxina A/g.

Jarvis (1974) obtuvo los datos enlistados en la tabla 6 para queso y leche en polvo y él reporta una sensibilidad de 0.006 μg de enterotoxina B/g de queso, y una sensibilidad un tanto menor para leche en polvo. Los métodos de extracción de enterotoxina del alimento que usó Jarvis fueron los mismos que usó Johnson.

La sensibilidad del radioinmunoanálisis puede ser aumentada por el uso de menos anticuerpo para la sensibilización de los tubos y usando enterotoxina marcada de actividad específica más alta, para que cantidades menores de 0.001 μg puedan ser empleadas en la prueba. Cantidades más altas de enterotoxina marcada se a visto que disminuye la sensibilidad del método.

Si los datos son referidos en inhibición la asimilación corresponde a la diferencia del valor dado de 100% de inhibición menos el valor dado de inhibición, y viceversa.

VENTAJAS. - La sensibilidad del método es adecuada para registrar las bajas concentraciones de enterotoxinas encontradas en los alimentos, no existen problemas con reacciones que puedan enmascarar los resultados y éstos son obtenidos en un período de tiempo bastante aceptable.

DESVENTAJAS. - Los aparatos utilizados son poco accesibles a la mayoría de los laboratorios, y se requiere gente especializada para manipular los reactivos y los aparatos.

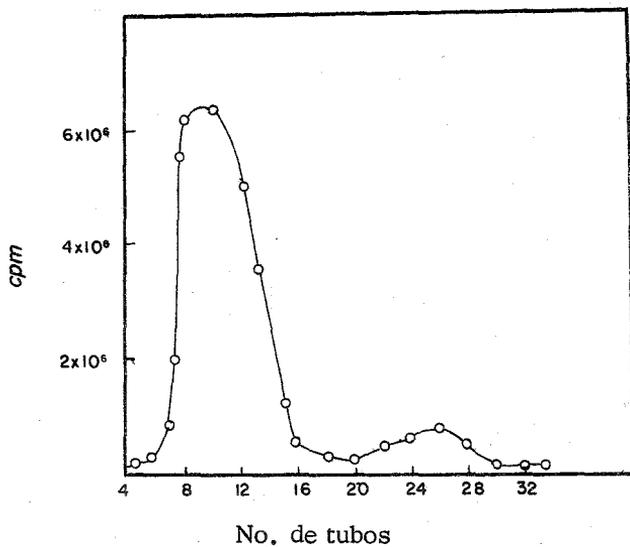


Fig. - Separación de enterotoxina B-1251 de 125I libre por una columna de Sephadex. El primer pico corresponde a enterotoxina B - 1251.

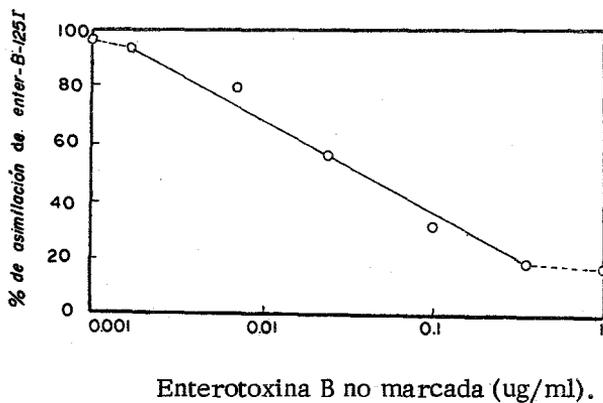


Fig. 8. - Inhibición de asimilación de enterotoxina B - 1251 por enterotoxina B no marcada.

TABLA 14.

Inhibición de la combinación de enter-1251 a tubos cubiertos con -
su anticuerpo por extractos de enterotoxina en ensalada de jamón.

Sistema de enterotoxina.	Inhibidor (extracto)	Concentración de inhibidor (μg adicionados/g de ensalada de jamón).	Inhibición (%) Duplicados	Promedio
Enterotoxina A marcada con 1251 y tubos cubiertos con anti-A	Ensalada de jamón.		13.9, 14.9	14.4
	Enter. A en ensalada de jamón	0.001	25.2, 21.1	23.1
		0.0025	34.4, 34.5	34.4
		0.005	44.5, 44.4	44.5
		0.01	56.7, 54.8	55.7
	Enter. B en ensalada de jamón.	0.01	7.9, 7.0	7.4
Enterotoxina B marcada con 1251 y tubos cubiertos con anti-B.	Ensalada de jamón.		21.7, 11.7	16.7
	Enter. B en ensalada de jamón.	0.001	33.6, 29.1	31.3
		0.0025	43.3, 43.1	43.2
		0.005	60.5, 57.2	58.8
		0.01	72.1, 66.5	69.3
	Eter A en ensalada de jamón.	0.01	25.1, 15.8	20.4

TABLA 15

Inhibición de la combinación de enter-1251 a tubos cubiertos con -
su anticuerpo por extractos de enterotoxina en queso cheddar.

Sistema de enterotoxina.	Inhibidor (extracto)	Concentración de inhibidor (μg adiccionados/g de queso)	Duplicados	Inhibición (%) Promedio
Enterotoxina A marcada con 1251 y tubos cu biertos con anti.-A.	Queso		13.1, 11.5	12.3
	Enter. A en queso.	0.001	11.1, 0.9	6.0
		0.0025	29.0, 32.1	30.5
		0.005	31.6, 34.4	33.0
		0.01	41.9, 41.8	41.9
		0.02	62.7, 67.9	65.3
	Enter. B en queso.	0.02	11.4, 15.7	13.5
Enterotoxina B marcada con 1251 y tubos cubiertos con anti- B.	Queso		13.1, 11.5	12.3
	Enter. B en queso.	0.001	30.5, 23.0	26.7
		0.0025	39.6, 41.5	40.5
		0.005	56.3, 57.6	56.9
		0.01	68.1, 70.7	69.4
		0.02	71.5, 70.6	71.1
	Enter. A en queso.	0.02	14.9, 9.1	11.5

TABLA 16

Inhibición de la combinación de enter-1251 a tubos cubiertos con su anticuerpo por extractos de enterotoxina en flan.

Sistema de enterotoxina.	Inhibidor (extracto)	Concentración de inhibidor (μg adicionados/ g de flan)	Inhibición (%)	
			Duplicados	Promedio
Enterotoxina A marcada con 1251 y tubos cubiertos con anti - A.	Flan		10.0, 11.6	10.8
	Enter. A en flan.	0.001	18.8, 20.4	19.6
		0.0025	36.8, 35.8	36.3
		0.005	46.2, 44.5	45.3
		0.01	55.8, 58.2	57.0
		0.02	68.5, 72.1	70.3
	Enter. B en flan.	0.02	11.8, 9.6	10.7
Enterotoxina B marcada con 1251 y tubos cubiertos con anti- B.	Flan		6.8, 0.4	3.6
	Enter. B en flan.	0.001	36.2, 20.3	28.2
		0.0025	49.1, 38.6	43.8
		0.005	56.0, 49.1	52.5
		0.01	64.9, 67.7	66.3
		0.02	72.4, 73.5	72.9
	Enter. A en flan.	0.02	3.8, 19.8	7.3

TABLA 17

Inhibición de la combinación de enter-1251 a tubos cubiertos con su anticuerpo por extractos de enterotoxina en leche condensada.

