

E-8+1



TOXI-INFECIONES DE ORIGEN ALIMENTARIO



RAPIDA DETECCION DE MULTIPLICACIONES ESTAFILOCOCCICAS EN ALIMENTOS

R. Victor F. Lachica

Microbiólogo, Laboratorio Unificado de Alimentos, OPS/OMS/INCAP/Gobierno de Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala, C. A.

Los métodos de detección de enterotoxinas estafilocócicas no son prácticos para exámenes rutinarios de alimentos, por lo que se ideó un procedimiento de depuración en que la nucleasa termoestable se utiliza como indicio de multiplicaciones estafilocócicas en alimentos. El uso de un medio barato de agar, ácido deoxirribonucleico y azul de toluidina, facilita la rápida detección de la enzima en tres o cuatro horas, con mínima manipulación. Los estudios indican en gran medida que la producción de termonucleasa es una propiedad característica de casi todas las cepas de *S. aureus*. La producción de la enzima en diversos alimentos está estrechamente relacionada con la multiplicación de *S. aureus* y la producción de enterotoxinas. La tolerancia de la enzima es comparable con la de éstas. Entre las pocas muestras de alimentos comerciales analizadas hasta la fecha, las que dan resultados positivos en cuanto a la presencia de enterotoxina también contienen termonucleasa.

Introducción

La intoxicación por alimentos estafilocócicos es una enfermedad común en el mundo entero y se produce cuando un individuo propenso ingiere enterotoxinas elaboradas por *Staphylococcus aureus*. Los síntomas varían, siendo los más comunes el vómito y la diarrea que sobrevienen en el término de 2 a 6 horas después y, por regla general, la enfermedad dura de unas pocas horas a un día.

Según estudios realizados en Estados Unidos, alrededor de la mitad de la población tiene bacterias de *S. aureus* en la nariz y en la piel. Es prácticamente imposible evitar la contaminación de alimentos por este microorganismo.

El procedimiento ideal para diagnosticar la intoxicación por alimentos estafilocócicos es el análisis que permite detectar la presencia de enterotoxina en el alimento sospechoso. Se ha logrado progresar mucho en los ensayos serológicos, siendo el método preferente el de Casman y Bennett (1). Como la sensibilidad de las pruebas es relativamente baja, se requieren complicados procedimientos de concentración y purificación. Para fines de control de calidad, el costo de la detección de enterotoxinas en alimentos es prohibitivo y

el proceso requiere mucho tiempo.

Los laboratorios de control pueden determinar fácilmente la presencia de una posible colonia de *S. aureus* en productos alimenticios. Se requiere un medio de multiplicación que suprima la proliferación de otros microorganismos en alimentos. Se han determinado varios medios selectivos y de diagnóstico, pero como éstos no suprimen el crecimiento de la totalidad de los microorganismos que no son *S. aureus*, se efectúan además diversas pruebas de diagnóstico. También es preciso confirmar los resultados mediante la prueba de coagulasa a fin de obtener el diagnóstico completo de la presencia de *S. aureus*.

Las desventajas de este procedimiento son las siguientes: 1) requiere varios días para llevarlo a término; 2) la recuperación de *S. aureus* en colonias mixtas puede que no indique la verdadera población máxima, y 3) en alimentos calentados y/o fermentados, pueden persistir enterotoxinas preformadas, decreciendo a su vez el *S. aureus* viable a niveles no detectables.

Entre las distintas características fisiológicas y de cultivo de los estafilococos, ninguna ha resultado ser un indicio totalmente confiable de enterotoxigenicidad. Con base en los estudios efectuados por Evans y colaboradores (2), se acepta en general que la capacidad de producir enterotoxina se limita al *S. aureus*, aunque no todas las cepas la tienen.

Durante demasiado tiempo, la prueba de coagulasa en tubo ha sido el único criterio utilizado para identificar *S. aureus*. Esta práctica ha causado cierta confusión cuando se aislaban a veces cepas cuyos resultados eran positivos en cuanto a la presencia de enterotoxina, pero negativos en cuanto a la de coagulasa. La capacidad de mutación observada en este microorganismo impulsó el estudio de otras propiedades.

