

R. 6.527

01.05.92
OFD

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I

**DETECCION DE ENTEROTOXINAS
ESTAFILOCOICAS Y TSST—1
MEDIANTE UNA TECNICA DE
TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA**



José Antonio Orden Gutiérrez

Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 6/92

© José Antonio Orden Gutiérrez

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-6510-1992



La Tesis Doctoral de D. *José Agustín*.....
..... *Ordaz Gubéran*.....
Titulada *Protección de enfermedades infecciosas*
Y T.S.S.T. 1 mediante una técnica de
inactivación de virus.....
Director Dr. D. *Gustavo Sáenz de Santarita*.....
fue leída en la Facultad de *Veterinaria*.....
de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día *18*..
de *Febrao*..... de 19 *91*.., ante el tribunal
constituido por los siguientes Profesores:
PRESIDENTE *Manuel Ruiz Añel*.....
VOCAL *Isaca Dominguez Rodriguez*.....
VOCAL *Eliz. Ferrando Rodriguez Fari*.....
VOCAL *Javier Pardo Sando*.....
SECRETARIO *Ricardo de la Fuente Sáenz*.....

.....
habiendo recibido la calificación de
Apto "cum laude" por unanimidad.....

Madrid, a *18* de *Febrao* de 19 *91*.
EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

DETECCION DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOVICAS
Y TSST-1 MEDIANTE UNA TECNICA DE
TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA

José Antonio Orden Gutiérrez

DPTO. PATOLOGIA ANIMAL I
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Dirigida por los Drs. G. Suárez y E. Gómez-Lucía

MADRID

1991

Memoria presentada para
optar al grado de Doctor
en Veterinaria



A mis padres y hermanos.

A todos los becarios que se encuentran realizando la tesis doctoral. Para que cuando la terminen conserven su ilusión y capacidad de trabajo.

Parece que es condición necesaria de la ciencia humana el que tengamos que aprender muchas cosas inútiles con el fin de llegar a conocer aquellas que nos sirven.

S. BAILEY

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Guillermo Suárez Fernández, por haber confiado en mí para realizar este trabajo.

A la Doctora Esperanza Gómez-Lucía, por ayudarme a dar los primeros pasos en el mundo de la Microbiología, y por sus acertados consejos.

A Javier Hernández, por sus valiosas sugerencias a la hora de redactar esta tesis, y por los muchos días empleados en diseñar las tablas que ilustran este trabajo.

A José Antonio Ruiz Santa Quitéria, por su ayuda en la puesta a punto de la técnica de transferencia electroforética y en otros muchos momentos.

A Joaquín Goyache y Ana Doménech, compañeros de alegrías y penalidades del grupo de enterotoxinas.

A Alicia Gibello, Mónica Suárez, Carmen Delgado y Susana Díaz, por su amistad.

A todos los compañeros del Departamento de Patología Animal I que, de una u otra forma, me han ayudado.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV (U.D. Química) de esta Facultad, por permitirme utilizar el sistema de electroforesis "Phast System" y la cubeta de transferencia, y por que en sus laboratorios he podido trabajar como en los de mi propio Departamento. Sin su colaboración esta tesis no habría sido posible.

En general, a todos aquellos que han colaborado al desarrollo de uno de los trabajos más creativos, apasionantes y completos, pero a su vez, más estresantes, peor pagados, y menos reconocidos social y profesionalmente que una persona pueda realizar.

INDICE

Pag.

CAPITULO X. INTRODUCCION.....	1
A. ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOICAS Y TOXINA DEL SINDROME DEL CHOQUE TOXICO-1.....	1
A. 1. Tipos y antigenicidad.....	1
A. 2. Características bioquímicas.....	3
A. 3. Estabilidad.....	4
A. 4. Genética.....	6
A. 5. Epidemiología.....	7
A. 5. 1. Alimentos implicados en los brotes.....	7
A. 5. 2. Fuente de contaminación de los alimentos.....	8
A. 6. Intoxicación estafilocócica: patogenia y cuadro clínico.....	9
A. 6. 1. Efectos producidos por la intoxicación estafilocócica.....	9
A. 7. Experimentación animal.....	11
A. 8. Síndrome del choque tóxico.....	11
A. 8. 1. Toxina del síndrome del choque tóxico-1.....	12
A. 9. Enterotoxigenicidad de los estafilococos aislados de mastitis.....	15
A. 10. Características relacionadas con la enterotoxigenicidad.....	18
A. 10. 1. Fermentaciones.....	18
A. 10. 2. Coagulasa.....	21
A. 11. Enterotoxigenicidad de las especies coagulasa negativas del género <i>Staphylococcus</i>	22
A. 11. 1. Producción de TSST-1 por estafilococos coagulasa negativos.....	24
A. 12. Detección.....	26
A. 12. 1. Métodos biológicos.....	26
A. 12. 1. a. Pruebas del gato.....	26
A. 12. 1. b. Pruebas biológicas en monos.....	27
A. 12. 2. Métodos inmunológicos.....	27
A. 12. 2. a. Técnicas de inmunodifusión en gel.....	28
A. 12. 2. b. Hemaglutinación y técnicas afines.....	32
A. 12. 2. c. Inmunofluorescencia.....	34
A. 12. 2. d. Radioinmunoensayo (RIA).....	34
A. 12. 2. e. Enzaimmunoensayo (ELISA).....	36
A. 12. 2. f. Proteína A.....	40
B. TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DE PROTEINAS.....	41
B. 1. Definición de términos e historia.....	41
B. 2. Etapas.....	43
B. 2. 1. Electroforesis.....	43
B. 2. 2. Difusión.....	45
B. 2. 2. a. Difusión.....	46
B. 2. 2. b. Convección.....	46
B. 2. 2. c. Electroelución.....	47
B. 2. 3. Adsorción de proteínas a matrices inmobilizantes.....	49
B. 2. 3. a. Nitrocelulosa.....	49
B. 2. 3. b. Diazomembranas.....	50
B. 2. 3. c. Nylon.....	51
B. 2. 3. d. Difluoruro de polivinilideno (PVDF).....	52
B. 2. 4. Bloqueo de matrices inmobilizantes.....	52
B. 2. 5. Inmudetección en matrices inmobilizantes.....	55

B.3.Ventajas e inconvenientes.....	57
B.3.1.Ventajas.....	57
B.3.2.Inconvenientes.....	58
B.4.Aplicaciones.....	59
 CAPITULO II.OBJETIVOS.....	 63
 CAPITULO III.MATERIAL Y METODOS.....	 66
 A.CEPAS DE ESTAFILOCOCOS.....	 66
A.1.Cepas controles.....	66
A.2.Cepas de estafilococos aisladas de nistitín.....	66
A.2.1.Material biológico.....	66
A.2.2.Siembr de las muestras y aislamiento.....	66
A.2.2.a.Metodología del aislamiento.....	68
A.2.3.Conservación en congelación.....	68
A.2.4.Identificación.....	69
A.2.4.a.Coagulasa.....	69
A.2.4.b.Identificación de las especies coagulasa positivas.....	70
A.2.4.c.Identificación de las especies coagulasa negativas.....	72
A.3.Inducción a la producción de EE y TSST-1.....	73
A.3.1.Material.....	73
A.3.2.Método.....	74
 B.MUESTRAS DE ALIMENTOS.....	 75
B.1.Alimentos utilizados.....	75
B.2.Inoculación de los alimentos con EE.....	75
B.3.Extracción de EE a partir de los alimentos.....	76
B.3.1.Material.....	76
B.3.2.Método.....	76
 C.DETECCION DE EE Y TSST-1.....	 78
C.1.Técnica ELISA.....	78
C.1.1.Material.....	78
C.1.2.Reactivos y tampones.....	78
C.1.3.Marcaje de las inmunoglobulinas con peroxidasa.....	80
C.1.3.a.Material.....	80
C.1.3.b.Método.....	81
C.1.4.Método.....	83
C.2.Transferencia electroforética.....	88
C.2.1.Material.....	88
C.2.2.Reactivos y tampones.....	89
C.2.2.a.Soluciones utilizadas en la tinción de azul de Coomassie.....	91
C.2.3.Preparación de la muestra para electroforesis SDS-poliacrilamida.....	92
C.2.4.Métodos.....	92
C.2.4.a.Electroforesis SDS-poliacrilamida.....	93
C.2.4.b.Tinción azul de Coomassie.....	94
C.2.4.c.Electroelución.....	101
C.2.4.d.Inmunodetección.....	104

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	107
A. UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA PARA LA DETECCIÓN DE BE Y T8ST-1.....	107
A.1. Comprobación del peso molecular y grado de pureza de las BE y T8ST-1 patrones mediante una electroforesis SDS-poliacrilamida.....	107
A.1.1. Resultados.....	107
A.1.2. Discusión.....	107
A.2. Optimización de la técnica.....	110
A.2.1. Resultados.....	110
A.2.2. Discusión.....	116
A.2.2.a. Ventajas.....	118
A.3. Estudios de la detección de BE y T8ST-1 crudas y de las posibles reacciones cruzadas de las BE entre sí y con la T8ST-1.....	123
A.3.1. Resultados.....	123
A.3.2. Discusión.....	123
A.4. Estudios de los posibles falsos positivos debidos a la proteína A.....	124
A.4.1. Resultados.....	124
A.4.2. Discusión.....	124
A.5. Detección de BE y T8ST-1 en extractos de cepas patrones y en alimentos artificialmente contaminados.....	126
A.5.1. Resultados.....	126
A.5.2. Discusión.....	128
B. IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE BE Y T8ST-1 POR ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE MASTITIS.....	131
B.1. Identificación.....	131
B.1.1. Identificación de las especies de estafilococos coagulasa positivas.....	131
B.1.1.a. Resultados.....	131
B.1.1.b. Discusión.....	131
B.1.2. Identificación de las especies de estafilococos coagulasa negativos.....	139
B.1.2.a. Resultados.....	139
B.1.2.b. Discusión.....	139
B.1.3. Distribución de los estafilococos por especies animales.....	143
B.1.3.a. Resultados.....	143
B.1.3.b. Discusión.....	143
B.2. Producción de BE y T8ST-1.....	144
B.2.1. Resultados.....	144
B.2.2. Discusión.....	149
B.2.2.a. Comparación de los resultados obtenidos por ELISA y transferencia electroforética.....	149
B.2.2.b. Enterotoxigenicidad de los estafilococos aislados de mastitis.....	151
B.2.2.c. Producción de BE y T8ST-1 por BCP.....	154
B.2.2.d. Producción de BE y T8ST-1 por ECM.....	154
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RESUMEN.....	159
A. CONCLUSIONES.....	159
B. RESUMEN.....	160
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA.....	167

ABREVIATURAS

- * AOAC: "Association of Official Analytical Chemist"
- * BHI: infusión de cerebro y corazón
- * BSA: seroalbumina bovina
- * DAB: diaminobencidina
- * DEM: diazobenciloximetil
- * DPT: diazofeniltioeter
- * ECN: estafilococos coagulasa negativos
- * ECP: estafilococos coagulasa positivos
- * EE: enterotoxina(s) estafilocócica(s)
- * ELISA: enzimoimmunoensayo
- * FDNB: fluorodinitrobenzeno
- * NC: nitrocelulosa
- * OPD: ortofenildiamina
- * PBS: tampón fosfato salino
- * pI: punto isoeléctrico
- * Pm: peso molecular
- * PVDF: difluoruro de polivinilideno
- * RIA: radioimmunoensayo
- * RPHA: hemoaglutinación pasiva reversible
- * RPLA: aglutinación pasiva reversible con látex
- * SDS: dodecil sulfato sódico
- * SNC: suero normal de conejo
- * TSS: síndrome del choque tóxico
- * TSST-1: toxina del síndrome del choque tóxico-1
- * ZB: Zetabind

Capítulo I: INTRODUCCION

A. ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCICAS Y TOXINA DEL SINDROME DEL CROQUE TOXICO-1

Las enterotoxinas estafilocócicas (EE) son exoproteínas simples producidas por algunas cepas de estafilococos bajo ciertas condiciones, tanto en medios sintéticos como en alimentos. La ingestión de estos últimos produce un cuadro gastrointestinal conocido como "intoxicación estafilocócica".

Las enterotoxinas poseen propiedades higroscópicas, siendo muy solubles en agua y en soluciones salinas. En su composición participan exclusivamente aminoácidos, formando una cadena polipeptídica de peso molecular comprendido entre 26.000 y 30.000 daltons.

La producción de enterotoxinas no está limitada a los estafilococos de un origen particular; así, ya sean las cepas de origen humano, animal o ambiental, todas resultan potencialmente enterotoxigénicas.

A.1. TIPOS Y ANTIGENICIDAD

Las distintas EE que se conocen han sido identificadas por reacciones con anticuerpos específicos. Sin embargo, debido a su producción en cantidades mínimas y a su difícil purificación, todavía existen EE sin identificar que pudieran representar un 5% de los brotes de intoxicación estafilocócica (Bergdoll *et al.*, 1976).

Las EE conocidas son siete:

- A.....(Casman, 1960).
- B.....(Bergdoll et al., 1959).
- C₁.....(Bergdoll et al., 1965).
- C₂.....(Bergdoll et al., 1965).
- C₃.....(Bergdoll et al., 1979).
- D.....(Casman et al., 1967).
- E.....(Bergdoll et al., 1971).

Así mismo, existe otra toxina, denominada TSST-1 ("Toxic Shock Syndrome Toxin Type-1"; Bergdoll et al., 1981), estudiada conjuntamente con las enterotoxinas por razones estructurales y antigénicas. Sin embargo, no es considerada una enterotoxina dado que, funcionalmente, no determina sintomatología gastrointestinal.

