

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



26

**ESTUDIOS INMUNOLOGICOS DE
ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS**

**GARCIA CARREÑO FERNANDO LUIS
NAVARRO FERNANDEZ BERNARDO**

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS TESIS 1979
ADE U.T. 10 126
FECHA _____
PROC _____
S _____



N

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. OSCAR AMOR DODERO
VOCAL	" MAGDALENA ACOSTA SEGURA
SECRETARIO	" LEONOR MARTINEZ SOTO
1er SUPLENTE	" SOCORRO CAO ROMERO
2º SUPLENTE	" ELDA PENICHE QUINTANA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: BIBLIOTECAS

NOMBRES COMPLETOS Y FIRMAS DE LOS SUSTENTANTES:

GARCIA CARREÑO FERNANDO LUIS

NAVARRO FERNANDEZ BERNARDO



NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

MAGDALENA ACOSTA SEGURA



INDICE

CAPITULO	PAGINA
CAPITULO I. OBJETIVO	1
CAPITULO II. PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS.....	7
CAPITULO III. OBTENCION DE LAS ENTEROTOXINAS EN EL LABORATORIO.....	25
CAPITULO IV. IDENTIFICACION DE LAS ENTEROTOXI- NAS.....	47
CAPITULO V. EXTRACCION DE ALIMENTOS SOSPECHO- SOS Y PURIFICACION DE LAS ENTERO- TOXINAS OBTENIDAS EN MEDIOS DE - CULTIVO.....	71
CAPITULO VI. OBTENCION DEL SUERO INMUNE ANTIE <u>N</u> TEROTOXINA.....	78
CAPITULO VII. RESUMEN, CONCLUSIONES Y BIBLIOGRA <u>A</u> FIA.....	81

CAPITULO I. OBJETIVO.

1. Objetivo.

2. Importancia del estudio de las enterotoxinas estafilococcicas.

1. OBJETIVO.

Las intoxicaciones causadas por alimentos contaminados con cepas toxigénicas de S. aureus son muy frecuentes en nuestro medio; inclusive ocurren en forma masiva, como sucedió en las guarderías de una institución oficial en 1977 y en el año de 1978 varios miles de niños sufrieron intoxicación en las escuelas primarias del D.F. al ingerir, los desayunos que diariamente se les reparten. En ambos casos la intoxicación se atribuyó a productos lácticos contaminados con enterotoxinas de S. aureus.

En si la intoxicación no llega a causar la muerte, ya que la cantidad de enterotoxinas presentes en los alimentos es generalmente baja, pero en niños, que son los afectados con mayor frecuencia, la deshidratación provocada por la diarrea y vómito, si no se controla adecuadamente, puede ser mortal. En los adultos la intoxicación tiene repercusiones de orden económico debidas al ausentismo ya que el individuo que presenta un cuadro de vómito y diarrea está incapacitado para desarrollar sus labores.

Para la detección de enterotoxinas en productos alimenticios se hace necesario contar con un método capaz de detectar hasta 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de enterotoxina, reproducible y de fácil ejecución, con características tales, que pudiera aplicarse no únicamente como un método de comprobación en alimentos sospechosos, si no como una prueba de control rutinario en el proceso y manejo de productos alimenticios susceptibles de ser contaminados por este microorganismo.

La Secretaría de Salubridad y Asistencia (4) y (19) ha reportado trabajos en los que la investigación se hace por el método microbiológico, pero con mucha frecuencia se da el caso de que los microorganismos ya no están viables, pero las enterotoxinas todavía son activas, por lo que los métodos microbiológicos no son los más adecuados.

Se han descrito también (1) y (3) pruebas biológicas que utilizan monos o gatos, estos métodos reúnen las condiciones de sensibilidad, pero llevan implícita la falta de reproducibilidad por las variaciones en la susceptibilidad de los animales a las enterotoxinas, además de que su realización por el hecho de manejar estos animales no reúne la condición de ser métodos simples.

Por todo lo anteriormente expuesto nos abocamos a realizar una investigación bibliográfica sobre el tema, poniendo especial énfasis en los métodos inmunológicos, ya que por sus características de la reacción antígeno-anticuerpo es de esperarse que las técnicas inmunológicas reúnan las condiciones antes mencionadas, que son necesarias en las pruebas para la detección de enterotoxinas estafilocócicas en productos alimenticios contaminados.

2. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS

La importancia del estudio de las enterotoxinas de estafilococos se debe a que aproximadamente el 25 % de los casos de intoxicaciones por alimentos contaminados con microorganismos son causadas por Staphylococcus aureus.

En nuestro medio el problema de las intoxicaciones por alimentos es de gran importancia; en 1977 en las guarderías de una institución ocurrió la intoxicación masiva de niños. En 1978 se presentó otro caso, a nivel de escuelas primarias en el que se llegó a detectar la intoxicación de por lo menos 24 000 escolares. Atribuyéndose en ambos casos el origen del problema a la presencia de enterotoxinas en un producto lácteo utilizado en la preparación de un alimento, lo que hace necesario contar con un método confiable y de fácil realización para la investigación de productos tóxicos derivados de microorganismos.

La investigación de las enterotoxinas tiene la ventaja de que se pueden identificar aún cuando las bacterias ya no se encuentren viables, después del proceso de elaboración o conservación del alimento debido a que las enterotoxinas se encuentran aún activas (Thatcher y Clark, 1968).

Por el otro lado, el hallazgo de enterotoxinas en alimentos procesados es un indicador de las malas condiciones sanitarias que prevalecen dentro de la fábrica en que se elaboran.

Para dar una idea de la incidencia de estafilococos viables se da a continuación el resultado de un estudio de los pu-

blicados por la SSA que se refiere a la cuenta de bacterias aisladas en distintos alimentos.

CUADRO 1. Calidad sanitaria de productos derivados de la leche según su contenido de <u>S. aureus</u> en 1971 y 1972.				
ALIMENTO	1971		1972	
	No. de muestras	% de aceptados	No. de muestras	% de aceptados
Creimas lácteas	250	100	237	95.5
Creimas vegetales	66	98.8	93	100
Leche malteada	19	100	22	100
Leche fermentada	109	100	73	100
Mantequilla	209	100	194	96.6
Margarina	149	100	117	98.5
Quesos frescos (grasa láctea)	486	61.2	237	70.2
Quesos frescos (grasa vegetal)	185	37,3	85	40,2
Quesos fundidos	53	100	50	100

Boletín informativo de la Secretaria de Salubridad y Asistencia 1^o de marzo de 1973.

CUADRO 2. Aislamiento de <u>S. aureus</u> a partir de alimentos por siembra en medio 110 y por el método de enriquecimiento.			
PRODUCTOS	Muestras examinadas	Muestras con <u>S. aureus</u>	Por ciento (+)
Carnes (embutidos)	189	16	8.4
Quesos	258	56	21.7
Cremas	103	3	2.9
Helados	26	2	7.6
Mantequillas y margarinas	203	0	---
Leches malteadas	10	0	---
Leches acidificadas y Yougurt	9	0	---
Gelatinas	4	0	---
Totales	802	77	9.6

(+) El porcentaje se refiere a los productos que aparecen en cada línea.

Basándose en el número de microorganismos no existe un criterio definido sobre el número mínimo de estafilococos presentes en los alimentos que puedan considerarse como peligrosos. Ya que algunos autores toman desde 50 000 por gramo (Thatcher y Clark) en tanto que otros piensan que desde un punto de vista práctico un alimento que contiene 500 000 por gramo debe considerarse inadecuado para el consumo humano (Dack, 1963).

Es notable el aumento de las intoxicaciones de este origen en los meses de junio, julio y agosto, es decir, a fines del verano y principio del otoño, cuando son mas frecuentes las lluvias y mas alta la temperatura. Paralelamente al aumento en la producción de enterotoxinas en estos meses, se observa con mayor frecuencia un número más alto de microorganismos en los alimentos contaminados.

CAPITULO II. PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS

1. Patogenicidad de las enterotoxinas estafilocóccicas.
2. Clasificación de las enterotoxinas.
3. Propiedades de las enterotoxinas.

1. PATOGENICIDAD DE LAS ENTEROTOXINAS.

Las enterotoxinas son responsables de las intoxicaciones por alimentos contaminados con estafilococos, este problema de salud pública se presenta a nivel mundial. Dack et al en 1930 demostraron que el agente causal de estas intoxicaciones eran sustancias de naturaleza proteica, elaboradas por ciertas cepas de cocos Gram positivos (Staphylococcus aureus).

El cuadro clínico que se presenta durante las intoxicaciones es el siguiente: vómito, diarrea y espasmos abdominales, la aparición de estos síntomas es de 2 a 5 horas después de haber ingerido el alimento contaminado. Rakarowa en 1972 describió el efecto citotóxico que las enterotoxinas ejercen sobre células HeLa y cultivos de células de intestino de embrión humano. En base a estos estudios se puede concluir que el cuadro clínico observado durante el padecimiento se debe al efecto citotóxico que las enterotoxinas tienen sobre el tracto gastrointestinal. Hodoval en 1968 (14) reportó que cuando se administran dosis altas de estas toxinas a monos, por vía intravenosa, producen trastornos cardiovasculares que ocasionan la muerte de los animales, afortunadamente en la mayoría de los casos, la concentración de las enterotoxinas contenida en los alimentos con estafilococos no alcanza la dosis mínima mortal para el humano, por lo que generalmente los pacientes se recuperan entre 2 y 5 días después de la intoxicación. En niños es particularmente importante controlar la deshidratación provocada por el vómito y la diarrea ya

que esta condición si puede ser mortal.

En el año de 1967 Casman (13) estudió diversas cepas de S. aureus aisladas de varias fuentes, para determinar su enterotoxigenicidad por métodos serológicos, encontrando los siguientes porcentajes de casos positivos: el 44 % de 438 muestras de especímenes clínicos, el 31 % de muestras nasales de portadores sanos, el 10 % de 236 leches crudas analizadas, el 30 % de 260 alimentos congelados y el 96 % de 80 alimentos involucrados en intoxicaciones. Aproximadamente el 30 % de las cepas probadas por métodos serológicos dieron resultados negativos, sin embargo produjeron emesis en gatos. Bergdoll en 1960 dedujo que el 50 % de estas cepas eran enterotoxigénicas.

Estudios más recientes, en los que se emplearon monos, de mostraron que el porcentaje es mayor (Bergdoll, 1972), (13).

2. CLASIFICACION DE LAS ENTEROTOXINAS.

Existen varios tipos serológicos de enterotoxinas, las dos primeras estudiadas fueron designadas por Casman, 1963 (6) como en terotoxina "E" (enteritis) y enterotoxina "F" (food poisoning). Debido a la existencia de cepas productoras de ambas enterotoxinas y al descubrimiento de nuevos serotipos, en el Congreso anual de la Sociedad Americana de Microbiología (Kansas, mayo de 1962), se acordó nombrarlas con las letras mayúsculas del alfabeto, por lo que los tipos "F" y "E" se denominaron "A" y "B" respectivamente. Las enterotoxinas reportadas posteriormente se designaron

con las letras C, D, E, etc., una vez que se demostró que se trataba de entidades serológicamente diferentes a las ya reportadas

Actualmente se han reportado cinco nuevos tipos, que son C₁ (Bergdoll, 1965), (2); C₂ (Bergdoll, 1967), (3); D (Casman, 1967), (13); E (Toshach, 1972), y F (FDA, USA).

Hájek y Marsálek (1973) hicieron un estudio de la incidencia de cepas productoras de enterotoxina A, B y C aisladas de muestras obtenidas de humano, cabra, gallina, bovino, carnero, liebre, perro, caballo, visón y paloma. Estos investigadores reportaron que la enterotoxina A se encontró con mayor frecuencia en las muestras analizadas.

3. PROPIEDADES DE LAS ENTEROTOXINAS.

Las enterotoxinas son proteínas que al ser desecadas constituyen un polvo higroscópico, muy soluble en agua y en soluciones salinas. Precipitan con sulfato de amonio, ácido clorhídrico etanol y metanol. Pueden ser cristalizadas y parcialmente purificadas cuando se les trata con alcohol metílico a temperaturas menores de 0°C.

Los experimentos realizados por Bergdoll en 1967, demuestran que cuando la enterotoxina A es calentada a 60°C durante 20 minutos a pH 6.85 pierde el 50 % de su reactividad con el anticuerpo específico, en tanto que no se altera la reactividad cuando se calienta a 80°C durante 3 minutos o bien 100°C durante 1

minuto:

Si la enterotoxina B se calienta a 60°C durante 16 horas, a un pH de 7.3, conserva su actividad biológica incluyendo su toxicidad, sin embargo cuando se somete a 100°C durante 5 minutos se conserva más del 50 % de la actividad biológica de la toxina. El calentamiento a 99°C por 87 minutos produce inactivación completa debido a que la proteína coagula.

Cuando la enterotoxina C₁ se calienta a 60°C durante 30 minutos no se observa cambio en la reactividad con su anticuerpo específico, sin embargo la solución presenta turbidez cuando el calentamiento es prolongado.

Si se eleva la temperatura de una solución de enterotoxina C₂ hasta 100°C durante 1 minuto, pierde el 80 % de reactividad frente a su anticuerpo.

La enterotoxina B fué estudiada por el método de doble difusión en gel de agar por Read en 1966, quién determino a que temperaturas y en que tiempos 30 µg/ml se reducen a 0.7 µg/ml. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

De todos los datos anteriores se concluye que la enterotoxina A es la más sensible al calor, en tanto que la enterotoxina B es la más termoresistente. Esta propiedad es la responsable de que la enterotoxina permanezca en los alimentos contaminados aun después de que las bacterias han muerto.

