

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION DE POST-GRADO  
MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA



“OBTENCION DE ENTEROTOXINAS B Y C DE Staphylococcus aureus  
E IMPLEMENTACION DE TECNICAS INMUNOENZIMATICAS PARA  
SU DETECCION EN PRODUCTOS LACTEOS”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA

GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ

MONTERREY, N. L.  
SEPTIEMBRE DE 1983



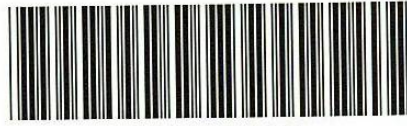
TM

Z66

FM

198

G63



1020071147

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA  
SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POST-GRADO  
MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA

"OBTENCION DE ENTEROTOXINAS B Y C DE Staphylococcus aureus  
E IMPLEMENTACION DE TECNICAS INMUNOENZIMATICAS PARA SU DE-  
TECCION EN PRODUCTOS LACTEOS"

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA

GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ

MONTERREY, N.L.  
SEPTIEMBRE DE 1983

TM

Z6658

FM

1983

963



139650

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

QFB. MSc. ALICIA SUAREZ SEMOUR

Financiado por el Fideicomiso para el apoyo complementario a la Investigación Científica en la U. A. N. L.

Gobierno del Estado-CONACYT

Referencia 353.01

A mis padres, cuyos ideales para mi vida he intentado cumplir, aunque no siempre con éxito, y cuya energía y apoyo me acompañan siempre.

A mis hermanos, por la fortaleza y confianza que siempre me inspiraron sus palabras.

A mi asesora de tesis:

QFB. MSc. ALICIA SUAREZ SEMOUR

Que como Maestra supo sembrar en mí la semilla del entusiasmo por la Microbiología, como asesora por su dirección e indicaciones en la elaboración de este trabajo y por sus palabras de estímulo, resultado de una gran amistad.

## A G R A D E C I M I E N T O S

AL DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA:

Cuya disposición hizo posible el desarrollo de una labor creativa.

A mi asesor académico:

DR. JOSE W. BUSTOS ALDANA

Por su valiosa guía en mi preparación.

AL DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA:

Ejemplo de hombre que con su entusiasmo por la superación nos contagia, estimulando en la búsqueda de nuevas metas.

AL DR. SERGIO A. MARTINEZ GARCIA:

Por su apoyo y estímulo.

A todos mis Maestros:

Por su dedicación en el logro de la superación de cada uno de nosotros como alumnos.

A mis compañeros:

Por haber convivido con ustedes una etapa importante de mi vida.



## I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	32
RESUMEN.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38

## I. INTRODUCCION

Los estafilococos están entre las bacterias mas importantes que pueden causar enfermedad en el hombre. Son habitantes normales de las vías respiratorias superiores, piel o intestino del hombre y pueden producir enfermedad bajo ciertas circunstancias (44,63). Fueron observados en pus y cultivados por Koch y Pasteur en 1878 y 1880. En 1881 Ogston usó el nombre de estafilococos por la agrupación de los cocos en racimos de uvas observados en coloraciones. Fué Rosenbach sin embargo, quien obtuvo en 1884 cultivos puros en medios de cultivo sólidos. Usando el nombre genérico de *Staphylococcus*, clasificó al grupo en dos especies: S. albus (S. epidermidis) y S. aureus (1,25).

Probablemente no hay otra bacteria que produzca tantas toxinas extracelulares, enzimas y componentes celulares como Staphylococcus aureus (63), ya que se han descrito mas de 30 diferentes productos extracelulares (45).

Entre estos productos se encuentran las enterotoxinas, de gran importancia por ser las responsables de los brotes de intoxicación alimentaria producidos por los estafilococos al contaminar los alimentos (63).

La relación de estas enterotoxinas producidas por el estafilococo con el cuadro de intoxicación fué descrita por Dack en 1930; quien aisló estafilococos en pasteles rellenos de crema. Reportes anteriores mostraron esta misma relación, al haber aislado este microorganismo de carne de res por Denys de Bélgica en el año de 1894; en carne de res seca por Owen en Estados Unidos de América en 1907 y en leche por Barber en Filipi

nas en 1914. Con todos estos informes se sugirió la presencia de un factor tóxico en los alimentos contaminados con Staphylococcus aureus, el cual sería el responsable de estos brotes de intoxicación (19). Sin embargo no se le dió importancia a este hecho, hasta que investigando la causa de la intoxicación en los pacientes, quienes habían comido pastel relleno de crema, se aisló Staphylococcus aureus. Dack y sus colaboradores continuaron su investigación administrando a voluntarios humanos, filtrados de los cultivos del estafilococo aislado del pastel, causándoles gastroenteritis leve en 2 de los pacientes a los cuales se les había administrado de 5 a 10 ml. del filtrado. Un tercer voluntario, al cual se le dió 25 ml. del filtrado, mostró gastroenteritis aguda, después de 3 horas de su ingestión (1). Años después fueron reportados otros brotes de intoxicación por alimentos contaminados por estafilococos (Jordán y Jordán y Burrows).

Transcurrieron 21 años de la demostración de estos hallazgos, hasta que en 1951, Bergdoll y colaboradores reportaron la purificación parcial de la enterotoxina B (3) que fué la primera en ser demostrada.

La intoxicación alimentaria producida por enterotoxinas de estafilococos es de las mas frecuentes en Estados Unidos de América (18). La incidencia permanece alta a pesar de continuos esfuerzos para mejorar el medio ambiente sanitario en el procesado de alimentos, su preparación y establecimientos de servicio así como instrucción a los manejadores de alimentos respecto a las condiciones que permiten la multiplicación de los estafilococos y la formación de sus enterotoxinas (33, 34, 35, 43, 63).

Los alimentos contaminados por estafilococos en-

terotóxicos producen gastroenteritis aguda, resultante de la ingestión del alimento en el que Staphylococcus aureus se ha multiplicado y producido las enterotoxinas (25,43). El comienzo de los síntomas es brusco y característico, presentándose en general a las 3 horas de haber ingerido el alimento. Los síntomas primarios son náusea, vómito, dolor abdominal tipo cólico y diarrea. Estos están frecuentemente acompañados por dolor de cabeza y calambres musculares. En casos severos la postración acompaña a los vómitos y diarrea. La enfermedad es aguda y auto-limitada; la recuperación es completa dentro de las 24 a 72 horas. La muerte es rara - (1,33,34,35,63).

En la actualidad se conocen 5 tipos serológicos de enterotoxinas estafilocócicas; se han designado como A, B, C, D y E (4,5,12,14,16,39); recientemente se ha encontrado una nueva proteína que tentativamente se ha designado como enterotoxina F (6). De la enterotoxina C hay dos tipos la C<sub>1</sub> y la C<sub>2</sub> que pueden ser diferenciadas por su punto isoeléctrico (5). Todas son proteínas simples que tienen un peso molecular en el rango de 26 000 a 34 000 daltons. La composición de aminoácidos ha sido determinada para las 5 enterotoxinas, pero las secuencias de ellos solo se ha establecido para la enterotoxina B (51). Las enterotoxinas son relativamente resistentes al calor y pueden estar presentes en alimentos en los que el organismo productor ha sido destruido durante el procesamiento o la cocción. Los alimentos mas comunmente asociados con esta forma de intoxicación son: carnes rojas y sus productos, leche y derivados, pescado, vegetales y huevos (33,34,35,43,63).

Hay algunos métodos disponibles para la detección de enterotoxinas estafilocócicas. Entre los métodos serológicos están las técnicas de inmunodifusión simple y doble en gel (4,11,12,15,24,44,49,53,58) y microtécnicas en portaobjetos (15,24). Algunos métodos más sensibles, como la hemaglutinación pasiva y la hemaglutinación pasiva reversa (30,38,50), no necesitan de la eliminación de proteínas de los alimentos, ni de la concentración de las muestras, pero son difíciles de manejar. Antígenos y anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes (37,55) han sido usados ampliamente para inmunodiagnóstico en las últimas dos décadas, sin embargo tienen algunas desventajas. La inmunofluorescencia habitualmente depende de valoración subjetiva - en el resultado final, es difícil de cuantificar y con frecuencia es laboriosa (9,22,55,56,57,60). Las enterotoxinas estafilocócicas también pueden ser demostradas por su actividad biológica, la cual se determina por la prueba de Dolman en gatitos (11,20,59) y en monos (54).

Aunque la utilidad de estos ensayos ha sido descrita para la detección de enterotoxinas en alimentos contaminados, estas técnicas no han tenido un uso tan extenso. Esto es en parte, debido al hecho de que estos ensayos son poco sensibles, requieren técnicas de concentración laboriosas y valoración subjetiva de la reacción antígeno-anticuerpo (21,61).

