

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSTGRADO



" OBTENCION Y PURIFICACION PARCIAL DE ENTEROTOXINA  
ESTAFILOCOCICA TIPO A Y SU APLICACION EN LA  
IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA INMUNOENZIMATICA  
PARA SU DETECCION EN ALIMENTOS ".

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BLANCA ESTHELA RODRIGUEZ URIBE

MONTERREY, N. L., MEXICO  
NOVIEMBRE DE 1981.

IM  
Z6  
FM  
19  
R6



1020071127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSTGRADO



" OBTENCION Y PURIFICACION PARCIAL DE ENTEROTOXINA  
ESTAFILOCOGICA TIPO A Y SU APLICACION EN LA  
IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA IMMUNOENZIMATICA  
PARA SU DETECCION EN ALIMENTOS ".

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BLANCA ESTHELA RODRIGUEZ URIBE

MONTERREY, N. L., MEXICO  
NOVIEMBRE DE 1981.

TM  
Z6658  
FM  
1981  
R6



139640

*El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de:*

**DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA**

**Q.F.B.MSc. MA. ALICIA SUAREZ SEMOUR**

## INDICE

	Pág.
INTRODUCCION . . . . .	1
MATERIAL Y METODOS . . . . .	4
RESULTADOS . . . . .	16
DISCUSION . . . . .	23
RESUMEN . . . . .	26
BIBLIOGRAFIA . . . . .	27

## INTRODUCCION

Staphylococcus aureus vive en estrecha asociación con el hombre, colonizando su faringe y piel [13]. Esta relación huésped parásito es --relativamente estable y solo se ve afectada cuando hay una alteración en los mecanismos homeostáticos del huésped, la cual favorece a Staphylococcus aureus para causar enfermedad.

Durante su desarrollo en medios de cultivo apropiados, Staphylococcus aureus puede producir una multitud de productos extracelulares --entre los cuales están las enterotoxinas [12,23]. La ingestión de estas sustancias por el hombre resulta en una variedad de síntomas, entre los cuales son comunes el vómito, el espasmo y la diarrea [5] los que pueden aparecer de 1 1/2 a 5 horas después de ingerir un alimento conteniendo --la enterotoxina [13,7] .

Por la naturaleza histórica y cultural de nuestra sociedad mexicana, los alimentos del pueblo son preparados sin ninguna o con escasas reglas de higiene, son también mal conservados y su manejo al nivel del consumidor es todavía más incierto, lo que facilita su contaminación con diversas bacterias, entre ellas S. aureus, pudiendo producir fácilmente enterotoxina en estas condiciones. Esto da lugar a brotes de casos de --intoxicación alimentaria que en ocasiones adquieren proporciones catas--tróficas. Aún cuando es raro que una intoxicación alimentaria estafilocócica sea causa de muerte, ésta puede producir un alto índice de incapaci--dad en las personas afectadas y pérdidas económicas considerables.

Un solo microgramo de enterotoxina producida por estos microorga--nismos es capaz de producir síntomas en el hombre [13]. Entre los alimen--tos en que puede desarrollarse fácilmente el estafilococo están: leche y sus derivados, huevo, carne, productos de la carne y vegetales [5]. Se-



conocen hasta la fecha cinco tipos serológicos diferentes de enterotoxinas que se han designado como A, B, C, D y E. Hay dos tipos de enterotoxinas - - C: C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> (13), las enterotoxinas son relativamente resistentes al calor y pueden estar presentes en el alimento aún después de que los microorganismos que la produjeron hayan sido destruidos por calor (13).

En nuestro país, no hay datos de frecuencia de intoxicaciones alimentarias de tipo estafilocócico y mucho menos del serotipo responsable. En otros países, estudios al respecto señalan a la enterotoxina 'A' como la más frecuentemente aislada de alimentos involucrados en brotes de intoxicación alimentaria (2,3,4,9,11,16) Por tal razón decidimos primero - - aislar la enterotoxina estafilocócica serotipo 'A' a partir de una cepa -- patrón productora de ésta enterotoxina, luego preparar su antisuero en animales de laboratorio e implementar una técnica para la detección de ésta - enterotoxina en extractos de alimentos sospechosos de contenerla.

La técnica a implementar debía ser simple y además sensible, de tal forma que no fuera necesario concentrar el extracto del alimento para poder demostrar la presencia de la toxina. Por tal motivo se descartaron técnicas como inmunofluorescencia, precipitación en gel de Ouchterlony y la técnica de difusión simple de Oudin (18) y se decidió la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) por las ventajas y sensibilidad demostrada en otros sistemas (8,10,22). Esta es una técnica -- relativamente reciente que se presta para investigar tanto antígeno como anticuerpo; utiliza al igual que el radioinmunoensayo un marcador (24) excepto que éste en ELISA es una enzima en lugar de radioisótopos. Primero el antígeno [pegado directamente al soporte ó indirectamente pegado a través de su anticuerpo] se hace reaccionar con un conjugado de anticuerpo enzima. Después el sistema es incubado con sustrato para la enzima. La aparición del producto coloreado determina la presencia de la enzima (21). ELISA puede ser tan sensible como el correspondiente RIA (8,10,22) dependiendo por supuesto de la pureza de sus reactivos. Además, ELISA tiene ciertas

## MATERIAL Y METODOS

Para la parte experimental se utilizó Staphylococcus aureus cepa-FRI-100, productora de enterotoxina serotipo 'A' (obtenida por cortesía de M.S. Bergdoll del Food Research Institute, University of Wisconsin - U.S.A.). Esta cepa fue mantenida por pasajes mensuales en agar infusión de cerebro y corazón adicionada de cistina y conservado en refrigeración a 4°C.