Sistema de Enterotoxina.	Inhibidor (extracto)	Concentración de inhibidor (μ g adicionados/ml de leche)	Inhibición (%) Promedio.
Enterotoxina A Marcada con 1251 y tubos cubiertos con	Leche		7.9
	Enter. A en leche.	0.001	21.4
		0.0025	38.1
		0.005	48.5
		0.01	58.9
		0.05	73.6
		0.1	78.6
		0.1	8.0
Enterotoxina B marcada con 1251 y tubos cubiertos con anti - B.	Leche		7.9
	Enter. B en leche.	0.001	24.5
		0.0025	47.7
		0.005	60.5
		0.01	67.5
		0.05	72.8
		0.1	74.9

TABLA 18.

Inhibición de la combinación de enter A-1251 a tubos cubiertos con anti-A por extractos de enter. en salami.

Inhibidor (extracto)	Concentración de inhibidor (μ g adicionales/g de salami)	Inhibición (%)	
		Duplicados	Promedio
Salami		11.8, 17.6	14.7
Enter. A en salami	0.002	11.7, 13.1	12.6
	0.005	25.9, 15.1	21.5
	0.01	47.2, 38.1	42.6
	0.02	65.8, 63.8	64.8

TABLA 19

Inhibición de la asimilación de enter B-1251 por enter. extraída de queso y leche en polvo.

Alimento	Enter. adicionada al alimento (μ g/g)	Asimilación de enter B- 1251 (%)
Queso	Nil	100
	0.002	94
	0.006	62
	0.02	38
	0.2	25
Leche en polvo	Nil	90
	0.002	80
	0.006	74
	0.02	51
	0.2	28

TABLA 20

Inhibición de la asimilación de SEB-1251 por diversas cantidades de enter. nomarcada

Enter. no marcada (μg)	cpm +	Asimilación de SEB-1251 (%) * *
Nil	16 380	100
Nil	17 008	
Nil	18 163	
0.001	16 640	98
0.001	16 662	
0.003	15 310	
0.003	15 210	
0.003	16 477	
0.01	13 150	79
0.01	13 998	
0.01	13 574	
0.03	10 060	61
0.03	10 569	
0.03	10 652	
0.10	6 165	36
0.10	6 479	
0.10	6 061	
0.30	4 531	24
0.30	4 015	
0.30	4 136	
1.0	3 647	20
1.0	3 549	
* Blanco	180	
* Blanco	167	

* Blanco indica acoplamiento no específico ejem. nada de enter. normar - cada ó antisuero.

* % de asimilación calculado por medio de la fórmula:

$$\frac{\text{Promedio de cpm - blanco}}{\text{cpm sin enter. nomarcada (Nil)}} \times 100$$

+ cpm Cuenta radiactiva por minuto.

MÉTODOS DE DETERMINACION QUE POR SU SENSIBILIDAD PUEDEN SER ÚTILES EN EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS.

Los métodos que se dan a continuación no han sido utilizados para la determinación de enterotoxinas en alimentos, tan solo lo han sido en -- filtrados de cultivo, pero son citados aquí a causa de que su sensibilidad los hace adecuados para la determinación de enterotoxinas en alimentos. Los métodos incluidos son aglutinación de latex, electroinmunodifusión - de Laurell, y un radioinmunoanálisis.

I. - AGLUTINACION DE LATEX.

El procedimiento que se cita a continuación fue descrito por Salomon y Tew (1968).

Preparación del buffer de borato salino. - 3.1 g de H_3BO_3 , 2.0 g - de Na Cl y 6.25 ml de NaOH 1 en un litro.

METODOLOGIA.

Preparación del látex. - Se agregan partículas de látex de poliestireno (0.17 ó 0.22μ) a un buffer de borato salino (BSB) de fuerza iónica -- 0.04μ y pH 8.2, hasta dar una suspensión de 0.1 % de sólidos de látex.

Se adiciona antisuero específico a enterotoxina a una alícuota de - 100 ml de la suspensión, hasta dar una concentración final de antisuero - de 1:1000.

Se deja en incubación a $56^\circ C$ por 1.5 hr con agitación suave y breve cada 15 minutos y se almacena por 12 hr a $4^\circ C$. Las partículas de látex sensibilizadas de éste modo pueden ser almacenadas a $4^\circ C$ por más -

de tres meses sin alteración.

Determinación. - En equipo de microanálisis que consiste de placas de fondo V, se agrega BSB conteniendo 0,07 % de seroalbúmina de bovino, - en cantidades de 50 μ l a cada uno de los manantiales del 2 al 12. Los problemas se colocan en los manantiales 1 en alicuotas de 100 μ l. Se hacen diluciones seriadas simultáneamente en cada caja, pasando 50 μ l del contenido del manantial 1 al 2, se mezcla golpeando suavemente los lados de las cajas, se pasan 50 μ l del contenido del manantial 2 al 3 (se mezcla), - y así sucesivamente hasta el manantial 12. Esto se hace en todas las hileras de manantiales.

Finalmente se adicionan 25 μ l de látex sensibilizado a cada uno de los manantiales y se mezcla golpeando suavemente los lados de las cajas. Las cajas se sellan y se dejan toda la noche a 23°C en un área libre de vibraciones. Después de éste lapso de tiempo se procede a ver los resultados de la prueba.

El punto final de la titulación se considera en el último manantial - en las series de dilución que muestra una diferencia detectable a los manantiales control conteniendo un blanco, es decir una aglutinación parcial detectable.

La cantidad de toxina en las muestras de prueba se calcula con la ecuación: toxina/ml de solución original = detección límite $\times 2^{n-1}$. Donde la detección límite es la cantidad más baja de toxina que puede ser determinada bajo las condiciones particulares del análisis, y n es el número - del manantial en el cual el punto final de una muestra dada fue encontrado.

Se pueden emplear métodos gráficos análogos.

La sensibilidad reportada es de 2×10^{-4} μg de enter B/ml de muestra que equivale a 1×10^{-5} μg /manantial.

VENTAJAS. - La determinación se puede llevar a cabo de una manera sencilla, se obtienen resultados en un período de tiempo aceptable y la sensibilidad es bastante alta.

DESVENTAJAS. - Es un poco difícil determinar el punto final.

II. - ELECTROINMUNODIFUSION DE LAURELL.

El método descrito a continuación es el que utilizaron Gasper, Heimsch, y Anderson (1973) para la determinación de enterotoxina.

Anticuerpo. - El anticuerpo que utilizaron fue antisuero liofilizado de conejo, proporcionado por M. S. Bergdoll del Food Research Institute and Department of Food Science, Universidad de Wisconsin. Fue restaurado a su volumen original por la adición de 1 ml de buffer de barbital-NaOH de fuerza iónica 0.05μ (pH 8.6) preservado con 0.1 mg de mertiolate por ml. Las soluciones de trabajo se preparan por la dilución 1:4 con el mismo buffer. Se almacenan a 4°C . La sensibilidad óptima del antisuero reconstituido no se ve afectada hasta después de 7 a 10 días de encontrarse almacenado. Una dilución de antisuero 1:36 detecta $1 \mu\text{g}$ de toxina por ml usando la técnica de microplaca.