La termolabilidad de la enterotoxina A dificulta su purificación por lo que debe trabajarse a temperaturas cercanas a 0°C

cuando se pretende extraerla de alimentos o sobrenadantes de cultivos.

TABLA 1. Tiempo y temperatura requerida para reducir 30 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina B a 0.7 $\mu\text{g/ml}$.

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO (minutos)
96	103
99	87.1
101.7	70.5
104.4	57.2
110	39.1
115.6	27.6
121	16.4
126.7	12.0

El método empleado para la cuantificación de la enterotoxina fué el de doble difusión en gel de agar. Read y Bradshaw, 1965 (18).

Su coeficiente de sedimentación tiene valores entre 2.76 y 3.04 como se observa en la Tabla 2 que resume algunas de las propiedades de las enterotoxinas.

Se ha determinado el coeficiente de difusión de la enterotoxina B por el método de doble difusión en gel de agar (Schantz

y Lauffer) y los de las enterotoxinas A, C₁ y C₂ por otros métodos. Los valores se muestran en la Tabla 2.

Los valores de viscosidad de las enterotoxinas se encuentran entre los límites de 3.4 y 4.07 ml/g correspondiendo el valor menor a la enterotoxina C₁ y el más alto a la enterotoxina A.

El peso molecular de la enterotoxina A se obtuvo de la ecuación de Svedberg que relaciona el coeficiente de sedimentación, el coeficiente de difusión y el volumen específico parcial. El valor que se obtuvo por este método es de 34 500 y coincide con el valor determinado por el método de la composición de aminoácidos que da el dato de 34 700 \pm 100.

Los pesos moleculares de las enterotoxinas C₁ y C₂ son 34 100 y 34 000 respectivamente.

De acuerdo con los valores de peso molecular se concluye que las enterotoxinas son sustancias no dializables, propiedad que se aprovecha para su obtención en los métodos de cultivo en tubo y saco de diálisis. Tomando en consideración la ecuación y la tabla de Scheraga y Mandelkern se piensa que la forma de la molécula de las enterotoxinas es un elipsoide. Los datos sobre los radios axial y friccional indican que se trata de moléculas con alta densidad.

Todas las enterotoxinas tienen un máximo de absorción en la región del ultravioleta a 277 nm, con extinciones alrededor de 14 para las enterotoxinas A y B y de 12 para C₁ y C₂.

El punto isoeléctrico de la enterotoxina B fué determinado

por Hibnick y Bergdoll (3) y es de 8.6. Los puntos isoeléctricos de las demas enterotoxinas fueron calculados por medio de electroforesis en papel. Los valores de pH en los que se encuentran dicho punto isoeléctrico son: para la enterotoxina A de 6.8, para C_1 de 8.6 y para C_2 de 7.0.

TABLA 2. Propiedades de las enterotoxinas.

PROPIEDAD	ENTEROTOXINA			
	A	B	C ₁	C ₂
Dosis emética al 50 % (DE ₅₀) en monos (µg/animal)	5	5	5	5
Contenido de nitrógeno	16.5	16.1	16.2	16.0
Coefficiente de sedimentación (S _{20w} ⁰) S	3.04	2.78	3.00	2.90
Coefficiente de difusión (D _{20w} ⁰) x 10 ⁻⁷ cm ² seg ⁻¹	7.94	8.22	8.10	8.10
Viscosidad (ml/g)	4.07	3.81	3.40	3.70
Peso molecular (10 ³)	34.7	30.0	34.1	34.0
Volúmen específico parcial	0.72	0.72	0.73	0.74
Punto isoeléctrico	6.8	8.6	8.6	7.0
Absorción máxima (nm)	277	277	277	277
Extinción (E _{1cm} ^{1%})	14.3	14.4	12.1	12.1

Bergdoll 1967, (3).

La composición de aminoácidos de las enterotoxinas A, B, C₁ y C₂ fué determinada en el Food Research Institute (Universidad de Wisconsin) mediante hidrólisis por calentamiento con ácido clorhídrico 9 mol/litro a 110°C durante 12, 24, 36 y 60 h en tubos sellados al vacío. La cistina se determinó tratando a la enterotoxina con ácido perbórmico, de manera que la cistina se oxida a ácido cistéico, posteriormente se hidrolizó y cuantificó en el analizador de aminoácidos. El triptófano fué determinado por el método de Beaven y Holiday. La enterotoxina A contiene menor cantidad de lisina, ácido aspártico y metionina, pero más arginina, ácido glutámico, leucina, y triptófano que las demás enterotoxinas. No se sabe si esto tiene relación con la actividad y estabilidad de la molécula.

La composición de aminoácidos de las enterotoxinas aparece en las Tablas 3 y 4.

3.1. AMINOACIDOS TERMINALES.

En el año de 1965, Spero et al (3), reportaron que los aminoácidos terminales en amino y en carboxilo de la enterotoxina B son ácido glutámico y lisina respectivamente. El aminoácido terminal en amino fué determinado por la técnica de Sanger. Se hidrolizó el compuesto DNP-toxina, se extrajo con éter y el extracto se analizó por cromatografía bidimensional de Levy, (1955) y por el método de Blackburn (1951). El aminoácido terminal en car

boxilo fué determinado por hidrazinólisis siguiendo el método de Niu y Fraenkel-Conrat modificado por Spero. Estos investigadores usaron el analizador de aminoácidos después de la reacción con benzaldehído.

Las enterotoxinas B, C₁ y C₂ coinciden en que las tres tienen al ácido glutámico como aminoácido terminal en amino. Las enterotoxinas C₁ y C₂ difieren de la enterotoxina B en que ambas tienen a la glicina como aminoácido terminal en carboxilo.

Los aminoácidos terminales en carboxilo y en amino de la enterotoxina A son serina y alanina respectivamente.

Bergdoll en 1965 determinó la secuencia de aminoácidos del extremo terminal en amino de la enterotoxina B por el método del fenilisotiocianato de Edman modificado por Fraenkel-Conrat (1955) encontrando que es ácido glutámico-serina-ácido aspártico-lisina. El mismo investigador determinó la secuencia de aminoácidos del extremo terminal en carboxilo de la enterotoxina B por el método modificado de la hidrazinólisis de Akabori (1956), tratando los péptidos de la enterotoxina con carboxipeptidasa y la secuencia es lisina-glicina-tirosina-leucina.

Bergdoll (3) demostró que el residuo de la enterotoxina B obtenido por tres tratamientos con carboxipeptidasas que separan de 20 a 22 aminoácidos antes de la aparición de la prolina del extremo terminal en carboxilo y recuperado por cromatografía en celulosa, conserva la capacidad de reaccionar con el anticuerpo para la enterotoxina B y continúa siendo tóxico para los monos.

La composición de aminoácidos de las otras enterotoxinas fué determinada por los mismos métodos y los resultados se encuentran en las Tablas 3 y 4.

TABLA 3. Composición de aminoácidos de las enterotoxinas.
g/100g de proteína.

AMINOACIDO	A	B	C ₁	C ₂
Lisina	11.32	14.85	14.43	13.99
Histidina	2.86	2.34	2.91	2.87
Ac. aspártico	15.75	18.13	17.85	18.38
Treonina	6.28	4.50	5.31	5.80
Serina	3.90	4.05	4.58	4.81
Ac. glutámico	11.65	9.45	8.95	8.93
Prolina	1.82	2.11	1.16	2.23
Glicina	3.56	1.78	2.99	2.90
Alanina	2.19	1.32	1.85	1.61
Valina	4.95	5.66	6.50	5.87
Metionina	1.11	3.52	3.20	3.60
Isoleucina	4.34	3.53	4.09	4.02
Leucina	8.68	6.86	6.54	6.13
Tirosina	10.09	11.50	9.80	10.27
Fenilalanina	5.12	6.23	5.35	5.25
Triptófano	1.71	0.95	0.99	0.84
NH ₃ amido	1.66	1.66	1.71	1.62
TOTAL	99.94	100.15	100.00	99.99

Bergdoll 1967 (3).

TABLA 4. Composición de aminoácidos de las enterotoxinas.
Número de residuos de aminoácidos.

AMINOACIDO	A	B	C ₁	C ₂
Lisina	31	35	38	37
Histidina	7	5	7	7
Arginina	9	5	4	4
Ac. aspártico	48	47	53	54
Treonina	22	13	18	20
Serina	16	14	18	19
Ac. glutámico	32	22	24	24
Prolina	7	7	8	8
Glicina	22	9	18	17
Alanina	11	5	9	8
Valina	18	17	22	20
Metionina	3	8	8	9
Isoleucina	13	9	12	12
Leucina	27	18	20	18
Tirosina	22	21	21	21
Fenilalanina	12	13	12	12
Triptófano	3	2	2	2
NH ₂ amido	37	29	36	34
TOTAL	305	252	296	294

Bergdoll 1967 (3).

3.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

Schantz en 1965 (3) y Chu et al en 1966 reportaron que las enterotoxinas son resistentes a la acción de la tripsina, quimotripsina, renina y papaína en tanto que la pepsina a pH menor de 2 destruye la actividad de las toxinas estafilocócicas. La propiedad de las enterotoxinas de resistir a la acción de la tripsina se usa para separar a las toxinas de las alfa y beta hemolisinas que se encuentran en los sobrenadantes de los medios de cultivo, cuando son empleadas en la inmunización de animales.

Se han mencionado otras propiedades biológicas de las enterotoxinas, entre las ya mencionadas se encuentran: la de ser inmunogénicas y antigénicas, cualidades que se aprovechan para obtener sueros inmunes para identificarlas y cuantificarlas en alimentos contaminados con cepas enterotoxigénicas de S. aureus; la existencia de seis tipos serológicos, obliga a la elaboración de los respectivos sueros monoespecíficos para lograr una tipificación adecuada.

3.2.1. PATOGENIA.

Por vía oral, que es la vía normal de entrada al organismo, las enterotoxinas provocan después de dos horas de la ingestión vómito, diarrea y espasmos abdominales, por lo que inicialmente se pensaba que únicamente atacaban al tracto gastrointestinal. Sin embargo, Hodoval en 1968 (14) reportó que las enterotoxinas purificadas administradas a monos por vía intravenosa, producen

cambios cardiovasculares como; hipotensión arterial irreversible disminución en el rendimiento cardíaco, "shock" y finalmente la muerte. Colateralmente observó disminución en el contenido de O_2 venoso y de pO_2 . En contraste con este dato, el contenido de O_2 arterial permaneció constante hasta poco antes de la muerte, razón por la cual observó cianosis debido a la interferencia de intercambio gaseoso en los pulmones. Actualmente se sabe que las enterotoxinas también atacan otros tejidos como el renal, hepático, pulmonar y nervioso; aunque el daño es muy lento por lo que generalmente no es detectable. Existe una fuerte evidencia en favor de que las enterotoxinas alteran la permeabilidad del endotelio vascular.

"in vitro" se ha descubierto la toxicidad para las células HeLa (Rakarowa), células de intestino y fibroblastos de embrión humano.

3.2.2. CATABOLISMO DE LAS ENTEROTOXINAS.

Sigurd en 1972 (16) estudió el catabolismo de las enterotoxinas en animales inoculados por vía intravenosa con dosis letales y encontró que del 0.7 al 5 % del total de la toxina se localizó en el tejido pulmonar, del 55 al 25 % en el tejido hepático y del 42 al 75 % en células tubulares del riñón. El análisis homogeneizados de tejido renal e identificó productos de degradación de las enterotoxinas con un peso molecular desde 1 000 a 9 000. El organelo celular encargado de esta digestión enzimati-

ca fué el lisosoma. Las enzimas lisosomales que llevan a cabo este proceso degradativo fueron del tipo de las catepsinas, clasificadas como endopeptidil-transferasas, con pH óptimo de 3.2 y con especificidad similar, pero más limitada que la pepsina. Este proceso proteolítico se demostró por la pérdida de la toxicidad y de la reactividad de enterotoxina con su anticuerpo específico - después de ser tratada con lisosomas de células renales.

Se ha encontrado resistencia de las enterotoxinas a la degradación proteolítica "in vitro" ya que requieren 8 h para alcanzar el mismo porcentaje de disminución de la reactividad de la enterotoxina con su anticuerpo específico, mientras que "in vivo" ocurre en 1 h.

Los resultados anteriores hacen pensar que la degradación de las enterotoxinas por la catepsina de los lisosomas de células renales es un mecanismo de detoxificación natural para las toxinas.

3.2.3. POTENCIA.

La potencia biológica de las enterotoxinas se determina administrando la toxina por vía oral o intravenosa a monos rhesus jóvenes de tres kilogramos de peso. Los resultados de un estudio realizado por Bergdoll, para determinar la potencia de un lote de enterotoxina se muestran en la Tabla 5.

La potencia también puede determinarse empleando gatos jóvenes de 250 a 800 gramos de peso (Dolman, 1940) y (Hammon, 1941) (12), inyectando en la vena safena de 0.5 a 5 ml del sobrenadan-

de un cultivo de estafilococos o del alimento sospechoso.

TABLA 5. Efecto de la enterotoxina A sobre monos rhesus.			
VIA DE ADMINISTRACION			
ORAL		INTRAVENOSA	
$\mu\text{g}/\text{animal}$	resultado	$\mu\text{g}/\text{Kg}$	resultado
5	4/10	0.017	2/6
10	16/30	0.035	2/9
20	9/12	0.140	5/6

El resultado se expresa en el número de animales que presentaron vómito sobre el número de animales empleados. Bergdoll, 1967 (3).