Una técnica que ha conseguido extender su uso para el mismo propósito, es el radioinmunoensayo (28,29,31,36). Las razones de su uso incluyen su sensibilidad; el hecho de que sus reacciones antígeno-anticuerpo pueden ser medidas objetivamente y cuantificación precisa. A pesar de que el radioinmunoensayo es muy

valioso tiene un gran número de desventajas asociadas con el uso de sustancias radioactivas que incluyen: corta vida media de los isótopos disponibles, complejo y costoso equipo es requerido para leer los resultados; por lo que estos estudios se llevan a cabo frecuentemente solo en laboratorios centrales; además, se deben tomar medidas de seguridad debido al riesgo potencial de la radiación de los reactivos y requiere personal especialmente adiestrado (9,22,52,55,56,57,60,61). Estas limitaciones han llevado a investigar otros sistemas de ensayos que sean igualmente sensibles y objetivos pero que no requiera el uso de sustancias radioactivas.

El uso de anticuerpos o antígenos ligados a enzimas supera las desventajas antes mencionadas, lográndose así el inmunoensayo enzimático llamado ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (9,22,52,55,56). Este sistema es simple, dá resultados objetivos, los reactivos no presentan peligro para la salud y son estables (retienen sus actividades después de meses de almacenaje antes y después de la conjugación), la manipulación es sencilla, la estimación de los resultados puede hacerse visualmente o con un simple espectrofotómetro (17), las pruebas son rápidas (62), específicas (10, sensibles (23) y reproducibles (42).

Esta técnica fué introducida por Engvall y Perlmann (23) y depende básicamente de dos hechos: a) el antígeno o anticuerpo pueden ser ligados a un soporte de fase sólida y retener su actividad inmunológica y b) el antígeno o anticuerpo pueden estar ligados a una enzima y el complejo retener ambas actividades; la inmunológica y la enzimática (22,55,62). Así, una sola molécula de enzima puede reaccionar con muchas moléculas de sustra-



to durante la hidrólisis de la enzima ligada al antígeno o anticuerpo sobre el sustrato, lo que amplifica las reacciones inmunológicas, proporcionando un ensayo con gran sensibilidad (61,62).

Las enzimas que han sido utilizadas en ELISA incluyen la fosfatasa alcalina, la peroxidasa, la betagalactosidasa y la glucosa oxidasa (2,8,48,61), siendo las dos primeras las más ampliamente utilizadas. La simplicidad de ELISA deriva del uso de sustratos cromogénicos, que en su mayoría, son incoloros inicialmente pero generan un producto coloreado después de la degradación enzimática. Este color visible y medible es proporcional al anticuerpo fijado y puede ser usado entonces como punto final en el ensayo.

Por la forma en que son manejados los alimentos en nuestro país, sin ninguna o escasas reglas de higiene al nivel de productor, mal conservados y mal manipulados a nivel del consumidor, es fácil de imaginar como se contaminan con S. aureus y son producidas las enterotoxinas en estas condiciones tan irregulares.

Como no contamos en nuestro país con datos de frecuencia de intoxicaciones alimentarias estafilocócicas y mucho menos de los serotipos responsables se decidió como objetivo fundamental, el implementar la técnica inmunoenzimática (ELISA), que tiene una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica para construir la infraestructura científico-técnica para un estudio epidemiológico horizontal de alimentos del grupo lácteo, que son los que más intoxicaciones producen en nuestro medio.

Si bien es cierto que lo expresado anteriormente

es el objetivo central de esta línea de trabajo, la hipótesis de trabajo de esta investigación es la de probar que en las condiciones operativas de nuestro medio científico-técnico se es capaz (o nó) de montar una técnica inmunoenzimática de alta especificidad para enterotoxinas B y C de S. aureus a partir de los elementos mas simples; y así mismo, determinar la sensibilidad de este sistema, sobre todo probar que se es capaz de demostrar enterotoxinas en muy pequeñas cantidades (al nivel de microgramos o nanogramos). Si estos dos objetivos se cumplen, se podrá dar por descontado que la hipótesis fué satisfactoriamente fundada.

## II. MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con las cepas de S. aureus productoras de las enterotoxinas B y C. Se obtuvieron primeramente las toxinas, se purificaron parcialmente, se obtuvieron los antisueros correspondientes en conejos y se prepararon los conjugados anticuerpo-enzima. Se eligió a la fosfatasa alcalina como enzima marcadora por su gran actividad y estabilidad, porque el sustrato es económico y no tóxico, el cual da un color amarillo brillante durante la reacción (2,8,56,61).

Para la preparación de conjugados dos tipos de reacciones de acoplamiento han sido descritas. La primera involucra reacciones de un paso y la otra reacciones de dos pasos. En este estudio se utilizó el procedimiento de un paso y como agente eslabonante el glutaraldehído (2).

Se llevó a cabo la técnica del doble "sandwich" de anticuerpo, en la cual el anticuerpo específico es adsorbido sobre una fase sólida. La muestra es añadida y si el antígeno está presente, se fija al anticuerpo previamente adsorbido, después se añade el anticuerpo conjugado. Esto hace un "sandwich" de antígeno entre dos anticuerpos; quedando en un extremo el anticuerpo y en el otro el anticuerpo que está marcado con la enzima. Después se agrega el sustrato, el cual va a ser degradado por la acción de la enzima (21,56,57,60).

### I. OBTENCION DE ENTEROTOXINAS B Y C DE S. aureus.

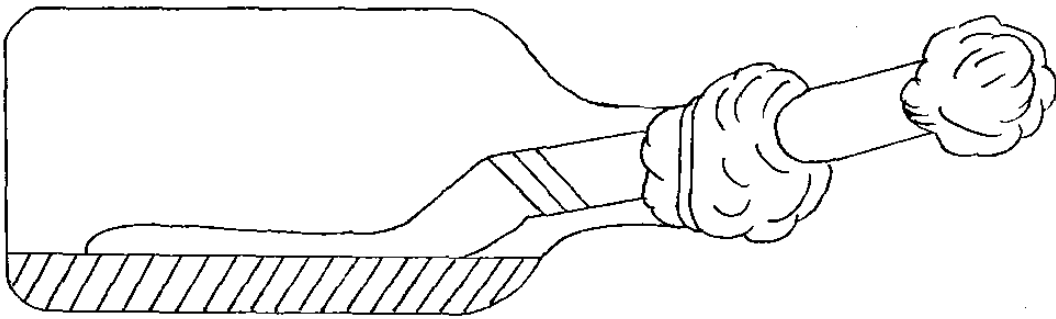
Para la obtención de la enterotoxina B, se utilizó la cepa de S. aureus 243 (14); y para la C, la cepa 361

(5); ambas fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Merlin S. Bergdoll del Instituto de Investigación de Alimentos de la Universidad de Wisconsin. Estas cepas fueron inoculadas en un medio de hidrolizado de caseína al 4% (Mead Johnson Int.) suplementado con tiamina al 0.00005% y niacina al 0.001% (41); el pH fué ajustado a 6.8 para la cepa productora de la enterotoxina B (52) y a 7.0 para la cepa productora de la enterotoxina C (27).

Para obtener las enterotoxinas mas concentradas, se elaboró la técnica de cultivo en saco de Casman y Bennett (13), utiliznado para ello un tubo de diálisis de celulosa (D 1615-2 Scientific Products) de 2 cm. de diámetro por 40 cm. de largo. Se cerró este tubo de diálisis por uno de sus extremos con tres nudos y por el otro se unió firmemente un tubo de vidrio de 20 cm. de longitud y con un diámetro interno de 8 mm. Este tubo fué ensamblado en una botella apropiada, conteniendo 90 ml. de medio de cultivo; finalmente se fijó el tubo de vidrio al cuello de la botella con algodón. Una vez armada la unidad se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos y 121°C. Ya lista para utilizarse, se inoculó en el interior del saco una alícuota de 0.5 ml. de una suspensión bacteriana de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación de la cepa correspondiente; desarrollada en agar BHI (Bioxon) y resuspendida en solución salina para dar una turbidez correspondiente al tubo número uno de la escala del nefelómetro de Mc Farland. Ver figura 1.

En posición horizontal y con agitación continua, se incubaron las unidades a 37°C por 72 horas (26). Al término de este tiempo, se retiró el saco de celulosa de la botella, y el contenido se depositó en tubos y se

FIGURA 1



Unidad de cultivo por el método de Casman y Bennett.

centrifugó a 12, 100 x g por 30 minutos en una centrifuga Servall SS-34. El sobrenadante conteniendo la enterotoxina se retiró y se mantuvo a 4°C, para posteriormente llevar a cabo la purificación parcial. Este procedimiento se siguió tanto para la producción de la enterotoxina B como para la C.