Preparación del gel de agarosa conteniendo anticuerpo. - El medio-soporte sólido consiste de agarosa al 1% en buffer de barbital 0.05μ , pH 8.6. Se prepara calentando el buffer, agregando el agarosa y poniendo a ebullición hasta total disolución. Inmediatamente después se filtra a través

de un filtro de vidrio granulado (granulación gruesa). Se almacena a 4°C - en recipientes con tapón de rosca. Para utilizarlo, el contenido de un re-
 cipiente se funde en agua hirviente y se equilibra a 47°C en un baño de agua a temperatura constante. En éste paso se adiciona el antisuero que se pre-
 paró anteri ormente a una dilución 1:4 (Vol/vol) hasta dar la concentración final deseada. El recipiente se toma entre las palmas de las manos y se -
 gira hacia uno y otro lado para asegurar una distribución uniforme del an-
 tisuerdo de enterotoxina en el agarosa. Usando una pipeta caliente, el aga-
 rosa conteniendo el anticuerpo se transfiere a un molde (#) y se deja soli-
 dificar por espacio de 10 a 15 minutos a 4°C.

METODOLOGIA.

(#) Preparación del molde. - Consiste de una plantilla de plástico -- (81 por 100*1 mm) colocada entre dos placas fotográficas de vidrio (diapo-
 sitiva de 81 por 100 mm), todo lo anterior se mantiene junto por medio de
 grapas. A la plantilla de plástico se le corta una sección de 50 por 70 mm,
 para que en el hueco que queda agregar el agarosa derretido. La sección-
 se corta de tal manera que el borde de 70 mm sea paralelo al borde de 81
 mm de las placas de vidrio. Previo al uso de las placas fotográficas de --
 vidrio, éstas se limpian por medio de autoclave ó vaporización en una so-
 lución detergente moderada por aproximadamente 15 minutos, se lavan --
 muy bien con agua destilada, y se almacenan en una solución Photo-Flo --
 200 (Eastman Kodak, Rochester, N. Y.) hasta que sean utilizadas. Cuando
 el molde es ensamblado, las placas se lavan nuevamente con agua destila-
 da. Las grapas se colocan de tal manera que el marco pueda ser colocado

recto sobre un nivel de superficie tal que uno pueda pipetear el agarosa desde arriba, cuidadosamente, para evitar que queden atrapadas burbujas de aire.

Preparación del gel de agarosa para electroforesis. - Después de que se ha endurecido el gel, se quitan las grapas y el resto del molde se coloca sobre un nivel de superficie de tal manera que uno de los bordes de la plantilla quede recargado sobre una caja. La placa de vidrio de arriba se empuja cuidadosamente fuera del gel y sobre la caja. Se quita también la plantilla de plástico, y, cualquier exceso de humedad alrededor de la plancha de agarosa-anticuerpo se quita con un paño. La sección central (40 por 50 mm) del gel se cubre con una placa de Lucite, dejando a cada lado de ella secciones de 15 por 60 mm de gel para contacto con puentes eléctricos. La placa de Lucite tiene dimensiones totales de 40 por 100 por 4 mm, con un soporte base a cada extremo de 40 por 10 por 1 mm y a la cual se le han practicado 4 agujeros como se muestra en la fig. 10. La altura del soporte base es para igualar el grosor del gel de agarosa para que la placa de Lucite pueda ser colocada sobre el gel sin ejercer una presión indebida. Es esencial excluir todas las burbujas de aire de la interfase entre el gel y la placa de Lucite (ésto es fácilmente llevado a cabo poniendo unas cuantas gotas de buffer de barbital-NaOH 0.05 μ , pH 8.6, sobre la cara de la placa que va a estar en contacto con el gel) y remover cualquier exceso de líquido a lo largo de los bordes de 70 mm del gel. A través de los agujeros en la placa de Lucite se hacen 4 agujeros de 4 mm de diámetro en el gel de agarosa con un tubo de vidrio (ver la fig. 9).

Electroforesis. - La placa de vidrio con el gel preparado se coloca sobre una superficie refrigerante en una unidad convencional de inmunoelectroforesis. La superficie refrigerante se mantiene a 24°C por medio de un baño de agua. En ambos recipientes de electrodo se agrega buffer de barbital-NaOH de fuerza iónica 0,1 μ , pH 8,6 . Los puentes eléctricos se construyen con tiras (55 por 70 mm) de papel filtro Whatman No. 3 mm. Los pabilos se humedecen en el buffer y los bordes cortos se colocan de tal manera que queden tocando la placa de Lucite, para que ninguna porción de la superficie del gel quede expuesta al aire. Los pabilos se cubren con tiras de plástico como las comunmente usadas en inmunoelectroforesis. Finalmente, la superficie entera de los pabilos expuesta al aire, se cubre con una pelcula de plástico.

Se aplica una corriente constante de 25 mA(5 mA/cm) por espacio de 5-10 minutos hasta que el voltage alcanza un valor constante. Este valor se ajusta entonces a 10-11 V/cm (medio entre los pabilos) aumentando ó disminuyendo el nivel del buffer en los recipientes de electrodo. Una vez ajustado, éste nivel de voltage es siempre alcanzado en carreras subsiguientes. Después de que se han alcanzado condiciones electroforéticas constantes, los manantiales de muestra se llenan con volúmenes de 10 μ l de problema. La electroforesis dura de 1-8 hrs. La vida del buffer se alarga si se desvía la polaridad sobre la unidad de electroforesis después del término de cada experimento (la hilera de los manantiales de muestra en el gel de agarosa se encuentra del lado del cátodo).

Detección de los conos de precipitación. - Después de la electrofo-

resis, se retiran los puentes eléctricos y la placa de Lucite, y el gel de agarosa se sumerge en NaCl 0.2 M por 1 hr. a temperatura ambiente, y luego se lava brevemente en agua destilada. Se quita cualquier exceso de agua pasando cuidadosamente un paño absorbente tocando los lados y la superficie del gel. La superficie del gel se cubre entonces con una capa de suero de carnero antiglobulina de conejo diluida 1:10 en buffer de barbital-NaOH 0.05M, pH 8.6, y preservada con 0.1 mg de mertiolate por ml. Se deja reaccionar 1 hr. a temperatura ambiente y después de éste tiempo se recupera la globulina y se almacena a 4°C para uso posterior. El remanente de globulina se quita bajo la acción de una suave corriente de agua destilada seguida por la inmersión de la plancha de gel en una solución acuosa al 1% de acetato de cadmio. La cubierta del gel con suero de carnero antiglobulina de conejo y la inmersión en el acetato de cadmio es para aumentar el volumen y densidad de los complejos originales antígeno-anticuerpo y así mejorar su visibilidad. Los conos de precipitación se desarrollan ó se vuelven visibles en 15 a 30 minutos. Si se tiñe con rojo de tiazina al 0.1% en ácido acético al 1% por 15 a 30 minutos se mejora la visibilidad de los conos. Las líneas de precipitación pueden ser observadas mejor poniendo el gel sobre el campo obscuro de una caja y observando por el mirador y además compaginando la caja con una fuente circular de luz fluorescente. La longitud de los conos de precipitación se mide desde 0.5 mm desde el centro del manantial de muestra a la punta del cono. Respecto a los conos, extremos redondeados de éstos indica-

exceso de antígeno, extremos puntiagudos, exceso de anticuerpo, dependiendo del tiempo de electroforesis.