En el caso de los distintos tipos de enterotoxina C, se ha comprobado que todos reaccionan con el mismo anticuerpo principal, además de reaccionar con anticuerpos secundarios propios, lo que demuestra la existencia de estructuras antigénicas diferentes (Lee et al., 1980; Reiser et al., 1984).

Algunos autores han detectado ligeras reacciones cruzadas entre EE-A y EE-B (Robbins y Bergdoll, 1984), EE-C y EE-B (Johnson et al., 1972), EE-A y EE-E (Bergdoll et al., 1971). Así mismo, se han propuesto puntos antigénicos comunes a todas las enterotoxinas. De todas ellas, la menos antigénica es la EE-A (Jozefczyk et al., 1980; Robbins y Bergdoll, 1984).

A. 3. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Peso molecular: en principio, el peso molecular de las enterotoxinas se estimó en unos 35.000 daltons, demostrándose con posterioridad que es ligeramente inferior. Actualmente se conocen las secuencias aminoácidas de las enterotoxinas B, C₁ y C₃. Así, el peso molecular de la EE-B es de 28.366 (Huang y Bergdoll, 1970), mientras que el de la EE-C₁ es 27.293 (Schmidt y Spero, 1983) y el de la EE-C₃ es de 27.111 (Reiser et al., 1984). Sin embargo, aún no existe un consenso sobre el peso molecular de las EE (Freer, 1988; Iandolo y Tweten, 1989).

Punto isoelectrico: existen diferencias en cuanto a los valores de los puntos isoelectricos de las distintas enterotoxinas. Dichos valores son los siguientes:

- EE-A.....7,3 (Schantz et al., 1972).
- EE-B.....8,6 (Bergdoll et al., 1965).
- EE-C₁.....8,6 (Borja y Bergdoll, 1967).
- EE-C₂.....7,0 (Avena y Bergdoll, 1967).
- EE-C₃.....7,9 (Reiser y Bergdoll, 1979).
- EE-D.....7,4 (Chang y Bergdoll, 1979).
- EE-E.....7,0 (Borja et al., 1972).

Composición química: las EE son exoproteínas simples. Su contenido en lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina es elevado en todas ellas, mientras que, por el contrario, presentan dos moléculas de cisteína y una o dos de triptófano (Huang et al., 1967; Huang y Bergdoll, 1970; Schantz et al., 1972; Borja et al., 1972; Bergdoll, 1989). Por su similitud en la composición de aminoácidos, las EE se dividen en dos grupos: uno que comprende la EE-A y la EE-E (con una o dos moléculas de metionina) y otro con la EE-B y

las EE-C (con ocho moléculas de metionina). Ambos grupos presentan además diferencias cuantitativas en otros aminoácidos (lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina y triptófano). La EE-D no puede incluirse en ninguno de los grupos anteriores, formando otro aparte.

Conformación de la molécula: Bergdoll et al. (1974) suponen que las EE son moléculas elipsoidales, siendo esencial esta estructura para la actividad biológica. Al carecer de grupos sulfhidrilos libres, los dos residuos de cisteína forman un puente disulfuro. De esta manera se origina un lazo denominado "lazo de la cistina", que las confiere una estructura muy estable, formando un enrollamiento (Warren et al., 1974). Se ha propuesto como centro tóxico porciones de este lazo de cistina que son idénticas en las diferentes EE (Huang et al., 1975).

A.3. ESTABILIDAD

Las EE son unas de las proteínas más estables. Esta estabilidad se recoge en varios puntos:

- Termorresistencia: las EE son más termorresistentes que los propios estafilococos y que las toxinas de numerosos microorganismos. Tras someter EE no purificada a ebullición durante 30 minutos permanecen todavía restos de toxicidad (Bergdoll, 1983). Esta termorresistencia depende de la temperatura, el tiempo de exposición, el tipo y concentración de la EE y el sustrato sobre el que se produce el tratamiento térmico. En este sentido, Denny et al. (1971) han señalado que la EE-A sufre una desactivación superior en tampón fosfato que en caldo de carne. Además la enterotoxina purificada ofrece una resistencia al calor

superior que la no purificada. La EE-B es más resistente que la EE-A, presentando la EE-C una sensibilidad media. Así, se ha observado que la EE-B pierde un 60-70% de su actividad durante los primeros minutos de calentamiento a 60-70 °C (Reichert y Fung, 1976). Sin embargo, tras el calentamiento, dicha EE puede recuperar parte de la actividad perdida (Chordash y Potter, 1976; Reichert y Fung, 1976). Así mismo, se ha estimado que la actividad biológica de las EE puede perderse antes que su actividad inmunológica, por lo que los ensayos inmunológicos sobrevalorarían el grado de inactivación real de las mismas (Bergdoll, 1989).

- Resistencia a las proteasas: las EE presentan cierta resistencia a enzimas tales como la tripsina, quimotripsina, renina o papaina, lo que les permite atravesar el tracto digestivo sin ver afectada su actividad biológica.

- Resistencia al almacenamiento: se ha observado en distintas experiencias que las EE mantienen su actividad después de un almacenamiento prolongado en diversas condiciones (amplio rango de temperatura, baja actividad de agua, etc.). Así, Genigeorgis (1974) comprobó que la actividad inmunológica de la EE-B se mantenía durante seis meses entre 2-5 °C y pH 7,0.

- Efecto del pH: las EE permanecen activas a pH 3 y 10 entre 22 y 34 °C durante al menos 4 horas. En condiciones más extremas de pH (1,85 y 12) no se observa reacción positiva con el antisuero correspondiente (Genigeorgis, 1974). La EE-B permanece estable durante una semana a temperatura ambiente y a pH entre 4,0 y 7,3 (Angelotti, 1969).

A.4.GENETICA

Las EE son bastante similares entre sí pero la localización de sus genes productores parece ser muy diversa. Así:

- El gen que codifica la síntesis de la EE-A (gen ent A) está contenido en un bacteriófago lisogénico que posee, al menos, dos sitios de integración en el cromosoma del estafilococo. (Betley y Mekalanos, 1988).

- El gen ent B (codifica para EE-B) se asocia con un elemento, dentro del cromosoma, que puede ser un bacteriófago defectivo o un plásmido integrado. (Johns y Khan, 1988).

- El gen ent C₁ (codifica para EE-C₁) se ha asociado a un plásmido (tipo penicilasa) que contiene también el gen ent B, en al menos una cepa de S. aureus. No se sabe si este gen podría ser cromosomal (Altboun et al., 1985).

- El gen ent D (codifica para EE-D) se localiza en un gran plásmido (tipo penicilasa) denominado pIB 485 (Bayles e Iandolo, 1989).

- El gen ent E (codifica para EE-E) se ha propuesto que se encuentra asociado a un bacteriófago defectivo (Couch et al., 1988).

- El gen ent TSST (codifica para TSST-1) es de localización cromosómica. No se sabe si está contenido en un elemento análogo a un transposón (Iandolo, 1989).

Se ha sugerido que las toxinas de los estafilococos están relacionadas por una serie de sucesos recombinantes promovidos por infecciones con bacteriófagos errantes (Betley y Mekalanos, 1985). Como resultado de una escisión imprecisa entre el gen cromosomal de una EE (localizado cerca del punto de inserción del fago) y el propio profago no toxicogénico, insertado muy próximo a este gen ent, se origina un

bacteriófago que contiene el gen ant. Las recombinaciones posteriores entre distintos tipos de fagos pueden originar nuevos fagos que contengan el gen ant (Betley y Mekalanos, 1985).

La diversidad de cepas estafilocócicas, la producción de exoproteínas (como las enterotoxinas) y la diversa localización de los genes, implican una fluidez genética dentro del género Staphylococcus que todavía no se comprende. Así, hay genes cromosomales, plasmídicos y localizados en bacteriófagos implicados en la producción de EE (Betley y Mekalanos, 1985).

Se supone que las proteínas extracelulares están codificadas por genes accesorios que se regulan independientemente del resto del cromosoma. Lo que es más, loci tan dispares sugieren que podrían ser elementos móviles que deben su movimiento a bacteriófagos (como es el caso del ant A) o a elementos tipo transposón (ant TSST). En definitiva, la expresión genética de las EE y su regulación está muy poco conocida, algo que sucede, en general, con toda la genética de los microorganismos Gram positivos.

A.3.EPIDEMIOLOGIA

A.3.1.Alimentos implicados en los brotes

Numerosos alimentos constituyen un buen sustrato para el crecimiento de los estafilococos. La leche está escasamente implicada en intoxicaciones en los países desarrollados; sin embargo, hay que tener en cuenta que las EE no se inactivan durante el proceso de pasteurización. Otros alimentos pueden ser vehículo para las EE, como es el

caso del queso, yogur, salsas, hamburguesas, etc (Suárez y Gómez-Lucía, 1983; Bergdoll, 1989).

A.5.2. Fuente de la contaminación de los alimentos

Los estafilococos son ubicuos, aunque sus mayores reservorios son el hombre y los animales, presentándose principalmente en la mucosa nasofaríngea y en la piel de los mismos. En algunas ocasiones, las intoxicaciones se presentan por alimentos que han sido contaminados a partir de portadores sanos. Sin embargo, más frecuentemente, los brotes resultan de la contaminación por manipuladores de alimentos, con algún tipo de infección estafilocócica, como la que se puede producir por un corte en las manos.

Los animales pueden también desarrollar infecciones estafilocócicas. La mastitis es un ejemplo de una enfermedad estafilocócica, que se presenta en animales, particularmente en vacas (Olson *et al.*, 1970) y ovejas (Gutiérrez *et al.*, 1982). Además de infecciones, la mayoría de las especies animales poseen estafilocócos en sus fosas nasales. La incidencia de portadores de Staphylococcus aureus entre los animales es variable.

La información disponible acerca de la enterotoxigenicidad de las cepas de estafilococos de origen animal está limitada a unas pocas especies animales, y están referidas principalmente a cepas aisladas de mastitis. Los portadores de origen animal son de menor importancia, en las intoxicaciones por EE, que los portadores humanos, ya que, la mayoría de los brotes resultan de la contaminación de los alimentos por manipuladores de los mismos. Esto es debido a que la mayoría de los brotes resultan de un crecimiento de estafilococos en alimentos después de que los mismos hayan

sido tratados. La principal posibilidad para la producción de EE en alimentos por estafilococos de origen animal es a través de la leche de animales mastíticos (Bergdoll, 1989).

A.6. INTOXICACION ESTAFILOCOCCICA: PATOGENIA Y CUADRO CLINICO

Las EE al ser ingeridas producen vómitos y diarrea como síntomas principales, entre una y seis horas después de ingerir el alimento. La muerte en este tipo de intoxicación no es frecuente, pero se produce en algunas ocasiones, principalmente en niños y ancianos, cuando se ingieren grandes cantidades de EE. Weed *et al.* (1943) notificaron la muerte de dos niños que murieron al día siguiente de haber bebido leche de una cabra con mastitis estafilocócica.

No existe un acuerdo en la dosis tóxica mínima. Tanto los datos obtenidos a partir de brotes como por la experimentación con voluntarios, inducen a pensar en la gran variabilidad en la sensibilidad entre los individuos. En individuos susceptibles menos de 1 µg de EE-A puede causar la intoxicación (Bergdoll, 1989).

A.6.1. Efectos producidos por la intoxicación estafilocócica

Vómito: es el síntoma más frecuente en este tipo de intoxicación. Esta reacción se usa en los monos para determinar si una cepa estafilocócica es enterotoxigénica. Los estímulos sensoriales para el vómito alcanzan el centro del vómito del cerebro a través de los nervios vago y simpático (Sugiyama y Hayama, 1965). Cuando la vagotomía es acompañada con una simpatectomía abdominal en el mono se produce una completa resistencia a la acción emética de las EE (Sugiyama *et al.*, 1960). Los intentos para determinar el

lugar de acción de la EE en el tracto intestinal han sido infructuosos.

Diarrea: el hecho de que las EE no reaccionen en la prueba del asa intestinal sugiere que los mecanismos implicados nada tienen que ver con el incremento de AMP-c o de GMP-c como ocurre con las toxinas de Escherichia coli. Se desconoce si la administración intravenosa de EE-B induce diarrea por mecanismos neurogénicos y/o por un efecto directo sobre las células de la mucosa intestinal.

Enteritis: este proceso se observa en los casos de intoxicación grave y se manifiesta como una hiperemia mucosa zonal, edema, irritación muscular, erosiones, petequias, y exudado purulento (Bergdoll, 1972). En ocasiones se manifiesta con aparición de pseudomembranas en las heces (Miert et al., 1983), las cuales pueden ser sanguinolentas.

Otros efectos:

- Dérmicos: erupción vesiculosa y descamación.
- Sistema nervioso central: desorientación y alteración de la conciencia.
- Renales: Miert et al. (1983) han sugerido una posible acción nefrotóxica de la EE-B.
- Sistema circulatorio: en Macacuscus rhesus que habían recibido de 0,05 a 1,0 ng de EE-B/Kg se pudo detectar taquicardia, disminución de la presión arterial, del ritmo, gasto y potencia media cardiacas, y del volumen de latido (Liu et al., 1977). También debido a la pérdida de fluidos se produce una hemoconcentración.
- Sistema inmune: Gilbert (1966) señaló que se produce una leucopenia debida a una eliminación o destrucción de los leucocitos más que por la alteración en la génesis de los mismos.