#### Purificación Parcial de la Enterotoxina B

La purificación de la enterotoxina B se llevó a cabo por el método de Schantz (47).

El extracto crudo obtenido después de la centrifugación y mantenido a 4°C, fue dializado por 72 horas contra solución salina al 0.9% y ajustado al pH a 6.4 con fosfato de sodio 0.05 M. La enterotoxina B fue removida del sobrenadante con la resina Amberlite CG-50 (Sigma), equilibrada con fosfato de sodio 0.05 M a pH 6.4 por agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina conteniendo la enterotoxina e impurezas fue empacada en una columna de 10 cm. de longitud por 2 cm. de ancho y la enterotoxina fue eluida con 200 ml. de fosfato de sodio 0.5 M en cloruro de sodio 0.25 M a pH 6.8. Se colectaron fracciones de 5 ml. a una velocidad de 20 gotas por minuto.

#### Purificación Parcial de la Enterotoxina C

La purificación de esta enterotoxina se llevó a cabo por el método de Borja y Bergdoll (?).

El extracto crudo fue dializado por 72 horas contra solución salina 0.9% a 4°C. Una vez dializado se ajustó el pH a 5.5 con amortiguador de fosfato de sodio



0.01 M. Por quedar la solución turbia, ésta fué centrifugada a 12, 100 x g por 15 minutos y se volvió a ajustar el pH a 5.5 con fosfato de sodio dibásico 0.01 M. La enterotoxina C fué removida del sobrenadante con la resina Carboximetil-celulosa (C 2758, Sigma) previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos a pH 5.5, por agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina conteniendo la enterotoxina e impurezas fue empacada en una columna de 22.5 cm. de longitud y 2.5 cm. de ancho y la enterotoxina fue eluida con 200 ml. de amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M, pH 5.5. Se colectaron fracciones de 5 ml. con una velocidad de 10 gotas por minuto.

La elución continuó con otros tres amortiguadores de fosfato de sodio en los que se aumentó su concentración y pH: amortiguador de fosfato de sodio 0.02 M, pH 6.0; amortiguador de fosfato de sodio 0.06 M, pH 6.8 y por último fosfato de sodio dibásico 0.2 M. en cada uno de ellos se utilizó 200 ml. y se colectaron fracciones de 5 ml. a una velocidad de 10 gotas por minuto. Las fracciones fueron guardadas a 4°C.

## II. DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE LAS ENTEROTOXINAS B Y C POR TECNICAS ESPECTROFOTOMETRICAS, INMUNOLOGICAS Y DE ACTIVIDAD BIOLOGICA:

### Técnicas Espectrofotométricas

Todas las fracciones obtenidas de la purificación parcial de las enterotoxinas B y C fueron leídas en un espectrofotómetro Carl Zeiss PM Q II a una longitud de onda de 277 nm. y una apertura de 0.03 mm.

### Técnica de Inmunodifusión en portaobjetos

Para demostrar la presencia de enterotoxina B y C, se utilizaron los antisueros correspondientes (gentilmente donados por el Dr. Bergdoll).

Para la enterotoxina B, las fracciones obtenidas en las que se elevó la densidad óptica se procedió a hacerles inmunodifusión en portaobjetos. En el pozo del centro se colocó el antisuero estandar diluido 1:10 (título Oudin 6.4) y a su alrededor las fracciones a ensayar. La distancia media entre el hoyo del centro (antisuero) y los periféricos (fracciones antigénicas) fué de 6 mm.

Para la demostración de la enterotoxina C se siguió el mismo procedimiento anterior y el antisuero estandar se diluyó 1:6 (título Oudin 6.5).

Se utilizó el amido negro para colorear las bandas de precipitación, las cuales fueron evaluadas visualmente.

### Prueba de Dolman para demostrar la actividad biológica de las Enterotoxinas B y C

Se tomó 1 ml. de cada una de las toxinas parcialmente purificadas y se ajustaron a pH 7.0 con ácido acético 10%. Se colocaron en baño de agua hirviendo por 30 minutos, al final de los cuales apareció un precipitado, el cual se retiró por centrifugación. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó a gatitos de 3 a 5 meses de edad por vía intraperitoneal. Al gatito testigo se le inoculó solución salina en la misma forma.

### Determinación de Proteínas para las Enterotoxinas B y C

La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente por el método de Lowry (32).

### III. OBTENCION DE LOS ANTISUEROS PARA LAS ENTEROTOXINAS B Y C.

El antisuero para la enterotoxina B fué preparado utilizando 6 conejos y para la enterotoxina C, 4 conejos de Nueva Zelandia, con un promedio de peso de 3.5 Kg. inyectando una serie de dosis de toxoides de cada una de las toxinas.

### Preparación de los Toxoides para las Enterotoxinas B y C

A 60  $\mu$ gr. de la enterotoxina correspondiente, se le añadió 1 ml. de amortiguador de fosfato salino 0.01 M, pH 7.4 con 0.2% de formaldehído. Se incubó por 24 horas a 37°C y después se dializó el toxoide contra PBS 0.01 M, pH 7.4 por 24 horas. Después se añadió 1 ml. de hidróxido de aluminio al 2% (52).

### Esquema de Inmunización para la Enterotoxina B

El esquema de inmunización que se siguió fué el sugerido por Salinas Carmona (46), el cual se presenta en la tabla 1.

TABLA 1  
Esquema de Inmunización para la Enterotoxina B

Secuencia de inyecciones de toxoide	Dosis de toxoide	Vía de inoculación por inyección	Sitio de inoculación
Primera semana	60 µg. con adyuvante completo de Freund	Intradérmica en sitios múltiples	Dorso del conejo
Tercera semana	24 µg. con adyuvante incompleto de Freund	Intradérmica en sitios múltiples	Dorso del conejo
Cuarta semana	36 microgramos	Intraperitoneal	Peritoneo
Quinta semana	36 microgramos	Intramuscular	Muslo
Sexta semana	15 microgramos	Intraperitoneal	Peritoneo
Séptima semana	15 microgramos	Intraperitoneal	Peritoneo

Esquema de Inmunización para la Enterotoxina C

Se siguió un esquema muy parecido al anterior, aun que cambiando algunas de las concentraciones de antígeno, como puede verse en la tabla 2.

TABLA 2

Secuencia de inyecciones de toxoide	Dosis de toxoide	Vía de inoculación por inyección	Sitio de inoculación
Primera semana	12 $\mu$ g. con adyuvante completo de Freund	Intradérmica en sitios múltiples	Dorso del conejo
Tercera semana	15 $\mu$ g. con adyuvante incompleto de Freund	Intradérmica en sitios múltiples	Dorso del conejo
Cuarta semana	15 microgramos	Intraperitoneal	Peritoneo
Quinta semana	15 microgramos	Intraperitoneal	Peritoneo
Sexta semana	15 microgramos	Intraperitoneal	Peritoneo

Para la obtención de los antisueros, del toxoide B, los animales fueron sangrados de la vena marginal de la oreja obteniendo 20 ml de sangre a la sexta y séptima semana de inmunización y 35 ml. de sangre en la octava semana.

Para la obtención del antisuero del toxoide C, los conejos fueron sangrados de la vena marginal de la oreja obteniendo 20 ml. de sangre, pero a la quinta y sexta semanas de la inmunización y 35 ml. de sangre a la séptima semana.

#### IV. ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA).

##### Obtención de la fracción gamma globulina de los sueros de conejos

Se siguió la técnica descrita por Voller y Bartlett (55).

De la mezcla de sueros obtenida de los conejos inmunizados, se tomó 1 ml. y se mezcló con 1 ml. de amortiguador de fosfatos en solución salina (PBS) a pH de 7.4 y se adicionaron 2 ml. de sulfato de sodio al 36%. Se agitó suavemente por 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 3, 000 x g por 10 minutos en una centrífuga Servall SS-34 y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con sulfato de sodio al 18%. El precipitado se disolvió en 0.8 ml. de PBS y se añadió una cantidad igual de sulfato de sodio al 24%. Se centrifugó a 3, 000 x g por 10 minutos y se lavó el precipitado con sulfato de sodio al 12%. El precipitado se redisolvió en 1.0 ml. de PBS y fué transferido a bolsas de diálisis. Se dializó contra PBS a 40C por 48 horas.



Se determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret.