Se analizan en este trabajo los estudios sobre la utilidad de la nucleasa termoestable (o termonucleasa) como un indicador de la multiplicación de *S. aureus* en alimentos.

Termonucleasa: Propiedad Estable y Característica de *S. aureus*

Según hemos visto, la capacidad de producir termonucleasa es una propiedad estable del *S. aureus*. Entre las 251 cepas productoras de enterotoxina del Food Research Institute Culture Collection (Wisconsin), el 95% produjo termonucleasa y el 93%, coagulasa (3). En otro estudio encontramos que la totalidad de los 1,619 aislamientos clínicos de *S. aureus* formaron termonucleasa; tres fueron los resultados negativos en cuanto a la presencia de coagulasa (4). Las observaciones de Jasper (5) con aislados de *S. aureus* relacionados con mastitis bovina corroboraron nuestras conclusiones.

Al parecer, la capacidad de elaborar termonucleasa es también propiedad característica del *S. aureus*. Entre los 68 aislados lácteos de *S. epidermidis* que examinamos, el 50% produjo nucleasa termolábil; cinco de los 10 micrococcos también exhibieron nucleasa termolábil (6). Por otra parte, de los 1,781

cocos gram positivos y catalasa positivas aislados de un hospital, 60 produjeron nucleasas termolábiles (4). Más de cien de las bacterias aeróbicas mesofílicas de distinto género que depuramos para determinar cepas productoras de termonucleasa de *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquifaciens* y *Aeromonas hydrophila* elaboraron de inmediato nucleasas detectables, pero termosensibles (datos inéditos). Chesbro y Auburn (7) observaron que ninguna de las 19 bacterias examinadas por ellos producían termonucleasas.

Metodología

Chesbro y Auburn (7) fueron los primeros en sugerir la detección de la termonucleasa en alimentos como indicador de una multiplicación de *S. aureus*. Estos investigadores emplean un método espectrofotométrico corriente que implica laboriosas etapas de purificación para reducir a un nivel bajo los oligonucleótidos y nucleótidos circundantes que crecen naturalmente. Otros autores han tratado de eliminar la purificación previa requerida mediante el uso de ácido deoxirribonucleico con ^{14}C como sustrato de la enzima (8). El costo y las precauciones especiales necesarias en el manejo de materiales radioactivos anulan las ventajas del procedimiento.

Por nuestra parte, hemos establecido un método sencillo y barato que consiste en colocar pequeñas partículas de alimento sólido precalentado bajo vapor sobre una capa fina de un medio de detección de nucleasa. Alternativamente pueden recortarse pocillos de 2 mm sobre el medio, los que se llenan de muestras de alimentos líquidos precalentados en agua hirviendo. Las zonas rosa que se forman alrededor de las partículas de comida o de los pocillos después de un período de incubación de 3 a 4 horas a 37°C indican actividad de nucleasa.

Observamos que el método es lo suficientemente sensible para detectar la presencia de nanogramos de termonucleasa en distintos alimentos sin extracción, purificación o concentración previas (9). En ninguno de los alimentos apareció el halo de color rosa vivo sin el agregado de termonucleasa estafilocócica, es decir, no hubo reacciones positivas falsas. La carne salada de vaca y de cerdo que sustentaron una buena multiplicación de la cepa S-6, en todos los casos dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de termonucleasa y, en casi todos, en cuanto a la de la enterotoxina B. Dos productos alimenticios (pollo y pavo), contaminados naturalmente con enterotoxina, revelaron presencia de termonucleasa. El medio de detección de nucleasa (o TDA) consiste fundamentalmente en una mezcla de azul de toluidina (AT), ácido deoxirribonucleico y agar en tampón Tris a pH 9. Es estable al esfuerzo físico y resistente a la descomposición microbiana (10).