### Obtención de la enterotoxina 'A'.

El medio de cultivo para la obtención de la enterotoxina consistió en 4% de PHP (Protein Hydrolysate Powder), un digerido pancreático de caseína producida por Mead-Johnson International, suplementando con 0.00005 % tiamina y 0.001 % niacina. El pH final del medio de cultivo fue de 5.5 - 5.7 (15).

El método de cultivo utilizado fue el de Casman y Bennett (3), mediante el cual se puede obtener una enterotoxina concentrada. Para el desarrollo de este método se utilizaron tubos de difusión de celulosa (Scientific Products No. D1615-2) de 25 cm. de longitud y 3.2 cm. de diámetro. Un extremo del tubo se selló con nudos mientras el otro extremo fue firmemente unido al borde de un tubo de vidrio de 20 cm. de largo y un diámetro interno lo suficientemente amplio para permitir la entrada de una pipeta de 1 ml.

Este tubo fue introducido parcialmente en una botella apropiada - conteniendo 90 ml. del medio de cultivo. Finalmente se fijó el tubo de vidrio al cuello de la botella con algodón y sobre la boca libre del tubo de vidrio se colocó un tapón de algodón (Ver figura No. 1). Una vez arma



FIGURA No. 1 UNIDAD DE CULTIVO  
(Método Casman-Bennet)

da la unidad fué esterilizada en autoclave a 121°C por 15 minutos.

De un cultivo de 18 a 24 hrs., de Staphylococcus aureus cepa FRI-100 en agar infusión de cerebro y corazón (BBL), se preparó una suspensión en solución salina equivalente al tubo # 1 del nefelómetro de Mac. Farland.

Las botellas preparadas, se inocularon con 0.8 ml. de la suspensión bacteriana en el interior del saco de celulosa. Una vez inoculadas se incubaron con agitación suave por 72 hrs., a 37°C en posición horizontal, de tal manera que el tubo de celulosa se ponga en contacto con el medio de cultivo y éste pueda penetrar al interior del tubo donde yacen las bacterias (Ver figura No. 1a). Se inoculó además una de las unidades con solución salina estéril y se incubó en las mismas condiciones para servir de testigo del procedimiento y para descubrir cualquier contaminación.

Las bacterias contenidas en el saco de diálisis, después del período de incubación, fueron separados por centrifugación a 3000 x g. por 20 min. (usando una centrífuga marca "Servall SS-34") y el sobrenadante, después de ser esterilizado por filtración (Seitz), se liofilizó y se conservó en refrigeración a 4°C.

#### Determinación de la actividad biológica de la enterotoxina cruda.-

El filtrado conteniendo la enterotoxina cruda, se trató para eliminar las alfa y beta toxinas (7), con el método siguiente: el extracto -- crudo se ajustó a un pH de 7 con ácido acético 10 %. Se mantuvo en baño de agua hirviendo por 30 min., al final de los cuales apareció un precipitado (componentes precipitables por calor). Se separó por centrifugación y se trabajó con el sobrenadante diluido 1:10 en solución salina estéril. En éste se determinó la actividad biológica para enterotoxinas por la -- prueba de Dolman (7). Se utilizan para esta prueba 3 gatitos de aproximadamente 5 meses de edad. A 2 de ellos se les administra por vía intraperitoneal 3 ml. del sobrenadante libre de alfa y beta toxinas y al tercero , -

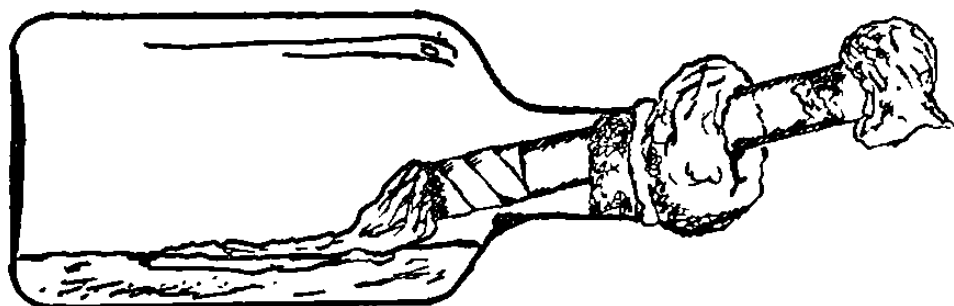


FIGURA No. 1a UNIDAD DE CULTIVO  
(Método Casman-Bennet)

se le administra 3 ml del sobrenadante por la misma vta de la solución salina que fuera inoculada en la bolsa de celofán e incubada en las mismas condiciones que la cepa FRI-100 que ya se señaló fué usada como un testigo negativo.

#### Demostración 'in vitro' de la enterotoxina cruda.-

Se determinó la presencia de la enterotoxina mediante una prueba de precipitación en tubo capilar. Una muestra del filtrado conteniendo la enterotoxina cruda se hizo reaccionar en tubo capilar con suero anti-enterotoxina 'A' sin diluir y diluida 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 (antisuero de referencia Food Research Institute, U. of Wisconsin), y además se enfrentó suero sin diluir contra enterotoxina sin diluir y diluida 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024.

#### Purificación parcial de la enterotoxina cruda.-

La enterotoxina cruda fué pasada a través de una columna de carboximetilcelulosa (17). La columna fué montada de la siguiente forma: -- Se hidrató en agua destilada por 1 hora, 2 gramos de carboximetilcelulosa (Sigma). Se decantó el agua y fué suspendida la carboximetilcelulosa de nuevo en solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.01 M. El pH se ajustó a 6.0 con NaOH y fué nuevamente ajustado después de 1 hora.

Una vez tratada así, la carboximetilcelulosa fué empacada en una columna de 0.9 cm de diámetro y 13.5 cm de largo. La columna mantenida a 4°C. fué lavada con 15 ml. de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0 también a 4°C.