#### Preparación del Conjugado anticuerpo específico-enzima

El conjugado fué preparado con fosfatasa alcalina (tipo VII-S, 5 000 U, Sigma) de intestino de bovino. A 5 mg. de esta enzima, se agregaron 2 mg. de inmunoglobulinas en 1.0 ml. de PBS, pH 7.4, se mezcló a temperatura ambiente y se dializó exhaustivamente a 4°C, con varios cambios de PBS durante 48 horas. Se agregó glutaraldehído al 25% (grado II, Sigma) para dar una concentración final de 0.2%; se mezcló e incubó por 2 horas a temperatura ambiente y se dializó a 14°C con varios cambios de PBS.

El saco de diálisis se transfirió a una solución amortiguada con Tris (hidroximetil aminometano) a pH 8.0. Se continuó dializando exhaustivamente a 4°C por 48 horas con algunos cambios del amortiguador. El conjugado fué diluido a 4.0 ml. con amortiguador Tris conteniendo 1% de albúmina de suero bovino y 0.2% de azida de sodio y se conservó en la oscuridad a 4°C.

#### Determinación de la actividad del conjugado

Se utilizaron placas para microhemaglutinación en U y placas de Immunol I e Immunol II de los laboratorios Dynatech.

La inmunoglobulina fué diluida a 500 ng/ml. en amortiguador de carbonato-bicarbonato pH 9.0. Los pozos fueron cubiertos con 200 µl. de anticuerpo (conteniendo cada pozo 100 ng/0.2 ml.). Las placas fueron cubiertas con hojas inmunoaderentes parafilm, colocadas en cámara

ra húmeda e incubadas toda la noche a 4°C (55). Después de esta incubación las placas fueron lavadas con PBS Tween 20 durante 3 minutos por 3 veces.

La enterotoxina correspondiente (antígeno) fué diluida a 1000 ng/ml. con PBS pH 7.4 y adicionada a cada pozo a probar. Se incubó en cámara húmeda, después de lo cual se lavó con PBS-Tween 20, 3 veces por 3 minutos.

Se agregó 200 µl. del conjugado correspondiente diluido en PBS-Tween y se incubó en cámara húmeda por 3 horas a 4°C. Se lavaron los pozos con PBS-Tween 3 veces por 3 minutos.

El sustrato que se utilizó fue el p-nitrofenil fosfato (sigma 104-105). 5 mg. se disolvieron en 5 ml. de amortiguador dietanolamina al 10%, agregando 200 µl. a cada pozo. El color desarrollado fué observado visualmente y a los 30 minutos se detuvo la reacción agregando 50 µl. de hidróxido de sodio 3 M (55). Al final de este tiempo se hicieron las lecturas en un lector Micro ELISA (Standard Mod. 530, Dynatech) a una longitud de onda de 405 nm y se anotaron los resultados.

En cada uno de los ensayos las muestras se trabajaron por duplicado y se llevaron 3 testigos: testigo del anticuerpo, testigo del antígeno y testigo del conjugado. Agua destilada fué utilizada como "blanco" para ajustar a cero el espectrofotómetro.

#### Calibración de reactivos

La técnica fué montada en la forma anteriormente descrita pero variando los distintos reactivos y tiem-

pos en forma independiente, una variable cada vez, tal como sigue:

- a) Se probaron concentraciones de antisueros para enterotoxinas B y C de 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 ng/ml. en forma independiente.
- b) Concentración de antígeno: 200 ng/0.2 ml.
- c) Tiempos de incubación para los antígenos B y C de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas.
- d) Temperaturas de incubación: 4° , 25° y 37°C.
- e) Los dos conjugados (anti-B y anti-C) fueron probados a diluciones de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80 y 1:100.
- f) Se ensayaron tres tipos diferentes de soportes de fase sólida: placas de hamaglutinación U, Immunol I e Immunol II (Dynatech 011-010-6301 y 011-010-6302).

#### V. DEFECCION DE ENTEROTOXINAS B Y C EN LECHE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS:

A tubos conteniendo 5 ml. de leche cada uno, fueron contaminados en la siguiente forma: para la enterotoxina B, 0.16, 0.32, 0.96 y 1.6 µg/ml. y para la enterotoxina C, 0.12, 0.24, 0.72 y 1.2 µg/ml.

Para la extracción de estas enterotoxinas se utilizaron dos métodos. El primer método fué el de Silverman (50) modificado por nosotros; en el cual a 5.0 ml. de leche contaminada se agregaron 5.0 ml. de agua destilada y se homogenizaron en un mezclador "Vortex". El homogenizado se diluyó con 10.0 ml. de PBS 0.02 M, pH 6.4 y

se calentó a 50°C por 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 45 minutos y se centrifugó a 15, 900 x g durante 20 minutos.

La porción del líquido claro entre el sedimento y la capa superior fué removida con una pipeta Pasteur. Al precipitado se le volvió a repetir la extracción dos veces más y los sobrenadantes se mezclaron; estos se filtraron a través de papel filtro (Whatman No. 1) y se concentró por calentamiento a 50°C hasta 1 ml.

El segundo método de extracción que se utilizó fué el de Reiser (40) modificado por Terplan (52). Una cantidad de 5 ml. de leche contaminada se mezcló con 5.0 ml. de agua destilada y se homogenizaron en un mezclador. El pH se ajustó a 4.5 con ácido clorhídrico 2 N, y se centrifugó a 12, 100 x g por 20 minutos.

El sobrenadante fué ajustado a un pH de 7.5 con hidróxido de sodio 2 N, después se añadió cloroformo al 10%, se agitó por 5 minutos y se centrifugó a 12, 100 x g por 20 minutos. El sobrenadante fué reajustado a pH 4.5, se centrifugó y se neutralizó el pH a 7.0. Se añadió Tween 20 al extracto para dar una concentración final de 0.25%.

Para ambos métodos de extracción previamente descritos, se utilizaron, las mismas concentraciones de enterotoxina B y C.

A estos extractos se les determinó la concentración de enterotoxina, siguiendo la técnica Micro ELISA, previamente descrita. Al mismo tiempo, a cada uno de los extractos obtenidos, se les sometió a la técnica de inmunodifusión en portaobjetos para detectar estas enterotoxinas.

## RESULTADOS

### I. OBTENCION DE LAS ENTEROTOXINAS B Y C DE S. aureus

Para la obtención de la enterotoxina B llevada a cabo por el método de Casman y Bennett se montaron 25 botellas y se obtuvieron 50 ml. de extracto crudo de la enterotoxina.

Para la obtención de la enterotoxina C se montaron 30 botellas y se lograron 55 ml. del extracto crudo de la enterotoxina.

En la purificación parcial de la enterotoxina B se siguió el procedimiento descrito por Schantz, en el cual se utilizó 200 ml. del eluyente, correspondiendo a 40 fracciones de 5 ml. cada una.

Para la purificación parcial de la enterotoxina C se siguió el procedimiento de Borja y Bergdoll y se utilizó 200 ml. de cada eluyente y se recolectaron 160 fracciones de 5 ml. cada una.

### II. DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE LAS ENTEROTOXINAS B Y C POR TECNICAS ESPECTROFOTOMETRICAS, INMUNOLOGICAS Y DE ACTIVIDAD BIOLOGICA.

Las fracciones obtenidas de la purificación parcial de la enterotoxina B fueron leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 277 nm. Ver gráfica 1.

Las fracciones obtenidas de la purificación parcial de la enterotoxina C no pudieron ser leídas espectrofotométricamente debido a la turbidez existente en la mayoría de ellas.

De aquellas fracciones de la purificación en la enterotoxina B donde se observaron picos en las lecturas del espectrofotómetro a 277 nm. se practicaron pruebas de inmunodifusión en gel sobre portaobjetos, utilizando en el pozo del centro anticuerpo testigo (1:10) y a su alrededor las muestras. Para aquellos pozos en que se observaron bandas de precipitación (comprendiendo del tubo #7 al tubo #21) se procedió a diluir el antígeno contenido en las fracciones, para determinar así la máxima dilución del antígeno en la que aún se observaron bandas de precipitado, la cual correspondió a una dilución de 1:32.

Con respecto a la enterotoxina C a cada una de las fracciones se les practicó pruebas de inmunodifusión en gel, llenando el pozo del centro con anticuerpo testigo (1:6) y a su alrededor las muestras de las fracciones eluidas. Para los pozos en que se observaron bandas de precipitación (con el primer eluyente tubos #5 al #21 y con el tercer eluyente tubos #14 al #21) se diluyó la enterotoxina presente en las fracciones y la máxima dilución del antígeno en la que aún se observaron bandas de precipitado fué 1:16; sin embargo, en muy pocas fracciones hubo precipitado a dilución 1:32.