Metacromasia

A diferencia de los colorantes monocromáticos, los metacromáticos, tales como el azul de toluidina no obedecen a la ley de Beer dado que su espectro de absorción varía al cambiar la concentración del colorante o en

presencia de polímeros aniónicos en solución acuosa. La solución acuosa diluida de azul de toluidina tiene la máxima de absorción de 612 nm. Michaelis (11) explica que la presencia de un polianión como el agar hace que se polimerice el colorante, desplazando la máxima de absorción a 540 nm, punto en que la mezcla es de color rosa vivo. Por otra parte, cuando a la solución colorante se agrega ácido deoxirribonucleico (ADN) se produce un pequeño desplazamiento a una longitud de onda más alta que, a simple vista, parece azul. Observamos que ello ocurre tanto en presencia del ácido (ADN) como del agar. El comportamiento de la toluidina azul en presencia del ácido (ADN) puede ser análogo al del complejo de acridina anaranjada y ácido deoxirribonucleico, notificado por Lerman (12), en que el colorante se intercala entre capas sucesivas de los pares básicos. Los complejos de toluidina azul con agar son aparentemente más débiles que con ácido nucleico y éste desplace la máxima de absorción a una longitud de onda más elevada. Sólo cuando desaparece el ácido ADN, tal como en el caso de la hidrólisis, es que el colorante actúa sobre el agar cambiando la coloración a rosado (10).