La toxina cruda diluida 1:5 con agua destilada y a 4°C fué pasada a través de la columna a una velocidad de 2 ml/min. Después de esto, la columna fué lavada con 5 ml. de solución amortiguadora de fosfatos 0.008M, diluida en una solución de NaCl a pH 6.0 y 0.008 M. Enseguida la toxina fué eluida, a temperatura ambiente con 12 ml. de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 6.8, recolectando muestras de 2.5 ml. del líquido de elución cada vez. Las fracciones fueron analizadas espectrofotométricamente a 277 nm en un aparato CARL ZEISS Modelo PMQ 11.

#### Preparación del antisuero para Enterotoxina Estafilocócica tipo 'A'

El antígeno para la preparación del antisuero utilizado consistió en 100 miligramos de enterotoxina liofilizada, los cuales fueron disueltos en 10 ml. de solución amortiguadora de fosfato (PBS 0.01 M pH 7.4) y llevados a ebullición por 25 min. [7]. Después de centrifugar, para eliminar las alfa y beta toxinas, se le agregó al sobrenadante formaldehído para dar una concentración final de 0.2 % y se dejó por 24 horas a 37°C. Esta solución fué dializada contra PBS por 24 horas. A este antígeno lo llamamos "toxóide".

El antisuero para la enterotoxina cruda fué preparado en 6 conejos de Nueva Zelanda de aproximadamente 2 1/2 kg. de peso, utilizando la técnica descrita por Terplan [19]. La cantidad de toxóide formalizado, necesaria para cada conejo fué diluido a 0.2 ml. con PBS y se le agregó 0.2 ml. de Al (OH)<sub>3</sub> al 2 %, esta mezcla se mantuvo en refrigeración a 4°C. por una hora, después de la cual se emulsionó con 0.6 ml. de adyuvante incompleto de Freund y esta mezcla se inoculó a los conejos.

Cada uno de los 6 conejos recibieron por vía intramuscular a intervalos de 8 días las siguientes dosis de toxóide: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1000, 1000 microgramos.

Diez días después de la administración de la última dosis se sangraron los conejos. El suero sanguíneo así obtenido fue distribuido en alícuotas de 1 ml. en ampollitas. Fueron liofilizadas y mantenidas a  $4^{\circ}\text{C}$ ., para su conservación.

### Inmunoensayo Enzimático.-

#### -Preparación del Conjugado:

Se trabajó con una mezcla de suero sanguíneos obtenidos de los conejos inmunizados con la enterotoxina 'A', así como con antisuero proporcionado por el Food Research Institute University of Wisconsin. Se utilizó la metodología descrita por Voller y col. (20). Un ml. del antisuero se diluyó a 2 ml. con PBS (buffer salina fosfato 0.01 M). pH 7.4, se le agregó 2.0 ml. de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 36 %. Se mezcló a temperatura ambiente por 30 minutos y se centrifugó a  $3000 \times g$  por 10 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  18 %. Se disolvió el precipitado en 0.8 ml. de PBS y se le agregó 0.8 ml. de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 24 %. Se centrifugó a  $3000 \times g$  por 10 min. Se lavó el precipitado ahora con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 12 %. Se redisolvió el precipitado en 1.0 ml. de PBS y se transfirió a un saco de diálisis y fue dializado prolongadamente contra PBS a  $4^{\circ}\text{C}$ . Una vez dializadas las dos suspensiones se determinó su concentración de proteínas totales espectrofotométricamente a 540 m $\mu$ ., mediante el método de Biuret (1).

2 mg. de las suspensiones de inmunoglobulinas contenidas en 1 ml. de PBS se mezclaron con 5 mg de fosfatasa alcalina (tipo VII Sigma) a temperatura ambiente. Se dializó prolongadamente contra PBS a  $4^{\circ}\text{C}$ ., después de lo cual se le agregó glutaraldehído al 25 % para dar una concentración final de 0.02 %. Se mezcló y dejó por 1 Hr. a temperatura ambiente y se dializó primero contra PBS a una temperatura de  $14^{\circ}\text{C}$  y después contra amortiguador TRIS (Hydroximetil aminometano) 0.05 M a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .



El conjugado (anticuerpo unido a la enzima) fue diluido a 4.0 ml. con amortiguador TRIS (pH 8) conteniendo albúmina de suero de bovino al 1 % y azida de sodio al 0.02 %. Se almacenó a 4 °C en la oscuridad.

— Microtécnica ELISA:

Se realizó el método de doble anticuerpo de Voller para la detección del antígeno (Ver figura No. 2) (20) .

Se prepararon a partir de los antisueros no marcados (el obtenido en nuestro laboratorio y el de referencia de Wisconsin) una solución patrón de 5,000 nanogramos/ml. de proteína en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 de cada uno de ellos. 0.2 ml. de esta solución a diferentes diluciones, se depositaron en 8 pozos de una placa de hemaglutinación de poliestireno en U (Dynatech Co.) la cual fue utilizada como superficie sobre la cual se adsorbió la inmunoglobulina anti-enterotoxina inicial (ver figura No. 3 ).