El campo eléctrico es constante de 2-3 hrs. de electroforesis, luego declina en fuerza.

Se debe correr un standard para el cálculo de la concentración.

Registros. - El gel de agarosa, transferido sobre una diapositiva completamente limpia, se sumerge en alcohol etílico al 95% por 1 hr. a temperatura ambiente, después se drena el exceso de alcohol, y el gel se seca a 37°C hasta que queda una película delgada, se etiqueta y se almacena en una caja seca libre de polvo. El tratamiento con alcohol asegura que el secado sea rápido y que el gel no se distorciona. Para la revisión de alguna placa el gel seco debe ser humedecido para que los conos de precipitación sean visibles nuevamente.

Este procedimiento alcanza su límite de detección reproducible a 1.5 ng de toxina por manantial y a una dilución de antisuero de aproximadamente 1:400. Lo anterior quiere decir que el método tiene una sensibilidad de 0.15 µg de enterotoxina A/ml.

La sensibilidad puede ser mejorada pero se requieren diluciones más altas de anticuerpo en el gel de agarosa para formar conos de precipitación de longitud medible. Los conos así obtenidos llegan a ser difícilmente vistos por el ojo humano, por lo cual se tendrían que desarrollar medios de visualización.

VENTAJAS. - No hay problema de reactividad antigénica cruzada, se pueden correr varias muestras al mismo tiempo ó diluciones de la

la enterotoxina patrón para elaborar la curva standard y se obtienen resultados en un tiempo aceptable.

DESVENTAJAS. - La sensibilidad tal vez sea un poco baja pero se encuentra dentro del rango de detección de enterotoxina en alimentos, y - además requiere una amplia manipulación de material.

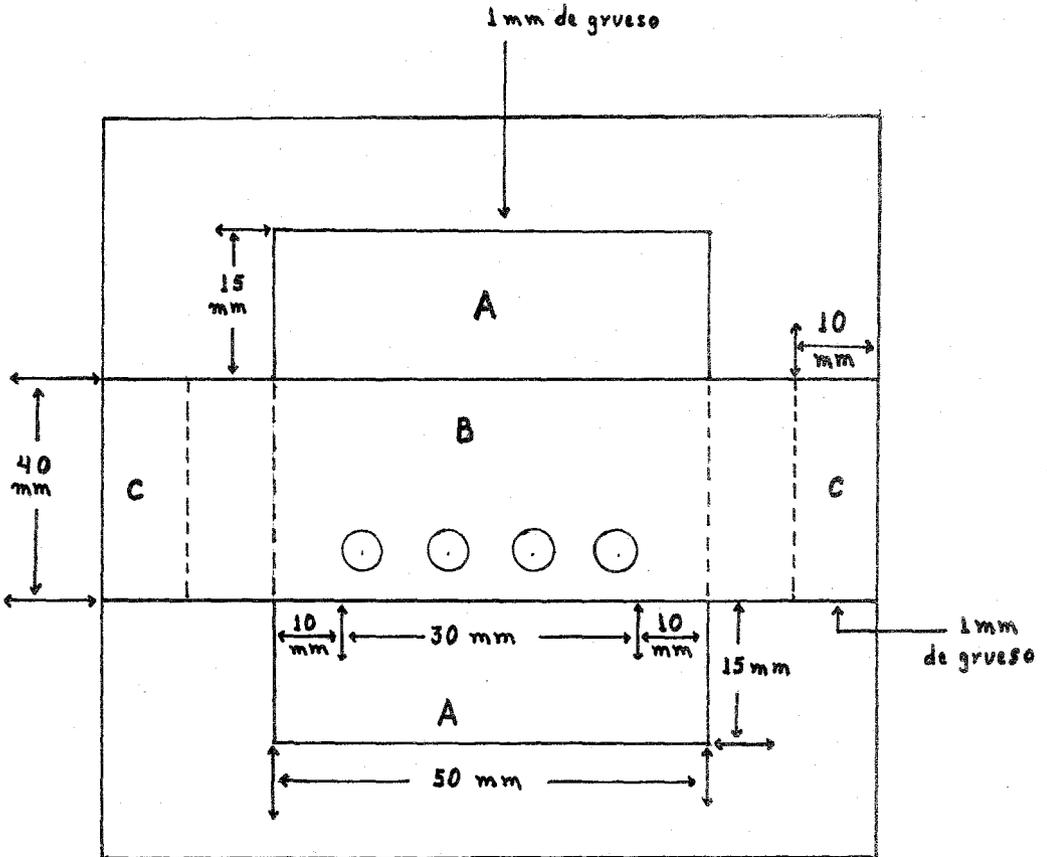
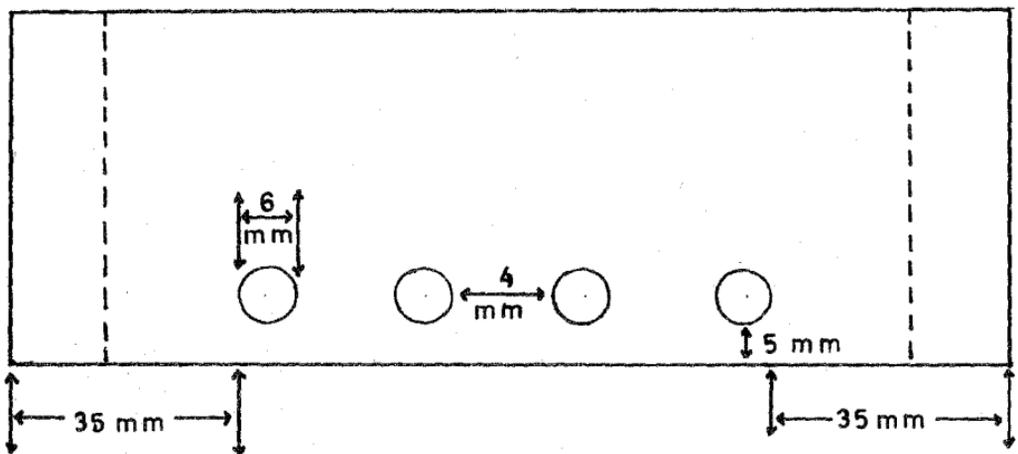


Fig. 9.- Esquema del gel de agarosa y la placa de Lucite colocados sobre la placa de vidrio. A, áreas de contacto del gel para la conexión con los puentes eléctricos; B, placa de Lucite provista de cuatro agujeros para muestra; C, soportes base de la placa de Lucite.

Fig. 10. - PLACA DE LUCITE.