3.2.4. INHIBICION DEL EFECTO CITOTOXICO "in vitro".

El, 1-bis (p-clorofenil)-2,2,2- tricloroetano (DDT) y su derivado el 1,1- bis (p-clorofenil)-2,2- dicloroetano (DDD) protejen contra el efecto citotóxico de las enterotoxinas a los cultivos de células de intestino de embrión humano. El efecto protector de estos dos compuestos sobre las células tratadas se observa aun después de 24 h de haberlo retirado. Esto hace suponer que los insecticidas actuan sobre las células y no sobre la toxina. También se ha observado que este efecto protector inhibe el eritema y la necrosis en la piel al inocular cobayos con enterotoxina y DDT (Gabliks, 1972).

3.2.5. TERAPEUTICA EN LOS CASOS DE INTOXICACION.

Hodoval (14) observó que la administración de epinefrina en los últimos estadios del "shock" en monos inyectados por vía intravenosa con enterotoxinas, causa la elevación de la presión arterial casi inmediatamente después de haberla administrado, así como la normalización del rendimiento cardíaco. La vida de los animales puede prolongarse durante varias horas, si se administra epinefrina en forma constante. Sin embargo los efectos de las grandes dosis de enterotoxina casi siempre son letales.

CAPITULO III. OBTENCION DE LAS ENTEROTOXINAS EN EL LABORATORIO.

1. Obtención de enterotoxinas en tubo de celofán.
2. Producción de enterotoxinas en saco de celofán.
3. Producción de enterotoxinas en medio líquido con agitación.
4. Producción de enterotoxinas en medio semisólido.
5. Producción de las enterotoxinas en fermentador.

1. OBTENCION DE LAS ENTEROTOXINAS.

Actualmente se conocen varios métodos para la producción de enterotoxinas estafilocóccicas, dentro de estos procedimientos se encuentran la técnica en tubo de diálisis (Casman, 1963) (7) y la de saco de diálisis (Donnelly, 1967) (10). Ambas técnicas son muy semejantes las únicas dos diferencias consisten en que el diámetro del tubo de diálisis es menor que el de la bolsa empleada en la técnica del saco de diálisis, además en la técnica del tubo el medio de cultivo se coloca fuera de él, mientras que en la técnica del saco de diálisis el medio se deposita dentro. Hollander en 1965 ideó un método en el que el inóculo se coloca en una bolsa de celofán sobre medio sólido y Kato (15) describió el método que utiliza medio líquido con agitación.

Jarvis en 1973 (11) obtuvo enterotoxinas en un fermentador bajo condiciones controladas de pH y aereación. Para conocer la eficiencia de este método comparó la cantidad de toxina producida con la obtenida usando medio líquido con agitación.

1.1. OBTENCION DE ENTEROTOXINAS EN TUBO DE CELOFAN.

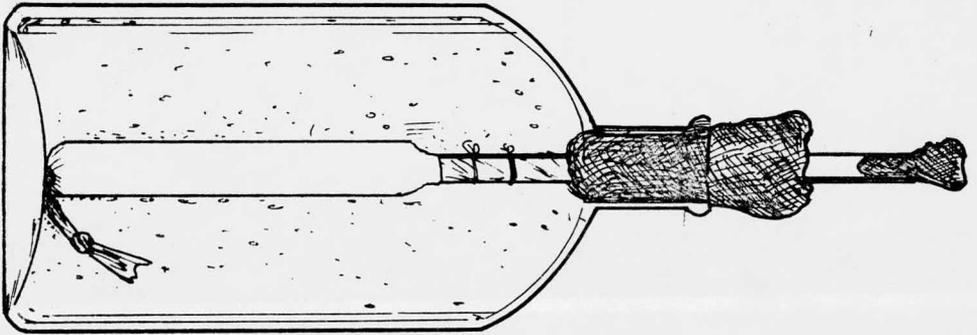
Para la identificación de cepas enterotoxigénicas, así como para la producción de cantidades pequeñas de enterotoxina de alto título se usa el tubo de diálisis en el cual el desarrollo bacteriano y por lo tanto la producción de la enterotoxina se llevan a cabo en el interior de un tubo de celofán.

METODOLOGIA.

Se cortan tubos para diálisis de 2 cm de diámetro por 35 cm de longitud, se lavan varias veces con agua destilada, cambiando la en cada lavado, se prueba la integridad de las paredes, anudando los tubos por un extremo y llenándolos, con agua, una vez que se ha visto que no tienen perforaciones se vacía el agua, Por el extremo abierto se les introduce un tubo de vidrio de 20 cm de longitud y de diámetro tal que permita el paso de una pipeta de 1 ml, se fija el tubo de diálisis al tubo de vidrio por medio de cuatro ligaduras, de manera que queden los tubos de diálisis de 12 cm de largo a partir del extremo del tubo de vidrio. Para evitar que los tubos de diálisis se rompan se deberan mantener húmedos durante todas las manipulaciones.

Se colocan 100 ml del medio de infusión de cerebro corazón en un frasco de Roux de 1 litro. Se introduce en el frasco el tubo de celofán y se tapa con algodón de manera que el tubo de vidrio pase por el centro del tapón. El dispositivo completo se esteriliza en autoclave 121°C , 15 lb, durante 20 minutos. Posteriormente se inocula con 0.5 ml de una suspensión bacteriana que debe contener 3×10^8 microorganismos/ml de 18 a 24 h de incubación. El inóculo se distribuye en la superficie del tubo de celofán que esta en contacto con el medio, mediante movimiento de rotación suave. Se incuba a 37°C durante 72 h colocando los frascos en posición horizontal. Se cosecha con una pipeta el desarrollo presente en el tubo de celofán y se eliminan las bacterias

por centrifugación.



Dispositivo empleado en la técnica del tubo de celofán, Casman (1963).

VENTAJAS.

La principal ventaja que presenta esta técnica es que la enterotoxina que se obtiene esta muy concentrada porque el medio de cultivo se coloca fuera del saco de diálisis que es el que contiene el inóculo. Este método es útil para la detección de cepas enterotoxigénicas, porque para realizar su identificación no se necesitan grandes cantidades de toxina, pero esta debe tener un título elevado. Otra ventaja es que no es necesario purificar la enterotoxina ya que el medio de cultivo no entra en contacto con la toxina porque se encuentra en el tubo de celofán.

INCONVENIENTES.

La gran desventaja de esta técnica es que se obtiene muy poco volumen de enterotoxina. Si lo que se desea es tener la cantidad de toxina necesaria para inocular animales y poder obtener una antitoxina, este método no es el de elección.

1.2. PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS EN SACO DE CELOFAN.

Esta técnica es muy similar a la anterior; las únicas dos diferencias se mencionaron con anterioridad. El método fué diseñado por Donnelly (10) para investigar la presencia de enterotoxinas en quesos contaminados por S. aureus.

METODOLOGIA.

El saco se prepara con un tubo de celofán para diálisis de

7.5 cm de diámetro y 40 a 45 cm de largo. La pieza se hierve con una solución de EDTA al 0.01 % en agua, durante 5 minutos y se la va varias veces con agua destilada. Se anuda por un extremo y se infla con aire. El extremo anudado se coloca en la boca de un matraz Erlenmeyer de 300 ml de capacidad procurando que la parte media quede sobre el fondo del matraz, se colocan 100 ml del medio de infusión de cerebro corazón dentro del saco, se anuda el extremo abierto y se unen los dos extremos de tal manera que el saco en forma de U y los extremos se localicen cerca del cuello del matraz, se tapa éste y se esteriliza en autoclave a 121°C , 15 lb, durante 20 minutos.

Una vez estéril se colocan 18 ml del amortiguador de fosfatos, de pH 6.8, en el matraz. Se prepara el inóculo tomando una asada de un cultivo de 18 h de incubación en medio de infusión de cerebro corazón , se suspende en 2 ml del mismo amortiguador y se adiciona al matraz con lo que queda un volumen final de inóculo de 20 ml. Se incuba con agitación por rotación a una temperatura de 37°C durante 48 h. El desarrollo se extrae del matraz y se centrifuga para obtener el sobrenante libre de bacterias.

El medio de infusión de cerebro corazón es el más frecuentemente usado para el desarrollo de cepas enterotoxigénicas de estafilococos ya que en el se ha encontrado mayor rendimiento en comparación con otros medios de cultivo (7). Las diferentes marcas comerciales y los distintos lotes de una misma marca varían en cuanto al rendimiento de enterotoxina (Reiser y Weiss, 1968).

Por lo que es importante registrar el número de los lotes de medio en que se produce mayor cantidad de enterotoxina con cepas poco toxigénicas, para poderlos usar en el estudio de la enterotoxigenicidad de cepas desconocidas.

En los métodos de tubo y saco de diálisis se emplea el medio de infusión de cerebro corazón ya que es el que proporciona enterotoxinas de mayor título, según los estudios de Casman (7), en los que comparó la cantidad de toxina producida empleando este medio y el de Dolman y Wilson; los resultados de esta comparación se muestran en la Tabla 6.

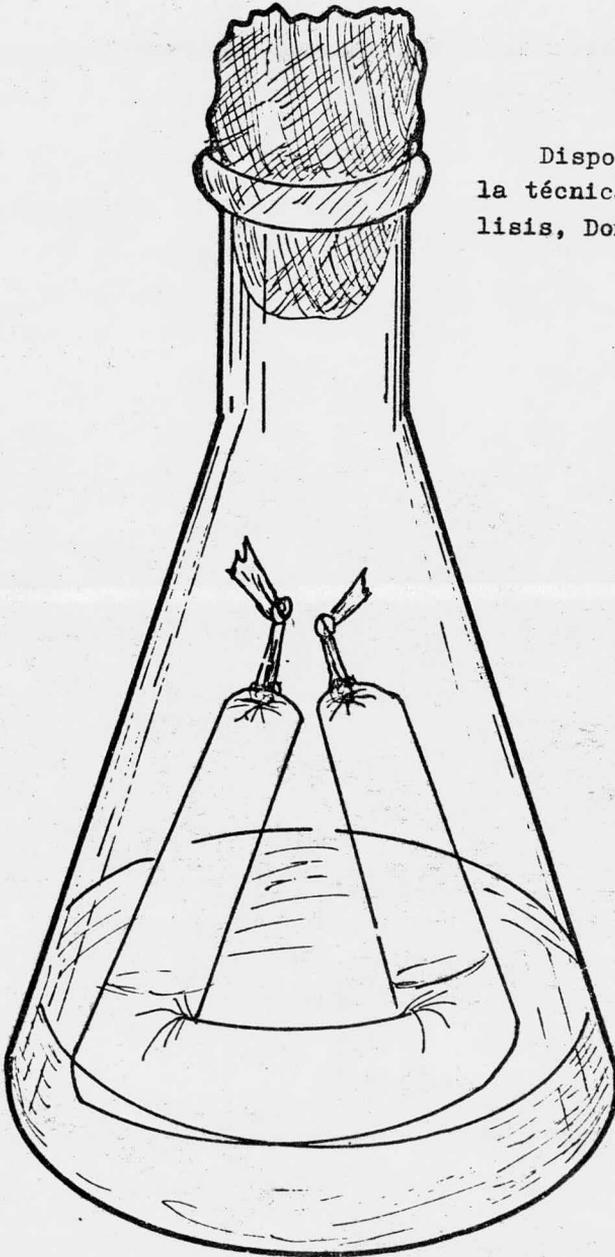
El pH óptimo del medio de cultivo para la obtención de las enterotoxinas se encuentra entre 6.5 y 7, este dato fué obtenido también por Casman (7), la Tabla 7 resume los resultados de los cultivos a diferentes valores de pH.

VENTAJAS.

Las ventajas que ofrece este método son las mismas que brinda la técnica anterior. Solo que con esta técnica es posible obtener una mayor cantidad de enterotoxina. Es más fácil recuperarla, porque se encuentra en un volumen final pequeño y en alta concentración.

INCONVENIENTES.

De hecho no los hay; aunque no es la técnica ideal para obtener grandes cantidades de toxina, es posible emplearla en la producción de enterotoxinas para la inmunización de animales.



Dispositivo empleado en la técnica del saco de diálisis, Donnelly (1967).

TABLA 6. Producción de enterotoxinas A y B en el medio de infusión de cerebro corazón y en el medio semisólido de Dolman y Wilson (1940).

CEPA	ENTERO- TOXINA	BHI		DW	
		A	B	A	B
243	B	-	48	-	3.5
196 E	A	8	-	1	-
265-1	A	12	-	1	-
S6	AB	7	128	1	48
D258	AB	3	40	-	2.5
D263	AB	2	24	-	2.5

BHI = infusión de cerebro corazón.

DW = medio de Dolman y Wilson.

Los resultados se expresan como el recíproco del título de toxina.

Casman y Bennett, 1963 (7).

TABLA 7. Producción de enterotoxinas A y B en medio de infusión de cerebro corazón por el método de tubo de celofán a diferentes valores de pH.

CEFA	VALORES DE pH							
	6		6.5		7		7.5	
	A	B	A	B	A	B	A	B
243	-	4096	-	4680	-	6235	-	5496
246-3A	93	-	82	-	87	-	63	-
196 E	135	-	150	-	259	-	143	-
265-1	207	-	195	-	201	-	158	-
269	142	-	133	-	155	-	101	-
S6	108	11035	83	11035	92	6293	67	6014
D254	25	1272	37	1707	54	2111	39	1800
D258	21	460	16	920	25	573	40	602
D263	43	588	40	693	43	702	36	743
D270	36	30	43	35	52	45	39	27

Los resultados se expresan como el recíproco del título de enterotoxina.