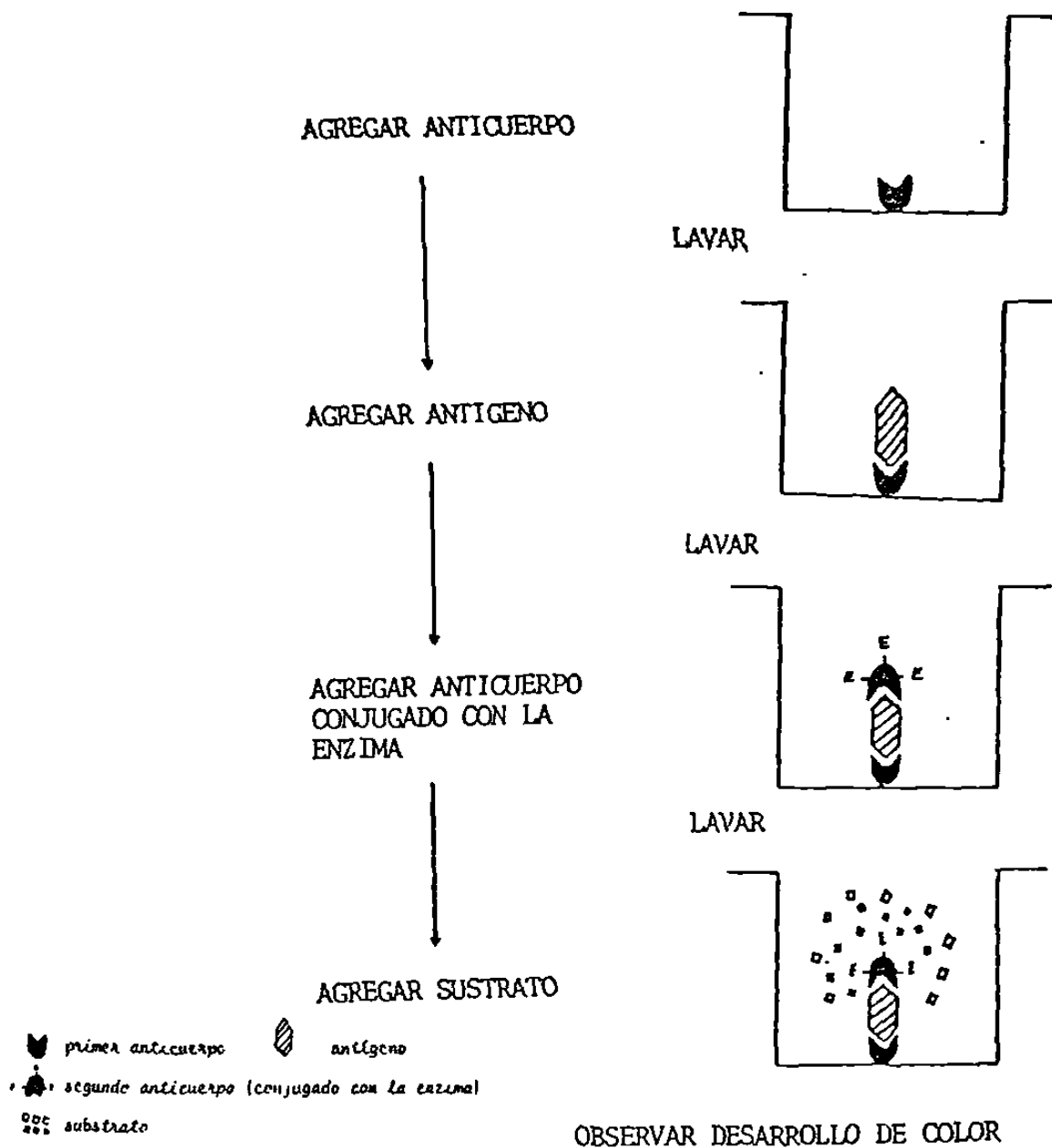
Se utilizaron 2 placas diferentes, una para cada antisuero. Se incubaron 24 horas a 37°C en cámara húmeda. El contenido de los pozos fue eliminado y se lavaron con PBS-Tween (buffer salinas fosfato 0.01M-0.05% Tween 20, pH=7.4) por 3 min. El lavado se repitió 3 veces.

Enterotoxina serotipo 'A' cruda obtenida en nuestro laboratorio y enterotoxina cruda de Wisconsin fueron utilizadas como antígenos. Se agregaron 0.2 ml. del antígeno conteniendo 100 nanogramos de la enterotoxina. Se incubaron a 37°C por 4 horas y se lavaron 3 veces con PBS Tween.

Se agregó 0.2 ml del conjugado en cada pozo y se dejó a 37°C en cámara húmeda por 4 horas. Se lavó de nuevo 3 veces con PBS Tween.

Se agregó 0.2 ml. de solución de sustrato (p-nitrofenil fosfato -- Sigma) a una concentración de 1 mg/ml. Después de 30 min. se detuvo la ---

FIG. 2.- SECUENCIA DIAGRAMATICA DE UNA REACCION INMUNOENZIMATICA  
PARA INVESTIGAR ANTIGENO ( doble anticuerpo ).



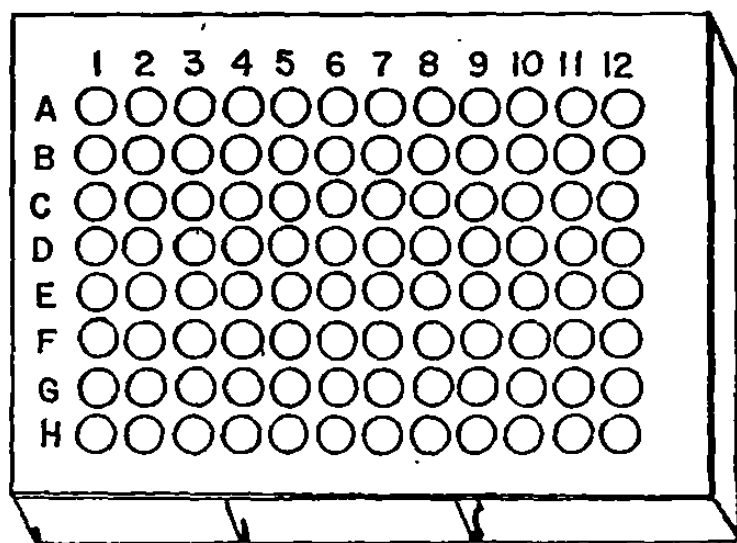


FIGURA No.3 PLACA POLIESTIRENO

reacción por adición de 0.05 ml de NaOH 3 M.