Los gatitos utilizados en la prueba de Dolman y que se les inoculó las enterotoxinas B y C por vía intraperitoneal, presentaron salivación y vómito dentro de los primeros 20 minutos. Se observaron otros accesos de vómitos a tiempos mas prolongados. El gatito testigo no presentó los síntomas mencionados.

Se hizo la determinación de proteína para las enterotoxinas B y C por el método de Lowry. Los resultados obtenidos fueron: 24 microgramos por ml. para la enterotoxina B y 12 microgramos por ml. para la enterotoxina C.



### III. OBTENCION DE LOS ANTISUEROS PARA LAS ENTEROTOXINAS B Y C.

De cada uno de los conejos inmunizados con el toxoi de B siguiendo los esquemas de inmunización y sangrado se ñalados en el capítulo de material y métodos (tabla 1) se recolectaron 75 ml. de sangre en total.

Como se observó en los esquemas de inmunización y sangrado, se intercalaron la inmunización y los sangrados. Después de cada inoculación y sangrado con el toxoi de B se obtuvo una pequeña cantidad de sangre para hacer pruebas de inmunodifusión en portaobjetos y seguir la respuesta inmune del animal ante el toxoide. Para las pruebas de inmunodifusión se utilizó el antígeno testigo de referencia (10 microgramos/ml.) y el preparado en este estudio. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Para la inmunización con el toxoide C se utilizó un esquema de inmunización y sangrado muy parecido al anterior. También se hicieron pruebas de inmunodifusión en portaobjetos (después de cada inmunización y sangrado), utilizando el antígeno testigo de referencia ( 4 microgramos/ml.) y el obtenido en este estudio. Se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 4.

Todos los conejos resultaron buenos respondedores a los toxoides B y C.

Después de obtener las inmunoglobulinas de los sueros inmunes, se determinó la concentración de proteínas. Se utilizó la técnica de Biuret para proteínas totales, obteniéndose 1 gr/100 ml. para el antisuero B y 0.6 gr/100 ml. para el antisuero C. Para tener la seguridad de tener solo inmunoglobulinas se llevó a cabo un ensayo por

electroforesis en acetato de celulosa para cada antisuero, observándose solo un pico en cada uno, correspondiendo éste a la fracción gamma globulina por su desplazamiento en el campo.

#### IV. INMUNOENSAYO ENZIMATICO (ELISA)

Una vez que estuvieron preparados todos los reactivos para desarrollar la técnica ELISA se procedió a realizar el inmunoensayo enzimático con grandes cantidades de cada uno de los reactivos y tiempos de incubación prolongados, con el objeto de ver el funcionamiento de los reactivos preparados en este estudio. El resultado obtenido con exceso de reactivos fué muy satisfactorio, desarrollándose las reacciones antígeno-anticuerpo en forma completa y la reacción enzimática en forma correcta.

Era necesario entonces hacer estudios cuantitativos con los diferentes reactantes. Después de que se ensayaron diferentes concentraciones de cada uno de ellos los resultados obtenidos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- a) La concentración óptima de antisueros para las enterotoxinas B y C, fué de 100ng/0.2 ml.
- b) Para ambos inmunoensayos enzimáticos la temperatura de incubación que dió mejores resultados fué la de 4°C.
- c) Los tiempos óptimos de incubación para el antígeno fueron: para la enterotoxina B de 4 horas y para la enterotoxina C de 2 horas.
- d) La dilución óptima de los conjugados (anti-enterotoxinas B y C) para fines cuantitativos fué 1:20.

e) El soporte de fase sólida que dió mejores resultados para ambos ensayos fué con las tiras Immunol II.

Una vez implementada y calibrada la técnica de ELISA con los datos ya mencionados, se procedió a probar la sensibilidad del ensayo, para lo cual se preparó una solución de 1,000 ng/0.2 ml. tanto para la enterotoxina B como para la enterotoxina C. A partir de estas soluciones, se siguió diluyendo a la mitad para que quedaran 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0 y 1.0 ng/0.2 ml.

Se siguió la técnica ya descrita en la sección de Material y Métodos. Se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro micro-ELISA y de esta manera quedaron preparadas las curvas de calibración.

Este ensayo implementado en las condiciones experimentales ya descritas fué capaz de detectar 5 ng/ml. de enterotoxinas B y C.

#### V. DETECCION DE ENTEROTOXINAS B Y C EN LECHEs ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.

Se hizo un estudio doble ciego en donde se contaminaron leches con ambas enterotoxinas B y C independientemente.

Se compararon los dos métodos de extracción ya descritos. El método de Silverman resultó ser el método que extrajo más enterotoxina y fué la técnica seguida con alguna modificación hecha por nosotros.

Para la detección de la enterotoxina B de las leches el ensayo quedó implementado de la siguiente manera:

- a) Antisuero para enterotoxina B, 100 ng/0.2 ml.
- b) Extracto de la leche artificialmente contaminada conteniendo presumiblemente la enterotoxina B.
- c) Tiempo de incubación para la primera reacción antígeno-anticuerpo: 4 horas a 4°C.
- d) Antisuero para la enterotoxina B conjugado con la fosfatasa alcalina, diluido 1:20.

Los resultados obtenidos con varias muestras de leche contaminadas se expresan en la tabla 5.

Para la detección de la enterotoxina C en las leches contaminadas el ensayo quedó implementado como sigue:

- a) Antisuero para la enterotoxina C, 100 ng/0.2 ml.
- b) Extracto de leche artificialmente contaminada conteniendo presumiblemente la enterotoxina C.
- c) Tiempo de incubación para la primera reacción antígeno-anticuerpo: 2 horas a 4°C.
- d) Antisuero para la enterotoxina C conjugado a la fosfatasa alcalina, diluido 1:20.

Los resultados obtenidos con varias muestras de leche contaminadas se muestran en la tabla 6.

A los extractos en los que se cuantificó las enterotoxinas por ELISA, se les determinó también la presencia de las enterotoxinas por técnica de inmunodifusión en

portaobjetos para comparar la sensibilidad de ambas pruebas. En todas las muestras ensayadas los resultados fueron negativos independientemente de los resultados por las pruebas de ELISA, lo que permite concluir que el ensayo inmunoenzimático es mucho más sensible que el de inmunodifusión, como era de esperarse.