Casman y Bennett, 1963 (7).

1.3. PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS EN MEDIO LIQUIDO CON AGITACION.

Cuando se requieren grandes cantidades de enterotoxina para emplearla como inmunógeno se recurre al método de Kato (15) que es superior en este sentido a las técnicas descritas anteriormente.

Kato desarrolló un método en el que empleó medio líquido con agitación y probó dos medios de cultivo para determinar en cual se logra mayor producción de enterotoxina. Los medios que estudió tuvieron como base diferentes hidrolizados pancreáticos de caseína. Uno de los hidrolizados (PHP) fué producido por Mead Johnson y el otro (N-Z Amino NAK) fué elaborado por Sheffield - Chemical Co.

Los resultados de los estudios de Kato en los que usó concentraciones diferentes de los hidrolizados, se muestran en la Tabla 8.

Debido a la poca disponibilidad del hidrolizado PHP Kato trató de sustituirlo con N-Z Amino NAK, que resultó poco eficaz por lo que recurrió a una mezcla de PHP al 3 % y N-Z Amino NAK al mismo porcentaje.

METODOLOGIA.

El inóculo se prepara tomando una asada de un cultivo de S. aureus enterotoxigénico de 18 a 24 h de incubación en medio de infusión de cerebro corazón y se suspende en un matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad que contiene 50 ml del medio PHP al

2 % complementado con niacina y tiamina. El matraz se incuba a 37°C durante 18 h.

Un matraz Erlenmeyer de 250 ml, que contiene 50 ml del hidrolizado PHP al 3 % combinado con el medio N-Z Amino NAK al 3 % a pH 6, se siembra con 0.5 ml del inóculo. Se incuba el matraz a 37°C durante 24 h con agitación por rotación a 280 rpm.

TABLA 8. Efecto del medio de cultivo en la producción de enterotoxina.

MEDIO ^b	ENTEROTOXINA (µg/ml)
PHP al 2 %	200
N-Z Amino NAK al 2 %	40
N-Z Amino NAK al 4 %	110
N-Z Amino NAK al 4 % + 0.1 % de K ₂ HPO ₄	210
PHP al 1 % + N-Z Amino NAK al 1 %	190
PHP al 3 % + N-Z Amino NAK al 3 %	480

^bSuplementado con niacina 0.001 % y tiamina al 0.00005 %.

Kato 1966, (15).

VENTAJAS.

Con este método se obtienen grandes cantidades de enterotoxina. Esta toxina una vez que ha sido sujeta a un proceso de purificación, se emplea en la obtención del suero hiperinmune --

que se utiliza en la detección de las enterotoxinas por métodos inmunológicos.

Otra ventaja que presenta esta técnica es que es más fácil preparar un matraz Erlenmeyer con el medio de cultivo para la obtención de la toxina, que efectuar el proceso de preparación de los dispositivos que se emplean en los métodos anteriores.

INCONVENIENTES.

El principal inconveniente es que la enterotoxina obtenida se encuentra en un volúmen final muy grande, lo que dificulta su separación del medio de cultivo, pero este inconveniente se elimina al purificar y concentrar el producto crudo.

1.4. PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS EN MEDIO SEMISOLIDO.

Casman y Bennett, 1963 (7).

El método consiste en colocar 25 ml del medio en cajas Petri. La superficie del medio se inocula con 4 gotas de una suspensión acuosa que contenga 3×10^8 microorganismos/ml, el inóculo se reparte en toda la superficie de la placa y se incuba en aerobiosis de 2 a 3 días a una temperatura de 35 a 37°C. Las bacterias y el medio de cultivo se eliminan por centrifugación a altas velocidades.

En general este método es muy poco empleado, por lo que

la información acerca de las ventajas e inconvenientes es muy es casa y las cantidades de enterotoxina obtenidas se desconocen.

1.5. OBTENCION DE LAS ENTEROTOXINAS EN FERMENTADOR.

Jarvis, Lawrence y Pritchard en 1973 (11) estudiaron la producción de las enterotoxinas A, B y C, en fermentador, bajo diferentes condiciones de pH, aereación y agitación. La Tabla 9 muestra las cepas que estos investigadores emplearon, en la obtención de las correspondientes toxinas.

TABLA 9. Cepas que emplearon Jarvis "et al" para la producción de las enterotoxinas A, B y C en fermentador.

CEPA	ENTEROTOXINA
10	A
100	A
743	A
22	B
30	B
S-6	B
3	C
37	C
361	C

Jarvis "et al", 1973, (11).

Estos investigadores usaron dos medios para la producción de las enterotoxinas; un hidrolizado de caseína (medio HC), complementado con vitaminas y sales minerales, el segundo fué un medio que contenía aminoácidos, vitaminas y sales minerales (medio AA) y fué desarrollado por Bergdoll y Wu en el año de 1971.

Jarvis "et al" compararon la cantidad de enterotoxina producida por el método del fermentador, con la obtenida con el medio líquido con agitación. El objetivo de esta comparación fué determinar las condiciones de pH, aereación y agitación, óptimas para la producción de las enterotoxinas. Los resultados de esta comparación se muestran en la Tabla 10.

Un objetivo adicional de esta comparación fué el observar el efecto del antiespumante, empleado en la técnica del fermentador, sobre la producción de las enterotoxinas.

METODOLOGIA.

El inóculo se prepara separando el desarrollo de un cultivo de S. aureus de 18 a 24 h de incubación, en medio de infusión de cerebro corazón agar inclinado. Esta separación se efectúa de la siguiente forma; se adicionan 6 ml de solución salina isotónica estéril, mediante una pipeta de 10 ml estéril con un bulbo de hule adaptado, se expelle y se absorbe repetidas veces, hasta que se desprenda el desarrollo bacteriano, que se pasa a un matraz Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 250 ml de infusión de cerebro corazón agar. Este matraz se incuba de 18 a 24 h

Al finalizar el tiempo de incubación se adicionan aproximadamente 100 ml de solución salina isotónica estéril para desprender el desarrollo.

Esta suspensión de bacterias se pasa a un tanque de fermentador de 5 litros de capacidad, el cual se ha cargado previamente con 2 litros del medio en estudio. El medio de cultivo se debe seleccionar de acuerdo a la cepa que se va a emplear y a la enterotoxina que se desea obtener.

El pH óptimo para la producción de las enterotoxinas en fermentador debe ser de 6.5 a 7.3, estos datos se encuentran en las Tablas 11 y 12. Las otras condiciones para la obtención de las enterotoxinas en fermentador son: la aereación se efectúa con una mezcla de aire y nitrógeno; la velocidad de rotación es de 1 000 rpm; el antiespumante se adiciona a medida que se va necesitando; el tiempo de incubación es de 18 a 24 h y la temperatura de 37°C.

VENTAJAS.

La Tabla 10 muestra que el método que emplea el medio líquido con agitación permite obtener cantidades mayores de enterotoxina que con el fermentador. La ventaja que tiene esta última técnica sobre la primera, es que se efectúa un número menor de pasos para la obtención de la enterotoxina. Porque solo se tiene



que inocular un recipiente mientras que en el método del medio líquido con agitación se tienen que inocular varios matraces, para obtener cantidades equivalentes de enterotoxina a las obtenidas en el fermentador.

INCONVENIENTES.

Una de las principales desventajas del método que emplea fermentador, es el volúmen final tan grande en que se encuentra la enterotoxina, por lo que tiene que ser sometida a procesos de purificación y concentración.

El antiespumante disminuye la producción de todas las proteínas extracelulares. Este grado de inhibición depende de la cepa de que se trate; las tres cepas productoras de enterotoxina A fueron menos sensibles al efecto del antiespumante, que las otras seis cepas que Jarvis "et al" emplearon. La Tabla 13 muestra el efecto del antiespumante en la producción de las enterotoxinas.

Es probable que la causa de tal inhibición, se deba a que el antiespumante disminuye la difusión del oxígeno en el medio de cultivo y a las células bacterianas.

Uno de los inconvenientes mayores es que es necesario contar con el fermentador y todos sus aditamentos.

TABLA 10. Producción de enterotoxinas y proteínas extracelulares totales (PET), en medio líquido con agitación (MLA) y en el fermentador (FER).

METODO	CEPA Y TIPO DE ENTEROTOXINA	ENTEROTOXINA (µg/ml)	PET (mg/ml)
MLA	10 A	2.6	0.98
FER	10 A	ND	0.22
MLA	100 A	7.6	0.13
FER	100 A	8.2	0.04
MLA	743 A	2.0	1.10
FER	743 A	1.0	0.38
MLA	22 B	104.0	0.28
FER	22 B	66.0	0.17
MLA	30 B	130.0	0.55
FER	30 B	53.0	0.15
MLA	S-6 B	290.0	2.95
FER	S-6 B	114.0	0.97
MLA	3 C	62.0	0.59
FER	3 C	11.0	0.27
MLA	37 C	86.0	0.22
FER	37 C	3.0	0.71
MLA	361 C	63.0	0.75
FER	361 C	2.6	0.09

ND = no detectable.

Jarvis, Lawrence y Pritchard, 1973 + (11).

TABLA 11. Efecto del pH sobre la producción de enterotoxinas A, B, C y otras proteínas extracelulares (el medio empleado es un medio con aminoácidos).

CEPA	PROTEINA EXTRACELULAR	MLA	pH EN EL FERMENTADOR			
			6.0	6.5	7.5	8.0
100	ENT A	6.5	24.3	32	20	-
	PET	0.14	0.06	0.05	0.15	-
S-6	ENT A	ND	3.1	1.9	1.4	ND
	ENT B	194	96	129	131	78
	PET	0.68	0.46	0.67	1.12	0.46
.	ENT C	100	25	53	30	-
	PET	0.64	0.21	1.02	0.90	-

MLA = medio líquido con agitación.

ENT = enterotoxina expresada en $\mu\text{g/ml}$.

PET = proteína extracelular total expresada en mg/ml .

ND = no detectable.

Jarvis, Lawrence y Pritchard, 1973 (11).

TABLA 12. Efecto del pH sobre la producción de enterotoxinas A, B, C y otras proteínas extracelulares (el medio empleado es un hidrolizado de caseína).

CEPA	PROTEINA EXTRACELULAR	MLA	pH EN EL FERMENTADOR			
			6.0	6.5	7.5	8.0
100	ENT A	7.6	11	21.5	15	6.5
	PET	0.13	0.04	0.14	0.04	0.04
S-6	ENT A	ND	-	3.1	2.0	ND
	ENT B	290	-	169	180	124
	PET	2.95	-	0.73	1.67	1.14
361	ENT C	63	-	3.7	4.6	7.1
	PET	0.75	-	0.27	0.7	0.4

MLA = medio líquido con agitación.

ENT = enterotoxina en $\mu\text{g/ml}$.

PET = proteína extracelular total en mg/ml .

ND = no detectable.

Jarvis, Lawrence y Pritchard, 1973 (11).

TABLA 13. Efecto del antiespumante en la producción de las enterotoxinas A, B y C (el medio empleado es un hidrolizado de caseína).

CEPA		ANTIESPUMANTE (mg/ml)		
		0.0	1.5	5.0
100	ENT A	8.3	8.3	6.3
	PET	0.04	0.03	0.03
S-6	ENT B	256	214	72
	PET	0.20	0.16	0.12
361	ENT C	38	28	13
	PET	0.35	0.21	0.19

ENT = enterotoxina en $\mu\text{g/ml}$

PET = proteína extracelular total en mg/ml

Para la obtención de la enterotoxina se empleo la técnica del medio líquido con agitación.

Jarvis, Lawrence y Pritchard 1973 (11).

CONCLUSIONES SOBRE LA OBTENCION EN EL LABORATORIO DE LAS ENTEROTOXINAS.

Con los métodos que utilizan tubo y saco de diálisis se obtiene enterotoxina altamente concentrada, esto se debe a que el volúmen final es muy pequeño porque en los dos casos la enterotoxina producida no entra en contacto con el medio de cultivo.

La técnica de cultivo en saco ofrece ventajas sobre el método del tubo de celofán, porque es más fácil preparar el dispositivo empleado en el método del saco que el usado en el procedimiento del tubo. Otra ventaja es que es más fácil sembrar el matraz empleado en la técnica del saco que el tubo de diálisis que se usa en el segundo método. Por lo que respecta al volúmen de enterotoxina obtenido, este es mayor utilizando la primera técnica (Donnelly, 1967) (10) por lo que es más fácil la recuperación de la enterotoxina en comparación con el volúmen pequeño obtenido por la técnica del tubo. De los estudios de Bergdoll sobre los dos métodos, llegó a la conclusión de que la técnica del tubo de diálisis es superior porque la enterotoxina está contenida en un volúmen final más pequeño. Untermann en el año de 1972 concluyó que el método del saco es mejor. Holbrook (13) recomienda la técnica de Donnelly (saco de diálisis) como la más accesible para el trabajo de rutina.

Si se desea obtener cantidades muy grandes de enterotoxina para ser usada como inmunogéno, las técnicas de elección son: el medio líquido con agitación y el método que emplea fermentador.

El uso de un procedimiento u otro depende del material con que cuente el laboratorio; la desventaja que presentan estos dos métodos es que como la enterotoxina se libera en el medio de cultivo por lo que el volúmen final es muy grande, y esto hace necesario que se proceda a la purificación y concentración de la toxina cruda.