Ensayo Cuantitativo

El medio de detección de nucleasa también sirve para el ensayo cuantitativo de termonucleasa (13). La relación de la concentración diagramada de nucleasa con la pigmentación rosa alrededor de los pocillos es lineal. Puede trazarse una curva estándar utilizando diluciones dobles de nucleasa estafilocócica comercial, en serie.

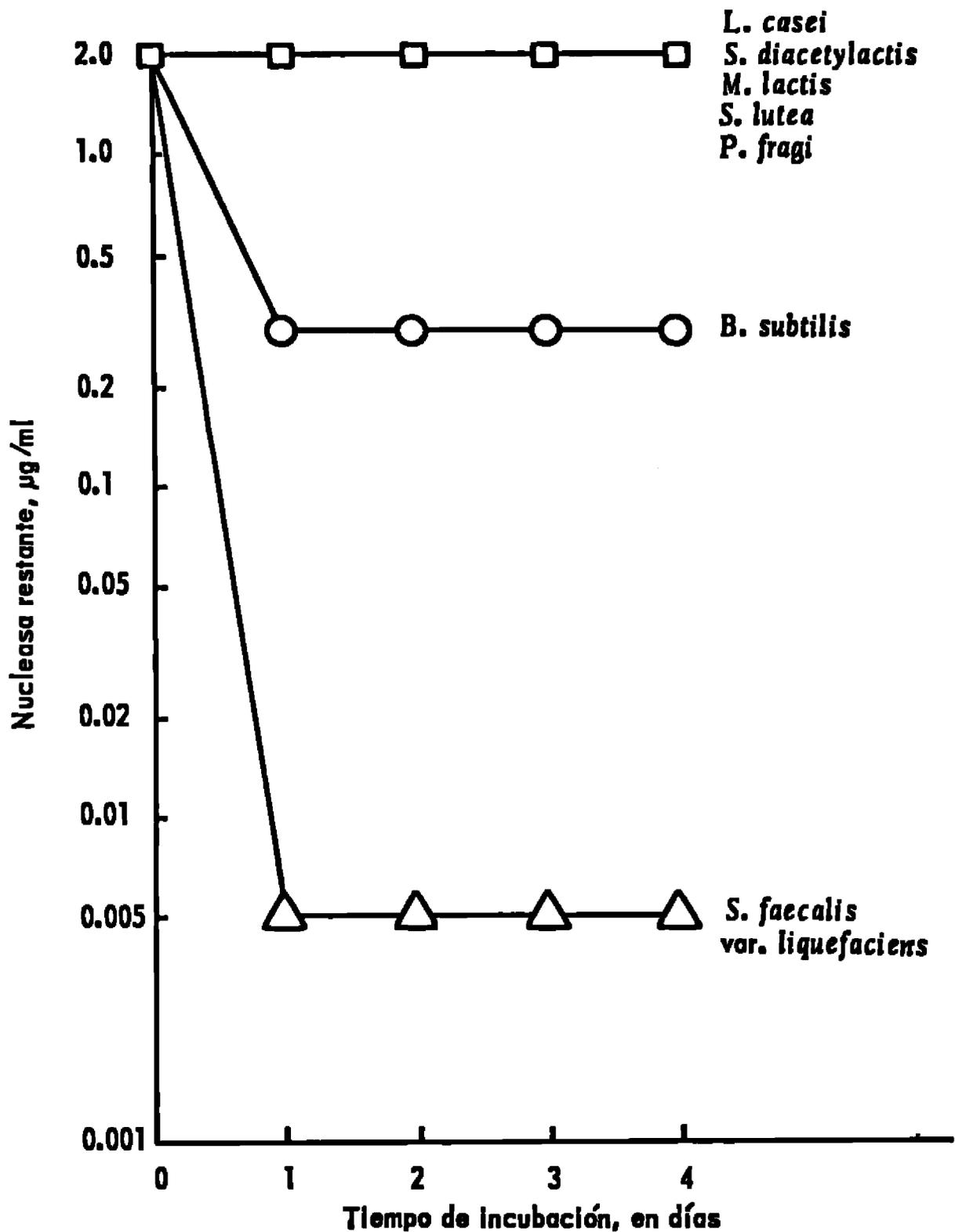
Cords y Tatini (14) modificaron el procedimiento agregándole una fase de extracción que comprende lo siguiente: se añade 40 ml de agua a 20 g de muestra de alimento y se mezcla durante 3 minutos. Luego la suspensión se centrifuga al frío durante 30 minutos. El sobrenadante se trata con 0.05 volúmenes de ácido tricloroacético 3 M frío y se recentrifuga durante otros 30 minutos. El precipitado se ajusta a un pH de 8.5 con NaOH 1N y se resuspende en un volumen final de 2.0 ml en tampón Tris a pH 9.0. Esta solución se coloca en agua hirviendo durante 15 minutos antes de efectuar el ensayo de actividad de nucleasa. Queda por determinar si esta etapa de extracción es necesaria.