Si hay hidrólisis del sustrato, empieza a aparecer una coloración amarilla, ésta es proporcional a la cantidad de anticuerpo marcado presente y éste a su vez, es proporcional a la cantidad de antígeno que fué fijado por el primer anticuerpo.

La medición se efectuó visualmente. Se llevaron testigos de antígeno, anticuerpo conjugado con la enzima y el sustrato para la enzima.

La determinación de la concentración mínima de reactivos que pudiese ser utilizada para que la técnica anterior operara, fué realizada -- haciendo el mismo ensayo anterior pero variando la concentración de un reactivo y manteniendo las otras constantes en la forma siguiente:

- a) Antígeno en exceso, pero en cantidad constante (obtenido en nuestro laboratorio ó de Wisconsin).
- b) Conjugado en exceso, pero en cantidad constante (que puede ser de -- los dos tipos elaborados en nuestro laboratorio, pero uno de ellos -- con anticuerpo obtenido en nuestro laboratorio y el otro preparado -- con anticuerpo obtenido de Wisconsin).
- c) Cantidades variables de anticuerpo (100, 200, 300, 400, 500, 1000 ng/ml) -- de antienterotoxina estafilocócica tipo 'A', preparado en Wisconsin además de las mismas concentraciones del anticuerpo preparado en -- nuestro laboratorio.

El siguiente paso fué realizar el ensayo enzimático pero utilizando: a) Anticuerpo en cantidad un poco mayor a la mínima necesaria para así asegurar que habría reacción positiva. Se decidió utilizar 100 ng/- 0.2 ml.

- b) Antígeno en exceso, pero en cantidades constantes (obtenido en nuestro laboratorio ó de Wisconsin)
- c) Cantidades variables de conjugado que aún diera positivo el ensayo.

— Determinación de la presencia de Enterotoxina en Alimentos:

Se procedió a contaminar artificialmente leche, disolviendo 12 mg. de enterotoxina cruda obtenida en nuestro laboratorio en 10 ml. de leche -- y en otra muestra de 10 ml. de leche se disolvieron 12 mg. de Enterotoxina

patrón de Wisconsin.

Se llevó a cabo el método de extracción de Reiser. [14,19]. A 10 ml. de leche se agregó 10 ml. de agua destilada y se homogenizó. Se ajustó el pH a 4.5 con HCl 1 M., y se centrifugó a (9,500 x g) por 20 minutos. El sobrenadante se llevó a un pH 7.5 con NaOH (2N), se agregó cloroformo al 10 % y se agitó por 5 min., y después de centrifugar el sobrenadante se reajustó a pH 4.5 con HCl 1 M; se centrifugó, neutralizó y - - añadió Tween 20 para dar una concentración final de 0.25 %.

Este extracto fue utilizado como antígeno al llevar a cabo de -- nuevo la prueba inmuno-enzimática (ELISA) de la siguiente manera:

- a) 100 ng/0.2 ml. de anticuerpo presente en anti-enterotoxina 'A' .
- b) Antígeno (muestra de la extracción de leche artificialmente contaminada).
- c) Conjugado de anti-enterotoxina con fosfatasa alcalina en dilución - 1:100 con anticuerpo preparado en nuestro laboratorio.

Se montó la técnica tal y como se describió anteriormente haciendo la determinación por duplicado. Se llevaron testigos negativos apropiados.

## RESULTADOS

### Obtención de enterotoxina cruda.-

Se procesaron 3 lotes de 16 unidades de cultivo cada uno. Finalmente se recolectó un volumen total de 40 ml de extracto crudo.

### Determinación de la presencia de enterotoxina mediante su actividad biológica.-

La presencia de la enterotoxina en el extracto crudo fue hecha por la prueba de Dolman.

Los gatitos a los cuales se les administró el sobrenadante libre de alfa y beta toxinas, presentaron después de 30 a 40 minutos: náuseas, salivación y vómito y, aproximadamente 15 minutos más tarde, tuvieron un segundo acceso de vómito. Mientras tanto, el gatito testigo no presentó dichos síntomas. Esto se repitió en todos los lotes de enterotoxina trabajados.

### Demostración "in vitro" de la enterotoxina cruda.-

Fue observada la presencia de un escaso precipitado de complejo Ag-Ac en la prueba de precipitación en capilar al utilizar los reactantes sin diluir. De tres preparados uno dió reacción de precipitación positiva y dos no la dieron. Sin embargo, todos los lotes causaron náusea y vómito en los gatitos.

### Purificación parcial de la enterotoxina cruda.-

Durante la elusión de la toxina de la columna de carboximetilcelulosa se recolectaron 12 muestras de 2.5 ml cada una, las cuales registraron las siguientes lecturas al espectrofotómetro a una longitud de onda de 277 nanómetros.

DENSIDAD ÓPTICA DE MUESTRAS ELUIDAS DE LA  
COLUMNA DE CARBOXIMETILCELULOSA CONTENIENDO  
ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA

Muestra No.	D.O. 277 nm
1	0.09
2	0.036
3	0.08
4	1.85
5	0.92
6	0.124
7	0.04
8	0.054
9	0.01
10	0.04
11	0.0
12	0.05