CAPITULO IV. IDENTIFICACION DE LAS ENTEROTOXINAS.

1. Métodos biológicos.

2. Métodos serológicos.

2.1. Técnicas de precipitación.

2.2. Técnicas de aglutinación.

2.3. Radioinmunoanálisis.

IDENTIFICACION DE LAS ENTEROTOXINAS.

1.0 METODOS BIOLOGICOS.

Los primeros métodos biológicos descritos para la detección de cepas enterotoxigénicas o de la toxina presente en los alimentos contaminados, fueron desarrollados por Dolman en 1940 Hammon en 1941 (12) y Bergdoll y Wen 1959 (1), (3).

1.1. PRUEBA EN MONOS.

La prueba se efectúa en monos rhesus (Macaca mulata) jóvenes (1) y (3), administrándoles por vía oral, intragástrica o intravenosa la muestra por probar, y se basa en el efecto emético que la enterotoxina ejerce sobre estos animales de prueba.

METODOLOGIA.

Se toma un lote de seis monos de 3 Kg de peso, a los que se les administra la toxina cruda (50 ml). Cuando se emplea la vía oral se usa un catéter para lograr la ingestión. Si se presenta emesis durante las 5 h posteriores a la administración de la enterotoxina en dos o más monos del lote, la prueba se interpreta como positiva.

SEN

SENSIBILIDAD.

Por este método es posible detectar cantidades tan pequeñas como 5 ug de enterotoxina ya que esta concentración es la dosis emética al 50 % (DE_{50}) según se concluye de la Tabla 2.

VENTAJAS.

No es necesario procesar los alimentos sospechosos ni purificar las enterotoxinas a partir de sobrenadantes de cultivo de S. aureus para administrarlos a los monos. Esta técnica y la prueba en gatos són los dos únicos métodos biológicos que existen para detectar enterotoxinas así como para determinar la potencia de las enterotoxinas, cuando no se cuenta con el suero inmune.

INCONVENIENTES.

Los animales adquieren rápidamente resistencia después de la primera dosis de enterotoxina, por lo que es necesario emplear animales nuevos en cada prueba y esto hace que el costo de la prueba sea muy elevado.

1.2. PRUEBA EN GATOS.

Hammon en 1941 (12) evaluó la prueba en gatos descrita por Dolman en 1936, en un intento por detectar las enterotoxinas estafilococcicas y para simplificar y estandarizar la interpretación de los resultados obtenidos.

METODOLOGIA.

Se emplean lotes de cuatro gatos (Felis catus) jóvenes de 800 g de peso, que se inyectan en la vena safena con 0.5 a 5 ml de sobrenadante de un cultivo de S. aureus enterotoxigénico, o

de extracto de alimento sospechoso. Hammon calentaba el material de prueba en baño de agua durante 30 minutos para inactivar las alfa y beta hemolisinas antes de administrar el inóculo a los gatos. Actualmente se sabe que con este procedimiento se corre el riesgo de inactivar algunas enterotoxinas por el tratamiento térmico, por lo que se recurre a la tripsinización para destruir - las hemolisinas.

INTERPRETACION.

Si se produce emesis en tres o más gatos, 10 a 180 minutos después de la inyección, el resultado se interpreta como positivo. La prueba no es definitiva si solo dos animales presentan vómito durante este tiempo y la respuesta se considera negativa - cuando solo uno o ninguno presenta vómito.

SENSIBILIDAD.

No se ha establecido.

VENTAJAS.

Las mismas que presenta la prueba en monos pero además los gatos son fáciles de conseguir.

INCONVENIENTES.

Los gatos al igual que los monos adquieren rápidamente resistencia a las enterotoxinas por lo que es necesario usar anima

les nuevos para cada determinación. La importancia de estas pruebas es histórica debido al hecho de haber sido las primeras usadas para detectar las enterotoxinas.

2.0. METODOS SEROLOGICOS.

2.1. TECNICAS DE PRECIPITACION.

Se han descrito varios métodos para la detección y cuantificación de las enterotoxinas, de éstos la técnica de micro-doble difusión y la de doble difusión en tubo, son las más frecuentemente empleadas para la investigación de las enterotoxinas en los alimentos y sobrenadantes de cultivos.

2.1.1. MICRO-DOBLE DIFUSION EN GEL DE AGAR.

Este método desarrollado originalmente por Ouchterlony se emplea según la modificación de Wadsworth (1957) y Crowle (1958)

La reacción antígeno anticuerpo se efectúa en una placa de gel de agar, en la que se practican cortes circulares, se elimina el agar de los cortes y los pozos así obtenidos se llenan uno con la enterotoxina y el otro adyacente con el suero inmune. Tanto el antígeno como el anticuerpo difunden en el seno del gel con una velocidad que es directamente proporcional a su concentración e inversamente a su peso molecular (ley de Fick). En el lugar donde ambos reactivos, se ponen en contacto forman una línea de precipitación como resultado de la interacción entre ambos. Cuando se prueba una mezcla de antígenos con sus respecti-

vos anticuerpos se obtendrán tantas líneas de precipitación como sistemas antígeno-anticuerpo estén presentes.

Esta técnica se emplea cuando se desea conocer la composición de una mezcla de antígenos o anticuerpos y también para determinar las relaciones entre dos muestras a analizar por medio de comparación directa.

METODOLOGIA.

Un portaobjetos de 7.5 x 2.5 cm, perfectamente limpio y -desengrasado, se cubre con una capa fina de solución selladora, hecha con agar puro al 2 % en agua destilada, esta solución debe estar a una temperatura cercana al punto de ebullición. Se deja solidificar la película de agar a temperatura ambiente dejando el portaobjetos en posición vertical. A continuación, se coloca la laminilla sobre una superficie perfectamente nivelada, libre de vibraciones y se le adicionan 2.5 ml de agarosa fundida (esta es una solución de agarosa al 2 % preparada con amortiguador de veronal-acetato de pH 8.6 y μ de 0.01) de tal manera que se forme una capa de 3 mm de grosor aproximadamente. Se deja solidificar la placa colócala unos minutos en el refrigerador.

Con un horador de 3 mm de diámetro se practican 5 cortes circulares dispuestos en forma de roseta, uno central y cuatro periféricos, se sacan los cilindros de agar de los cortes mediante succión o con un aplicador de madera terminado en punta.

Mediante un tubo capilar se llena la horadación central -

con suero inmune monovalente. Empleando diferentes tubos capilares, se llenan los pozos 2 y 4, con la enterotoxina de referencia y los pozos 1 y 3 con el sobrenadante del cultivo de estafilococos o extractos de alimentos sospechosos. Se deja reaccionar de 32 a 72 h en cámara húmeda a temperatura ambiente.

La interpretación se hace de la siguiente manera, si la muestra por probar no contiene la enterotoxina o la que contiene es de un tipo serológico diferente a la toxina control, no se observarán líneas de precipitación frente a los pozos 1 y 3. Si la muestra por probar contiene enterotoxina del mismo tipo inmunológico que la toxina control se observará que las líneas de inmunoprecipitado se continúan con las de los controles, con lo cual se comprueba la identidad de las enterotoxinas.

SENSIBILIDAD.

Se pueden detectar entre 0.1 y 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina. De aquí la necesidad de extraer y concentrar las toxinas de los alimentos, como se describe en el siguiente capítulo.

VENTAJAS.

Es un método fácil de ejecutar, no requiere equipo, se necesitan volúmenes muy pequeños (0.02 ml) de reactivos, no interfieren con la reacción de precipitación otras proteínas que forman parte de los alimentos o de los sobrenadantes de cultivo.

INCONVENIENTES.

El tiempo requerido para observar las bandas de precipitación cuando la concentración de las enterotoxinas es de 0.5 ug/ml o menor, es de tres días o más de incubación. Por lo que solo puede emplearse como método de comprobación.

2.1.2. DOBLE DIFUSION EN TUBO (Caklay y Fulthorpe, 1953).

El sistema descrito por estos autores para realizar la precipitación en tubo está formado por tres capas, una inferior - constituida por suero inmune incorporado al gel de agar, una capa central de gel de agar y una superior de sobrenadante del cultivo de estafilococos o del extracto de alimento. El anticuerpo y el antígeno difundirán hacia la capa central formando una banda de precipitación en el área donde esten en concentración equivalente. Bergdoll, Surgalla y Dack (13), fueron los primeros en usar este método para detectar las enterotoxinas.

METODOLOGIA.

El agar se prepara con agarosa al 0.5 % disuelta con cloruro de sodio 0.145 mol/litro.

El suero inmune se diluye con amortiguador de fosfatos,, - 0.04 mol/litro, pH 7.2 y adicionado de timerosal al 0.002 %, para tener la dilución apropiada cuando se mezcle con un volumen igual de gel de agarosa fundida.

La agarosa fundida y a una temperatura de 60°C se mezcla con el suero inmune, se colocan 0.5 ml, tan rápido como sea posible, en tubos de 12 x 75 mm. Se debe tener especial cuidado para evitar que queden trazas de la mezcla agar-anticuerpo en la parte superior del tubo. Los tubos se tapan con tapones de hule y pueden almacenarse en refrigeración.

Cuando se va a usar un tubo, se colocan 0.2 ml de agarosa

al 0.25 % disuelta en amortiguador de fosfatos pH 7.2 sobre la base de agar-suero inmune.

Se preparan diluciones seriadas (en incrementos de dos) de la muestra por probar (extracto de alimento sospechoso o sobrenadante de un cultivo de estafilococos) con amortiguador de fosfatos 0.02 mol/litro y pH 7.2.

Una vez que la capa intermedia ha solidificado, se colocan 0.5 ml de las diluciones preparadas en el paso anterior, en sus respectivos tubos.

Los tubos se incuban 14 días a 25°C, se examinan periódicamente para observar si se han formado líneas de precipitación.

SENSIBILIDAD.

Con este método se pueden detectar concentraciones de más de 0.6 µg/ml de enterotoxina después de 7 días. Se presume que pueden determinarse 0.05 µg/ml de enterotoxina mediante un tiempo de reacción prolongado.

La sensibilidad del método depende de que el espesor de la capa central de agar sea pequeño, de que se logre la concentración óptima en la relación antígeno-anticuerpo y del tiempo.

VENTAJAS.

Los tubos con la mezcla gel de agarosa-anticuerpo son fáciles de preparar y se pueden mantener en refrigeración durante se

manas. Hoibrook (13) encontró que la sensibilidad del método no se ve afectada por concentraciones de cloruro de sodio hasta del 8 %, ni cuando el pH de la solución que contiene a la enterotoxina está entre 5 y 8.5.

INCONVENIENTES.

Cuando la enterotoxina se encuentra en baja concentración se requiere de 7 días como mínimo para que aparezcan las bandas de precipitación. El método consume mayor cantidad de suero inmune que la técnica de doble difusión en placa. Algunos extractos producen nebulosidad en la capa central que evita que las bandas débiles se puedan observar con claridad. No es posible comparar directamente las muestras de prueba con controles.

2.1.3. ELECTROINMUNODIFUSIÓN.

En esta técnica (Laurell, 1966) el antígeno colocado en un pozo migra bajo la influencia de un campo eléctrico desde su punto de aplicación, a través del gel de agar, que contiene el anticuerpo inmune monovalente. Conforme va avanzando el antígeno se forman dos líneas de precipitación paralelas al principio y que se cierran en el punto de equivalencia como consecuencia de la reacción de la enterotoxina con su anticuerpo. La longitud (l) medida a partir del borde del pozo al punto de equivalencia es directamente proporcional a la concentración del antígeno e inversamente a la concentración del anticuerpo.

Chugg en 1972 (13) describió las condiciones electroforéticas bajo las cuales se pueden obtener resultados cuantitativos, para concentraciones de enterotoxina superiores a 200 $\mu\text{g/ml}$, en el año de 1974 Holbrook (13), modificó las condiciones para trabajar con concentraciones de enterotoxina entre 0.5 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

METODOLOGIA.

Se emplean portaobjetos de 7.5 x 5 cm que se sellan con agar al 2 % disuelto en agua, se deja gelificar la capa de agar a temperatura ambiente, colocando el portaobjetos en posición vertical.

La mezcla de agar se prepara con 2 ml de agarosa al 2 % (disuelta en agua) fundida y a una temperatura de 50°C, y con un volumen igual de amortiguador de veronal acetato 0.025 mol/litro adicionado con lactato de calcio 0.004 mol/litro en el que va disuelta la cantidad requerida de anticuerpo. La placa con la mezcla antígeno-anticuerpo se deja solidificar aproximadamente 15 minutos, en el refrigerador.

Con un horador se practican cortes circulares de 2 mm de diámetro, separados entre si 8 mm. Mediante succión o con un aplicador de madera terminado en punta se sacan los cilindros de agar de los cortes. Tres pozos se llenan con 5 μl de enterotoxina control y los restantes con material de prueba.

El contacto entre las placas y los depósitos de amortiguador del tanque de electroforesis se logra con dos tiras de papel

Whatman No. 1.

La electroinmunodifusión se efectúa durante 2 h, con una corriente de 5.5 mA y 150 V, a una temperatura de 20°C.

Al término de la electroinmunodifusión la placa se sumerge en una solución de cloruro de sodio 0.2 mol/litro toda la noche con lo que se eliminan las proteínas que no reaccionaron.

La placa se seca con aire caliente o cubriéndola con papel absorbente en un horno a 60°C.