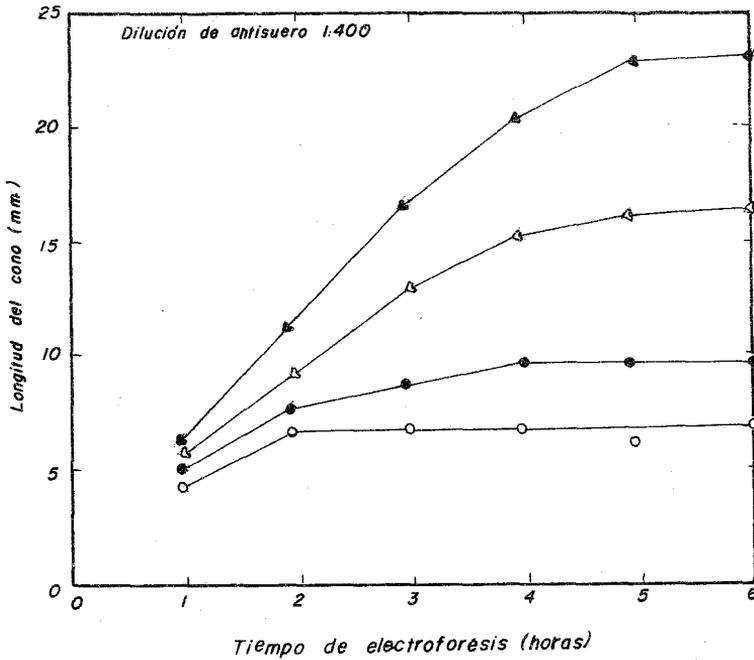


Fig. 11.- Dependencia de la longitud del cono de precipitación sobre la - duración de electroforesis, concentración de enterotoxina, y dilución de anticuerpo en el gel de agarosa. Concentraciones de enterotoxina A: 0, 0.15 ug/ml; 0, 0.30 ug/ml; , 0.60 ug/ml; , 1.0 ug/ml (correspondiendo a 1.5, 3.0, 6.0, y 10 ng de toxina -- aplicada a cada manantial, respectivamente).

III. - RADIOINMUNOANALISIS EN FASE SOLIDA.

El método que se describe a continuación fue utilizado por Collins, Metzger, y Johnson (1972) para la determinación de enterotoxina, y difiere del mencionado anteriormente, en la fase sólida usada y en que en este método se determina el antígeno marcado no combinado.

METODOLOGIA.

Preparación de anticuerpo combinado a bromoacetilcelulosa.

Las inmunoglobulinas G se separan de la antitoxina anti-enter B -- usando una columna de dietilaminoetil Sephadex A-50 equilibrada con un buffer de Trometamina-HCl 0.1 M a pH 8.3. El eluato 0.1 M contiene la porción mayor de las inmunoglobulinas G. Este componente IgG se concentra por ultracentrifugación y se combina con bromoacetilcelulosa (BAC).

La combinación con bromoacetilcelulosa se hace de la manera siguiente: aproximadamente 50 a 100 mg (D. 0. 280 nm) de la fracción de IgG de la anti-enter B se adiciona a 50-100 mg de BAC suspendida en 20 ml de buffer de fosfato y citrato 0.1 M (pH 4.6) y se agita vigorosamente por 24 hrs. a temperatura ambiente. Después de esto el complejo anticuerpo-BAC se centrifuga a 25,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se resuspende en 20 ml de NaHCO₃ 0.1 M y el pH se ajusta a 8.6 con NaOH 0.01 N y se deja a 4°C por 24 hrs. El complejo anticuerpo-BAC se centrifuga entonces a 25,000 x g por 10 minutos y se suspende en monoetanolamina 0.1 M (en NaCl 0.14 M) la cual se debe ajustar previamente a pH 8.6. Después de 24 hrs a 4°C el anticuerpo-BAC se centrifuga y se lava tres veces con

20 ml de NaCl 0.14 M y finalmente se resuspende en 40 ml de buffer de borato 0.2 M pH 8.3 y conteniendo 0.7% de seroalbúmina de Bovino (BSA) y se almacena a 4°C.

Preparación del antígeno. - La toxina se marca con 125I por medio del método de cloramin-T, por el uso de una relación de 10:1 de cloramin-T a proteína, y 5 mCi 125I a 100 µg de enterotoxina B. Después de la marcación, el 125I libre se separa por diálisis contra cargas múltiples 2 a 1 de buffer de fosfato salino 0.01 M hasta que 95% de la radiactividad en esta preparación marcada pueda ser precipitada por ácido tricloroacético al 10%. La actividad específica debería ser 1.5 a 3 µCi/µg de enterotoxina B.

La enterotoxina radiomarcada se almacena a -20°C. Antes de usar se diluye con buffer de borato-BSA para dar 3750 a 7500 dpm/10 µl en la prueba.

Determinación de la concentración de anticuerpo-BAC por pruebas de inhibición. - Un análisis de la concentración del anticuerpo combinado con la BAC se lleva a cabo para establecer el óptimo a ser usado en las pruebas de inhibición. El complejo anticuerpo - BAC se diluye de un rango de 1:2 a 1:10,000 en buffer de borato-BSA. Medio ml de cada dilución se adiciona por duplicado a tubos de centrifuga de policarbonato de 16 x 100 mm y 10 µl de antígeno 125I-enter B se adicionan a cada tubo. Los tubos se agitan vigorosamente sobre un vibrador por 15 minutos a temperatura ambiente y 2 hr. a 4°C. Se adiciona uno y medio ml de buffer de borato-BSA y los tubos se centrifugan a 25,000 x g por 15 minutos a 4°C. A un ml del sobrenadante se le determina la cuenta radioactiva.

Prueba de inhibición. - Collins (1972) construyó una curva de inhibición de la siguiente manera: se usa una dilución del anticuerpo-BAC que -- precipita 50 a 60% del antígeno 125I-enter B. El antígeno no marcado, a -- una concentración inicial de $1\mu\text{g/ml}$, se diluye por un rango de - - - - - 1:1000. $100\mu\text{l}$ de cada dilución se adiciona por duplicado a porciones de -- 0.5 ml del anticuerpo-BAC diluido. Después de la adición de $10\mu\text{l}$ del antf-- geno marcado, los tubos se agitan vigorosamente por 15 minutos a tempe-- ratura ambiente y 2 hrs. a 4°C . Después de ésto se adiciona a cada tubo -- uno y medio ml de buffer de borato-BSA frío y los tubos se centrifugan a -- 25,000 x g por 15 minutos. La radioactividad en un ml del sobrenadante se determina para analizar la cantidad de antígeno marcado que no fue combi-- nado por el anticuerpo -BAC.

La curva de inhibición obtenida del uso de cantidades conocidas de - enterotoxina B no marcada se muestra en la fig. 12. Puede ser visto clara-- mente que concentraciones de enterotoxina B no marcada en el rango de --- $1\mu\text{g/ml}$ y $0.01\mu\text{g/ml}$ pueden ser medidas por éste método.

El anticuerpo-BAC tiene una vida útil de 6 meses.

Las ventajas y desventajas de éste método son las mismas que para el método de Johnson (1971) sólo que éste método es un poco más rápido.