- Fiebre: es un síntoma raro e incluso, a veces, se produce el efecto contrario (hipotermia).

A.7. EXPERIMENTACION ANIMAL

En general, los animales son mucho más refractarios que el hombre a la presentación de un cuadro clínico después de la administración oral de EE, si bien puede lograrse la mayoría de los efectos observados en el hombre por administración parenteral.

La sintomatología en los monos antropoides, en especial Macacua rhesus, reviste un carácter semejante al hombre, y por esta razón, estos animales se utilizan para realizar pruebas biológicas.

La cabra puede ser un animal útil para el estudio de los efectos de la EE-B (Miart et al., 1984).

A.8. SINDROME DEL CHOQUE TOXICO

El síndrome del choque tóxico (TSS) es una enfermedad sistémica causada por algunas biovariedades de Staphylococcus aureus, que fue formalmente definida por Todd et al. (1978). Los síntomas observados en esta enfermedad incluyen vómitos, diarrea, fiebre alta, hipotensión, eritrodermia, descamación periférica, edema de extremidades, insuficiencias renal, hepática y respiratoria.

A pesar de que la mayoría de los casos de TSS han sido descritos en mujeres menstruantes que utilizaban tampones (Davis et al., 1980; Shands et al., 1980), también se han

observado casos de TSS de origen no menstrual (Jacobson et al., 1989). Las manifestaciones sistémicas de la enfermedad han sido también asociadas con uno o más productos tóxicos de Staphylococcus aureus (Bergdoll et al., 1981)

A.8.1. Toxina del síndrome del choque tóxico uno (TSST-1)

Una proteína estafilocócica conocida como toxina del síndrome del choque tóxico (Bergdoll y Schlievert, 1984), originalmente denominada EE-F (Bergdoll et al., 1981) y exotoxina C pirogénica (Schlievert et al., 1981), ha sido identificada como la principal causa de la enfermedad, si bien es posible que otros productos de los estafilococos, principalmente las EE, puedan causar también este síndrome (Crass y Bergdoll, 1986b; Whiting et al., 1989; McCollister et al., 1990).

El peso molecular de la TSST-1 es de 24.000 daltons y su punto isoelectrico es aproximadamente de 7,0 a 7,2. Se ha determinado la composición de aminoácidos siendo similar en algunos aspectos a la de las EE.

La TSST-1 es producida por más del 95% de las cepas de Staphylococcus aureus asociadas a TSS menstrual y por un 60-75% de los casos de TSS de origen no menstrual (Davis et al., 1980; Garba et al., 1985; Friedell y Mercer, 1986). Por tanto, el papel de la TSST-1 es más claro en los casos de origen menstrual que en el resto. En el caso de otros aislados clínicos humanos de Staphylococcus aureus, sólo del 5 al 25% de las cepas producen TSST-1 (Chow y Bartlett, 1983). Las cepas de Staphylococcus aureus asociadas a TSS son más productoras de EE que las cepas no asociadas a TSS (Todd et al., 1984; Crass y Bergdoll, 1986b). Crass y Bergdoll (1986a) señalaron que el 60% de las cepas de

Staphylococcus aureus asociadas a TSS producen también EE-A, EE-B o EE-C. Todd et al. (1984) encontraron producción de EE en el 65% de las cepas aisladas de TSS frente al 30% de las cepas no aisladas de casos de TSS. Estos datos sugieren efectos sinérgicos entre TSST-1 y las EE, que jugarían algún papel en la patogenia del TSS.

La TSST-1 purificada a partir de cepas de origen humano tiene un punto isoeléctrico (pI) entre 7,0 y 7,2. Sin embargo, Ho et al. (1989b) encontraron que el sobrenadante de una cepa aislada de oveja reaccionaba con anticuerpos propios de la TSST-1, pero no tenía un pI de 7,0-7,2 sino de 8,6. Estos autores (Ho et al., 1989a) realizaron un estudio en cepas aisladas de ovejas, cabras y vacas, encontrando una proteína con un pI de 8,6, aislada de ovejas y cabras, que se unía a anticuerpos específicos de la TSST-1. Así mismo, encontraron que una de las proteínas aisladas de 10 cepas de origen bovino tenía un pI de 8,6 y el resto un pI de 7,0 a 7,2. La explicación que estos investigadores dieron fue la de un entrecruzamiento entre cepas de origen humano y bovino por una mayor relación entre estas dos especies. Estos autores reseñaron el hecho de que un alto porcentaje de cepas asociadas con cabras y ovejas producen TSST-1 y EE-C, en contraposición con el bajo porcentaje de cepas aisladas de mastitis bovina que producen TSST-1 o alguna de las EE (Bergdoll y Robbins, 1973; Bergdoll, 1985; Buysse et al., 1987).

Olsvik et al. (1987) encontraron que 22 cepas, de un total de 92 (23,9%), de Staphylococcus aureus aisladas de diferentes especies animales producían TSST-1. En cepas procedentes de mastitis ovina y bovina, 7 de las 17 (41,1%) cepas aisladas, producían esta toxina.

Adekeye *et al.* (1989) encontraron cepas de Staphylococcus aureus productoras de TSST-1 aisladas de vacas, ovejas y perros. Estos autores, basados en los resultados obtenidos, sugirieron dos hipótesis:

- 1) La posibilidad de que los estafilococos de origen animal fueran una fuente de contagio de TSS para las personas.
- 2) La probabilidad de que la TSST-1 fuese un marcador de la patogenicidad de los estafilococos. Esta observación la hicieron basándose en la superior producción de TSST-1 por estafilococos aislados de casos clínicos sobre los aislados de tejidos sanos.

Jones y Wieneke (1986) comprobaron la producción de EE-C y TSST-1 por cepas de Staphylococcus aureus aisladas de mastitis bovina. Estos autores sugirieron la posibilidad de que la TSST-1 producida por cepas de Staphylococcus aureus contribuyera al desarrollo de enfermedades en los animales.

Morgan *et al.* (1986) aislaron una cepa de origen caprino de Staphylococcus aureus productora de EE-C y TSST-1 a partir de un caso de dermatitis localizada en las ubres de cuatro cabras. Una cepa de Staphylococcus aureus productora de EE-C y TSST-1 fue también aislada de la cavidad nasal de una de esas cabras. Estos animales mostraban unos signos clínicos similares al síndrome de piel escaldada del hombre que está causado por una toxina exfoliativa producida por algunas cepas de Staphylococcus aureus. Los aislados fueron examinados para comprobar la presencia de la toxina exfoliativa, siendo el resultado negativo, sugiriendo la posibilidad de que la TSST-1 jugara un papel importante en el cuadro clínico mostrado por estos animales.

A.9. ENTEROTOXIGENICIDAD DE LOS ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE MASTITIS

La leche obtenida de animales con mastitis estafilocócica supone un peligro importante para la salud del consumidor. La leche de oveja se usa generalmente para fabricar quesos, en muchos casos sin un tratamiento térmico previo. Recientemente, se han presentado intoxicaciones estafilocócicas después de consumir quesos de leche de oveja en Francia (Buyser *et al.*, 1985) y en Gran Bretaña (Wienseke y Gilbert, 1987) encontrándose EE-A y/o EE-D en los quesos responsables de los brotes.

Así mismo, se han descrito casos de gastroenteritis producidas al consumir leche que contenía EE:

- Geringer (1983b) estudió 3 brotes de gastroenteritis debidos a EE-A presente en leche UHT y productos lácteos obtenidos a partir de dicha leche en Alemania.
- Dahl (1986) describió un brote debido al consumo de leche cruda de vaca en Dinamarca.
- Gross *et al.* (1988) aislaron cepas de Staphylococcus aureus productoras de EE-B a partir de una leche de cabra responsable de la muerte de tres niños.

Se han caracterizado estafilococos aislados de leche de oveja encontrándose porcentajes de cepas enterotoxigénicas del 61,4 al 81,8% (Hájek, 1978; Olsvik *et al.*, 1981; Gutiérrez *et al.*, 1982), la mayoría de ellos productoras de EE-C.

Bautista *et al.* (1988) encontraron que de 124 cepas de estafilococos aisladas de leche cruda de oveja, 78 (62,9%) eran productoras de EE. Este porcentaje era muy superior al

de los estafilococos aislados de leche de vaca (Casman, 1965; Casman et al., 1967; Harvey y Gilmour, 1985). Estos autores encontraron 44 cepas productoras de EE-A, 43 de EE-D, 27 de EE-C, y 8 de EE-B. Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Hájek (1978) quien encontró en estafilocócos aislados de ovejas 46 productores de EE-C, 3 de EE-D, y 2 de EE-A, y por los obtenidos por Gutiérrez et al. (1982) quienes detectaron 48 estafilococos productores de EE-C, 4 de EE-A y 1 de EE-D, de un total de 71 estafilococos aislados de leche mastítica de oveja. Bautista et al. (1988) explicaron esta diferencia, en cuanto a los tipos de EE producidas, debido al diferente origen de las cepas: Hájek (1978) las aisló de ubres o fosas nasales, mientras que Gutiérrez et al. (1982) de leche mastítica y ellos de leche cruda.

Estudios realizados en leche cruda de vaca han demostrado una baja incidencia (2,6 a 9,4%) de estafilococos productores de EE, principalmente de los tipos A, C y D (Casman, 1965; Casman et al., 1967; Harvey y Gilmour, 1985). Otros autores han realizado también estudios en leche de vaca:

- Olson et al. (1970) estudiaron 157 cultivos procedentes de 72 vacas con mastitis, encontrando que 23 de dichos cultivos producían EE, principalmente EE-C y EE-D (11 EE-C, 11 EE-D y 1 ambas EE), mientras que no se hallaron EE-A y EE-B.

- García et al. (1980) aislaron 57 estafilococos de leche mastítica, encontrando 3 cepas productoras de EE-C, y una de EE-D, todas ellas pertenecientes a la especie Staphylococcus aureus

- Kato y Kume (1980) estudiaron estafilococos aislados de leche de vaca positiva al test de California, y comprobaron que 163 de 1056 estafilococos coagulasa positivos (ECP) producían EE. Estas leches se recogieron de 708 vacas procedentes de 168 granjas de Japón. Los tipos de EE encontrados fueron: EE-C (54,3%), A (31,1%), D (27%), B (10,7%), solas o en combinación. Estos autores no encontraron la EE-E.

- Strás (1980) realizó un trabajo sobre 146 ECP aislados de leche mastítica de vaca, de las cuales el 54,7% de las cepas eran positivas en el test del gato y un 49,2% lo eran por inmunodifusión. Las EE producidas fueron la A y la C, solas o en combinación. En ningún caso se detectó EE-B.

- Bolstridge y Roth (1985) aislaron, a partir de leche mastítica de vaca, 7 cepas enterotoxigénicas, de un total de 78, de Staphylococcus aureus.

- Schocken-Iturrino et al. (1986) encontraron que de 19 cepas de Staphylococcus aureus aisladas de leche mastítica de vaca 3 producían EE-C.

Menos estudios se han realizado en leche cruda o mastítica de cabra. Así, Buyser y Dilasser (1984) aislaron 14 cepas de Staphylococcus aureus de leche cruda, de las cuales 10 eran enterotoxigénicas; más concretamente 9 produjeron EE-C en combinación con TSST-1, y una EE-D. Geringer (1983a) realizó un estudio sobre 168 cabras afectadas de mastitis procedentes de 44 granjas; de estos animales aisló 46 estafilococos, de los cuales 18 eran Staphylococcus aureus y de éstos sólo 3 eran enterotoxigénicos (cada uno de ellos productores de una EE

diferencia: A, C y D).

Harvey y Gilmour (1988) realizaron un trabajo en leche de cabra no mastítica, y estudiaron 20 cepas de Staphylococcus aureus de las cuales sólo 7 producían EE, más concretamente EE-C. Esta producción exclusiva de EE-C está de acuerdo con los resultados obtenidos por Buysse et al. (1987). Sin embargo, este autor notificó que el porcentaje de cepas enterotoxigénicas era del 75% frente al 35% encontrado por Harvey y Gilmour. La diferencia puede ser debida a que las cepas aisladas por Buysse et al. (1987) procedían de mastitis, mientras que las de Harvey y Gilmour (1988) lo eran de animales sanos. Estos resultados coinciden con la experiencia de Lombale et al. (1980) en el sentido de la correlación entre patogenicidad y producción de EE para Staphylococcus aureus aislados de leche de vaca.

A.10. CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON LA ENTEROTOXIGENICIDAD

A.10.1. Termoneutralasa

La Termoneutralasa es una enzima de tipo globular, consistente en una cadena polipeptídica simple que se utiliza para detectar la posible enterotoxigenicidad de los estafilococos.

La producción de esta enzima por un número importante de cepas enterotoxigénicas de Staphylococcus aureus ha sido señalada como un criterio importante en la identificación de las cepas productoras de EE (Lachica et al., 1969; Lachica et al. 1971a y b; Barry et al., 1973).

Así mismo, se ha propuesto la prueba de la termonucleasa en el análisis de alimentos para verificar el crecimiento de Staphylococcus aureus y posible producción de EE (Chesbro y Auburn, 1967; Lachica *et al.*, 1972; Tatini *et al.*, 1975; Batish *et al.*, 1978).

Uno de los problemas de esta técnica es la probable presencia de microorganismos productores de termonucleasa, además de Staphylococcus aureus, en los alimentos (Batish *et al.*, 1982). Por tanto, la validez de esta prueba puede ser discutida. Estos microorganismos que pueden dar lugar a falsos positivos pertenecen al grupo de los enterococos y a especies del género Bacillus.