Para teñir los inmunoprecipitados, la placa se sumerge, durante 20 minutos, en una mezcla, hecha con partes iguales de Amido Black 10 B al 0.5 % y ácido acético al 5% (que contiene HgCl₂ al 5 % y rojo de tiazina al 0.1 % disuelta en ácido acético al 1 %). Se deja escurrir el colorante y se lava la placa con ácido acético al 1 %, la solución se debe cambiar cada 10 minutos, hasta que el gel de agar quede incoloro y solamente las bandas de precipitación estén teñidas. Finalmente se sumerge el portaobjetos en agua destilada y se seca.

Se mide la distancia entre los pozos y los puntos de equivalencia, las longitudes (l) medidas en mm, obtenidas de los pozos correspondientes a las diluciones de la enterotoxina control se grafican contra sus respectivas concentraciones. Para conocer la cantidad de toxina presente en los problemas, basta interpolar su longitud (l) en la curva patrón.

SENSIBILIDAD.

Las enterotoxinas A y B pueden ser cuantificadas desde con

centraciones de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

VENTAJAS.

Este método entre otras ventajas tiene la de ser cuantitativo, por el hecho de que en la misma placa se corren problemas y diluciones de la enterotoxina control, lo que permite elaborar una curva patrón bajo las mismas condiciones de trabajo a las que fueron sometidos los extractos de alimentos o sobrenadantes de cultivos sospechosos.

El método es rápido cuando la enterotoxina se encuentra en concentraciones superiores a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, porque no es necesario teñir los inmunoprecipitados, ya que estos son perfectamente claros a simple vista.

INCONVENIENTES.

Una de las desventajas del método es que requiere del aparato de electroforesis. Otro de los inconvenientes es que consume gran cantidad de suero inmune lo que eleva aún más su costo.

Cuando la concentración de la enterotoxina es menor de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ es indispensable teñir para observar las líneas de precipitación. Esta técnica requiere de personal entrenado para su ejecución.

2.2. TECNICAS DE AGLUTINACION.

Para hacer que un antígeno que está en solución, como en el caso de las enterotoxinas, intervenga en una reacción de aglutinación se recurre al artificio de recubrir con enterotoxina, o con su anticuerpo a eritrocitos (de humano del grupo O, de carne ro o de caballo), o bien partículas de látex, poliestireno, que actúan como soporte inerte; esto permite obtener resultados de la reacción antígeno-anticuerpo en cuestión de minutos y simplificar el método.

2.2.1. HEMAGLUTINACION INDIRECTA O PASIVA.

Esta técnica se denomina así porque se emplean eritrocitos como soporte inerte.

Existen diferentes variantes de este método: una en la que el antígeno se une a glóbulos rojos tratados previamente con ácido tánico (los eritrocitos sin tratar se lisan si el medio no es isotónico, por lo que generalmente se tratan con formol o glutaraldehído), este tratamiento en el caso particular de las exotoxinas estafilocócicas es necesario ya que los hace resistentes a la acción de las hemolisinas que pudieran encontrarse presentes en la muestra por analizar; los eritrocitos recubiertos o sensibilizados se lavan para eliminar el exceso de enterotoxina y se hacen reaccionar con la antitoxina.

La modalidad conocida como inhibición de la hemaglutinación consiste en hacer reaccionar cantidades constantes de anticuer-

pos con diluciones seriadas del problema, después de efectuarse la neutralización se adiciona un sistema revelador que consiste en glóbulos rojos recubiertos con enterotoxina; la concentración de la toxina corresponde a la máxima dilución que presente inhibición de la hemaglutinación.

La variante que se describe a continuación se denomina hemaglutinación pasiva inversa; esta técnica emplea eritrocitos - tratados con glutaraldehído sensibilizados con antienterotoxina, a los que se les adicionan diluciones seriadas de la muestra problema; el título se encuentra en la máxima dilución que presente hemaglutinación.

2.2.1.1. HEMAGLUTINACION PASIVA INVERSA.

Este método se puede resumir en los siguientes pasos: purificación del suero inmune, sensibilización de los eritrocitos con glutaraldehído y su recubrimiento con la gamma-globulina purificada y finalmente la reacción entre los eritrocitos sensibilizados adicionando las diluciones del material de prueba.

METODOLOGIA.

Purificación de la gamma-globulina. El suero antienterotoxina empleado debe tener un título alto de anticuerpos. El proceso de separación de las inmunoglobulinas se efectúa con dietilaminoetil celulosa (DEAE) que es un intercambiador iónico que tiene la propiedad de absorber a todas las proteínas plasmáticas

a excepción de las gamma-globulinas. La separación se efectúa a una temperatura entre 8 y 10°C. Una vez separadas las inmunoglobulinas la solución se concentra mediante diálisis con vacío.

Preparación de los eritrocitos de carnero (GRC). La sangre del carnero se obtiene por punción en la vena yugular, para evitar la coagulación, se mezcla volumen a volumen con solución de Alsever. El plasma se elimina y los GRC se lavan con solución salina isotónica, se centrifuga durante 15 minutos a 2 500 rpm. El proceso se repite hasta que el sobrenadante quede incoloro. Se mide el volumen que ocupan los eritrocitos y se adiciona la cantidad necesaria de solución salina para obtener una suspensión al 50 %. Se toma un volumen de la suspensión de eritrocitos y se mezcla con un volumen y medio de aldehído pirúvico al 25 % ajustado a pH de 7.0 con solución de Na_2CO_3 al 1 % y 0.7 volúmenes de amortiguador de fosfatos 0.15 mol/litro de pH 8.0. La suspensión se mantiene a 4°C durante 24 h con agitación constante. - Transcurridas estas 24 h se procede a lavar las células para eliminar el exceso de aldehído (este lavado se lleva a cabo en la misma forma que el anterior). Los GRC tratados se pueden almacenar durante seis meses en solución salina isotónica adicionada de azida de sodio al 0.1 % y a una temperatura de 4°C, sin que sufran deterioro.

Sensibilización de los eritrocitos. Las células tratadas se lavan dos veces con solución salina isotónica, se centrifugan

a 2 500 rpm durante 15 minutos. Se mide el volúmen del paquete celular y se adiciona solución salina para tener una suspensión de GRC tratados al 2.5 %. A esta suspensión se le adiciona un volúmen igual de glutaraldehido 1:20 000 preparado recientemente, la mezcla se deja reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se centrifuga a menos de 1 000 rpm, para sedimentar las células, se decanta el sobrenadante y se procede a lavar en la forma que se describió anteriormente. Las células libres del sobrenadante, se suspenden volúmen a volúmen con solución salina amortiguada con fosfatos 0.15 mol/litro de pH 6.4. A esta suspensión de eritrocitos se le adicionan, en proporción de 1:2 el preparado de inmunoglobulinas purificado y diluído con la misma solución amortiguada con fosfatos. (La concentración de glutaraldehido e inmunoglobulina, que da la sensibilización óptima de los GRC se obtiene mediante el proceso que se explica en el siguiente párrafo). Para continuar el proceso de sensibilización de los GRC, con los anticuerpos, se incuba durante 1 h a 37°C, se centrifuga a baja velocidad y se resuspenden las células en amortiguador de fosfatos 0.15 mol/litro pH 7.2 (adicionado de albúmina sérica bovina al 0.8 %). Se deja reposar durante 1 h a temperatura ambiente, se centrifuga a baja velocidad y finalmente se resuspende en la mitad del volúmen del mismo amortiguador.

Sensibilización óptima de los GRC. La concentración de glutaraldehido e inmunoglobulina necesarias para obtener la sensi--

bilización óptima de los eritrocitos se consigue tratando alícuotas de la suspensión de GRC con diluciones progresivas de glutaraldehído desde 1:10 000 hasta 1:80 000 y mezclando alícuotas de estas con diluciones progresivas de gamma-globulina desde 1:50 hasta 1:500. Los GRC se prueban con enterotoxina diluida desde 0.1 hasta 0.00009 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se corren controles para cada diluyente

Prueba. Se hace mezclando diluciones seriadas en incrementos de dos del material por analizar con 0.5 ml de amortiguador de fosfatos 0.15 mol/litro de pH 7.2 (adicionado de albúmina sérica bovina al 0.8 %); a cada dilución se le agrega una gota -- (0.025 ml) de GRC sensibilizados. Se mezcla perfectamente. En la prueba se deben incluir controles negativos y de eritrocitos. Los resultados se leen a las 4 h o al día siguiente.

SENSIBILIDAD.

Con el método de hemaglutinación pasiva inversa se pueden detectar hasta 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de enterotoxina.

VENTAJAS.

Una de las ventajas que presenta esta técnica es su rapidez. Cuando el sistema de prueba se ha establecido, se pueden obtener resultados en 4 h.

Otra ventaja es que los extractos de alimentos contaminados con estafilococos enterotoxigénicos pueden ser estudiados sin necesidad de someterlos a largos procesos de concentración.

INCONVENIENTES.

La aplicación de este sistema de prueba para la detección de la enterotoxina, en diversos tipos de alimentos, no se ha estudiado a fondo.

Las células recubiertas con el anticuerpo se deterioran después de una semana de almacenamiento a 4°C.

Quizá la mayor desventaja que presenta esta técnica es la dificultad para acoplar el suero inmune procedente de algunos animales con los eritrocitos.

2.3. RADIOINMUNOANÁLISIS. (9) y (13).

Johnson, Bukovic, Kauffman en 1971 y Collins, Metzger y Johnson en el año de 1972 aplicaron esta técnica a la cuantificación de enterotoxina B en alimentos contaminados con S. aureus. Los anticuerpos contra la toxina se fijan a un soporte sólido, que puede ser: tubos de poliestireno o partículas de bromoacetyl celulosa. Es factible efectuar un análisis cuantitativo, porque la enterotoxina B presente en el alimento contaminado, ejerce un efecto inhibitorio en la unión del antígeno marcado con ¹²⁵I con el anticuerpo fijado previamente al soporte sólido. Esto hace posible medir, con un contador de centelleo, el antígeno que queda libre (Collins, 1972) o el unido (Johnson, 1971).

El método que se describe a continuación, es el que en el año de 1973, Collins, Johnson y Metzger desarrollaron para la cuantificación de la enterotoxina A. Los pasos más importantes que lo

integran son los siguientes: unión del anticuerpo a la bromoacetilcelulosa, preparación del antígeno marcado, determinación de la concentración óptima del anticuerpo unido al soporte sólido.

METODOLOGIA.

Preparación del anticuerpo unido a la bromoacetilcelulosa (Ac-BAC). El suero inmune anti-enterotoxina A se obtiene inmunizando cabras con toxina altamente purificada, mezclada con adyuvante completo de Freund. El esquema de inmunización es el siguiente: durante 4 meses se inmuniza a los animales con 1 mg de la enterotoxina, por vía intramuscular, a intervalos de 2 semanas. La presencia de anticuerpos en alto título se determina por el método de doble difusión en gel de agar de Ouchterlony.

Las inmunoglobulinas se separan del suero inmune anti-enterotoxina A, usando una columna de dietilaminoetil-Sephadex A-50, que se equilibra con amortiguador de fosfatos 0.1 mol/litro de pH 6.5. Se eluyen las gamma-globulinas de la columna y su presencia en el eluado se demuestra mediante inmunodifusión y electroforesis.

Los anticuerpos purificados se acoplan a la bromoacetilcelulosa (Ac-BAC) de la siguiente manera (método de Robbins): la bromoacetilcelulosa (BAC) se lava con amortiguador de fosfatos y citratos 0.01 mol/litro de pH 4.6; 50 mg (peso seco) de BAC (lavada) se mezclan con 15 mg de gamma-globulina purificada, se adicionan 20 ml del mismo amortiguador con que se lavó la BAC, y se

agita vigorosamente durante 24 h. El complejo Ac-BAC se sedimenta por centrifugación a 1 500 g durante 20 minutos a 4°C, se resuspende con 20 ml de NaHCO₃ 0.1 mol/litro, se ajusta el pH a 8.6 con HCl 0.1 mol/litro y se refrigera durante 24 h a 4°C. Se vuelve a sedimentar bajo las mismas condiciones y se resuspende en 20 ml de monoetanolamina 0.01 mol/litro. Se deja reposar durante 24 h a 4°C, el complejo Ac-BAC se recupera por centrifugación, se lava tres veces con 20 ml de NaCl 0.14 mol/litro y se resuspende en una solución de NaCl 0.14 mol/litro adicionada de azida de sodio.

Preparación del antígeno marcado. El antígeno puro se puede marcar con ¹²⁵I mediante dos métodos: el de Greenwood y Hunter, que usa la Cloramina T como auxiliar en el acoplamiento entre la proteína y el yodo; en la técnica de Gruber y Wright la proteína se marca por microdifusión del ¹²⁵I en estado gaseoso, sin que existan otros reactivos en el sistema. El antígeno marcado por la primera técnica resulta ser más específico pero de menor estabilidad, que el obtenido por el segundo método. En el caso de la enterotoxina A marcada con el segundo procedimiento, se puede almacenar a 4°C (aproximadamente durante 2 meses) sin que sufra cambio en su antigenicidad. Antes de ser usada se diluye con amortiguador de boratos 0.2 mol/litro (adicionado de albúmina sérica bovina al 0.7 %), hasta 7 500 cpm/10 µl.