GRAFICA 1

PURIFICACION DE LA ENTEROTOXINA B POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN COLUMNA

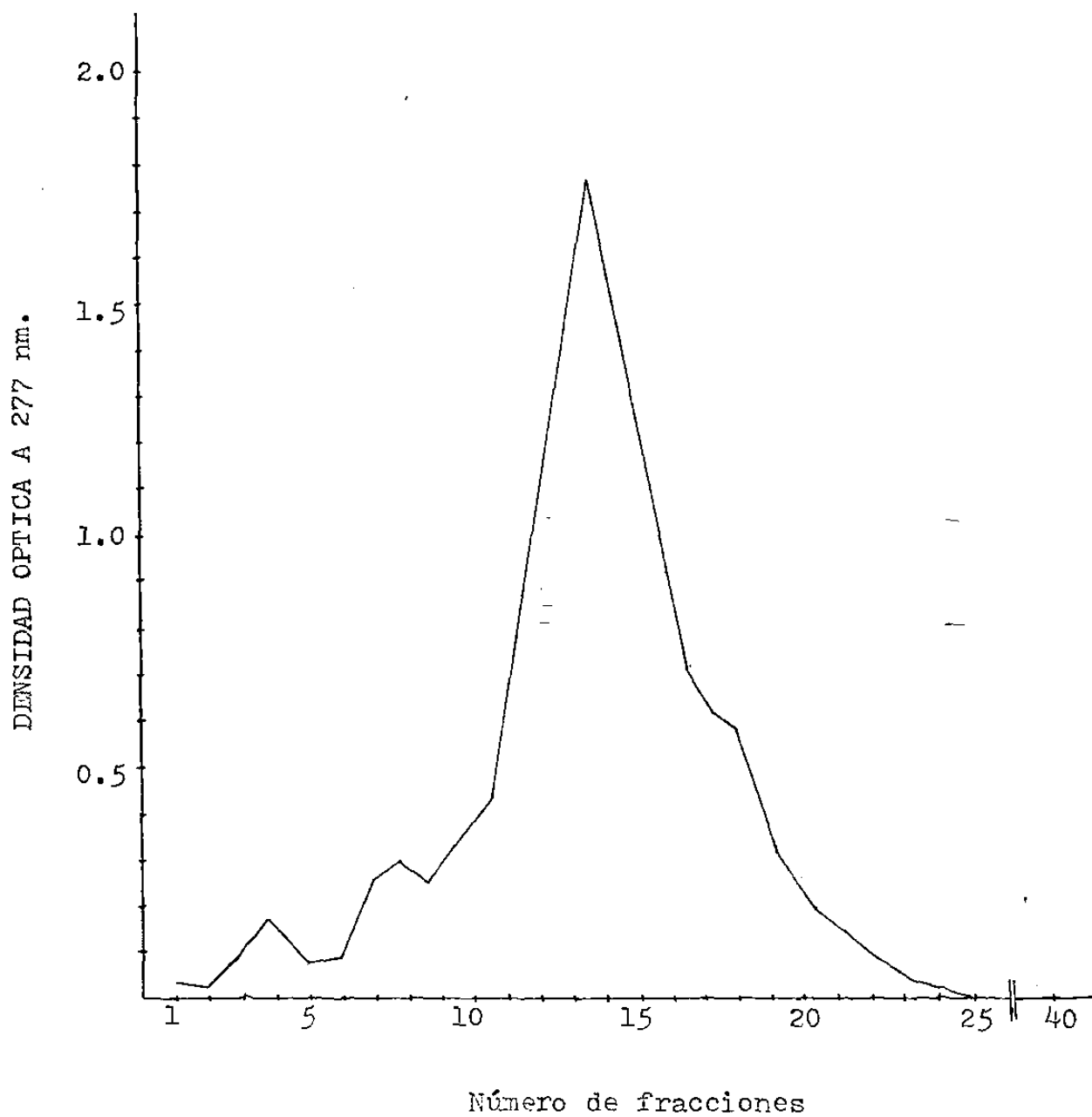


TABLA 3

TITULACION DE ANTICUERPOS PARA EL TOXOIDE DE LA ENTEROTOXINA B EN SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS.

Semanas de los esquemas de inmunización y sangrado.	Título de anticuerpos. (Inmunodifusión)
Tercera semana	1:8
Cuarta semana	1:32
Quinta semana	1:64
Sexta semana	1:64
Séptima semana	1:64
Octava semana	1:64

TABLA 4

TITULACION DE ANTICUERPOS PARA EL TOXOIDE DE LA ENTEROTOXINA C EN SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS.

Semanas de los esquemas de inmunización y sangrado.	Título de anticuerpos. (Inmunodifusión)
Tercera semana	1:4
Cuarta semana	1:8
Quinta semana	1:16
Sexta semana	1:16
Séptima semana	1:16

TABLA 5

DETERMINACION DE ENTEROTOXINA B POR LA TECNICA DE ELISA EN LECHES ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS. EFICIENCIA DE - LOS METODOS DE EXTRACCION.

Número de muestra.	Concentración de enterotoxina agregada a la leche.	Extracción de antígeno. Método de Silverman.	Extracción de antígeno. Método modificado por nosotros.
1	0.160 $\mu\text{g/ml}$ .	0.018 $\mu\text{g/ml}$ .	0.080 $\mu\text{g/ml}$ .
2	0.320 $\mu\text{g/ml}$ .	0.125 $\mu\text{g/ml}$ .	0.300 $\mu\text{g/ml}$ .
3	0.960 $\mu\text{g/ml}$ .	0.320 $\mu\text{g/ml}$ .	0.520 $\mu\text{g/ml}$ .
4	1.600 $\mu\text{g/ml}$ .	0.550 $\mu\text{g/ml}$ .	0.800 $\mu\text{g/ml}$ .

TABLA 6

DETERMINACION DE ENTEROTOXINA C POR LA TECNICA DE ELISA EN LECHES ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS. EFICIENCIA DE - LOS METODOS DE EXTRACCION.

Número de muestra.	Concentración de enterotoxina agregada a la leche.	Extracción de antígeno. Método de Silverman.	Extracción de antígeno. Método modificado por nosotros.
1	0.120 $\mu\text{g/ml}$ .	0.035 $\mu\text{g/ml}$ .	0.080 $\mu\text{g/ml}$ .
2	0.240 $\mu\text{g/ml}$ .	0.060 $\mu\text{g/ml}$ .	0.115 $\mu\text{g/ml}$ .
3	0.720 $\mu\text{g/ml}$ .	0.155 $\mu\text{g/ml}$ .	0.325 $\mu\text{g/ml}$ .
4	1.200 $\mu\text{g/ml}$ .	0.505 $\mu\text{g/ml}$ .	0.585 $\mu\text{g/ml}$ .



## DISCUSION

Es interesante señalar que la obtención de ambas enterotoxinas fué muy efectiva por el método escogido; sin embargo se obtuvo mayor concentración de la B que de la C, a pesar de que el número de unidades de cultivo montadas fué mayor para esta última, lo que demuestra que un procedimiento dado, no es necesariamente efectivo para el aislamiento de toxinas de la misma bacteria con efectos fisiológicos y toxicológicos semejantes.

En la purificación de la enterotoxina C, las fracciones eluidas no pudieron ser leídas espectrofotométricamente por haber turbidez en la mayoría de ellas. Esto llevó a la necesidad de demostrar la enterotoxina C por otros métodos y se eligió a la inmunodifusión en gel sobre portaobjetos, demostrando así la presencia de la enterotoxina en las fracciones eluidas. Este mismo método se siguió para la enterotoxina B, para comparar los resultados espectrofotométricos con los de precipitación.

La demostración de la actividad tóxico-biológica de estas enterotoxinas se hizo por la prueba de Dolman en gatitos, en donde uno de ellos fué el testigo y los otros dos fueron inoculados con las enterotoxinas respectivas, observándose en ambos una respuesta de vómito - - aproximadamente en 20 minutos. El gatito inoculado con la enterotoxina B, repitió los accesos de vómito hasta 2 horas después de la inoculación; mientras que el inoculado con la enterotoxina C, presentó manifestaciones de vómito hasta 6 horas después de la inoculación. Ambos gatitos fueron buenos respondedores a la acción de las enterotoxinas ensayadas. El gatito testigo no presentó ninguna manifestación.

Como se describió en el capítulo de resultados, se obtuvo una concentración mayor de enterotoxina B que para la enterotoxina C. Esto confirma lo apoyado por algunos autores, los cuales indican que se produce mayor cantidad de la enterotoxina B, que la que se obtiene para la C; en las mismas condiciones (41).

Es importante que el antisuero para la preparación del conjugado sea de alta potencia. De los varios esquemas de inmunización elegibles, el sugerido por Salinas Carmona (46) ofreció muy aceptables resultados que permitió obtener un título elevado de anticuerpos, aunque sería deseable obtener títulos mas altos, sobre todo para la enterotoxina C.

Como se indicó ya, durante la inmunización con toxoide B se tomaron muestras de sangre de cada conejo de la tercera a la octava semanas de inmunización con el propósito de determinar el título de anticuerpos. El incremento en el título, para la enterotoxina B llegó a 1:64 a la quinta semana y ya no aumentó más, por lo cual la inmunización se detuvo en la séptima semana.

Para la enterotoxina C las dosis de inmunización fueron menores que las utilizadas para B, porque la cantidad de toxina cruda fué menor. Se siguió un esquema igual al anterior, hasta la cuarta semana, variando la vía de inoculación en la quinta semana, en la que se usó la vía intraperitoneal. La razón de hacer este cambio fué de acuerdo a los pobres resultados obtenidos en el título de anticuerpos para la enterotoxina B, ya que se vió que el título no aumentó cuando el toxoide se inyectó por vía intramuscular.

Los anticuerpos obtenidos después de la inmunización fueron satisfactorios en el contenido de inmunoglobuli-

nas, siendo mayor para la enterotoxina B que para la C.

Como el contenido de proteínas fué muy elevado en los antisueros, se quizo comprobar si realmente el incremento se debía a un aumento en la fracción globulínica, para lo cual se llevó a cabo una electroforesis, la que demostró que efectivamente el incremento correspondía - exclusivamente a la fracción gamma globulínica.

El inmuno ensayo enzimático ELISA, se realizó probando varios soportes. Los ensayos se siguieron como se describe en material y métodos, encontrándose, que el soporte más adecuado fué el Immunol II para ambas enterotoxinas. Esto se concluyó porque utilizando los tres soportes en las mismas condiciones de tiempo, incubación y temperatura; la reacción fué más intensa visualmente en Immunol II.