Esta prueba presenta algunos inconvenientes que han sido señalados por varios autores que citamos a continuación.

Niskanen (1977b) realizando un estudio sobre la temperatura óptima de producción de la termonucleasa y de la producción de EE, observó que esta temperatura es más baja para la producción de termonucleasa. Este autor comprobó que alimentos contaminados con una cepa enterotoxigénica de Staphylococcus aureus podían contener cantidades detectables de EE antes de que la termonucleasa llegara a niveles detectables.

Niskanen y Koiranen (1977) encontraron que ciertas cepas enterotoxigénicas de Staphylococcus aureus son débilmente productoras de termonucleasa.

Park *et al.* (1978) observaron que la prueba de la termonucleasa no es adecuada para alimentos que contengan huevo, dado que esta enzima no es entonces detectada.

Devriese y Kerckhove (1979) pusieron de relieve que ciertas cepas de S. aureus, S. intermedius, y S. hyicus eran fuertemente positivas en la prueba de la termonucleasa. De igual manera observaron que cepas de Staphylococcus aureus aisladas de gallinas eran solo débilmente positivas mientras que cepas de Staphylococcus intermedius dieron resultados variables según el origen de las cepas.

Emswiller-Rose et al. (1980) observaron que puede no existir una correlación directa entre el número de colonias de Staphylococcus aureus y la cantidad de termonucleasa detectada.

Bouwer-Hertzberger et al. (1981) analizaron varios alimentos implicados en intoxicaciones por EE que dieron negativo en la prueba de la termonucleasa.

Otero et al. (1990) estudiaron la correlación entre las síntesis de EE y de termonucleasa comprobando que la concentración de EE se incrementa a través del ciclo de crecimiento, mientras que la concentración de termonucleasa permanece constante durante las últimas horas del mismo ciclo.

Tatini et al. (1975) explicaron las posibles causas de que la termonucleasa pudiera ser detectada en ausencia de cantidades detectables de EE debido a:

- Crecimiento de S. aureus no enterotoxigénicos.
- Crecimiento limitado de S. aureus enterotoxigénicos.
- Destrucción por calor de las EE, y no, de la termonucleasa.
- Crecimiento de otros microorganismos, distintos del S. aureus, productores de termonucleasa.

A.10.2. Coagulasa

Esta prueba está basada en la característica de las cepas de Staphylococcus aureus de producir esta enzima.

Lachica et al. (1969) realizaron un estudio en el que correlacionaron coagulasa, termonucleasa, y producción de EE. Estos investigadores comprobaron que, de las cepas coagulasa positivas, un 95% producían termonucleasa y que de las cepas productoras de EE un 93% producían coagulasa y un 95% termonucleasa.

Victor et al. (1969) realizaron un estudio similar y encontraron resultados análogos a los de Lachica et al. (1969). Sin embargo, apuntaron el hecho de que, en algunas ocasiones, Staphylococcus aureus puede perder la característica de producción de la coagulasa, y mantener la toxigenicidad y patogenicidad. Estos mismos autores encontraron que 10 de 41 cepas de Staphylococcus aureus coagulasa positivas producían termonucleasa y que de esas 10 cepas 9 sintetizaban EE. Este hecho lo explicaron señalando que esas cepas probablemente representaban mutantes que habían perdido la capacidad de producir coagulasa.

Esta técnica presenta los siguientes inconvenientes:

- No todas las cepas de Staphylococcus aureus son enterotoxigénicas.
- Existen otras especies del género Staphylococcus que son coagulasa positivas (S. intermedius y S. hyicus).
- Ciertas cepas de estafilococos coagulasa negativos pueden ser enterotoxigénicas.

A.11. ENTEROTOXIGENICIDAD DE LAS ESPECIES COAGULASA NEGATIVAS DEL GENERO STAPHYLOCOCCUS

Está generalmente aceptado que la producción de EE es propia de los estafilococos coagulasa positivos (ECP). Esta relación está tan asumida que generalmente se desestima el hecho de que la correlación entre la producción de coagulasa y la producción de EE no es total, puesto que existen ECP no productores de EE, y lo que es más importante, se ignora la posible producción de EE por parte de los estafilococos coagulasa negativos (ECN). Esto es un hecho a tener en cuenta dado que se han aislado ECN enterotoxigénicos.

Así, numerosos autores han estudiado la posible capacidad enterotoxigénica de las especies de ECN:

- Omori y Kato (1959) señalaron la aparición de un brote de intoxicación alimentaria causado por ECN entre los estudiantes de un instituto japonés.

- Bergdoll et al. (1967) publicaron la detección de EE producidas por cepas coagulasa negativas implicadas en un caso de enteritis humana.

- Victor et al. (1969) señalaron que diez ECN y termonucleasa positivos produjeron EE. Los mismos autores comentaron que estas cepas probablemente representaban mutantes de Staphylococcus aureus con una baja capacidad de producir coagulasa.

- Breckinridge y Bergdoll (1971) indicaron casos de intoxicaciones alimentarias con síntomas de gastroenteritis, que habían sido producidos por ECN enterotoxigénicos.

- Lotter y Genigeorgis (1975) estudiaron la composición de bases de ADN, así como determinadas propiedades bioquímicas de algunos ECN. Para estos investigadores, la producción de termonucleasa es propia de la especie Staphylococcus aureus, y todas las especies estudiadas, aunque eran coagulasa negativas, poseían esta propiedad. Por tanto, apoyaron la idea de que las cepas enterotoxigénicas estudiadas eran variantes mutadas de Staphylococcus aureus.

- Danielsson y Hellberg (1977) encontraron que el 7% de las cepas de ECN producían EE.

- Devriese et al. (1978) describieron la especie de origen animal Staphylococcus hyicus. Esta especie se caracteriza porque la mayoría de las cepas son coagulasa negativas, siendo todas ellas termonucleasa positiva

- Olsvik et al. (1982) detectaron la producción de EE-A, B, y C por parte de cepas coagulasa negativas pertenecientes a la familia Micrococcaceae. De 117 cepas estudiadas, 12 produjeron EE; identificaron estas cepas como pertenecientes a las especies S. epidermidis, S. haemolyticus, S. capitis y Micrococcus luteus. La metodología empleada por estos autores para la detección de EE fue la técnica ELISA "sandwich" siendo los extractos examinados para la posible presencia de proteína A.

- Hoover et al. (1983) y Adesiyun et al. (1984) encontraron cepas de Staphylococcus hyicus, coagulasa negativas y termonucleasa positivas, que fueron positivas en pruebas en monos.

- Bautista et al. (1988) estudiaron la producción de EE en cepas de estafilococos aisladas de leche de oveja, usando la

técnica ELISA, encontrando cepas de ECN enterotoxigénicos. Estas cepas pertenecían a las especies S. cohnii, S. epidermidis, S. haemolyticus y S. xylosus.

- En un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación (Valle et al., 1990) se estudió la capacidad enterotoxigénica de los estafilococos aislados de diferentes regiones anatómicas de cabras sanas. En este estudio se encontró que el 22% de las cepas de ECN producían algún tipo de enterotoxina, principalmente la del tipo C. Cinco especies de ECN (S. chromogenes, S. warneri, S. sciuri, S. saprophyticus y S. lentus), no descritas anteriormente como productoras de EE, fueron identificadas como enterotoxigénicas.

A.10.1. Producción de TSST-1 por estafilococos coagulasa negativos

Como consecuencia de la descripción dada por Bergdoll et al. (1981) de una nueva EE denominada EE-F y posteriormente llamada TSST-1 por haber sido asociada con el síndrome del choque tóxico, aparecieron algunos trabajos en los que se relacionaba la producción de esta toxina con cepas de ECN. Ya en el trabajo original de Bergdoll et al. (1981) se mencionaba la producción de esta toxina por dos cepas de Staphylococcus epidermidis.

Crass y Bergdoll (1986a) aislaron ECN en 7 de 19 pacientes con síndrome del choque tóxico; tres cepas producían TSST-1 y EE-A, y las otras 4 producían exclusivamente TSST-1. Citaron además, que de 27 cepas de Staphylococcus epidermidis recibidas en el laboratorio del profesor Bergdoll y procedentes del "Centers for Disease Control" de los Estados Unidos, 5 (18,5%) producían EE, más

concretamente, una cepa produjo TSST-1, y las otras 4 EE-C.

Kahler et al. (1986) mencionaron el aislamiento de dos cepas de ECN, aislados de pacientes con síndrome del choque tóxico, productoras de TSST-1. Aliu y Bergdoll (1988) aislaron, de un caso de TSS, una cepa de Staphylococcus hyicus que produjo EE-A y TSST-1.

Parsonnet et al. (1987) y Kreiswirth et al. (1987) pusieron en duda la producción de TSST-1 por las cepas de ECN mencionadas por Crass y Bergdoll (1986a) y Kahler et al. (1986). Parsonnet et al. (1987) examinaron 187 cepas de ECN aislados por ellos, mientras que Kreiswirth et al. (1987) analizaron 99 cepas con iguales características. Ambos grupos de autores sumaron a sus estudios las cepas aisladas por Crass y Bergdoll (1986a) y Kahler et al. (1986) como productoras de TSST-1. Sus conclusiones fueron que ninguna de las cepas probadas eran productoras de TSST-1. Parsonnet et al. (1987) criticaron fundamentalmente la técnica de detección del enzima coagulasa y la metodología de detección de la toxina por parte de Crass y Bergdoll (1986a), alegando que estos autores utilizaron un método de inmunodifusión con suero hiperinmune polivalente de conejo que, según Parsonnet et al. (1987), podría originar reacciones inespecíficas con las EE. Kreiswirth et al. (1987) basaron su afirmación de la no producción de TSST-1 por las cepas de Crass y Bergdoll (1986a) y las de Kahler et al. (1986) en el hecho de que no localizaron, en ninguna cepa, el gen productor de la toxina al utilizar una sonda de ADN específica.

A.12.DETECCION

Según Bergdoll et al. (1976) la sensibilidad de la técnica no debe ser inferior a la que se obtiene por el método usado por las agencias reguladoras. El método que actualmente utiliza el organismo estadounidense "Food and Drug Administration" (inmunodifusión doble en porta) detecta un mínimo de 0,1 a 0,2 µg de EE añadidos a 100 g de alimento.

Para la detección de las EE se pueden utilizar dos tipos de métodos:

- Biológicos
- Inmunológicos

A.12.1.Métodos biológicos

A.12.1.a.Prueba del gato ("Kitten test")

Dolman y Wilson (1940) sugirieron utilizar gatos para comprobar la capacidad enterotoxigénica de filtrados de cultivos de Staphylococcus aureus. La técnica se realiza administrando un filtrado que previamente debe haber sido tratado veinte o treinta minutos en agua hirviendo para destruir las hemolisinas estafilocócicas. Se deben utilizar gatos de seis semanas a tres meses de edad y de un peso de 350 a 700 g. En cada prueba se utilizan al menos dos animales, realizándose una inoculación intra-abdominal; la reacción positiva se manifiesta en forma de laxitud, debilidad, fuertes movimientos peristálticos, diarrea, vómito y, en raras ocasiones, muerte. Estos autores destacaron el problema de resistencias cuando se realizan inoculaciones repetidas.

Dack (1949) señaló algunos inconvenientes de esta técnica:

- Exige muchos controles negativos.
- Hay que proceder a una inactivación de sustancias que provocan emesis de forma inespecífica.

A.12.1.b.Pruebas biológicas en monos

Evans et al. (1950) destacaron la posibilidad de detectar la capacidad de un cultivo de producir EE mediante la administración de un sobrenadante de dicho cultivo a Macacacus rhesus. Cada animal recibía 50 ml de sobrenadante mediante un tubo intragástrico. En caso de que la prueba fuera positiva, se producían arcadas y vómitos. El número de animales usados para testar cada cultivo varía de dos a seis.

Por su parte, Surgalla et al. (1953) y Sugiyama et al. (1962) propusieron la administración de extractos de cultivos de Staphylococcus aureus a monos de la especie Macacca mulatta.

Las pruebas biológicas presentan los inconvenientes de la baja sensibilidad y de la resistencia individual a ciertos aspectos de la intoxicación. Además, debido a la creación de resistencias, se hace necesario utilizar animales no tratados anteriormente, con los gastos e inconvenientes que ello representa.

A.12.2.Métodos inmunológicos

Son métodos basados en el uso de anticuerpos específicos. Estos métodos plantean dos inconvenientes:

- Comprobar la presencia de cada una de las EE.
- Existencia de EE sin identificar.

Dentro de los métodos inmunológicos utilizados en la detección de EE destacan los siguientes:

- Técnicas de inmunodifusión en gel.
- Hemoaglutinación y técnicas afines.
- Inmunofluorescencia.
- Radioinmunoensayo.
- Enzimoimmunoensayo.

A.12.2.a. Técnicas de inmunodifusión en gel

* Inmunodifusión sencilla en tubo

Basándose en el método descrito por Oudin, Bergdoll et al. (1959) publicaron una técnica en la cual se registraba la velocidad de migración de la banda de precipitado formada por la reacción antígeno-anticuerpo.

Gandhi y Richardson (1971) describieron una microtécnica de difusión sencilla, de acuerdo con la cual, se podía detectar 1 µg de EE gracias al desarrollo de una banda de precipitado en el agar introducido en un capilar.

Esta técnica fue ligeramente modificada por Fung y Wagner (1971) utilizando pipetas capilares para su realización, aunque la sensibilidad obtenida por ellos fue de 1 a 2 µg de EE/ml.