Determinación de la concentración óptima del Ac-BAC para las pruebas de inhibición de la unión del antígeno marcado, con su anticuerpo. El Ac-BAC se titula para establecer las condiciones óptimas de la prueba de inhibición; esta titulación se hace de la siguiente manera: el complejo Ac-BAC se diluye con solución de boratos adicionada de albúmina sérica bovina (boratos-ASB), desde 1:2 hasta 1:10 000. Se colocan, por duplicado, 0.5 ml de cada dilución en tubos de centrifuga de policarbonato de 16x100 mm, se adicionan 10 μ l del antígeno marcado (aproximadamente 6 000 cpm), se incuba durante 15 minutos a 25°C y después 1 h a 4°C con agitación. Se agregan 1.5 ml de boratos-BSA a cada tubo y se centrifugan a 25 000 g durante 10 minutos a 4°C. Se toma 1 ml del sobrenadante de cada tubo, se llevan al contador de centelleo para determinar las cuentas por minuto. Estos datos se grafican contra las diluciones del Ac-BAC para obtener la concentración que da el 50 % de unión con el antígeno marcado.

Prueba. Se diluye 1 μ g/ml de enterotoxina (sin marcar) desde 1:2 hasta 1:1 000; se depositan 100 μ l de cada dilución en tubos de 16x150 mm, a los que se les agrega 0.5 ml de la dilución de Ac-BAC que da el 50 % de unión con el antígeno marcado y 10 μ l de la toxina marcada con 125 I. Los tubos se agitan vigorosamente durante 15 minutos a temperatura ambiente 1 h a 4°C, se les agregan 1.5 ml de boratos-ASB frío y cada tubo se centrifuga durante 10 minutos a 25 000 g. Para determinar la cantidad de enterotoxina marcada que no se unió al Ac-BAC, se determina la radioactivi

dad en 1 ml de cada sobrenadante. Las cuentas por minuto obtenidas se grafican contra la concentración ($\mu\text{g/ml}$) de toxina no marcada.

Para conocer la cantidad de enterotoxina A presente en un alimento, se procede en la misma forma que para la elaboración de la gráfica, sólo que en lugar de efectuar diluciones de toxina no marcada, se extrae la enterotoxina del alimento sospechoso con solución de boratos-ASB y se agregan 100 μl de este extracto al Ac-BAC. Las cuentas por minuto obtenidas se interpolan en la gráfica para conocer la cantidad de enterotoxina presente en el alimento.

SENSIBILIDAD.

Con esta técnica se pueden detectar 0.01 a 0.001 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina.

VENTAJAS.

Las principales ventajas del método son las siguientes: es muy sensible, puesto que detecta hasta 0.001 $\mu\text{g/ml}$ de toxina.

Cuando la ejecución de la prueba ya se domina y se cuenta con cantidades suficientes de reactivos se pueden obtener resultados en menos de un día.

El material por probar no se sujeta a procesos largos de extracción y concentración, si no que se adiciona al sistema de prueba en forma de suspensión en solución de boratos-ASB.

INCONVENIENTES.

La técnica requiere de equipo especializado, poco frecuente en el laboratorio, y personal capacitado para el manejo de radioisótopos. Por otra parte la preparación de los reactivos es laboriosa y consume mucho tiempo.

CONCLUSIONES SOBRE LOS METODOS SEROLOGICOS EMPLEADOS PARA LA INVESTIGACION DE LAS ENTEROTOXINAS EN ALIMENTOS CONTAMINADOS.

Para detectar las enterotoxinas con los métodos de precipitación los alimentos sospechosos de contenerlas, deben someterse a procesos de extracción y concentración. El proceso de extracción descrito por Casman en el año de 1967, tarda 4 días para completarse y la detección serológica de la enterotoxina de 1 a 7 días, dependiendo del método empleado.

Las dos técnicas más rápidas por no requerir el procesamiento de alimentos y más sensible (se pueden detectar hasta 0.001 ug/ml de enterotoxina) que se conocen en la actualidad son el radioinmunoanálisis y la hemaglutinación pasiva inversa. Con estos dos métodos los resultados se obtienen en 2 días. Sin embargo, estas dos técnicas solo se han utilizado en la detección de las enterotoxinas A y B. Para estas técnicas se requiere suero inmune de alto título, así como de enterotoxina muy pura; ambos reactivos son relativamente difíciles de obtener.

Bennett et al en 1963 encontraron que el método de hemaglutinación pasiva inversa da reacciones cruzadas con otros productos de origen bacteriano, en algunas ocasiones. La técnica de radioinmunoanálisis no presenta este inconveniente.

CAPITULO V. EXTRACCION DE ALIMENTOS SOSPECHOSOS Y PURIFICACION DE
LAS ENTEROTOXINAS OBTENIDAS EN MEDIOS DE CULTIVO.

EXTRACCION DE LAS ENTEROTOXINAS DE LOS ALIMENTOS SOSPECHOSOS.

Casman y Bennett en 1965 (13) y Bergdoll en 1972 (13) reportaron que los alimentos implicados en casos de envenenamientos pueden contener 0.01 μg o cantidades menores de enterotoxina por gramo de alimento.

Con los métodos de difusión en gel usados para detectar las enterotoxinas se tiene un máximo de sensibilidad de 0.1 a 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, esto hace necesario extraer y concentrar la toxina presente en los alimentos sospechosos.

Casman y Bennett en 1965 y Casman en 1967 describieron los métodos apropiados para la extracción de la enterotoxina de los alimentos. El método de Casman puede emplearse tanto en alimentos de bajo como de alto contenido proteico, para lograr la extracción completa se requiere de cuatro días.

1. METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINAS (CASMAN) MODIFICADO POR HOLBROOK (13).

El procedimiento para la extracción de las toxinas, modificado por Holbrook, en forma general, se efectúa de la siguiente manera: se homogeneiza el alimento sospechoso en solución salina se eliminan los lípidos con cloroformo; las toxinas se separan de otras proteínas presentes en el alimento por medio de precipitación ácida y cromatografía en columna y finalmente el eluado se concentra a un volumen de 0.4 ml.

METODOLOGIA.

Se homogeinizan 100 g del alimento con 500 ml de solución de cloruro de sodio 0.2 mol/litro, se ajusta el pH a 7.5, se deja reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se ajusta el pH nuevamente si es necesario. Se centrifuga a 20 000 g durante 15 minutos a 5°C. Se separa el sobrenadante y se vuelve a extraer el material soluble del sedimento con 125 ml de solución salina, se mezclan los dos sobrenadantes.

Para eliminar las grasas de los sobrenadantes, se adiciona una cuarta parte del volúmen de cloroformo y se agita vigorosamente diez veces; se centrifuga durante 10 minutos a 6 000 g a 5°C y se separa la fase acuosa.

Mediante diálisis inversa se concentra el extracto reduciendo su contenido salino con polietilen-glicol al 30 % a 4°C durante toda la noche. Al finalizar el proceso, se lava la parte externa del tubo de diálisis con agua destilada durante 10 minutos, se vacía su contenido y se remueve la toxina que haya quedado adherida a las paredes con 10 ml de solución salina con lo que se tiene un volúmen final de 40 ml.

Se ajusta el pH a 4.5 con HCl 5 mol/litro. Se centrifuga a 2 000 g durante 15 minutos a 5°C.

Se ajusta el pH del sobrenadante a 5.7 con hidróxido de so

dio 1 mol/litro.

Se extrae el sobrenadante con una cuarta parte del volúmen de cloroformo y se centrifuga 10 minutos a 6 000 g a 5°C y se se para la fase acuosa. Si aparece un precipitado, se extrae nuevamente con cloroformo. Si la fase acuosa es turbia se centrifuga.

Esta fase se diluye con cuarenta volúmenes de amortiguador de fosfatos 0.005 mol/litro de pH 5.7, si es necesario se ajusta al mismo pH con ácido fosfórico o fosfato disódico 0.005 a 0.01 mol/litro. Con esto la molaridad de la solución se reduce a 0.005 a 0.01 mol/litro.

Se pasa la solución a través de una columna de intercambio iónico de carboximetil celulosa (CMC) Watman CM 52, a una velocidad de flujo de 1.5 ml/minuto y a una temperatura de 4°C. Este paso se puede efectuar durante toda la noche.

El eluado se concentra a un volúmen de 0.4 ml por diálisis contra polietilen-glicol al 20 % a 4°C. Se lava con agua para eliminar los restos de polietilen-glicol y se sumerge en amortiguador de fosfatos 0.02 mol/litro pH 7.2 durante 15 minutos.

Se centrifuga para remover el material insoluble, y se extrae con cloroformo hasta que no se forme precipitado.

El material obtenido ya puede ser probado por las técnicas de difusión en gel para determinar la presencia de enterotoxinas

2. PURIFICACION DE LAS ENTEROTOXINAS EXTRAIDAS.

Se puede aumentar la concentración de enterotoxinas, para

cuantificación, ensayos farmacológicos y obtención de sueros in-
munes es necesario purificar las enterotoxinas a partir de sobre-
nadantes de medios de cultivo. El procedimiento de purificación
que da resultados más satisfactorios fué descrito por Bergdoll y
Sugiyama en 1959 (1). Este método de purificación esta constitui-
do por los siguientes pasos: precipitación ácida, adsorción con
alúmina, precipitación con etanol, cromatografía con Amberlita
IRC-50 y electroforesis en almidón.

METODOLOGIA.

Precipitación ácida. Las proteínas presentes en el sobrena-
dante obtenido de un cultivo de S. aureus se precipitan con -
 H_3PO_4 al 85 % de pH 3.5 (la precipitación se efectua a temperatu-
ra ambiente). Se adicionan 5 g del adyuvante de filtración Hyflo
Super Cel (Johns-Manville, New York, N.Y.) por cada litro de so-
brenadante. La mezcla se agita durante 1 h, se filtra a traves
de una capa de Hyflo Super Cel (esta capa se forma depositando
el adyuvante de filtración sobre un filtro de membrana de 50 mm
de diámetro y 0.5 u de porosidad promedio). El precipitado se ob-
tiene por tres extracciones con un volúmen total de 5 ml de -
 Na_2HPO_4 0.05 mol/g de Hyflo Super Cel usado.

Adsorción con alúmina. El precipitado obtenido en el paso
anterior se lava con fosfato de sodio 0.03 mol/litro hasta que
el pH sea de 6.3 y se pasa por una columna de alúmina de 20 cm
de altura (200 mallas, que tenga 7 g de adsorbente por cada 30 ml

del extracto. Posteriormente la columna se lava con 5 ml de una solución de Na_2HPO_4 0.03 mol/litro con pH de 6.3; la toxina se eluye con 5 ml de Na_2HPO_4 0.2 mol/litro.

Precipitación con etanol. El eluado se ajusta a pH de 5 con H_3PO_4 al 85 % y se enfría hasta 0°C . Se coloca etanol (95 %) en una mezcla de hielo seco y acetona, hasta que tenga una temperatura de -5°C . El alcohol etílico frío se adiciona al eluado en forma lenta y con agitación constante, hasta que el contenido de etanol sea de 40 %. La mezcla (alcohol-eluado) se filtra a través de una capa de Hyflo Super Cel y se refrigera a -7°C toda la noche. El precipitado formado se extrae con Na_2HPO_4 0.05 mol/litro, se dializa con agua destilada y se liofiliza.

Adsorción con Amberlita IRC-50 (XE-64). (Rohm y Hass, Filadelfia). La columna se prepara de la siguiente manera: se colocan 100 g de Amberlita en una probeta que contiene 800 ml de agua destilada, se deja sedimentar la resina durante 30 minutos, se decanta el sobrenadante, se agrega agua destilada y se vuelve a decantar (esta operación se repite dos veces más). A la resina lavada se le agregan 100 ml de NaOH 10 mol/litro y se agita durante 3 h. Una vez que las partículas de Amberlita se han sedimentado, se repite el lavado con agua cuatro veces (se emplean para este paso de 3 a 4 litros de agua destilada). Se adicionan 1.8 litros de HCl 3 mol/litro, se agita durante 4 h y se lava la resina con 2 litros de agua destilada, se refrigera a 5°C hasta

que se vaya a usar. La Amberlita necesaria para la preparación de la columna se suspende en Na_2HPO_4 0.02 mol/litro y se equilibra a pH 6 con NaOH 10 mol/litro. La columna se forma depositando la resina en un tubo de vidrio de 8 cm de largo, el diámetro de la columna debe ser de aproximadamente 1 cm cuando se tengan 160 mg de muestra. Una vez formada la columna se lava con una solución de Na_2HPO_4 0.02 mol/litro y pH 6. Cuando el pH de esta solución de lavado permanece constante, el equilibrio en la columna se ha establecido. La enterotoxina obtenida por precipitación con etanol se disuelve en la mínima cantidad requerida de la misma solución con que se lavó la columna y se pasa a través de ésta; la resina se lava con 100 ml de Na_2HPO_4 0.02 mol/litro de pH 6.0, para eliminar el material no adsorbido. El eluado se obtiene en dos pasos; primero se adicionan a la columna 100 ml de Na_2HPO_4 0.05 mol/litro pH 6.8. El eluado se colecta en fracciones de 3 ml. Se determina la cantidad de proteína por el método de Folin modificado por Lowry. La mayor cantidad de enterotoxina se encuentra en el eluado obtenido en el primer paso. Las fracciones obtenidas en ambos pasos se mezclan y se ajusta el pH a 6 y la concentración de fosfatos a 0.015 mol/litro. Se enfría la solución a 0°C . Se adiciona etanol frío hasta alcanzar una concentración de 25 %. Se deja de 2 a 3 días a -13°C , el precipitado formado se recoge por centrifugación, se redisuelve con agua y se liofiliza. El sobrenadante se lleva a una concentración de etanol de 30 % y se refrigera de 2 a 3 días a -13°C para obtener

un precipitado que se recoge por centrifugación, y al que se le da el mismo tratamiento final del paso anterior.