El conjugado preparado tanto para B, como para C, fué bajo en su potencia de reactividad para sus respectivos antígenos, sin embargo, para la determinación visual fué positivo hasta una dilución de 1:80. Estos resultados indican la necesidad de trabajar con un anticuerpo más purificado, ya que el obtenido por nosotros estaba mezclado con el resto de las inmunoglobulinas, así como purificar el conjugado una vez que el anticuerpo se ha combinado con la enzima. La sensibilidad de ELISA depende principalmente de la preparación de estos conjugados enzima-antígeno o enzima-anticuerpo que deben poseer una alta actividad enzimática e inmunológica. El acoplamiento de una enzima con un anticuerpo o antígeno involucra el uso de un agente eslabonante que reacciona con los grupos funcionales presentes en la enzima y en el antígeno o anticuerpo.

Un procedimiento de acoplamiento que produjese casi el 100% de conjugado, compuesto de una molécula de enzima ligada con una molécula de antígeno o anticuerpo y que preservara toda actividad inicial enzimática e inmunológica es difícil, ya que en estas reacciones de acoplamiento se producen siempre una mezcla heterogénea de conjugado enzima-antígeno o anticuerpo, enzima-enzima y anticuerpo-anticuerpo o antígeno-antígeno (2).

De los métodos de extracción utilizados, por las técnicas de Silverman y Terplan, el que mostró mejores resultados en nuestra experiencia fué el de Silverman; ya que con el de Terplan se detectaron cantidades insignificantes del antígeno para ambas enterotoxinas; mientras que con el de Silverman se demostró una mejor extracción de las enterotoxinas. Este método fué modificado por nosotros, lográndose determinar una mayor concentración de las enterotoxinas en los extractos de las muestras de leche ensayadas.

En la cuantificación de la enterotoxina B por el método de extracción de Silverman se pudo observar que las cantidades detectadas correspondieron a un 30% de la cantidad original para las muestras 2, 3 y 4, no así para la muestra 1 en la que demostró aproximadamente un 10%. Con el método de Silverman modificado por nosotros, detectamos el 50% en los tubos 1 y 4, en el tubo 3 se demostró el 54% y el caso del tubo 2 fué de 94%.

Para la enterotoxina C como puede verse las concentraciones trabajadas fueron menores que para la enterotoxina B. En este caso se detectó también menor cantidad de la enterotoxina C por el método de Silverman y mayor para el modificado por nosotros. Por el método de Silver

man se detectó entre el 21 y 29% de la enterotoxina para las muestras 1, 2 y 3 y fué del 42% para la muestra 4. Mientras que por el modificado por nosotros se obtuvo entre el 45 y 49% para las muestras 2, 3 y 4 y el 66% para el caso de la muestra 1.

Todas estas variaciones que se presentaron son debidas a errores técnicos factibles porque las cantidades con que se trabajaron las enterotoxinas fueron muy pequeñas. Aún así, sería deseable buscar modificaciones técnicas que permitieran una recuperación cuantitativa más alta y uniforme de las enterotoxinas.

A los extractos de leche contaminados a los que se determinó las enterotoxinas B y C por el inmunoensayo --enzimático ELISA también se les determinó por la técnica de inmunodifusión en portaobjetos, resultando todas estas pruebas negativas, por lo cual podemos concluir que ELISA es mucho más sensible que las pruebas de inmunodifusión, pues usando esta técnica no pudimos detectar las toxinas en tan pequeñas concentraciones, mientras que --por ELISA sí se pudieron cuantificar.

Conviene mencionar que siendo nuestros resultados --satisfactorios usando esta tecnología, queda abierta la posibilidad de su utilización para la búsqueda sistemática de las enterotoxinas B y C de S. aureus en productos lácteos, con el propósito de determinar la presencia de estas toxinas en un alimento tan importante para el ser humano como es la leche, el cual se consume desde la infancia hasta la vejez. Su consumo en grandes volúmenes por la población, sus problemas de producción, almacenamiento y manejo, la hacen un fuerte e importante producto alimenticio que es candidato a contaminarse con resultados desastrosos para la salud pública. Esta tecnología permite estudios mucho más amplios tanto en lo epidemiológico como un instrumento de control de calidad.

## RESUMEN

Se utilizaron las cepas 243 y 361 del Staphylococcus aureus para la obtención de las enterotoxinas B y C respectivamente, siguiendo el método de Casman y Bennett de cultivos en sacos de celofán.

La purificación parcial de las enterotoxinas se llevó a cabo en columnas de cromatografía con Amberlite CG-50 para la enterotoxina B y con Carboximetil-celulosa para la enterotoxina C.

Pruebas espectrofotométricas, inmunológicas y de actividad tóxico-biológica fueron realizadas para la demostración de las enterotoxinas; las cuales fueron lecturas en el espectrofotómetro de UV a una longitud de onda de 277 nm, inmunodifusiones en gel sobre portaobjetos y la prueba de Dolman en gatitos.

Se inmunizaron conejos para la obtención de antisue-ros para las enterotoxinas B y C, obteniéndose así los anticuerpos necesarios para preparar el conjugado con fosfata alcalina y para montar la técnica del doble "sandwich" de anticuerpo.

Se estandarizó la técnica inmunoenzimática cualitativa y cuantitativamente. Se contaminaron artificialmente leches y las enterotoxinas fueron determinadas del extracto demostrándose su presencia al nivel de nanogramos.

Esta técnica inmunoenzimática ELISA implementada por nosotros con las condiciones operativas de nuestro medio científico-técnico, resultó de fácil manejo, corto tiempo de elaboración, bajo costo y con una gran sensibilidad diagnóstica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Angelotti, R.; Staphylococcal Intoxications. Food Borne Infestions and Intoxications. Academic Press, New York; 359-393, 1969.
- 2.- Avrameas, S.; Ternynck, T.; and Guesdon, J.L. Coupling of enzymes to Antibodies and Antigens. Scand. J. Immunol. 8(7): 7-23, 1978.
- 3.- Bergdoll, M.S.; Lavin, B.; Surgalla, M.J. and Dack, G.M. Chromatography in the Purification of Staphylococcal Enterotoxin. Science. 116:633-634, 1952.
- 4.- Bergdoll, M.S.; Surgalla, M.J. and Dack, G.M. Staphylococcal Enterotoxin. J. Immunol. 83: 334-338, 1959.
- 5.- Bergdoll, M.S.; Borja, C.R.; Avena, R.M. Identification of a New Enterotoxin as Enterotoxin C. J. - Bacteriol. 90: 1481-1485, 1965.
- 6.- Bergdoll, M.S.; Crass, B.A.; Reiser, R.F.; Robbins, R.N.; Lee, C.M.; Chesney, J.; Davis, J.P.; Vergeront, J.M.; and Wand, P.J. An Enterotoxin-Like Protein in Staphylococcus aureus Strains from Patients with Toxic Shock Syndrome. Annals of Int. Med. 96(2): 969-971, 1982.
- 7.- Borja, C.R.; Bergdoll, M.S.; Purification and Partial Characterization of Enterotoxin C Produced by Staphylococcus aureus Strain 137. Biochem. 6: 1467-1473, 1967.
- 8.- Brian, G. W. Enzyme-Immunoassay. Clin Chem. 22: 1243-1255, 1976.
- 9.- Buxton, T.B. and Rissing, J.P. The Antibody and Antigen ELISA: Future Applications. Miles Laboratories, 4-6, 1982.
- 10.- Carlsson, H.E.; Lindberg, A.A. and Hammarström. Titration of Antibodies to Salmonella O antigens by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Infect. Immun. 6: 703-708, 1972.

- 11.- Casman, E.P. Serologic Studies of Staphylococcal Enterotoxin. Public Health Rept. 73: 599-609, 1958.
- 12.- Casman, E.P. Further Serological Studies of Staphylococcal Enterotoxin. J. Bacteriol. 79: 849-856, - 1960.
- 13.- Casman, E.P. and Bennett, R.W. Culture Medium for the production of Staphylococcal Enterotoxin A. - J. Bacteriol. 86: 18-23, 1963.
- 14.- Casman, E.P.; Bergdoll, M.S. and Robinson, J. Designation of Staphylococcal Enterotoxins. J. Bacteriol. 85: 715-716, 1963.
- 15.- Casman, E.P., and Bennett, R.W. Production of Antiserum for Staphylococcal Enterotoxin. Appl. Microbiol. 12: 363-367, 1964.
- 16.- Casman, E.P.; Bennet, R.W.; Dorsey, A.E. and Issa, J.A. Identification of a Fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin D. J. Bacteriol. 94: 1875-1882, 1967.
- 17.- Clem. T.R. and Yolken, R.H. Practical Colorimeter for Direct Measurement of Microplates in Enzyme Immunoassay System. J. Clin. Microbiol. 7: 55-58, -- 1978.
- 18.- Daver, C.C., and et. al. Summary of Disease outbreaks. Public Health Rept. 1952-1960.
- 19.- Denys, M. and Lippitz, J. Food Poisoning. Appl. -- Microbiol. 10: 472-479, 1962.
- 20.- Dolman, C. and Wilson, R. The kitten Test for Staphylococcus Enterotoxin. Can. Public Health J. 31: 129-135, 1972.
- 21.- Doskeland, S.O. and Berdal, B.P. Bacterial Antigen Detection in Body Fluids: Methods for Rapid Antigen Concentration and Reduction of Nonspecific Reaction J. Clin. Microbiol. 11: 380-384, 1980.
- 22.- Dynatech Laboratories, Inc. Micro ELISA, solidphase Immunoassays. 1-10, 1980.