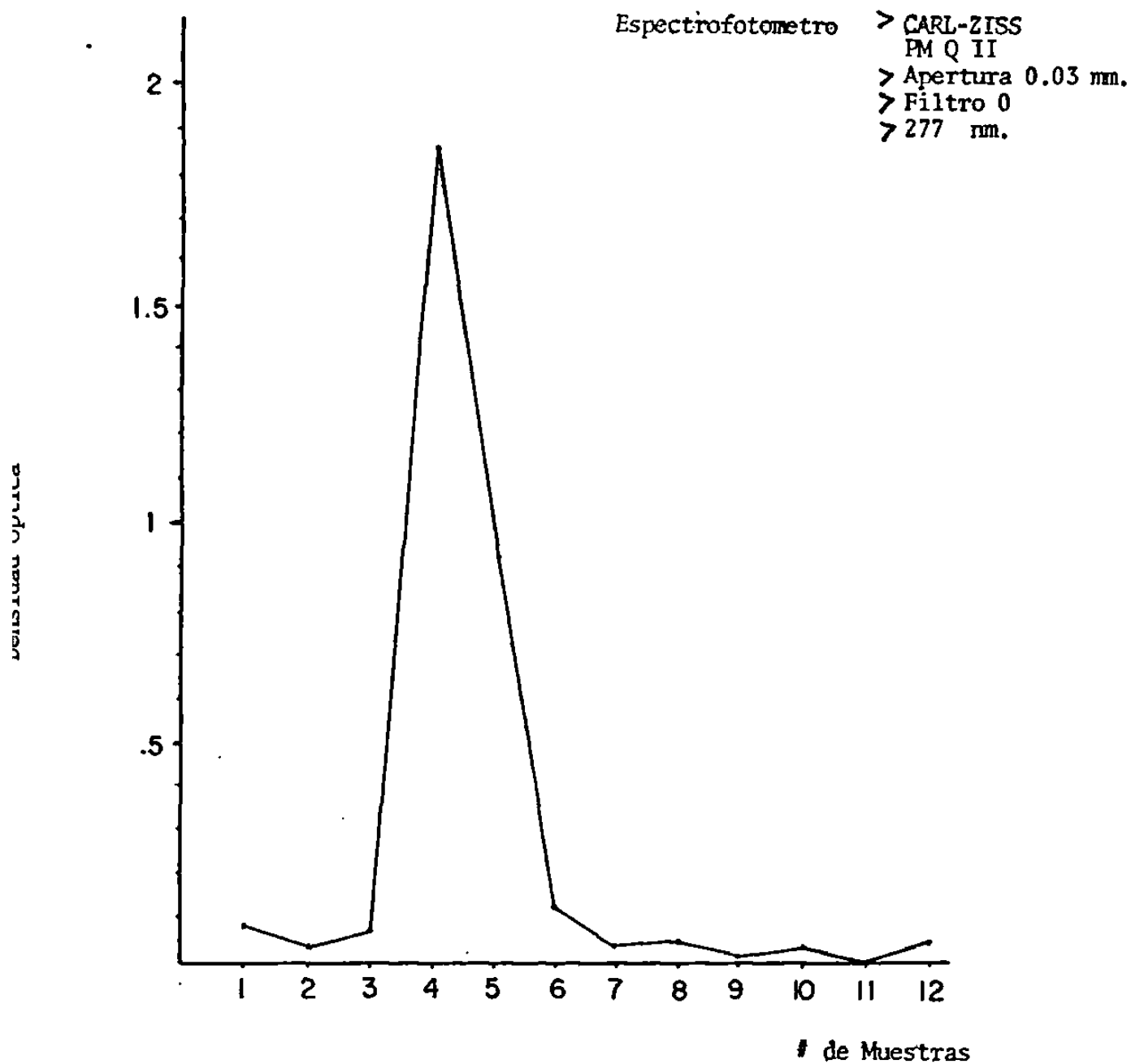
( Ver Gráfica # 1 )

Preparación del antisuero para enterotoxina estafilocócica tipo 'A'.-

De los seis conejos inmunizados se recolectó un volumen total de 20 ml. de suero sanguíneo, los cuales se mezclaron para formar una sola-muestra. Este antisuero se utilizó para la preparación de la técnica ELISA.

## GRAFICA # 1

PERFIL DE ABSORCION ESPECTROFOTOMETRICA DE ELUIDOS  
DE ENTEROTOXINA SEROTIPO A DE UNA COLUMNA DE - -  
CARBOXIMETILCELULOSA.





Inmunoensayo Enzimático.-*- Preparación del Conjugado:*

A las alícuotas del suero anti-enterotoxina estafilocócica tipo 'A' obtenido en nuestro laboratorio y el obtenido de Wisconsin, que fueron -- procesadas para la elaboración de conjugados se les determinó su contenido de proteína total y fue el siguiente:

- a).- Suero anti-enterotoxina estafilocócica tipo 'A'  
preparado en Wisconsin . . . . . 0.35 gr/100 ml
- b).- Suero anti-enterotoxina estafilocócica tipo 'A'  
preparado en nuestro laboratorio . . . . . 0.20 gr/100 ml

La actividad de los conjugados elaborados fue medida en la utilización de estos conjugados en un ensayo enzimático con el propósito de determinar su especificidad.

*- Microtécnica ELISA:*

Una vez que se realizó con éxito una prueba ELISA con cantidades no calibradas de nuestros reactivos (las determinaciones siempre fueron -- cualitativas), el siguiente paso consistió en realizar la prueba de ELISA -- variando un reactivo y manteniendo los otros dos constantes, para averiguar así la cantidad mínima necesaria de cada uno de los reactivos para dar -- una prueba positiva tal como se explicó en Material y Métodos.

En la Tabla No. 1 se muestra el resultado de 4 diferentes ensayos.

Tabla 1.- Concentración de antisuero antienterotoxina estafilocócica tipo A que aún presentó resultado positivo en la realización de la técnica ELISA.