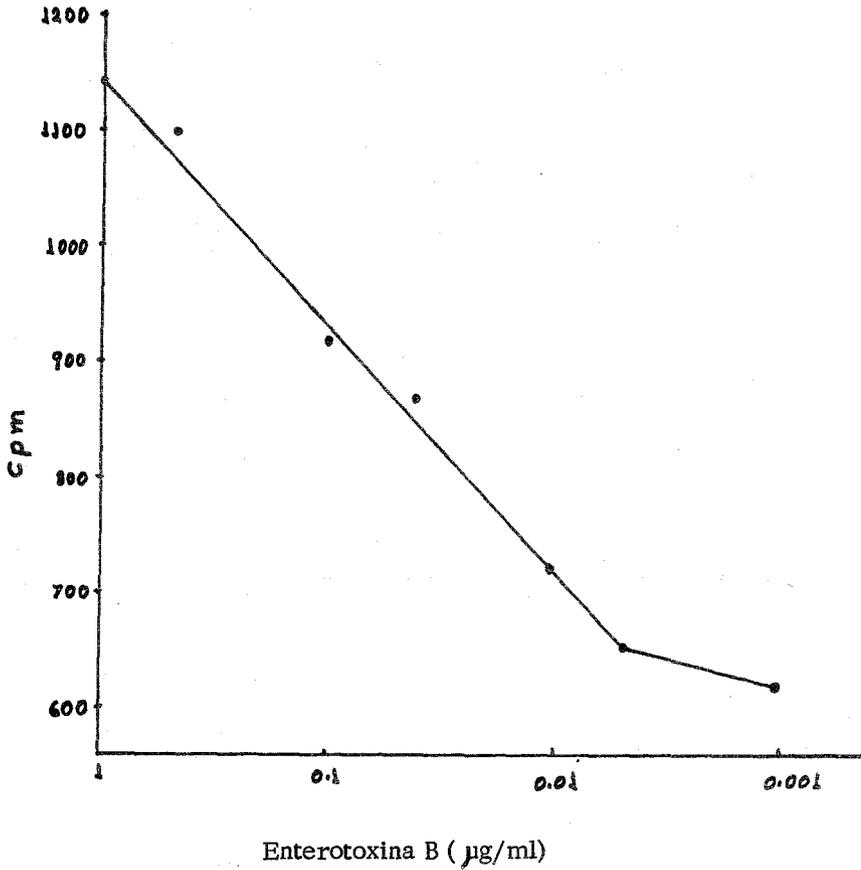


Fig. 12. - Curva de inhibición para enterotoxina B determinada por la gráfica de la cantidad de radioactividad (CPM) remanente en el sobrenadante contra los microgramos de enterotoxina B no marcada.

DISCUSION

Para la determinación de enterotoxina en un alimento se requiere de dos pasos: a) extracción de la enterotoxina del alimento, y b) determinación de la enterotoxina en el extracto del alimento.

En lo que se refiere a la extracción de la enterotoxina del alimento, los métodos empleados hasta la fecha son bastante largos, llegando a necesitarse, en algunos casos, de varios días para su completa ejecución.

De los diversos métodos mencionados, algunos ofrecen la ventaja de la rapidez con que se llevan a cabo, y otros la ventaja de la cantidad -- de enterotoxina recuperable del alimento, aunque éste en realidad no es -- una gran ventaja sobre los demás métodos, ya que si en un alimento se -- detecta enterotoxina, no importa en que cantidad, éste alimento debe ser -- considerado no apto para ser consumido.

Los métodos que ofrecen una mayor ventaja en cuanto a tiempo empleado, son los métodos de Stojanow (1965), el de Genigeorgis (1976), y el de Reiser (1974). De éstos métodos, el de Stojanow (1965) es el más -- corto, aunque no menciona el tipo de enterotoxina que usó, ni el tipo de -- alimento para el cual es útil, sin embargo, por el año en que se efectuó -- la investigación se debe haber utilizado ya sea enter. A ó enter. B, ó ambas, y respecto al tipo de alimento de alimento, parece ser que es útil para productos cárnicos ó carne y tal vez para productos lácteos (incluye un paso de separación de grasa solidificada).

Respecto a la recuperación de enterotoxina del alimento, los métodos que ofrecen mayores ventajas son el de Casman y Bennett (1965) y --

el de Genigeorgis (1976).

El método de Genigeorgis (1976), como puede verse, es el método que puede llegar a ser más útil cuando llegue a ser perfeccionado, por el hecho de que es un método rápido, general para todo tipo de alimentos, - general para todo tipo de enterotoxina, y recupera una gran cantidad de - enterotoxina del alimento. Por lo pronto, para hacer un estudio de productos lácteos, es recomendable usar el método de Read (1965 a, b), que es específico para éste tipo de alimentos.

Un gran problema que se presenta en la determinación de enterotoxina es que ninguno de los métodos de extracción de ésta del alimento, proporciona enterotoxina monovalente ó libre de impurezas que ocasionan reacciones cruzadas en ciertos métodos de determinación que podrían ser muy-útiles, como es el caso de inmunofluorescencia, que es un método rápido y sencillo (método no mencionado en la presente por no ser adecuado para -- propósito de diagnóstico) y que queda descartado por el hecho de que da una reacción falsa positiva muy intensa (mucho más que los otros métodos que-- presentan éste tipo de reacciones) a causa de la proteína A, que se encuentra presente en el 98% de las especies de *S. aureus* coagulasa positiva. Lo-- anterior fue demostrado en una revisión hecha por Forsum y Forsgren - -- (1972) a los métodos utilizados por otros investigadores.

Otros métodos de determinación de enterotoxina que presentan reacciones cruzadas por ésta causa, y que nos dan resultados en un tiempo bastante corto son Radioinmunoanálisis y Hemaglutinación Pasiva Invertida -- (Bennett y Keoseyan 1973). En éstos casos las reacciones cruzadas son -- causadas por las hemolisinas presentes en las enterotoxinas purificadas.

Las reacciones cruzadas disminuyeron por el tratamiento del extracto del alimento con una proteasa (tripsina) como lo hicieron Reiser, Conaway y Bergdoll (1974), pero no lograron que dichas reacciones fueran nulas, y por los resultados obtenidos Radioinmunoanálisis y Hemaglutinación Pasiva Invertida no son recomendables para propósitos de diagnóstico.

Los métodos más seguros para propósito de diagnóstico son los de difusión en gel, como en el caso de microplaca que está siendo utilizado en varios laboratorios de EEUU y se dice que con buenos resultados (Bennett y McClure, 1976).

Bennett y Keoseyan (1973) realizaron un estudio para comparar los métodos de microplaca, radioinmunoanálisis y hemaglutinación pasiva invertida, y como resultado obtuvieron que la microplaca puede ser tan sensible ó más que éstos dos últimos métodos, y además con la ventaja de que es más confiable, por no presentar reacciones cruzadas (Los resultados son dados en las tablas 21, 22, 23, 24, 25, 26).

Los métodos antes mencionados son los más rápidos y sensibles y pueden ser los que sean más útiles cuando se logre obtener un suero monovalente.