Tolerancia a Condiciones Adversas ("Stress") de la Termonucleasa

Con el procedimiento de ensayo de nucleasa comprobamos que la termonucleasa tiene una elevada resistencia a "stresses" tales como calentamiento y almacenamiento prolongados (15). Cords y Tatini (14) observaron que la enzima y la enterotoxina A podían detectarse en queso Cheddar, añejado durante 6 años a 4.4°C. De hecho, Tatini, *et al.* (16) determinaron que la termonucleasa es más resistente al calor que la enterotoxina A.

Es concebible que las enzimas proteolíticas bacterianas puedan inactivar termonucleasa. La Figura 1 muestra que entre las siete cepas bacterianas examinadas, la proliferación de *Bacillus subtilis* y, en especial, *Streptococcus*

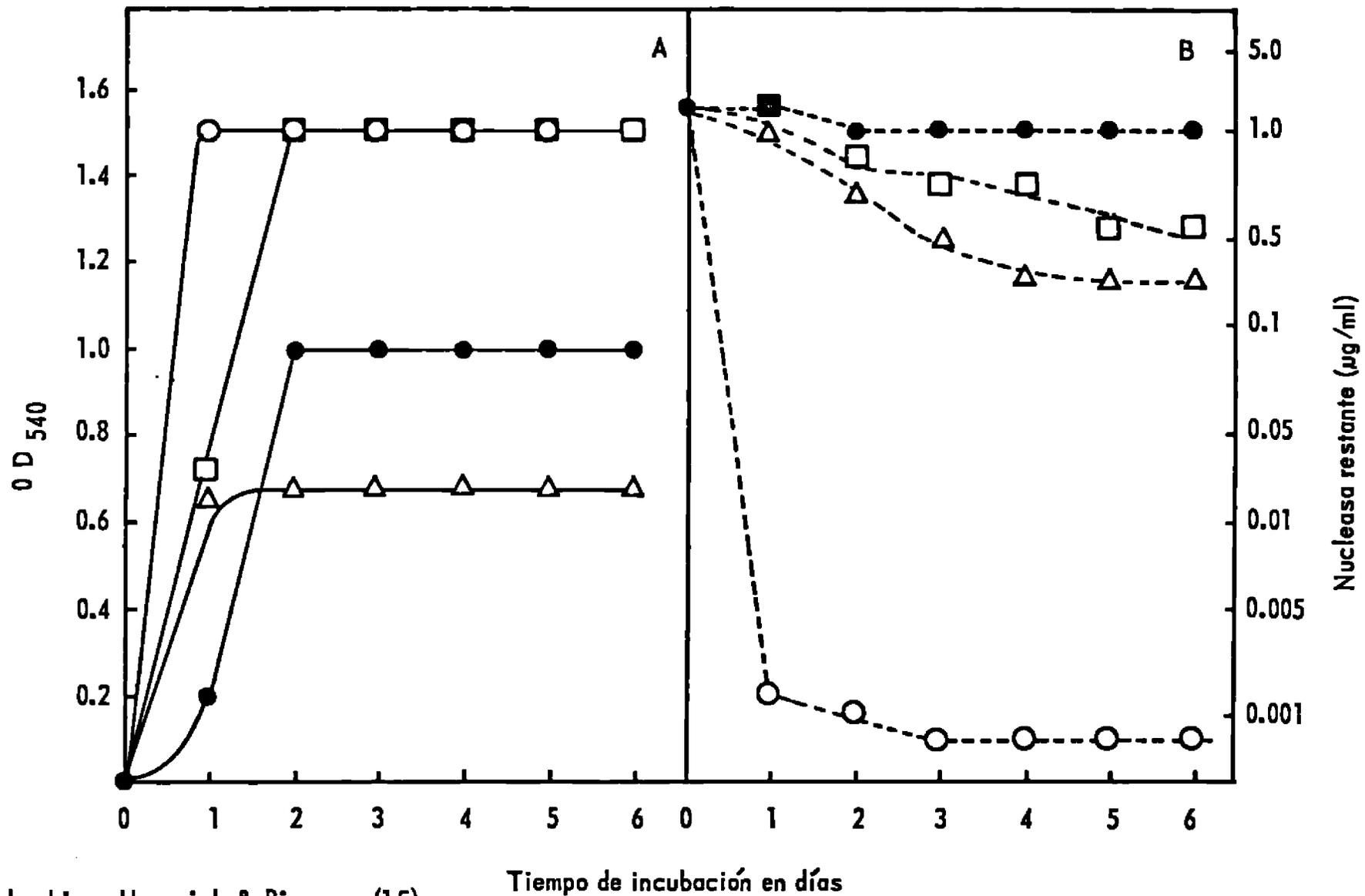
faecalis var. *liquefaciens* inactivó la enzima (15). En condiciones menos favorables de multiplicación, por ejemplo, una temperatura más baja de incubación (25°C) o elevado contenido de sal (5% NaCl), el *S. faecalis* inactivó menos la enzima (Fig. 2).



Tomado de: Lachica, Hoepflich & Riemann (15).

FIGURA 1

Inactivación de la nucleasa estafilocócica en cultivos de bacterias en crecimiento La *Pseudomonas fragi* fue incubada a 25°C a través del período de observación, mientras que todos los demás cultivos se incubaron a 37°C durante las primeras 24 horas, seguidas de incubación a 25°C de ahí en adelante