Concentración de Reactivos	Preparado en Wisconsin	Preparado en nuestro Laboratorio
1.1 mg/ml Ag. de nuestro laboratorio + 1:100 del conjugado con Ac. Wisc.	100 ng/ml	100 ng/ml.
1.1 mg/ml Ag. obtenido en nuestro lab. + 1:100 de conjugado con Ac. nuestro lab.	100 ng/ml	100 ng/ml
100 nanog/0.2 ml Ag. Wis. + dil.1:100 conjugado con Ac. Wis.	100 ng/ml	100 ng/ml
100 nanog/0.2 ml. Ag. Wis. + dil.1:100 conjugado con Ac. nuestro lab.	100 ng/ml.	100 ng/ml

Los resultados de estos ensayos demostraron que la concentración mínima de anticuerpos que aún dió la prueba positiva fué de 100 ng/ml.

Se observó además mayor intensidad del color en aquellos sistemas en las que se utilizó conjugado con anticuerpo preparado en nuestro laboratorio, en comparación con el correspondiente en que se utilizó -- conjugado con antisuero preparado en Wisconsin.

Los resultados obtenidos de variar la cantidad de antisuero conjugado en el ensayo, se presentan en la Tabla No. 2. La dilución mínima de antisuero conjugado que dió ensayo positivo, fué de 1:100 para el -- conjugado preparado con el antisuero de nuestro laboratorio y de 1:40 -- para el conjugado preparado con el antisuero de Wisconsin.

- Determinación de la presencia de Enterotoxina en leche contaminada artificialmente.

El resultado obtenido fué positivo en todas las réplicas, mostrando que el extracto de la leche contenía enterotoxina estafilocócica sero tipo 'A'. Los testigos sin enterotoxina dieron resultados negativos.

Tabla # 2.- Dilución máxima de conjugado que aún presentó reacción positiva en la realización de la - - técnica ELISA.

Concentración de reactivos	Conjugado con Ac nuestro laboratorio	Conjugado con Ac Wisconsin
1.1 mg/ml de Ag. nuestro lab. + 100 nanogr./0.2 ml del antisuero Wis.	1:100	1:40
1.1 mg/ml. de Ag. nuestro lab. + 100 nanogr. /0.2 ml de Ac. nuestro lab.	1:100	1:40
500 nanogr/ml de Ag. Wis. + 100 nanogr./0.2 ml. Ac nuestro lab,	1:100	1:40
500 nanogr./ml. de Ag Wis. + 100 nanogr./0.2 ml. Ac. wis.	1:100	1:40

## DISCUSIÓN

Se obtuvo enterotoxina estafilocócica tipo 'A' en baja concentración, pero con actividad suficiente para producir en gatitos náusea y vómitos por administración intraperitoneal. Sin embargo, no fue posible demostrar la presencia de la enterotoxina, mediante pruebas de precipitación en capilar en todos los lotes producidos, a pesar de que todos ellos mostraron prueba de Dolman positiva.

La realización de la prueba de Dolman fue exitosa, no encontrando ningún problema para su realización, resultando siempre los testigos negativos según lo esperado.

Se identificó espectrofotométricamente la toxina del líquido de elusión de la columna cromatográfica de carboximetilcelulosa. Pero desafortunadamente no se continuó con la purificación completa de la enterotoxina cruda por razones técnicas. Además, como la cantidad de toxina parcialmente purificada decrecía considerablemente en relación a la cruda, se decidió trabajar durante todo el ensayo con enterotoxina cruda, lo cual obviamente limita mucho los resultados de nuestro trabajo. Es muy probable que se requiera realizar la producción de enterotoxina en volúmenes mayores, para lograr una mayor concentración de ésta y mejorar el procedimiento de purificación.

Si bien es cierta la afirmación de Casman-Bennett (2) en cuanto a que el antisuero preparado en conejos utilizando enterotoxina cruda como antígeno, resulta contener cantidades considerables de anticuerpos contra componentes diferentes a enterotoxina 'A', el suero obtenido en nuestro laboratorio resultó ser suficientemente útil para ser utilizado en la técnica ELISA, no así para el método de precipitación en capilar, que en ocasiones dió resultado negativos, probablemente porque es un método mucho menos sensible (18).

La elaboración de los dos conjugados, el preparado con antisuero Wisconsin y el de anticuerpo preparado en nuestro laboratorio se efectuó simultáneamente. En la realización de la técnica ELISA los resultados más

alentadores fueron obtenidos con el conjugado preparado en anticuerpos obtenidos en nuestro laboratorio, mientras que el conjugado preparado con el antisuero de Wisconsin no funcionó con la misma eficiencia.

El resultado del ensayo enzimático para la determinación de la presencia de enterotoxina en el alimento artificialmente contaminado, fue intensamente positivo. Con esto probamos haber logrado extraer la toxina del alimento y demostrarla aún cuando solo fue cualitativamente mediante la utilización del método ELISA implementado en nuestro laboratorio. Por supuesto que la precisión y reproducibilidad de la técnica pudieron ser mejoradas si se hubiera utilizado:

- a).- Medición espectrofotométrica del resultado de la reacción.
- b).- Lavado mecánico de las placas, con lo que se lograría estandarizar la presión de lavado en todos los orificios de las placas.
- c).- Utilización de albúmina de huevo para saturar los espacios de la superficie de soporte no cubierta por el anticuerpo (comunicación personal Dr. Snyderlaar.)

Sin embargo, los resultados obtenidos fueron altamente satisfactorios para implementar una técnica para diagnóstico cualitativa -- rutinaria de alimentos involucrados en intoxicaciones estafilocócicas.

La hipótesis propuesta originalmente fue probada; siendo posible montar una técnica inmuno-enzimática útil para demostrar esta enterotoxina en leche.

Esta técnica, se deberá perfeccionar y afinar, elaborando reactivos más purificados con el objeto de incrementar la sensibilidad del ensayo, particularmente usando antisueros y conjugados de mayor afinidad inmunológica.

Se recomienda para probar la eficacia de esta técnica, montar un estudio epidemiológico con leches de uso comercial (que habitualmente poseen poblaciones significativas de Staphylococcus aureus) en un experimento doble ciego, y determinar si esta técnica puede detectar la enterotoxina 'A' en aquellas que la contengan.