Respecto a los métodos que no han sido utilizados en alimentos tal vez valdría la pena hacerlo, ya que por ejemplo el método de fijación de látex es un método muy sensible, sencillo y rápido, que podría ser muy útil, y además no se reporta que presente reacciones falsas positivas cuando se han determinado enterotoxinas purificadas.

CONCLUSIONES

La importancia del estafilococo en intoxicaciones alimenticias, como puede verse es muy grande, ya que produce una o varias enterotoxinas, que son las causantes de uno de los envenenamientos alimenticios más frecuentes en nuestro medio.

Es por ésto que es importante conocer las características del microorganismo, los medios y condiciones que son favorables para la producción de enterotoxinas, así como los medios de determinación de las mismas, con ésto, en un momento dado se pueden tomar las medidas necesarias para prevenir el desarrollo de estafilococos en alimentos y por consiguiente la producción de enterotoxinas.

Actualmente para diagnóstico de intoxicación alimenticia causada por estafilococo se realiza aislando el microorganismo y poniéndolo en un medio adecuado se determina si es productor de coagulasa ya que ésta característica va aunada a la producción de enterotoxina, pero éste es un método que no parece adecuado, ya que puede ser que el microorganismo no produzca enterotoxina en las condiciones presentes en el alimento.

Lo mejor es realizar la determinación de la enterotoxina directamente del alimento. Por desgracia, ésto plantea un problema y es que para hacerlo se necesitan dos pasos: extracción y determinación, que en conjunto, aun en los métodos que utilizan menos tiempo, éste es muy largo.

Los únicos métodos sensitivos accesibles para éste propósito, estan basados en el uso de anticuerpos específicos para cada una de las enterotoxinas que han sido identificadas. Esto plantea dos problemas: a) puede ser-

necesario un análisis para cada una de las 5 enterotoxinas identificadas, - y b) no han sido identificadas todas las enterotoxinas existentes. En el -- último de los casos éstas pueden representar solamente un pequeño porcen-- taje (menos del 5%) de los inicios de intoxicación alimenticia, y además la enterotoxina D aún no ha sido purificada y por lo tanto no puede ser deter-- minada.

Tal vez el problema deba centrarse en desarrollar una técnica de - extracción de enterotoxina que proporcione un suero monovalente que per-- mita efectuar una determinación de enterotoxina con las técnicas adecua-- das en cuanto a rapidez y sensibilidad.

El método que se sugiere para la determinación de enterotoxina es el método de microplaca (Bennett y McClure, 1976) por el antecedente que se tiene de que está siendo empleado en EEUU en varios laboratorios con-- propósito de diagnóstico y por el estudio realizado por Bennett y Keoseyan (1973) en el cual obtuvieron los mejores resultados con el método de mi-- croplaca.

Actualmente con la tecnología que se cuenta es preferible hacer la determinación de estafilococo coagulasa positiva.

TABLA 21.

Detección serológica de enterotoxinas A Y B en caldos de cultivos de especies enterotoxigénicas de *S. aureus*.

Especie	Tipo de enterotoxina	Microplaca (1)		Microplaca (2)		RIA		HPI (1)		HPI (2)	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
262 (56)	A, B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
485	A, B, D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
243	B	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Staph I	C	-	-	n/b	-	-	-	+	+	+	+
789	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BHIB ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Abreviaciones: Radioinmunoanálisis (RIA); Hemaglutinación pasiva invertida (HPI). (1) y (2) se refiere a los resultados de dos diferentes laboratorios.

(a) El doble signo representa resultados obtenidos en dos diferentes pruebas con HPI (2).

(b) No se observó líneas de precipitación (nl).

(c) Caldo infusión cerebro - corazón no-inoculado.

TABLA 22.

Respuesta de métodos serológicos con antisuero de enterotoxina B a fluidos de cultivo de enterotoxina A producida por especies de *S. aureus*.

Especie	Micoplaca (1)	Microplaca (2)	RIA	HPI(1)	HPI (2)
196 E	-	-	-	-	<u>+</u> b
D 510	-	-	-	+	+
267	-	-	-	-	<u>+</u>
787	-	-	-	-	+
786	-	-	-	-	+
265 - I	-	-	-	+	+
S - 100	-	-	-	-	+
743	-	-	-	+	+

(b) El doble signo representa resultados obtenidos de dos diferentes pruebas con HPI (2).

TABLA 23.

Respuesta de métodos serológicos con antisuero de enterotoxinas A y B a fluidos de cultivo de estafilococos no-enterotoxigénicos.

Especie	Microplaca (1)		Microplaca (2)		RIA		HPI (1)		HPI (2)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
298	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
R - 124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D - 87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
R - 121	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
W - 46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
785	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

TABLA 24

Comparación de tres métodos para la detección de enterotoxina A
en alimentos

Alimento	Enterotoxina adicionada (mg/g)	Microplaca	RIA	HPI (1)	HPI (2)
Salami	0.01	+	+	Na ^a	Na
	0.005	+	-	-	+
	0.0025	+	-	+	+
	0.0012	+ b	-	+	+
	0.0	-	-	-	+
Carne de cangrejo	0.01	+	+	Na	Na
	0.005	+	-	-	+ c
	0.0025	+	-	-	+
	0.0012	+	-	-	+
	0.0	-	-	-	+
Queso	0.01	+	+	Na	Na
	0.005	+	+ d	-	+
	0.0025	+	-	-	+
	0.0012	+	-	-	+
	0.0	-	-	-	+
Huevo	0.01	+	+	Na	Na
	0.005	+	-	-	+
	0.0025	+	-	-	+
	0.0012	+	-	-	+
	0.0	-	-	-	+

(a) No analizada (na)

(b) Línea indefinida de precipitación

(c) El doble signo representa resultados obtenidos de dos diferentes pruebas con HPI (2)

(d) Reacción positiva indefinida.

TABLA 25

Eficiencia de métodos serológicos para la detección de cantidades traza de enterotoxina A en alimentos.

Alimento	Enterotoxina A adicionada (mg/ml)	Microplaca	RIA	HPI (1)	HPI (2)
Leche	0.0012	+	-	-	+
	0.0006	+ a	-	-	+
	0.0003	-	-	-	+
	0.0	-	-	-	+ b
Mantequilla	0.0012	+	+ c	-	+
	0.0006	+	-	-	+
	0.0003	+ -	-	-	+ +
	0.0	-	-	-	+ +

(a) Línea indefinida de precipitación.

(b) El doble signo representa resultados obtenidos en dos diferentes pruebas con HPI (2).

(c) Reacción positiva indefinida.

TABLA 26.

Especificidad de tres métodos serológicos para la detección de enterotoxinas A y B en flan inoculado con estafilococo no-enterotoxigénico.

Especia	Microplaca		RIA		HPI (1)		HPI (2)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
D - 87	-	-	<u>+</u> a	-	-	-	+	+
D - 184	-	-	<u>+</u>	-	-	-	+	+
W - 46	-	-	<u>+</u>	-	-	-	+	+
785	-	-	<u>+</u>	-	-	-	+	+
Control - b	-	-	<u>+</u>	-	-	-	-	-

(a) Reacción positiva indefinida

(b) Flan no-inoculado.