* Inmunodifusión sencilla en placa

Esta técnica fue adaptada para la detección de EE por Meyer y Palmieri (1980). Se basa en la adición de anticuerpos específicos al agar, dispensándolos en una placa. A continuación se practican pocillos en los que se depositan los extractos. Transcurrido cierto tiempo de incubación, se pueden apreciar anillos de precipitación concéntricos alrededor del pocillo, el diámetro de los cuales depende de la concentración de las EE. Esta técnica presenta el inconveniente de la gran cantidad de anticuerpos que se requieren para su realización.

* Inmunodifusión doble en tubo

Este método fue desarrollado por primera vez por Oakley y adaptado a la detección de EE por Hall et al. (1965). En esta prueba el antígeno se difunde verticalmente hacia abajo, en dirección a un estrato de agar tamponado, a la vez que los anticuerpos disueltos en dicho agar difunden verticalmente hacia arriba formándose una línea de precipitado.

* Inmunodifusión doble en placa

Esta técnica fue desarrollada por Robbins et al. (1974) y recibe el nombre de doble difusión en gel con una sensibilidad óptima ("optimum sensitivity plate").

Según Bergdoll (1989) este método es el de elección para el testaje de las cepas. Su sensibilidad es de 0,5 µg/ml, que puede incrementarse hasta 0,1 µg/ml mediante concentración del fluido sobrenadante. Esta sensibilidad se considera adecuada para testar la enterotoxigenicidad de las cepas de estafilococos cuando se combina con los métodos de

membrana sobre agar, o cultivo en saco, para la producción de EE (Donnelly et al., 1967; Robbins et al., 1974).

* Inmunodifusión doble en porta

Casman y Bennet (1965) propusieron un método miniaturizado con una sensibilidad potencial de 0,1 µg/ml, aunque, en la práctica, resulta difícil alcanzar este límite. A fin de detectar entre 0,1-0,2 µg en 100 ml de alimento hay que seguir un proceso largo y laborioso, consistente en la purificación y concentración de la muestra para reducir su volumen a 0,1-0,2 ml, lo que requiere varios días.

Muchos investigadores han intentado modificar este método a fin de acortar el tiempo necesario para obtener resultados y hacerlo igualmente sensible a todos los tipos de alimentos. En este sentido, Reiser et al. (1974) variaron el método de forma que se pudiera realizar la lectura a partir del tercer día.

Esta técnica es la más sensible de las de gel difusión. Sin embargo, es mucho más difícil de realizar y requiere considerable experiencia antes de conseguir la sensibilidad óptima. Según Bergdoll (1989) es el método de elección para detectar EE en alimentos, combinándolo con procesos de extracción-concentración. Sin embargo, su uso ha decrecido con el desarrollo de técnicas como el radioinmunoensayo y el enzimoimmunoensayo.

A pesar de ello, este método es el recomendado en el "Official Methods of Analysis" (1990) de la "Association of Official Analytical Chemist" (AOAC). Al comentar la técnica cita algunos problemas que se pueden producir:

- Cuando la concentración de EE en el material de prueba es excesiva, la formación de la línea de referencia será inhibida debido a la rápida migración de la toxina a través del gel. Esta inhibición de la formación de la línea de referencia se produce cuando se utilizan concentraciones de 5 a 10 μg de EE por ml.

- En algunas ocasiones, se producen líneas patrones atípicas, que son difíciles de interpretar por analistas sin la suficiente experiencia. Una de las reacciones atípicas más comunes es la formación de líneas no relacionadas con las EE causadas por otros antígenos presentes en el material a analizar.

* Inconvenientes de las técnicas de gel difusión

Donnelly *et al.* (1967) discutieron los problemas que encontraron al utilizar los distintos tipos de gel difusión. Estos investigadores observaron zonas atípicas en las pruebas tanto de gel difusión simple como doble. También observaron anillos inespecíficos, principalmente en los test de difusión simple. Las zonas atípicas no fueron reacciones serológicas, debido a que ellas fueron observadas en controles negativos de ciertos cultivos. Los anillos atípicos observados en las pruebas de difusión simple probablemente representan una reacción antígeno-anticuerpo que no implica a las EE. Las reacciones aparentemente positivas, que se presentan en los test de gel difusión simple y doble en tubo de ciertos cultivos, pueden ser debidas a ciertos antígenos que están estrechamente relacionados con las EE y con los que presentan reacciones cruzadas.

A.12.2.b.Hemoaglutinación y técnicas afines

La hemoaglutinación pasiva inversa fue desarrollada por Silverman *et al.* (1968). Este método se basa en la adsorción de los anticuerpos específicos a eritrocitos de oveja tratados con ácido tánico, seguido de la aglutinación mediada por EE de las células así sensibilizadas. Según los autores, el límite de detección del método es de 1,5 ng de EE /ml. El tiempo requerido para obtener esta sensibilidad es de uno o dos días (Reiser *et al.*, 1974).

Más recientemente, Yamada *et al.* (1972) pusieron a punto una técnica mejorada de hemoaglutinación pasiva inversa utilizando eritrocitos de oveja formalinizados y sensibilizados con inmunoglobulinas frente a EE. La mejora de la técnica viene dada por una mayor especificidad, no observándose ninguna reacción falsa positiva con ingredientes alimentarios, ni reacciones cruzadas entre los distintos tipos de EE.

Los inconvenientes de esta técnica fueron puestos de manifiesto por Bergdoll *et al.* (1976), y se refieren al hecho de que los anticuerpos de algunos preparados séricos no se adsorbían o conjugaban adecuadamente a los eritrocitos; así mismo, se produce una aglutinación no específica de dichas células tratadas con los extractos alimentarios, principalmente los de origen cárnico.

Otra versión de esta misma técnica es aquella que utiliza partículas de látex en lugar de eritrocitos (Salomon y Tew, 1968). Este método presenta el inconveniente de que, en ocasiones, los anticuerpos específicos frente a las distintas EE están contaminados con otros que promueven la aglutinación espontánea de las partículas de látex.

Shingaki et al. (1981) desarrollaron un sistema de aglutinación pasiva reversible con partículas de látex, comercializado por Oxoid (Basingstoke Hampshire, UK) y denominado SET-RPLA. Esta prueba es menos sensible que el enzoinmunoensayo y requiere 20-24 horas de incubación. En este sentido, Bankes y Rose (1989) sugirieron la centrifugación de las placas de microtitulación para reducir el tiempo de incubación a 4 horas; de esta forma el análisis se puede realizar dentro de una jornada de trabajo.

Fujikawa e Igarashi (1988) propusieron la utilización de partículas de látex de alta densidad para rebajar el tiempo de incubación de los test SET-RPLA desde 16 a 3 horas. La sensibilidad de esta técnica es de 0,5 ng/ml. Estos autores destacaron el problema de reacciones inespecíficas con las partículas de látex sensibilizadas. El fluido debe ser lo más claro posible eliminando de la muestra cualquier posible material que produzca interferencia, tales como el almidón y los lípidos. Las muestras se deben centrifugar para eliminar material grosero; sin embargo, existen problemas con las muestras de queso, ya que el sobrenadante sigue turbio y produce reacciones inespecíficas en el test SET-RPLA.

La técnica de la inhibición de la hemoaglutinación fue desarrollada por Johnson et al. (1967) quienes conjugaron EE-B a eritrocitos de oveja mediante bencidina bi-diazotizada, señalando que la sensibilidad del método era igual o superior al del microporta (0,1 µg/ml), aunque requiere cierta práctica para su interpretación. Estos investigadores utilizaron eritrocitos de oveja formalinizados para realizar la hemoaglutinación, encontrando problemas asociados con la presencia de potentes hemoaglutininas para los eritrocitos de oveja en varios extractos de

estafilococos.

Morse y Mah (1967) describieron la misma técnica que Johnson et al. (1967) con la diferencia que ellos utilizaron ácido tánico para conjuguar la EE-B a los eritrocitos. Este cambio determinó que la sensibilidad fuera inferior a la conseguida por Johnson et al. (1967).

A.12.2.c. Inmunofluorescencia

Friedman y White (1965) utilizaron la técnica de inmunofluorescencia directa para detectar la presencia de EE-B en la superficie de la cepa S6 de Staphylococcus aureus.

Por su parte, Pliszka y Windyga (1972) probaron que este método era también adecuado para detectar EE-B en leche, tanto humana como de vaca, así como en el queso.

A.12.2.d. Radioinmunoensayo (RIA)

En esta técnica, un antígeno de una muestra problema compete por los anticuerpos específicos, con una cantidad determinada del mismo antígeno marcado con un isótopo radiactivo (Bergdoll y Reiser, 1980). De esta forma puede establecerse, no sólo la existencia de una reacción de identidad, sino también determinarse la cantidad del antígeno problema presente en la muestra.

Robert et al. (1975) publicaron una modificación de esta técnica, denominada "doble anticuerpo" (Lindroth y Niskanen, 1977; Robert et al., 1978). En esta variante se adicionan los anticuerpos específicos de la EE a detectar a una mezcla de muestra problema y EE marcada, para añadir a continuación inmunoglobulinas anti especie adsorbidas a una

fase sólida, o precipitadas con polietilenglicol (Robern y Gleason, 1978).

Niyomvit *et al.* (1978) propusieron un método de RIA de afinidad por el cual copulaban de forma covalente los anticuerpos específicos a Sepharosa 4B, mediante bromocianuro, introduciendo dicha mezcla en una columna a través de la cual se hacía pasar posteriormente la solución con EE problema y EE marcada mezcladas. Después de determinar la radiactividad del eluyente se podía calcular la cantidad de EE problema captada por los anticuerpos. La ventaja de este método era una mayor velocidad de análisis, pudiéndose completar en 2 ó 3 horas.

El isótopo de elección ha sido el I^{125} en un elevado número de ocasiones. Sin embargo, este elemento presenta una serie de inconvenientes puestos de manifiesto por Kauffman y Johnson (1975). Estos autores comprobaron la existencia de un descenso en la unión de EE marcada con I^{125} a los anticuerpos específicos debido a:

- La gran disociación del I^{125} en el almacenamiento.
- La formación de agregados de las EE después del marcaje con I^{125} , con lo que se reduce la actividad antigénica; los agregados no fueron encontrados en EE sin marcar, demostrando que su presencia en EE radiomarcadas se debe al proceso de marcado radiactivo.

Niskanen y Lindroth (1976) defienden el uso del I^{131} en vez del I^{125} debido a que el primero se descompone más lentamente que el segundo.

Las principales limitaciones de esta técnica son:

- Necesidad de hacer uso de EE purificadas, al menos con un 90% de pureza.
- Manejo de isótopos radiactivos.
- La vida media del antígeno marcado con iodo es muy corta.

A.12.2.e. Enzimoensayo (ELISA)

Los principios de esta prueba son similares a los del RIA, sustituyendo el isótopo radiactivo por un enzima, siendo las más utilizadas la fosfatasa alcalina y la peroxidasa.

Los primeros en emplear este método para la detección de las enterotoxinas estafilocócicas fueron Saunders y Clinard (1977) y Saunders y Bartlett (1977). En 1977 Simon y Terplan describieron un sistema competitivo para la detección de EE-B, cuya sensibilidad oscilaba entre 0,1 y 1,0 ng/ml. En el ELISA competitivo (Kauffman, 1980) la EE marcada con el enzima compete con la toxina problema por una cantidad limitada de anticuerpos específicos. La sensibilidad de esta técnica es de 2 ng/ml.

Además del ELISA competitivo, se utiliza para la detección de EE la modalidad doble "sandwich" (Fraed *et al.*, 1982). En este tipo de ELISA, el antígeno queda en medio de dos capas de anticuerpos, una la del tapizado, y otra la del conjugado.

Todos estos sistemas exigen al menos un componente muy purificado y dado que es más fácil obtener anticuerpos que antígenos purificados, suelen ser los primeros los de elección.

Las variantes de la fase sólida, pueden realizarse tapizando, bien los pocillos con fondo plano de las placas de microtitulación, bien las paredes internas de los tubos de poliestireno, o bien las bolas de poliestireno. La ventaja del primero es la capacidad de automatización, en el supuesto de tener que realizar muchas pruebas a la vez, siempre que se disponga de un lector de placas.

Saunders y Bartlett (1977) y Olsvik *et al.* (1982) defendieron el uso de una técnica con anticuerpos obtenidos en dos especies animales, utilizando primero anticuerpos anti EE y posteriormente un suero anti inmunoglobulinas de la primera especie marcado con peroxidasa. Posee la ventaja de ser innecesario el uso de anticuerpos marcados específicos frente a cada una de las EE, siendo su sensibilidad de 1 ng/ml.

Fey *et al.* (1984) compararon distintos tipos de ELISA y concluyeron que el ELISA tipo doble "sandwich" es el de elección para la detección de las EE. El ELISA competitivo presenta las ventajas de la alta especificidad y la ausencia de falsos positivos debidos a la proteína A, pero presenta las desventajas de la necesidad de disponer de EE purificadas (laboriosas de producir), y que las concentraciones del antígeno y el tapizado con anticuerpos son críticas. Por su parte, el ELISA "sandwich" presenta varias ventajas:

- Alta sensibilidad.
- Necesidad de poco antígeno.
- La titulación del antígeno no es crítica.
- Adecuado para el uso de anticuerpos monoclonales.

Tabla I.1. Sensibilidad de las técnicas de detección de EE y TSST-1.