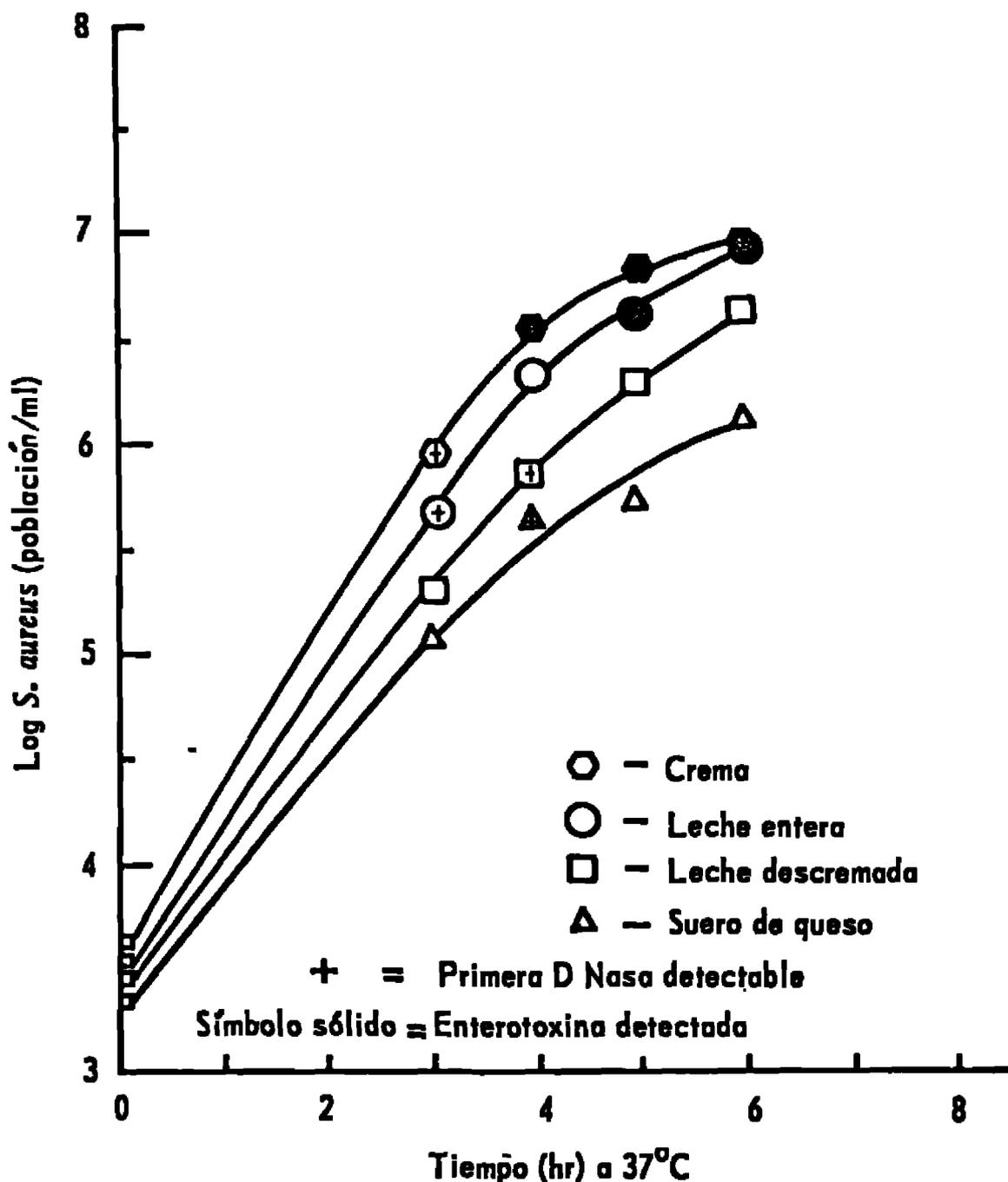
Tomado de: Lachica, Hoerich & Riemann (15).

FIGURA 2

Efectos de la temperatura de incubación y del contenido de NaCl en el caldo BHI sobre el crecimiento de *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens (línea sólida) y la inactivación de la term nucleasa estafilocócica (línea quebrada) Símbolos: (○) 37°C, 0.5% NaCl, (□) 25°C, 0.5% NaCl; (△) 37°C, 5.0% NaCl; (●) 25°C, 5.0% NaCl

Relación entre el Crecimiento y la Producción de Enterotoxina y Termonucleasa

Cords y Tatini (14) y Tatini y colaboradores (16) evaluaron hace poco la relación entre la multiplicación de *S. aureus* y la producción simultánea de termonucleasa y enterotoxina en ciertos alimentos. Como puede observarse en la Figura 3, en productos lácteos se empezó a detectar termonucleasa cuando la cepa 196 E alcanzó menos de $10^6/g$. Por otra parte, la multiplicación debía llegar a $5 \times 10^6/g$ para detectar enterotoxina. No ocurrió ninguna producción de enterotoxina en el suero de queso. El Cuadro 1 indica una modalidad análoga exhibida por otras cuatro cepas en carnes: *S. aureus* tiene mayor capacidad de elaborar termonucleasa que enterotoxina.