Electroforesis en almidón. La placa de almidón se prepara con 80 g de almidón lavado con 500 ml de Na_2HPO_4 0.05 mol/litro a pH 6, que se coloca sobre un recipiente rectangular de 2 cm de ancho, 1 cm de profundidad y 45 cm de largo. La muestra, aproximadamente 50 mg del primer liofilizado obtenido en el paso anterior disueltos en 8 gotas de Na_2HPO_4 0.05 mol/litro, se coloca en el centro de la placa. La separación se lleva a cabo durante un día a 5°C , con un gradiente de potencial de 3.3 V/cm. Al final del corrimiento la placa se corta en fracciones de 1 cm, las proteínas de cada fracción se extraen con 5 ml de Na_2HPO_4 0.05 mol/litro, pH 6, y se analizan por el método de Lowry. Las fracciones se combinan y la concentración de fosfatos de la solución se ajusta a 0.015 mol/litro diluyendo con agua y llevando la concentración de alcohol etílico al 30 % con etanol frío. Se refrigera a -13°C durante 3 días, el precipitado formado se elimina por centrifugación, se redisuelve en agua destilada y se liofiliza.

El mayor inconveniente de purificar las enterotoxinas es la pérdida de potencia durante el proceso y el tiempo que se requiere, por lo que un buen método debe constar del menor número de pasos posible. Es probable que la inactivación se deba a la eliminación de factores estabilizadores de la toxina.

CAPITULO VI. OBTENCION DEL SUERO IMMUNE ANTIENTEROTOXINA.

OBTENCION DEL SUERO INMUNE ANTIENTEROTOXINA.

Los estudios realizados por investigadores como Bergdoll, Casman, Bennett, Dack, etc., permiten contar en la actualidad - con sueros hiperinmunes antienterotoxina. Estos sueros se pueden obtener en dos formas: administrando enterotoxinas altamente purificadas, o bien empleando toxinas parcialmente purificadas, ésto hace necesario que el suero hiperinmune obtenido se someta a un proceso de absorción, para separar los anticuerpos no específicos.

Bergdoll en 1970 estudió la posibilidad de emplear toxoides como inmunógenos, pero el suero inmune que obtuvo fué de bajo título, razón por la cual en la actualidad, no se emplean en la obtención del suero inmune.

1. METODO DE HOLBROOK PARA LA OBTENCION DEL SUERO INMUNE ANTIENTEROTOXINA.

El esquema desarrollado por Holbrook (13), para la hiperinmunización de animales del laboratorio, puede ser empleado en la preparación de cualquier tipo inmunológico de antienterotoxina.

En el procedimiento de Holbrook se emplean conejos con un título basal de precipitinas contra estafilococo bajo; la enterotoxina que se utiliza en la inmunización de estos animales - debe tener un 95 % de pureza, de esta toxina se preparan las siguientes dosis: 0.1, 0.5, 1.0, 50, 250, 1 000 y 2 000 µg, contenidas cada una en 1 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4 y se esterilizan con un filtro Millipore. Cada una de estas dosis se

mezcla con 1.25 ml de adyuvante completo de Freund y se inyectan por vía subcutánea, a intervalos de tres semanas e inoculando dosis cada vez mayores.



2. METODOS DE CASMAN.

2.1. Obtención del suero inmune antienterotoxina A.

Casman en el año de 1967 (8) describió un proceso para la inmunización de animales, en esta técnica se emplea enterotoxina A con pureza del 20 al 50 %. Las vías de administración y las cantidades de toxina empleadas son las siguientes: 0.9; 1.8; 3.6; 14; 28 y 56 μg por vía intravenosa, 2 000 μg por vía subcutánea y 440; 1 300 y 8 800 μg (adicionados de fosfato de aluminio) administrados también por vía subcutánea, todas las dosis se inoculan a intervalos de una semana. Después de un mes los conejos se inyectan por vía intravenosa con 1 000 μg de enterotoxina y 7 días después se sangran para la obtención del suero.

2.2. Preparación del suero inmune antienterotoxina B.

Para la obtención del suero inmune antienterotoxina B, este investigador (8) describió el siguiente esquema: se utiliza enterotoxina B con el 95 % de pureza, esta toxina se administra a los animales de laboratorio de la siguiente manera; 1 y 2 μg por vía subcutánea, con un período de 7 días, las siguientes cantidades de enterotoxina se administran por la misma vía y con el mismo intervalo de tiempo, pero mezcladas con fosfato de aluminio;

5, 50, 100, 1 000 y 2 500 μg . Después de 3 semanas de reposo, se les administran 4 000 μg (mezclados con fosfato de aluminio) por vía subcutánea. Una semana después se procede a la sangría de co secha.

En el Capítulo IV inciso 2.3. se describe en forma breve un método para la obtención del suero inmune antienterotoxina A de alto título, empleando cabras.

RESUMEN.

Desde 1930 Dack et al demostraron que las enterotoxinas de estafilococos estan involucradas en el envenenamiento por alimentos contaminados con ciertas cepas de S. aureus. El cuadro clínico que se presenta durante las intoxicaciones es el siguiente: vómito, diarrea y espasmos abdominales. En niños este padecimiento puede ser mortal, si la deshidratación provocada por el vómito o diarrea no se controla.

Hodoval en 1968, reportó que las enterotoxinas purificadas administradas a monos por vía intravenosa, producen cambios cardiovasculares, renales, hepáticos, pulmonares y nerviosos. El efecto cardiovascular puede ser atenuado, administrando a los monos epinefrina; la vida de los animales puede prolongarse durante varias horas, si se administra este fármaco en forma constante.

Se pueden relacionar con estos estudios, los realizados por Sigurd en 1972 (16) en torno al catabolismo de las enterotoxinas en animales inoculados por vía intravenosa. El resultado encontrado por este investigador, es que el lisosoma de las células renales (por medio de las catepsinas) es el organelo encargado de la degradación enzimática de las toxinas estafilococcicas.

En contraste con estos estudios realizados "in vivo", en el año de 1972 Gabliks encontró que el DDT y su derivado el DDD inhiben el efecto citotóxico que las enterotoxinas ejercen sobre los cultivos de células de intestino de embrión humano.

En la actualidad se conocen siete tipos serológicos, designados A, B, C₁, C₂, D, E y F. Los serotipos cuyas propiedades son mejor conocidas son los cuatro primeros. Estas propiedades se encuentran resumidas en la Tabla 2 y algunas de las más importantes son las siguientes: las enterotoxinas son proteínas termolábiles, siendo la más sensible la A y la más resistente la B, lo que le confiere la capacidad de permanecer activa en los alimentos contaminados que han sido procesados. Son inmunogénicas y antigénicas, esta propiedad se ha aprovechado para obtener sueros hiperinmunes, para identificarlas o cuantificarlas en alimentos contaminados y que tales cualidades se aprovechan para identificarlas por técnicas inmunológicas; para ello se han reportado varios procesos para la producción de las toxinas en el laboratorio. Los procedimientos más empleados son los siguientes: los métodos que emplean tubo de diálisis, la técnica del medio líquido con agitación y la producción de las enterotoxinas en fermentador. El siguiente paso es inmunizar animales del laboratorio para obtener los anticuerpos específicos, con los que es posible identificar las toxinas presentes en los alimentos contaminados, empleando cualquiera de estos métodos inmunológicos: precipitación, aglutinación, electroinmunodifusión (técnica de Lawrell) y

radioinmunoanálisis. Para las técnicas de inmunoprecipitación es necesario extraer las enterotoxinas de los alimentos sospechosos ya que algunas de estas técnicas no tienen la sensibilidad apropiada para detectarlas.

Existen también métodos biológicos para la detección de las enterotoxinas. Estas técnicas emplean animales de laboratorio a los que se les administra el alimento sospechoso y se observa si les produce vómito, esto indica que la toxina está presente en el alimento, sin embargo estas pruebas tienden a desaparecer debido a que están sujetas a factores de variación en la susceptibilidad de los animales.

CONCLUSIONES.

1. En nuestro país aún cuando no se lleva un control estadístico de las intoxicaciones producidas por enterotoxinas estafilocócicas, su número es elevado. Al cuadro clínico que se presenta durante el padecimiento se le concede muy poca importancia, sin embargo en la población infantil, puede provocar la muerte en forma indirecta. Por estas razones es necesario contar con un método adecuado para la identificación de las toxinas en los alimentos contaminados.

2. De lo reportado en la literatura consultada se desprende que las técnicas más efectivas para la detección de las enterotoxinas estafilocócicas son las inmunológicas; porque superan a los métodos biológicos y bacteriológicos en muchos aspectos. Los métodos biológicos se ven afectados por las variaciones en la susceptibilidad de los animales que se emplean y en cuanto a los métodos bacteriológicos su principal desventaja es que con frecuencia los microorganismos presentes en el alimento ya no están viables, por lo que no es posible su detección; en tanto que las enterotoxinas se encuentran todavía activas.

3. Entre las ventajas que presentan las técnicas inmunológicas se pueden mencionar: poseen alta sensibilidad; en la hemaglutinación pasiva inversa y el radioinmunoanálisis, se pueden detectar hasta 0.01 ug/ml de toxina. Otra ventaja que presenta estos dos métodos es su rapidez, ya que se pueden obtener resultados en 2 días (porque no es necesario someter al alimento sos-

pechoso a largos procesos de extracción). El radioinmunoanálisis requiere de equipo especializado, poco frecuente en los laboratorios y personal capacitado para el manejo de radioisótopos, mientras que la hemaglutinación pasiva inversa no presenta esta desventaja, siendo accesible a cualquier laboratorio.

4. El único inconveniente que se puede argumentar en contra de estas técnicas, es que solamente se han evaluado en la identificación de las enterotoxinas A y B.

BIBLIOGRAFIA.

1. Bergdoll, M.S. and Surgalla, M.J. (1959). Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. Arch. Biochem. Biophys. 85, 62.
2. Bergdoll, M.S., Borja, M.R. and Avena, R.M. (1965). Identification of a new enterotoxina as enterotoxin C. J. Bact. 90, 1481.
3. Bergdoll, M. S. , Chu, F.S. and Borja, C.R. (1967). The staphylococcal enterotoxins. Japan J. Microbiol. 11, 358.
4. Boletín informativo de la Secretaria de Salubridad y Asistencia. México, D.F. marzo de 1973. 4.
5. Casman, E.P. (1960). Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. J. Bact. 79, 849.
6. Casman, E.P., Bergdoll, M.S. and Robinson, J. (1963). Designation of staphylococcal enterotoxins. J. Bact. 85, 715.
7. Casman, E.P. and Bennett, R.W. (1963). Culture medium for production of staphylococcal enterotoxin A. J. Bact. 86, 18.
8. Casman, E.P. and Bennett, R.W. (1964). Production of an tiserum for staphylococcal enterotoxin. Appl. Microbiol. 12, 363.
9. Collins, W.S., Metzger, J.F. and Johnson, A.D. (1972). A rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol. 25, 774.

10. Donnelly, C.B., Leslie, J.E., Black, L.A. and Lewis, K.H. (1967). Serological identification of enterotoxigenic staphylococci in chesse. Appl. Microbiol. 15, 1382.
11. Jarvis, A.W., Lawrence, R.C. and Pritchard, G.G. (1973) Production of staphylococcal enterotoxin, A, B and C under conditions of controlled pH and aereation. Infect. Immunity. 7, 847.
12. Hammon, W.M. (1941). Staphylococcus enterotoxin an improved cat test, chemical and immunological studies. Amer.J. Pub. Health. 31, 1191.
13. Holbrook, R. and Baird-Parker, A.C. (1975). Some Methods for Microbiological Assay. Academic Press. London. 107.
14. Hodoval, F.L., Morris, E.L. and Crauley, G.J. (1968). Pathogenesis of lethal shock after intravenous staphylococcal enterotoxin B in monkeys. Appl. Microbiol. 16, 187.
15. Kato, E. M. and Bergdoll, M.S. (1966). Production of enterotoxin A. Appl. Microbiol. 14, 966.
16. Norman, S.J. and Stone, C.M. (1972). Renal lysosomal catabolism of staphylococcal enterotoxin B. Lab. Invest. 27, 236.
17. Pacheco, G.M., Parrilla, M.C. y Becerril, C. Comparación de métodos de enriquecimiento y siembra directa para el aislamiento de S. aureus de alimentos. Revista de investigación en

salud pública. SSA. 30, 289

18. Read, R.B. and Bradshaw, J.G. (1966). Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in veronal buffer. Appl. Microbiol. 14, 130.

19. Rivas, T.M., Vargas, A., Castro, M.A. y Parrilla, M.C. (1965). Estudio estadístico, desde el punto de vista microbiológico de quesos sopechosos de haber causado intoxicación. Salud pública de México. 7, 243.

20. Surgalla, M.J., Kadavy, J.L., Bergdoll, M.S. and Dack G.M. (1951). Staphylococcal enterotoxin production methods. J. Infect. Dis. 89, 180.

21. Sugiyama, H., Bergdoll, M.S. and Dack, G.M. (1960). - "in vitro" studies on staphylococcal enterotoxin production. J. Bact. 80, 265.

22. Toshach, S., Thorsteinson, S. (1972). Detection of staphylococcal enterotoxin by the gel diffusion test. Can. J. Pub. Health. 60, 58

23. Vandenbosch, L.L., Fung, D.Y. and Widomski, M. (1973). Optimum temperature for enterotoxin production by S. aureus S-6 and 137 in liquid medium. Appl. Microbiol. 25, 498.