TECNICA	LIMITE DETECCION	AÑO	AUTORES
ID sencilla en tubo	1,0 µg/ml	1959	Bergdoll et al.
ID sencilla en tubo	1,0 µg/ml	1971	Gandhi y Richardson
ID sencilla en tubo	1-2 µg/ml	1971	Fung y Wagner
ID sencilla en placa	0,3 µg/ml	1980	Meyer y Palmieri
ID doble en tubo	0,1-10 µg/ml	1965	Hall et al.
ID doble en placa	0,5 µg/ml	1974	Robbins et al.
ID doble en porta	0,1 µg/ml	1965	Casman y Bennet
HA pasiva inversa	1,5 ng/ml	1968	Silverman et al.
HA pasiva inversa	10 ng/ml	1972	Yamada et al.
RPLA	1 ng/ml	1968	Salomon y Tew
RPLA	2 ng/ml	1981	Shingaki et al.
RPLA	0,5 ng/ml	1988	Fujikawa e Igarashi

Tabla I.1. Continuación.

TECNICA	LIMITE DETECCION	AÑO	AUTORES
Inhibición de la HA	0,1 µg/ml	1967	Johnson <i>et al.</i>
Inhibición de la HA	1,6 µg/ml	1967	Morse y Mah
IF directa	0,1 µg/ml	1965	Friedman y White
RIA	0,1 ng/ml	1975	Robern <i>et al.</i>
RIA	1,2-6,3 ng/ml	1978	Niyomvit <i>et al.</i>
RIA	1,0 ng/ml	1980	Bergdoll y Reiser
ELISA	0,4-3,2 ng/ml	1977	Saunders y Clinard
ELISA	1,0 ng/ml	1977	Saunders y Bartlett
ELISA	0,1-1,0 ng/ml	1977	Simon y Terplan
ELISA	2,0 ng/ml	1980	Kauffman
ELISA	1,0 ng/ml	1982	Olsvik <i>et al.</i>
ELISA	1,0 ng/ml	1982	Freed <i>et al.</i>
ELISA	3,0 ng/ml	1986	Hahn <i>et al.</i>

Abreviaturas utilizadas: ID: Inmunodifusión. HA: Hemaglutinación.
 RPLA: Aglutinación pasiva reversible con partículas de látex.
 RIA: Radioinmunoensayo. ELISA: Enzimoimmunoensayo.

Sin embargo, según Fey et al. (1984) este tipo de ELISA presenta también algunas desventajas:

- Tendencia a uniones no específicas, debido a la formación de agregados.
- Interferencias con la proteína A.

Hahn et al. (1986) adaptaron un sistema avidina-biotina a la técnica de ELISA que presentaba como ventajas la ausencia de falsos positivos por parte de la proteína A y la elevada sensibilidad (3 ng/ml).

A.12.2.f, Proteína A

Cuando se hace uso de las técnicas inmunológicas siempre hay que tener presente la posible presencia de proteína A que pueda alterar el resultado produciendo un falso positivo, debido a su capacidad de unirse de forma inespecífica a la porción Fc de ciertas inmunoglobulinas. Esto ya fue puesto de manifiesto por Notermans y Koper (1979), aunque otros investigadores (Freed et al., 1982; Olsvik et al., 1982) opinan que no se ha demostrado que la proteína A se encuentre presente en los alimentos en cantidad suficiente como para producir falsos positivos.

Se han propuesto varios métodos para evitar este problema:

- Koper et al. (1980) sugirieron el uso de los fragmentos F(ab') de las inmunoglobulinas debido a que no se unen a la proteína A.
- Freed et al. (1982) opinaron que la utilización de los fragmentos F(ab') es laboriosa y suele reducir la

sensibilidad, por lo que estos autores propusieron obtener los anticuerpos específicos en oveja, ya que las inmunoglobulinas del tipo G de esta especie muestran una baja afinidad por la proteína A.

- Fey *et al.* (1984) propusieron la adsorción de la posible proteína A presente en el medio, mediante la adición de suero normal de conejo a los extractos.

B. TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA DE PROTEINAS

B.1. DEFINICION DE TERMINOS E HISTORIA

Southern (1975) transfirió ADN desde geles de electroforesis a filtros de nitrocelulosa, pudiendo ser entonces hibridados a ARN y ADN radiactivos y ser detectados por radiografía o fluorografía. Esta técnica recibió el nombre de "Southern-blot". Una adaptación de esta técnica es la unión covalente de ARN a filtros que recibe el nombre de "Northern-blot" (Alwine *et al.*, 1977). Posteriormente, Towbin *et al.* (1979) describieron la transferencia de proteínas ribosómicas desde geles de poliacrilamida-urea a tiras de nitrocelulosa. Burnette (1981) denominó la transferencia electroforética de proteínas a matrices inmovilizantes como "Western-blot".

La palabra "blotting" o "blot" se puede traducir como el proceso de transferencia de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) desde geles de electroforesis a matrices inmovilizantes. Este término puede ser usado en conjunción con la macromolécula relevante; por ejemplo: "blotting" de

ADN, "blotting" de ARN, "blotting" de proteínas. Gershoni y Falade (1983) señalaron que se debiera evitar el usar referencias geográficas como "Northern" (Alwine *et al.*, 1977), "Western" (Burnette, 1981), y "Eastern" (Reinhart y Malamed, 1982), para evitar posibles controversias políticas o la construcción de nuevos términos. En este trabajo se va a utilizar el término transferencia electroforética como sinónimo de "blot" o "blotting" con el objetivo de emplear, en la medida de lo posible, términos españoles.

La transferencia electroforética de proteínas desde geles de electroforesis a una fase sólida para inmunorreacción permite la combinación óptima de la alta resolución de la electroforesis con la sensibilidad y simplicidad de los ensayos en fase sólida. Los primeros trabajos de transferencia electroforética de proteínas fueron realizados por Renart *et al.* (1979), quienes transfirieron proteínas desde geles de poliacrilamida y agarosa a papel diazobenciloximetil-celulosa, y por Towbin *et al.* (1979) que introdujeron la electrotransferencia al someter el conjunto gel-membrana a un campo eléctrico, lo que produce la migración rápida y eficiente de las proteínas desde los geles a las membranas.

Posteriormente, Bittner *et al.* (1980) realizaron un estudio comparativo de electrotransferencia de ácidos nucleicos y proteínas a partir de geles de poliacrilamida y agarosa a membranas de nitrocelulosa y de diazobenciloximetil-celulosa.

B.2.ETAPAS

Los pasos necesarios para realizar esta técnica son los siguientes:

- Electroforesis.
- Elución de las proteínas de los geles de electroforesis.
- Adsorción de las proteínas a matrices inmovilizantes.
- Bloqueo de las matrices inmovilizantes.
- Inmuno-detección en las matrices inmovilizantes.

B.2.1.Electroforesis

La mayoría de los polímeros biológicos están cargados eléctricamente y, por ello, se moverán al ser sometidos a un campo eléctrico. El transporte de macromoléculas a través de un solvente por un campo eléctrico recibe el nombre de electroforesis. La movilidad de una macromolécula en un campo eléctrico puede constituir un criterio de caracterización. La electroforesis permite así determinar masas molares de proteínas, diferenciarlas en virtud de su carga neta o su estructura, detectar cambios en aminoácidos por los cambios de carga que ocasionan y separar especies moleculares cuantitativamente (Mellado, 1985).

El uso de geles tales como el almidón, agarosa, poli(acrilamida) y poli(acrilamida)-agarosa como medio de soporte de la electroforesis aumenta la resolución, particularmente para ácidos nucleicos y proteínas. Las razones del aumento en la resolución no están del todo claras, pero parece deberse a una combinación de reducción de la difusión debida a la propia malla creada por el gel, y a la acción separadora de la cromatografía en el gel, lo que se ha dado en llamar tamizado molecular (Mellado, 1985).

El soporte más efectivo utilizado para la electroforesis de proteínas es el gel de poliacrilamida que ha sustituido al antiguo gel de almidón, debido a que la cantidad de tamizado molecular puede ser controlada por la concentración del gel, y a que la adsorción de proteína al gel es prácticamente inexistente. El gel de poliacrilamida se prepara por entramaje "crosslinking" de la acrilamida con N'N'-metilen-bis-acrilamida, bien en columnas de vidrio (geles en columna), o bien entre dos placas de vidrio (geles en placa). Los geles en placa han reemplazado prácticamente a los geles en columna, ya que sólo se puede correr una muestra por cada gel en columna, mientras que un gel en placa admite varias muestras a la vez. La electroforesis en geles de poliacrilamida es, probablemente, el sistema de electroforesis más útil y adaptable existente para el análisis y separación de macromoléculas (Mellado, 1985).

Los geles de poliacrilamida pueden ser homogéneos o tener un gradiente, y pueden ser nativos o desnaturalizantes (para este fin se emplea principalmente el dodecil sulfato sódico).

Los geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) se utilizan para determinaciones de peso molecular (Pm) y para análisis de polipeptidos (Jovin, 1973; Wyckoff *et al.*, 1977). Estos geles pueden tener gradiente de poliacrilamida. Las ventajas de los geles con gradiente son las siguientes:

- 1) Pueden separarse mezclas complejas con un Pm muy diferente en un único gel.
- 2) Se puede realizar una estimación del Pm de los componentes de una mezcla compleja (Hames, 1981).

3) Superior resolución (definición de las bandas).

Sin embargo, los geles homogéneos pueden ofrecer mejor separación (distancia entre bandas) cuando se trabaja con proteínas de un Pm similar. Por ello, se suele analizar primero la muestra mediante una electroforesis con gradiente de poliacrilamida; si la resolución de los componentes es suficiente, no se requerirán posteriores análisis. Sin embargo, si los componentes de interés tienen unos Pm muy próximos es recomendable usar un gel homogéneo.

Los geles nativos (no incluyen agentes desnaturalizantes) no alteran la conformación ni la actividad biológica de las proteínas (Davis, 1964). Por ello, se emplean para el estudio de la composición y estructura de las proteínas nativas, sobre todo cuando su actividad debe ser preservada para posteriores análisis o para detección.

Para la tinción de las proteínas se pueden utilizar diversos colorantes que se unen a las proteínas presentes en el gel de electroforesis. Dentro de estos destacan el negro amido, el verde brillante y el azul de Coomassie (Wilson, 1979). La tinción de plata presenta mayor sensibilidad que estos colorantes; así, la capacidad de detección del azul de Coomassie es de 20-30 ng de proteína/banda (Wilson, 1979) y la de la tinción de plata es de 0,3-0,5 ng de proteína/banda (Heukeshoven y Dernik, 1985).

B.2.2. Elución

Existen 3 tipos de métodos:

- Por difusión.
- Por convección.
- Eléctrica.

B.2.2.a. Difusión

Utilizada por Bowen *et al.* (1980) y por Lee *et al.* (1982). Es el tipo más sencillo y se realiza colocando el gel entre dos tiras de papel de filtro que, a su vez, están colocadas entre dos esponjas; este conjunto es posteriormente sumergido durante 36 a 48 horas en un gran volumen de tampón. La transferencia por difusión puede ser útil si la cantidad de la proteína adsorbida en el filtro es suficiente, y los largos tiempos de incubación no son un inconveniente.

Una de las ventajas de la transferencia por difusión es que puede realizarse sin un equipamiento especial. Como inconvenientes tiene una escasa capacidad de transferencia de proteínas, comparado con los otros tipos, y la pérdida de resolución durante los largos tiempos de difusión requeridos para su realización. Beisiegel (1986) calculó en un 30-35% la cantidad de proteínas adsorbidas a la matriz por este procedimiento, lo que dificulta la elución de las proteínas de alto peso molecular.

B.2.2.b. Convección

Es la forma que utilizó Southern (1975) en el procedimiento original de transferencia de ADN. Un fluido sirve como fuerza que aluye las proteínas desde el gel hacia el filtro. Esta técnica es más eficiente y más breve que la transferencia por difusión. Se puede realizar una modificación que permite una transferencia bidireccional: por ejemplo: transferencia con dos filtros, uno a cada lado del gel (Smith y Summers, 1980; Reinhart y Malanud, 1982).

El tiempo de elución puede ser reducido utilizando presión negativa (vacío). Peferoen et al. (1982) utilizaron una bomba de vacío para realizar la transferencia. Estos autores señalaron así mismo la precaución que se debe tener para controlar el tampón de transferencia, ya que de otra forma, el gel puede secarse y pegarse a la membrana.

B.2.2.c. Electroelución

Este procedimiento es el más ampliamente utilizado (Towbin et al., 1979; Bittner et al., 1980; Stellweg y Dahlberg, 1980), especialmente cuando se realizan trasferencias de proteínas de alto peso molecular o cuando se quiere transferir proteínas presentes en muy bajas cantidades. Esto se debe al hecho de que las proteínas, a diferencia del ADN, se adsorben a la nitrocelulosa, incluso con tampones de baja fuerza iónica. El uso de estos tampones permite utilizar altos voltajes (Sutton et al., 1982).

Sin embargo, la elución total de las proteínas desde el gel no significa que todas ellas se unan a la membrana. En muchos casos la proteína atraviesa la membrana y se pierde en el tampón de transferencia. Las proteínas son eluidas a diferente escala, lo cual puede causar problemas, ya que pequeñas proteínas pueden perderse a través de los poros de la membrana si intentamos eluir proteínas de elevado peso molecular.

La electroelución de macromoléculas para transferencia fue originariamente usada por Arnheim y Southern en 1977. Para realizar esta técnica es colocada la membrana sobre el gel sin formar burbujas de aire. Las burbujas de aire crean puntos de alta resistencia, con lo que se producen trasferencias de baja eficiencia y distorsión de bandas.