Tomado de: Tatini et al. (16).

FIGURA 3

Crecimiento de *S. aureus* (196E) y producción de la DNasa y enterotoxina en leche, leche descremada, crema, y suero de queso

CUADRO 1

Crecimiento de *S. aureus* y producción de enterotoxina y termonecleasa en carne de res molida y de salchicha de Bologna incubadas*

Cepa de <i>S. aureus</i>	Incubación		Sustrato	Crecimiento (CFU/g**)	Termonecleasa (µg / 20 g)	Enterotoxina en 100 g (tipo)
	Temperatura (°C)	Tiempo (días)				
237 A	10	9	Carne de res cruda	3.0×10^5	0	-
	10	5	Carne de res cocida	5.0×10^6	0.87	-
	10	7	Carne de res cocida	3.6×10^7	1.13	+ (A,D)
418	10	9	Carne de res cruda	8.0×10^4	ND***	-
	10	5	Carne de res cocida	1.6×10^6	1.27	-
	10	7	Carne de res cocida	3.6×10^7	ND***	+ (B,D)
Z 88	10	56	Salchicha de Bologna	1.9×10^8	36.0	+ (A,D)
137	10	56	Salchicha de Bologna	7.5×10^7	0.7	+ (C)
418	10	56	Salchicha de Bologna	2.0×10^8	28	+ (B,D)

* Tomado de Tatini et al. (16).

** *S. aureus* inicial para carne de res molida: 2.0×10^4 /g.

S. aureus inicial para salchicha de Bologna: 1.0×10^6 /g.

*** No determinada.

CUADRO 2

Presencia de termonucleasa, enterotoxina y *S. aureus* en productos alimenticios preparados comercialmente*

Tipo de producto	Fuente	<i>S. aureus</i> /g	Termonucleasa ($\mu\text{g}/20\text{ g}$)	Enterotoxina en 100 g (tipo)
Salchicha de Génova	A ₁ **	ND***	4.0	+ (A)
	A ₂ **	ND	4.4	-
	A ₃ **	ND	36.8	-
	A ₄ **	ND	2.0	+ (A)
Mantequilla	B ₁ **	3.5×10^4	1.0	+ (A)
	B ₂ **	< 100	1.0	+ (A)
	B ₃ **	< 100	2.0	+ (A)
	B ₄ **	< 100	5.0	+ (A)
	B ₅ **	< 100	1.5	-
Leche descremada en polvo	C **	2.5×10^5	36.0	+ (A)
	D	100	0.2	-
Leche malteada en polvo	E **	4.4×10^3	47.0	+ (F)
Queso Cheddar	F **	ND	7.0	+ (A)
	G	ND	0.6	+ (D)
	H-N	$0.16 \text{ a } 7.0 \times 10^7$	0.51-10.86	-

* Tomado de Cords y Tatini (14) y de Tatini et al. (16).

** De un lote involucrado en una intoxicación estafilocócica por alimentos.

*** ND = No determinado.

En el Cuadro 2 se resumen los estudios de Cord y Tatini (14) y de Tatini *et al.* (16) sobre alimentos naturalmente contaminados. En todos los casos se detectó la presencia de termonucleasa en muestras de alimentos que contenían enterotoxina. Se determinó que las cepas que se multiplicaban en las muestras de queso H a N eran *S. aureus* no enterotoxigenéticas. Esto explica por qué los resultados fueron positivos para termonucleasa, y negativos para enterotoxina. La mantequilla, leche descremada en polvo y leche malteada en polvo contenían un nivel de *S. aureus* que no indicaba peligro potencial, pero todos dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de termonucleasa y, salvo una muestra de mantequilla y leche desnatada en polvo, también para la enterotoxina. Es evidente que el procedimiento basado en enzimas es confiable para detectar la multiplicación de *S. aureus* y la prueba de depuración para determinar la posible presencia de enterotoxina en alimentos.