## RESUMEN

Se obtuvo enterotoxina estafilocócica serotipo 'A' a partir de la cepa FRI-100 de *Staphylococcus aureus* utilizando la técnica de cultivo en saco de Casman-Bennett.

La presencia de la enterotoxina en el filtrado del cultivo fue demostrada en forma preliminar "in vitro" mediante pruebas de precipitación en capilar e "in vivo" por la prueba de Dolman.

Se efectuó una purificación parcial de la enterotoxina cruda por técnicas cromatográficas en una columna de carboximetilcelulosa.

Se preparó antisuero para la enterotoxina cruda en conejos mediante la técnica de Terplan.

Utilizando la antitoxina obtenida, se preparó un conjugado con fosfatasa alcalina y se montó una técnica ELISA.

Fue determinada cualitativamente la enterotoxina estafilocócica-serotipo 'A' en filtrado de cultivo y en extracto de alimentos artificialmente contaminados por la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) lo que permite usarla en forma rutinaria para determinar su potencial como ensayo epidemiológico para enterotoxina estafilocócica tipo 'A' en leches.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bhagavan, N.V. *Bioquímica 1a. Ed. Editorial Interamericana* pp 902 - 1978.
- 2.- Casman, E. and Bennett, R., *Production of Antiserum for Staphylococcal Enterotoxin. Appl. Microbiol.* 12 (4): 363-367. 1964.
- 3.- Casman, E., and Bennett, R. *Culture Medium for the Production of - - Staphylococcal Enterotoxin A. J. Bacteriol* 86: 18-23. 1963
- 4.- Casman, E., Bergdoll, M. and Robinson, J. *Designation of Staphylococcal Enterotoxins. J. Bacteriol.* 85: 715-716 1962.
- 5.- Daver, C.C. et al. *Staphylococcal Intoxications* p. 359-393, *Summary - of Disease Outbreaks. Public Health Rept.* 1952-1961.
- 6.- Dawer. *Staphylococcal Food Poisoning. MMWR.* Sept. 21 1979. p. 445
- 7.- Dolman, C. and Wilson, R. *The Kitten Test for Staphylococcus Enterotoxin Can Public Health J.* 31: 68-71. 1940.
- 8.- Engvall, E. and Perlmann, P. *Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA. J. Immunol.* 109 (1): 129-135. 1972.
- 9.- Hajek, V. *Identification of Enterotoxigenic Staphylococci from sheep-Cheese. App. Enviro. Microbiol.* 35 (2): 264-268. 1978.
- 10.- Holmgren, J. and Svennerholm, M. *ELISA for the study of Enterotoxic - Diarrhoeal Diseases. Scand. J. Immunol.* 8 (7): 111-118, 1978.
- 11.- Jarvis, A; Lawrence, R. and Pritchard, G. *Production of Staphylococcal Enterotoxins A,B, and C Under Conditions of Controlled pH and Aeration. Infec. Immun.* 7 (6): 847-854. 1973.
- 12.- Jozefczyk, Z.; Robbins, R.; Spitz, J. and Bergdoll, M. *Antibodies to Staphylococcal Enterotoxin in Laboratory Personnel. J. Clin. Microbiol.* 11 (4): 438-439. 1980.

- 13.- Montie, T.; Kadis, S. and Ajl, S. *Bacterial Protein Toxin* p. 265-326  
*Microbiol. Toxins*. Academic Press.
- 14.- Rieser, R.; Conaway, D. and Berzdoll, M.S. *Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods*. *Appl. Microbiol.* 27: 83-85. 1974.
- 15.- Reiser, R. and Weiss, K. *Production of Staphylococcal Enterotoxins - A, B and C in Various Media*. *Appl. Microbiol.* 18 (6): 1041-1043. 1969.
- 16.- Robbins, R. ; Gould, S. and Bergdoll, M. *Detecting the - - - Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains*. *Appl. Microbiol.* 28 (6): 946-950. 1974.
- 17.- Schautz, E.; Roessler W.; Woodburn, M; Lynch, d.; Jacoby, H.; - - Silverman, S.; Gorman, J. and Spero, L. *Purification and some chemical and Physical Properties of Staphylococcal Enterotoxin A*. *Biochem.* - 11 (3): 360-366. 1972.
- 18.- Silverman, S.; Knott, A. and Howard, M. *Rapid, Sensitive Assay for -- Taphyloccocal Enterotoxin and Comparison of Serological Methods* *Appl. Microbiol.* 16 (7): 1019-1023. 1968.
- 19.- Stiffler. Rosenberg G.; Fey H. *Simple Assay for Staphylococcal - - Enterotoxins A, B and C: Modification of Enzyme-Linked Immunosorbent - Assay*. *J. Cli. Microbiol.* 8 (5): 473-479. 1978.
- 20.- Voller, A; Bidwell, D. and Bartlett, A. *Microplate Enzyme Immuno - - assays for the Immunodiagnosis of Virus Infections*. 506-512 in Rose, N. and Firedman, H. *Manual of Clinical Immunology* Chapter 69. - - American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1976.
- 21.- Voller, A.; Birdwell, D.E. and Bartlett, A. *The Enzyme Linked - - Immunosorbent Assay (ELISA)*. Dynatech, Laboratories Inc. 1979.

- 22.- Rodak, L.; Babiuk, L.A. and Acres D. Detection Radioimmunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Coronavirus Antibodies in Bovine Serum and Lacteal Secretions. *J. Clin. Microbiol.* 16 - (1): 34-40 1982.
- 23.- Rogolsky, M. Nonenteric Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 43 (3): 320-360. 1979.
- 24.- Tizard, I.R.- *Inmunologia Veterinaria*. Editorial Interamericana pp. 404-19 .