Por ello, es importante que el gel y el filtro estén firmemente sujetos (Burnette, 1981; Gershoni y Palade, 1982). El gel y el filtro, colocados en una cubeta que contiene un tampón de transferencia, se sitúan entre los dos electrodos.

El tampón de transferencia puede contener metanol. El uso de metanol, originalmente introducido por Towbin, tiene ventajas y desventajas. Así, tiende a incrementar la capacidad de unión de la nitrocelulosa para las proteínas y también estabiliza la geometría del gel durante la transferencia (Burnette, 1981; Gershoni y Palade, 1982; Nielsen *et al.*, 1982). Sin embargo, el metanol reduce la eficiencia de elución de proteínas desde geles de poli(acrilamida-dodecil sulfato sódico) (SDS) (Gershoni y Palade, 1982; Nielsen *et al.*, 1982) y su presencia debe prolongarse durante largos periodos de tiempo, más de 12 horas, con el fin de obtener transferencias eficientes de proteínas de alto peso molecular (Burnette, 1981). En ausencia de metanol los geles de poli(acrilamida) tienden a hincharse en tampones de baja fuerza iónica y, si esto ocurre, las bandas pueden llegar a distorsionarse. Humedecer el gel de media a una hora en el tampón de transferencia antes de realizar la misma puede evitar este problema (Burnette, 1981; Gershoni y Palade, 1982).

Las condiciones de transferencia son dependientes del tipo de gel, de la matriz inmovilizante, del aparato de transferencia, y de las proteínas a transferir.

La elución depende del peso molecular de los polipéptidos: dos horas son suficientes para eluir los polipéptidos de bajo peso molecular, mientras que seis horas, incluso más, son necesarias para eluir polipéptidos de alto peso molecular. Se han propuesto varias sugerencias para

intentar paliar este problema:

- Uso de geles de unión reversibles (Tas *et al.*, 1984) seguidos de una despolimerización del gel antes de la transferencia (Raymond y Weintraub, 1959; Bolen *et al.*, 1982).
- Digestión limitada de proteínas de elevado peso molecular mediante proteasas para convertirlas en péptidos más pequeños y, por tanto, más fácilmente eluibles (Gibson, 1981).
- Adición de detergentes como el SDS (Erickson *et al.*, 1982). Esta adición no tiene efectos negativos en la adsorción de proteínas a la nitrocelulosa y, por ello, ha sido utilizado por otros investigadores (Vaessen *et al.*, 1981; Nielsen *et al.*, 1982).

B.2.3. Adsorción de proteínas a matrices inmovilizantes

Se han utilizado diversos tipos de membranas para retener las proteínas:

- Nitrocelulosa (NC).
- Diazomembranas.
- Nylon.
- Difluoruro de polivinilideno (PVDF).

B.2.3.a. Nitrocelulosa

La NC es la matriz más ampliamente utilizada, siendo originariamente utilizada como filtros de superficie para microfiltración. En estos filtros las macromoléculas se adsorben por interacciones químicas más que por fuerzas mecánicas. No se comprenden claramente las interacciones de

las proteínas con la NC (Wallis et al., 1979); a un pH de 8, que es el pH al cual se realiza generalmente la elución, la NC está cargada negativamente y las proteínas se adsorben a ella. Efectos hidrofóbicos, probablemente, juegan un papel en esta interacción.

Algunas proteínas, especialmente las de bajo peso molecular, se unen con una baja afinidad a la NC y pueden perderse durante la transferencia o el procesado (Kakita et al., 1982). Burnette (1981) utilizó matrices menos porosas (0,2 en lugar de 0,45 μm) para reducir esta pérdida.

La presencia de acetato de celulosa en los filtros de NC parece reducir su capacidad para unir proteínas. Esto puede explicar los valores, relativamente bajos, obtenidos por Towbin et al. (1979) cuando utilizaron NC de Millipore (Bedford, Mass.).

B.2.3.b. Diazomembranas

En las membranas de este tipo las proteínas cargadas negativamente, reaccionan electrostáticamente con los grupos diazonium del papel cargados positivamente. Esta interacción es seguida por una unión covalente irreversible via azoderivados (Alwine et al., 1979).

Dentro de estas membranas destaca la diazobenciloximetil (DBM)-celulosa. La glicina, usada comúnmente en los tampones de transferencia, puede interferir con el proceso de adsorción a papeles de DBM-celulosa (Kakita et al., 1982).

Otro diazo papel es el diazofeniltioeter (DPT) que ha demostrado ser tan eficiente como el DBM pero más estable (Reiser y Wardale, 1981). El papel o acetato de celulosa

activado con CNBr se ha utilizado con las mismas ventajas que el DBM (Clarke *et al.*, 1979).

B.2.3.c.Nylon

Las membranas de nylon, originalmente utilizadas para filtración líquida y de gases, tienen algunas ventajas sobre la NC como por ejemplo la durabilidad.

Zetabind (ZB) (AMF/CUNO Meriden, Conn.) es una matriz de nylon modificada mediante la introducción de grupos amino terciarios. ZB tiene una capacidad de unión para las proteínas superior a la NC (Gershoni y Palade, 1982) y da mejores resultados que la NC en la electroelución de las proteínas desde geles SDS (Gershoni y Palade, 1982). Esto es probablemente debido a la diferencia de potencial extra creado por la carga positiva de ZB.

Un inconveniente de la alta capacidad de unión de ZB es la posibilidad de elevadas uniones de proteínas no específicas durante las incubaciones. Esto puede ser parcialmente evitado mediante un proceso adecuado de bloqueo (Gershoni y Palade, 1982). Una característica común de las membranas de nylon es que se unen fuertemente a los colorantes aniónicos, como el azul brillante de Coomassie o el negro amido. Esta característica interfiere con la tinción de los filtros; esto supone una desventaja con respecto a la NC dado que esta puede teñirse fácilmente con negro amido (Towbin *et al.*, 1979) o con azul brillante de Coomassie (Burnette, 1981). Gershoni y Palade (1982) para evitar las uniones no específicas propusieron realizar un bloqueo con seroalbúmina bovina al 10% en PBS durante toda la noche a una temperatura de 40-50 °C; esto supone realizar un bloqueo de mayor duración al que se debe emplear en el caso

de utilizar NC (una hora de bloqueo es suficiente).

B.2.3.d. Difluoruro de polivinilideno (PVDF)

Los filtros descritos con anterioridad presentan una serie de inconvenientes. Así, la NC es relativamente frágil y el nylon presenta elevados ruidos de fondo. Es por ello, por lo que se han investigado nuevos materiales para utilizarse como matrices inmovilizantes; fruto de estos trabajos son las membranas de PVDF desarrolladas por Millipore bajo el nombre comercial de "Immobilon-P".

Estas membranas presentan una serie de ventajas como son:

- Amplia compatibilidad química (tolera altas concentraciones de metanol y es compatible con cualquier tipo de colorante o reactivo de inmunodetección).
- Gran resistencia mecánica.
- Bajo nivel de adsorción inespecífica (bajo ruido de fondo).

La capacidad de adsorber proteínas es similar al de las membranas de NC, pero inferior a la de las membranas de nylon.

B.2.4. Bloqueo de las matrices inmovilizantes

La necesidad de realizar un bloqueo de matrices se debe a:

- Reducción de las uniones no específicas.
- Permitir la renaturalización de los determinantes antigénicos.

Los agentes de bloqueo más utilizados son:

- Gelatina (Sarivis, 1984).
- Seroalbúmina bovina (Towbin *et al.*, 1979; Wedege y Svenneby, 1986).
- Leche en polvo (Hauri y Bucher, 1986).
- Sueros animales (Hawkes *et al.*, 1982).
- Hemoglobina (Winter, 1982).
- Ovocalbúmina (Hanff *et al.*, 1982).
- Etanolamina (Kay *et al.*, 1983).
- Tween-20 (Batteiger *et al.*, 1982; Wedege y Svenneby, 1986).

No existe un acuerdo general sobre cual es el agente bloqueante idóneo. Así, Batteiger *et al.* (1982) utilizaron el PBS-Tween como agente bloqueante destacando algunas ventajas de este compuesto como son la no interferencia en la utilización de colorantes de proteínas y el escaso ruido de fondo (menor que el obtenido al utilizar seroalbúmina bovina o sueros animales).

Blas y Cherwinski (1983) destacaron la mejora en los resultados al utilizar Tween 20 como bloqueante cuando se emplean anticuerpos monoclonales. Sin embargo, Wedege y Svenneby (1986) compararon la seroalbúmina bovina con el Tween 20 y concluyeron que era mejor la seroalbúmina bovina, ya que con el Tween 20 se producía, en algunas ocasiones, una tinción no específica.

Gershoni y Palade (1982) sugirieron que las bandas falsas positivas en transferencia pueden ser resultado de una interacción hidrofóbica entre antígenos y anticuerpos mediada por detergentes. Hauri y Bucher (1986) indicaron que algunas

dificultades encontradas en los procesos de transferencia se deben a condiciones de bloqueo inadecuadas. Así, estos autores compararon cuatro agentes bloqueantes (suero fetal bovino, gelatina de mamífero, gelatina de pescado, y leche en polvo) y destacaron los malos resultados obtenidos con suero fetal bovino debido a los altos ruidos de fondo.

Spinola y Cannon (1985) al comparar 3 agentes bloqueantes (seroalbúmina bovina, leche desnatada en polvo y Tween 20) observaron diferencias, tanto cualitativas como cuantitativas, en los resultados obtenidos. Así, con la seroalbúmina bovina detectaron numerosas bandas pero algunas de ellas eran difíciles de distinguir del ruido de fondo; con el Tween 20 observaron una banda que no aparecía con la seroalbúmina bovina, y observaron diversas bandas con más claridad. Con la leche desnatada en polvo se redujeron los ruidos de fondo, pero no visualizaron algunas bandas observadas con los otros agentes bloqueantes. En esta prueba comparativa los mejores resultados con anticuerpos policlonales se obtuvieron con Tween 20, pero con anticuerpos monoclonales lo fueron con seroalbúmina bovina. Estos autores concluyeron que se deben comparar diversas sustancias bloqueantes, dado que no existe un agente bloqueante que sea idóneo para todos los antígenos.

Una de las ventajas de utilizar los agentes bloqueantes es la renaturalización de los determinantes antigénicos. Esto tiene mucha importancia si utilizamos anticuerpos monoclonales en la inmunodetección, ya que muchos de estos anticuerpos fallan al reaccionar con antígenos proteicos transferidos desde geles SDS debido a las malas condiciones renaturalizantes.

B.2.5. Inmunodetección en las matrices inmovilizantes

El sistema antígeno-anticuerpo es el sistema más comúnmente empleado. En él, un anticuerpo frente a la proteína de interés se usa como detector específico. Se puede utilizar un sistema directo, o bien, un sistema indirecto. En el sistema directo el anticuerpo específico está radiomarcado, o copulado a una enzima o a una sustancia fluorescente. El sistema indirecto es más sensible e implica el uso de un segundo anticuerpo, o bien de proteína A; en este método, el anticuerpo específico (a veces un anticuerpo monoclonal) está sin marcar, y es el segundo anticuerpo el que está marcado.

En general, todas las reacciones se llevan a cabo diluyendo los anticuerpos en un tampón conteniendo agentes bloqueantes. Después de cada incubación la membrana se debe lavar, una o varias veces, con un tampón que no contenga proteínas. Los tiempos de incubación y diluciones de anticuerpos varían en un amplio rango, dependiendo de los anticuerpos y de la cantidad de antígeno. Para anticuerpos de alta avidéz, se pueden usar altas diluciones y largos periodos de incubación para ahorrar suero, como es el caso de los sueros anti-hormona. Para anticuerpos de baja avidéz es mejor utilizar una alta concentración de anticuerpos durante un tiempo breve (tanto para el primer anticuerpo como para el segundo).

En el caso de detección con proteína A, el suero completo no puede ser usado en la solución de bloqueo. Hay que tener presente que la unión de la proteína A varía entre especies e isotipos; así, los anticuerpos de conejo son los que mejor se unen a la proteína A.

Se suele emplear el método indirecto utilizando enzimas, generalmente peroxidasa, para marcar el segundo anticuerpo. En el caso de utilizar peroxidasa los substratos más utilizados son la diaminobencidina (DAB) y el cloronaftol. Blas y Cherwinski (1983) compararon estos dos substratos y obtuvieron mejores resultados con DAB. Las técnicas de transferencia utilizando peroxidasa fueron desarrolladas, primero con anticuerpos policlonales (Towbin *et al.*, 1979), y después con anticuerpos monoclonales (Hawkes *et al.*, 1982; Blas y Cherwinski, 1983).

Towbin *et al.* (1979) compararon anticuerpos conjugados bien con peroxidasa o bien con fluoresceína, y obtuvieron mejores resultados con la peroxidasa, ya que los anticuerpos marcados con esta enzima podían ser utilizados a diluciones mucho más altas, además de permitir la detección de cantidades muy pequeñas de antígeno (hasta 100 pg).

La tinción de las proteínas adsorbidas a la matriz inmovilizante puede ayudar a la interpretación de resultados negativos en la transferencia. Los colorantes utilizados para teñir proteínas son el negro amido, el verde brillante, el azul de Coomassie, y la tinta india. Yuen *et al.* (1982) desarrollaron la tinción de plata que también se ha empleado para teñir las proteínas fijadas a las membranas. Estos colorantes pueden perjudicar la capacidad antigénica de las proteínas transferidas y disminuir la visibilidad del color que se produce en los sistemas de detección ligados a enzimas. Los métodos de inmunodetección son más sensibles que los sistemas de tinción de proteínas, con las excepciones de la tinta india (Hancock y Tsang, 1983) y la tinción de plata dado que ambos tienen un rango de detección de ng. Esto puede producir, en algunas ocasiones, el visualizar bandas al realizar la inmunodetección que no se verían al teñir las

proteínas adsorbidas a la membrana.