BIBLIOGRAFIA

1. - Angelotti, R. Staphylococcal Intoxications. Food-Borne Infec. Intoxications. 1969; pág. 359-93
2. - Arbuthnott, J. P. Staphylococcal Toxins. Microbiology (Washington, D. C). 1975; pág. 267-71.
3. - Avena, R.; Bergdoll, M. Purification and Some Physicochemical Properties of Enterotoxin C₁ S. aureus Strain 361. Biochemistry. 6(5); 1967; pág. 1474-1480.
4. - Baird-Parker, A. C.; Joseph, R.L. Fractions of Staphylococcal - Enterotoxin B. Nature. 207 (4997); pág. 663-4; 1965.
5. - Benjamin, E.H. Control of Staphylococcal Food Poisoning. Public Health Reports. 1960; 75; pág. 355-61.
6. - Bennett, R.; McClure, F. Collaborative Study of the Serological- Identification of Staphylococcal Enterotoxins by the Microslide -- Gel Double Diffusion Test. Journal of the AOAC. 1976; 59 (3); --- pág. 594-601.
7. - Bergdoll, M. S. Staphylococcal Enterotoxins. Biochem. Some Food borne Microbial Toxins, Pap. Symp., New York, 1966 (Pub. 1967), 1-25.
8. - Borja, C. R.; Bergdoll, M.S. Staphylococcal Enterotoxin C. II- -- Physical, Immunological, and Toxic Properties. Biochemistry. - - 1969; 8 (1); pág. 75-9.
9. - Borja, C.R.; Fanning, E.; Huang, I. Y.; Bergdoll, M. S. Purification and Some Physicochemical Properties of Staphylococcal Enterotoxins E. The Journal of Biological Chemistry. 1972; 247(8); pág. 24-63.
10. - Casman, E. P.; Bennett, R. Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Food. Applied Microbiology. 1965; 13 (2); pág. 181-9
11. - Collins, W. S.; Metzger, J. F.; Johnson, A. D. A Rapid Solid Phase Radioimmunoassay for Staphylococcal B Enterotoxin. The Journal of Immunology. 1972; 108(3); pág. 852-6.
12. - Chun, F. S.; Thadhani, K.; Schantz, E. J.; Bergdoll, M.S. Purification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin A. Biochemistry. 1966; 5(10); pág. 3281-89.

13. - Ezechuk, Y. V.; Nikolaeval, I. S.; Burgrova, V. I. Staphylococcal Enterotoxin A. Purification and Comparative Study of the Two Toxin Forms (Heat-Treated and Untreated). *Int. J. Biochem.* 1974; 5 (5-6); pág. 443-9.
14. - Forsum, U; Forsgren, A. Immunofluorescent Detection of Enterotoxin B from *Staphylococcus aureus*. *Toxicon.* 1972; 70(5); pág. 451-6.
15. - Frea, J.; McCoy, E.; Strong, F. Purification of Type B Staphylococcal Enterotoxin. *J. Bacteriol.* 1963; 86(5); pág. 1308-12.
16. - Gasper, E. Quantitative Detection of Type A Staphylococcal Enterotoxin by Laurell Electroimmunodiffusion. *Applied Microbiology.* -- 1973; 25(3); pág. 421-6.
17. - Genigeorgis, C.; Kuo, J. Recovery of Staphylococcal Enterotoxin -- from Foods by Affinity Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology.* 1976; 31(2); pág. 274-9.
18. - Hall, H. E.; Angelotti, R.; Lewis, K. Detection of Staphylococcal-- Enterotoxins in Food. *Health Lab. Sci.* 1965; 2(3); pág. 179-91.
19. - Hallander, H. O. Purification of Staphylococcal Enterotoxin B. *Acta Pathol et Microbiol. Scandinav.* 1966; 67(1); pág. 117-32.
20. - Huang, I. Y.; Scantz, E.J.; Bergdoll, M.S. Amino Acid Sequence of the Staphylococcal Enterotoxins. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1975; 28(1); pág. 73-5.
21. - Jarvis, A. W. A Solid-phase Radioimmunoassay for the Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Dairy Products. *N.Z.J. Dairy Sci. - Technol.* 1974; 9(2); pág. 37-9.
22. - Johnson, H. M.; Bukovic, J. A.; Kauffman, P.E.; Pecler, J.T. Staphylococcal Enterotoxin B. Solid-phase Radioimmunoassay. *Applied Microbiology.* 1971; 22(5); pág. 837-41.
23. - Johnson, H. M.; Bukovic, J. A.; Kauffman, P.E. Staphylococcal -- Enterotoxins A and B. Solid-phase Radioimmunoassay in Food. -- *Applied Microbiology.* 1973; 26(3); pág. 309-13.
24. - Read, R.B.; Pritchard, W. L.; Bradshaw, J.; Black, L. A. In Vitro assay of Staphylococcal Enterotoxins A and B from Milk. *J. Dairy Sci.* 1965 a; 48, 411.

25. - Read, R.B.; Pritchard, W.L.; Bradshaw, J.; Black, L. A. Assay of Staphylococcal Enterotoxin from Cheese. *J. Dairy Sci.* 1965 b; 48, 420.
26. - Reiser, R.; Conaway, D.; Bergdoll, M. Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods. *Applied Microbiology.* 1974; 27(1); pág. 83-5.
27. - Salomon, L. L.; Tew, R. W. Assay of Staphylococcal Enterotoxin B by Latex Agglutination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968; 129 -- (2); pág. 539-42.
28. - Schantz, E. J.; Roessler, W. G.; Woodburn, M. J. Purification and some Chemical and Physical Properties of Staphylococcal Enterotoxin. *A Biochemistry.* 1972; 11(3); pág. 360-6.
29. - Silverman, S. J.; Knott, A. R.; Howard, M. Rapid Sensitive Assay for Staphylococcal Enterotoxin and a Comparison of Serological Methods. *Applied Microbiology.* 1968; 16 (7); pág. 1019-23.
30. - Stojanow, I. M.; Schenk, E. Isolation of Staphylococcal Enterotoxin from Food. *Ger. J.* 1, 598, 610 (Cl. G 01 n), 21 Sep. 1972, *Appl. P* 15-90 610. 4-52, 13 Dec. 1965; 3 pp.
31. - Tan, P. L.; Denny, C. B.; Heilman, W R.; Bohrer, C. W. New -- Technique for Rapid Purification, Entrapment, and Recovery of --- Enterotoxin A from a Liquid Chamber by Poliacrylamide Gel Electrophoresis. *Applied Microbiology.* 1969; 18(6); pág. 1089-90
32. - Thatcher, F. S.; Robinson, J. Food Poisoning: and analysis of Staphylococcal Toxins. *J. Appl. Bacteriol.* 1962; 25(3); pág. 378-88.
33. - Wieneke, A.A.; Enterotoxin Production by Strains of Staphylococcus aureus Isolated from Foods and Human Beings. *J. Hyg., Epidemiol., Microbiol., Immunol.* 1974; 73 (2); pág. 255-62.