- 23.- Engvall, E. and Perlmann, P. Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay, ELISA. *J. Immunol.* 109: 129-135, 1972.
- 24.- Hall, H.E.; Angelotti, R. and Lewis, K.H. Quantitative Detection of Staphylococcal Enterotoxin B - in Food by Gel-Diffusion Methods. *Public Health - Rep.* 78: 1089-1098, 1963.
- 25.- Ivler, D. The Staphulococci; Ecologic Perspectives. *Annals of New York Academy of Sciences.* 128: 124-131, 1965.
- 26.- Jarvis, A.W. and Lawrence, R.C. Production of Extracellular Enzymes and Enterotoxins A, B, and C by Staphylococcus aureus. *Infect. Immunol.* 4: 110-115, 1971.
- 27.- Jarvis, A.W.; Lawrence, R.C. and Pritchard, G.G. Production of Staphylococcal Enterotoxins A, B, - and C Under Conditions of Controlled pH and Aera-- tion. *Infect. Immunol.* 7: 847-854, 1973.
- 28.- Johnson, H.M.; Bucovic, J.A., and Kauffmann, P.E. Staphylococcal Enterotoxins A and B: Solid-Phase Radioimmunoassay in Food. *Appl. Microbiol.* 26: 309-313, 1973.
- 29.- Johnson, H.M., Bukovic, J.A., Kauffman, P.E. and Peeler, J.P. Staphylococcal Enterotoxin B: Solid-Phase Radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.* 22: 837-841, 1971.
- 30.- Johnson, H.M.; Hall, H.E. and Simon, M. Enterotoxin B: Serological Assay in Cultures by Passive - Hemagglutination. *Appl. Microbiol.* 15: 815-818, 1967.
- 31.- Kauffmann, P.E. and Johnson, H.M. Stability of - <sup>125</sup>I-Labeled Staphylococcal Enterotoxins in Solid-Phase Radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.* 29: 776-779, 1975.
- 32.--Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phe-

- noi Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 33.- MMWR. Staphylococcal Food Poisoning Delaware. *Epidemiologic Notes and Reports CDC.* 445-446, 1979.
- 34.- MMWR. Staphylococcal Food Poisoning Wisconsin. *Epidemiologic Notes and Reports CDC.* 226-231, 1977.
- 35.- MMWR. Presumed Staphylococcal Food Poisoning Associated with Whipped Butter. *Epidemiologic Notes and Reports CDC.* 268, 1977.
- 36.- Pober, Z. and Silverman, G.J. Modified Radioimmunoassay Determination for Staphylococcal Enterotoxin B in Foods. *Appl. Environ Microbiol.* 33: 620-625, 1977.
- 37.- Stark, R.L. and Middaugh, P.R. Immunofluorescent - Detection of Enterotoxin B in Food and a Culture - Medium. *Appl. Microbiol.* 18: 631-635, 1969.
- 38.- Morse, S.A. and Mah, R.A. Microtiter Hemagglutination-Inhibition Assay for Staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Microbiol.* 15: 58-61, 1967.
- 39.- Plotkin, G.R.; Kluge, R.M. and Waldman, R.H. Gastroenteritis: Etiology, Pathophysiology and clinical Manifestations. *Medicine.* 58: 95-110, 1979.
- 40.- Reiser, R.; Conaway, D. and Bergdoll, M.S. Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods. *Appl. Microbiol.* 27: 83-85, 1974.
- 41.- Reiser, R.F. and Weiss, K.F. Production of Staphylococcal Enterotoxins A, B, and C in Various Media. *Appl. Microbiol.* 18: 1041-1043, 1969.
- 42.- Rissing, J.P.; Buxton, T.B.; Talledo, R.A. and Sprinkle, T.J. Comparison of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Antigen Quantitation Direct - Competition and Antibody Inhibition. *Infect. Immun.* 27: 405-410, 1980.
- 43.- Rivas, M. and Rodricks, J.V. Food Hazards of Microbial origin. II. Bacterial Toxins. *Rev. Latamer. Microbiol.* 21: 159-165, 1979.

- 44.- Robbins, R.; Gould, S. and Bergdoll, M.S. Detecting the Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus Strains. *Appl. Microbiol.* 28: 946-950, 1974.
- 45.- Rogolsky, M. Nonenteric Toxins of Staphylococcus aureus. *Microbiol. Rev.* 43: 320-359, 1979.
- 46.- Salinas Carmona, M.C. Comunicación personal.
- 47.- Schantz, E.; Roessler, W.G.; Wagman, J.; Spero, L. - Dunnery, D.A., and Bergdoll, M.S. Purification of Staphylococcal Enterotoxin B. *Biochem.* 4: 1011-1016, 1965.
- 48.- Scharpe, S.L., Cooreman, W.M., Blomme, W.J., and -- Laekeman, G.M. Quantitative Enzyme Immunoassay: Current Status. *Clin Chem.* 22: 733-738. 1976.
- 49.- Silverman, S.J. Serological Assay of Culture Filtrates for Staphylococcus Enterotoxin. *J. Bacteriol.* 85: 955-956, 1963.
- 50.- Silverman, S.J.; Knoit, A.R. and Howard, M. Rapid, Sensitive Assay for Staphylococcal Enterotoxin and a Comparison of a Serological Methods. *Appl. Microbiol.* 16: 1019-1023, 1968.
- 51.- Spero, L.; Stefany, D.; Brecher, P.I.; Jacoby, H.M.; Dalidowicz, J.E., and Schantz, E.J. Amino Acid Composition and Terminal Amino Acid of Staphylococcal - Enterotoxin B. *Biochem.* 4: 1024-1029, 1965.
- 52.- Stiffler, R.G. and Fey, H. Simple Assay for Staphylococcal Enterotoxins A, B, and C: Modification of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* 8: 473-479, 1978.
- 53.- Sugiyama, H.; Berdoll, M.S. and Dack, G.M. In Vitro Studies on Staphylococcal Enterotoxin Production. *J. Bacteriol.* 80: 265-270, 1960.
- 54.- Sugiyama, H.; McKissic, E.M.; Bergdoll, M.S. and - - Heller, B. Enhancement of Bacterial Endotoxin Lethality by Staphylococcal Enterotoxin. *J. Infect. Dis.* 114: 111-118, 1964.

- 55.- Voller, A.; Bidwell, D. and Bartlett, A. Microplate Enzyme Immunoassays for the Immunodiagnosis of Virus Infections.
- 56.- Voller, A.; Bidwell, D.E. and Bartlet, A. Enzyme - Immunoassays in Diagnostic Medicine. Bull. World -- Health Organ. 53: 55-65, 1976.
- 57.- Voller, A.; Bidwell, D.E. and Bartlett, A. The Enzy me Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dynatech Labo ratories, 1979.
- 58.- Weirether, F.J.; Lewis, E.E. Rosewald, A.J. and - - Lincoln, R.E. Rapid Quantitative Serological Assay of Staphylococcal Enterotoxin B. Appl. Microbiol. 14: 284-291, 1966.
- 59.- Wesley, G. C.; Gerard, F. V. and Herbert L. B. Emetic Effect of Purified Staphylococcal Enterotoxin in Cats. P.S.E.B.M. 111: 205-207, 1962.
- 60.- Yolken R. H. ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Hospital Practice. 121-127, 1978.
- 61.- Yolken, R.H. Enzyme Immunoassays for the Detection of Infectious Antigens in Body Fluids: Current Limita- - tions and Future Prospects. Rev. Infect. Dis. 4: 35-68, 1982.
- 62.- Yolken, R.H. and Leister, F.J. Investigation of Enzy- me Immunoassay Time Courses: Development of Repaid - Assay Systems. J. Clin. Microb. 13: 738-741, 1981.
- 63.- Youmans G.P.; Paterson, P.Y. and Sommers, H.M. Sta-- phylococci. The Biologic and Clinical Basis of Infec- tious Diseases. 596-609, 1976.