Conclusiones

Hemos examinado las observaciones que indican la ventaja de aplicar el procedimiento de detección de la termonucleasa en alimentos, como indicio de crecimiento de *S. aureus*. No obstante, cabe señalar que hasta la fecha sólo un reducido número de investigadores lo ha analizado. Sería de sumo interés que otros evaluaran este método, sobre todo para determinar la necesidad de incluir en el proceso la etapa de extracción aquí comentada.

Resumen

Se discuten los aspectos poco prácticos inherentes a los métodos de detección de enterotoxinas estafilocócicas para el examen rutinario de alimentos. Esta situación ha impulsado el desarrollo de un procedimiento de tamizaje usando la nucleasa termoestable como indicador del crecimiento estafilocócico en los alimentos. Se comenta el uso de un medio barato, el azul de toluidina-ADN-agar que facilita la detección de la enzima en un término de tres a cuatro horas y con un mínimo de manipulación. Los estudios a este respecto, señalan enfáticamente que la producción de la termonucleasa es una propiedad única compartida por casi todas las cepas de *S. aureus*.

Se ha logrado determinar que la producción de la enzima en diferentes alimentos está estrechamente asociada con el crecimiento de *S. aureus* y con la producción de la enterotoxina. La tolerancia de la enzima a condiciones adversas ("stress") es comparable a la de la enterotoxina. Entre unas pocas muestras comerciales de alimentos examinadas hasta la fecha, las que son positivas para la enterotoxina, ha podido comprobarse que éstas contienen también la termonucleasa.

Referencias

1. Casman, E. P. & R. W. Bennett. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.*, 13:181, 1965.

2. Evans, J. B., L. G. Buettner & C. F. Niven, Jr. Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. *J. Bacteriol.*, 60:481, 1950.
3. Lachica, R. V. F., K. F. Weiss & R. H. Deibel. Relationships among coagulase, enterotoxin and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, 18:126, 1969.
4. Barry, A. L., R. V. F. Lachica & F. W. Atchison. Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.*, 25:496, 1973.
5. Jasper, D. E. Thermostable nuclease production by staphylococci in milk samples from bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 34:445, 1973.
6. Lachica, R. V. F., P. D. Hoepflich & C. Genigeorgis. Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.*, 21:823, 1971.
7. Chesbro, W. R. & K. Auburn. Enzymatic detection of the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol.*, 15:150, 1967.
8. Sharpe, A. N. & M. N. Woodrow. Insoluble radioactive DNA complex for determination of *Staphylococcus aureus* deoxyribonuclease activity. *Anal. Biochem.*, 41:430, 1971.
9. Lachica, R. V. F., P. D. Hoepflich & C. Genigeorgis. Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Microbiol.*, 23:168, 1972.
10. Lachica, R. V. F., C. Genigeorgis & P. D. Hoepflich. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585, 1971.
11. Michaelis, L. & S. Granick. Metachromasy of basic dyestuffs. *J. Am. Chem. Soc.*, 67:1212, 1945.
12. Lerman, L. S. The structure of the DNA-acridine complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49:94, 1963.
13. Lachica, R. V. F., P. D. Hoepflich & C. E. Franti. Convenient assay for staphylococcal nuclease by the metachromatic well-agar-diffusion technique. *Appl. Microbiol.*, 24:920, 1972.
14. Cords, B. R. & S. R. Tatini. Applicability of heat-stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. *J. Dairy Sci.*, 56:1512, 1973.
15. Lachica, R. V. F., P. D. Hoepflich & H. P. Riemann. Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. *Appl. Microbiol.*, 23:994, 1972.

16. **Tatini, S R., H. M. Soo, B. R. Cords & R. W. Bennett. Heat-stable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxin in foods. Presented at the Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, New Orleans, La, May 12-16, 1974.**