B.3.VENTAJAS E INCONVENIENTES

B.3.1.Ventajas

La transferencia desde geles de electroforesis a filtros presenta las siguientes ventajas sobre los análisis realizados directamente sobre los geles:

- Los filtros húmedos son apilables y fáciles de manejar.
- Las proteínas inmovilizadas son accesibles a varios ligandos.
- El gasto de reactivos es pequeño.
- Se pueden conseguir múltiples réplicas de un gel, cada una de las cuales puede someterse a un ensayo individual.
- Las proteínas transferidas pueden conservarse en los filtros de 6 meses a 1 año antes de realizar las incubaciones (Reiser y Wardale, 1981; Gershoni y Palade, 1982; Lee *et al.*, 1982.)
- La misma proteína transferida puede ser usada para varios análisis sucesivos.
- Las sustancias que tienen reacciones cruzadas y las sustancias interfirientes son separadas en el paso de la electroforesis.
- Se puede utilizar una cuantificación densitométrica de la tinción de inmunoperoxidasa con la ayuda de un densitómetro (Towbin *et al.*, 1982; Rordorf *et al.*, 1983).
- Existe la posibilidad de analizar antígenos poco solubles y, dependiendo del tipo de electroforesis,

pueden ser detectados epitopos inaccesibles en la proteína nativa.

- Debido a su alta sensibilidad, permite la detección de antígenos presentes en bajas concentraciones (1 pg-1 ng), como es el caso de los antígenos virales localizados en células o en fluidos naturales (McMichael et al., 1981; Bolen et al., 1982; O'Donnell et al., 1982).

B.3.2. Inconvenientes

Los principales problemas que se presentan al utilizar estas técnicas son los siguientes:

- Se pueden producir distorsiones del gel y de la membrana durante electrotransferencias prolongadas, particularmente a voltajes elevados.

- Utilizando geles SDS pueden existir alteraciones en la antigenicidad de los epitopos (Reynolds y Tanford, 1970a). Esto no representa un problema si se utilizan sueros policlonales; sin embargo, sí lo es si se utilizan anticuerpos monoclonales, dado que estos anticuerpos están dirigidos contra epitopos simples dentro de una molécula y por tanto, existe la posibilidad de que la reacción sea abolida por el efecto desnaturante del detergente (Stone y Nowinski, 1980).

- Un exceso de proteínas puede pasar a través de la membrana durante la electroelución perdiéndose en el tampón de transferencia (Howe y Hershey, 1981; Gershoni y Palade, 1982); este fenómeno se acentúa cuando la transferencia es realizada en ausencia de metanol.

B.4. APLICACIONES

* Análisis de asociaciones proteína-ligando

Se pueden estudiar interacciones proteínas-ADN y proteínas-ARN (Bowen *et al.*, 1980; Hoch, 1982). Desarrollar el gel bajo condiciones desnaturalizantes suaves parece mejorar la eficiencia con que una señal es generada (Delepelaire y Chua, 1979). Sin embargo, la afinidad de un ligando a una proteína inmovilizada puede ser menor que a la proteína nativa. Es por ello por lo que se deben estudiar condiciones para una renaturalización más eficiente de las proteínas, como pueden ser mejorar la eliminación de los reactivos desnaturalizantes o facilitar la regeneración de los puentes disulfuro *in situ*.

* Demostración de interacciones proteína-célula

Hayman *et al.* (1982) utilizaron transferencias para demostrar interacciones entre polipéptidos y células enteras.

* Identificación de subunidades enzimáticas

Mullerman *et al.* (1982) destacaron la utilidad de esta técnica para el aislamiento de enzimas sin necesidad de disponer de la enzima o de los anticuerpos específicos frente a ella con un elevado nivel de purificación.

* Purificación de anticuerpos monoespecíficos por afinidad

Olmsted (1981) utilizó transferencias para obtener y purificar anticuerpos monoespecíficos. Los polipéptidos resueltos en geles SDS-poliacrilamida se transfirieron a papeles DPT y los filtros se incuban con suero que contiene

anticuerpos policlonales. Posteriormente, se cortan las bandas que contienen los complejos antígenos-anticuerpo y los anticuerpos monoespecíficos se eluyen de las bandas cortadas incubándolos en un tampón de bajo pH.

* Aumento de la sensibilidad en las autorradiografías

La transferencia de proteínas marcadas radiactivamente desde los geles a los filtros aumenta la capacidad de detección (Symington et al., 1981; Erickson et al., 1982).

* Testaje de clones

Se pueden seleccionar los clones apropiados, incluso sin disponer de antígeno purificado (Towbin et al., 1979).

* Autoinmunidad

Se puede conseguir una caracterización de antígenos y el testaje de sueros en enfermedades autoinmunes mediante esta técnica (Towbin et al., 1979).

* Alergia

Permite detectar anticuerpos del tipo inmunoglobulinas E que están presentes en el suero a concentraciones más bajas que otras inmunoglobulinas (Sutton et al., 1982).

* Estados transformados

Strnad et al. (1981) caracterizaron el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr que está presente en células transformadas por este virus. Las técnicas de transferencia pueden utilizarse también para caracterizar antígenos

asociados a tumores (Rosen et al., 1983).

* Identificación de hormonas en tejidos

Kakita et al. (1982) detectaron ng de insulina sin necesidad de extraer la hormona de los tejidos.

* Estudio de la respuesta inmune a infecciones por vermes

Esta respuesta es difícil de estudiar debido a la complejidad y dificultad de obtener preparaciones de antígenos solubilizados. Estos problemas pueden resolverse mediante las técnicas de transferencia (Tsang et al., 1982).

* Técnica de detección en enfermedades infecciosas

Estos métodos pueden utilizarse en análisis serológicos de infecciones virales debido a que estos organismos son difíciles de cultivar y son antigénicamente complejos, además de escasamente solubles (Karchen et al., 1981; Norrild et al., 1981; Braun et al., 1983). También se pueden identificar antígenos virales de plantas en aislados de campo (O'Donnell et al., 1982; Rybicki y Von Wechmar, 1982).

Escribano et al. (1990) destacaron el uso de estas técnicas para confirmar los resultados positivos en el diagnóstico de la peste porcina africana. Para testar los sueros de cerdos para esta enfermedad se utiliza el ELISA (Pastor et al., 1989a) y para confirmar los resultados se utilizaba la inmunofluorescencia indirecta (Boal et al., 1969). Sin embargo, esta última técnica presenta con frecuencia falsos negativos debido a su baja sensibilidad. Por ello, se ha adaptado la transferencia electroforética dado que ofrece una mayor sensibilidad y objetividad en la

interpretación (Pastor et al., 1989b). Estos autores probaron 207 sueros positivos en ELISA y sólo uno de ellos no reaccionó por transferencia (este suero fue confirmado como positivo mediante radioinmunoprecipitación). Probaron también 208 sueros dudosos por la técnica de ELISA y todos aquéllos que fueron positivos por otras técnicas lo fueron también por transferencia sin encontrar, en ningún caso, falsos positivos. Sueros positivos por el método ELISA y negativos por la inmunofluorescencia fueron también negativos por transferencia electroforética.

Los falsos positivos por ELISA se deben, en general, a la fijación inespecífica de anticuerpos al soporte de poliestireno de las placas de microtitulación (Escribano et al., 1989). También se pueden producir falsos positivos en esta técnica por la seroalbúmina bovina: los antígenos utilizados en los métodos de detección se consiguen cultivando el virus en células y para este propósito se utiliza suero bovino (que contiene seroalbúmina). También las vacunas virales pueden contener seroalbúmina bovina y producirse anticuerpos frente a ella, y son estos anticuerpos los que pueden dar lugar a falsos positivos en las técnicas de detección utilizadas en el diagnóstico de la peste porcina africana. Estos falsos positivos se pueden evitar utilizando el método de transferencia electroforética.

Capitulo II: OBJETIVOS



Nuestro primer objetivo en esta tesis ha sido el de desarrollar una nueva técnica de detección de EE y TSST-1. Aunque actualmente se utilizan diversas técnicas (inmunodifusión, RIA y ELISA principalmente) con buenos resultados, todas ellas presentan diversos inconvenientes. Así, la inmunodifusión es una técnica sencilla pero de escasa sensibilidad y que requiere un elevado número de horas para completar el análisis (Casman y Bennet, 1965). El RIA es una técnica muy sensible y relativamente rápida (Bergdoll y Reiser, 1980), pero presenta un grave problema: la necesidad de trabajar con material radiactivo; este inconveniente ha motivado que esta técnica haya sido sustituida por otra tan sensible como ella pero carente de riesgos: el ELISA. Precisamente, el método ELISA es el que presenta un mayor número de ventajas: sensibilidad, rapidez, y posibilidad de procesar un elevado número de muestras (Fay *et al.*, 1984). Sin embargo, presenta el inconveniente, como todas las técnicas de detección de EE y TSST-1, de presentar falsos positivos, debidos principalmente a la proteína A, pero también a otros elementos interfirientes.

Para evitar algunos de estos problemas hemos puesto a punto una técnica de transferencia electroforética que utiliza un sistema de electroforesis semiautomático con gales comerciales ultrafinos. Para comprobar la validez de este método procedimos primero a estudiar cual era la cantidad de EE y TSST-1 más pequeña que podíamos detectar. Posteriormente investigamos la posibilidad de reacciones cruzadas de las EE entre sí y con la TSST-1, los posibles falsos positivos debidos a la proteína A y la capacidad de detección de EE y TSST-1 en extractos de cepas patrones y en alimentos artificialmente contaminados.

En la segunda parte de la tesis estudiamos la capacidad de producción de EE y TSST-1 por parte de estafilococos, tanto coagulasa positivos como negativos, aislados de leche de animales mastíticos (ovejas, cabras y vacas). Primero procedimos a la identificación de los estafilococos y posteriormente a la detección de las EE y TSST-1 producidas por los mismos. Para realizar esta detección utilizamos dos técnicas, una de ellas la técnica ELISA doble "sandwich" (Freed *et al.*, 1981), que es probablemente la mejor variante de la técnica ELISA (Fey *et al.*, 1984), y el método de transferencia electroforética desarrollado por nosotros. De esta manera, comparamos el posiblemente mejor método de detección de EE y TSST-1 con la técnica de transferencia electroforética.

Eligimos realizar el estudio con estafilococos aislados de mastitis debido al hecho que estos suponen el principal riesgo de intoxicación por EE a partir de estafilococos de origen animal. La causa de este peligro es el carácter termorresistente de las EE: los tratamientos térmicos a los que habitualmente se somete la leche no eliminan totalmente a las mismas, con el consiguiente peligro para el consumidor.

No sólo estudiamos la producción de EE por parte de las cepas coagulasa positivas, sino que también investigamos la posible producción de las mismas por parte de los estafilococos coagulasa negativos, dado que todavía se duda de su capacidad enterotóxigena.

Aunque se conoce el papel de la TSST-1 en el síndrome del shock tóxico en el hombre, se han hecho muy pocos estudios de esta toxina en animales. A pesar de ello, existen autores (Jones y Wisnake, 1986; Morgan *et al.*, 1986) que sugieren que esta toxina jugaría un papel importante en

la patogenia de las enfermedades producidas por estafilococos. Por esta razón, decidimos investigar la producción de TSST-1 por parte de las cepas aisladas de mastitis.

Capítulo III: MATERIAL Y METODOS



A. CEPAS DE ESTAFILOCOCOS

A.1. CEPAS CONTROLES

Se utilizaron las cepas tipo que se detallan en la tabla III.1., en la que se especifican las EE y/o TSST-1 producidas por cada una de ellas. Estas cepas fueron cedidas por el "Food Research Institute" (Wis. Mad.).

A.2. CEPAS DE ESTAFILOCOCOS AISLADAS DE MASTITIS

A.2.1. Material biológico

Se estudiaron 38 brotes de mastitis presentados en ovejas, cabras y vacas localizados en las provincias de Segovia, Zamora, Toledo, Avila y Madrid. De estos brotes 20 se presentaron en ovejas, 9 en vacas y 9 en cabras. Las muestras de los animales afectados se conservaron a 4°C en contenedores estériles hasta la llegada al laboratorio.

A.2.2. Siembra de las muestras y aislamiento

Las muestras remitidas a nuestro laboratorio se sembraron en agar sangre;

- Agar sangre de carnero: se utilizó como medio base "Blood Agar Base" (Difco). El medio se preparó según las normas del fabricante; después de enfriar el medio en Baño María hasta 45-50 °C se añadió asepticamente un 5-7% de sangre estéril de carnero desfibrinada (Oxoid).

Tabla III.1. Toxinas producidas por cada una de las cepas patrones utilizadas.

CEPAS PATRONES DE <i>S. aureus</i>	TOXINA PRODUCIDA
FRI-100	EEA
FRI-161	EEA
S6	EEA + EEB
FRI-350	EEB
FRI-379	EEB
FRI-1173	EEB
FRI-137	EEC ₁
FRI-361	EEC ₂ + EED
FRI-472	EED
FRI-326	EEE
FRI-1183	EEC ₁ + TSST-1
FRI-913	EEA + EEC ₁ + EEE + TSST-1

FRI: Food Research Institute (Wis. Mad. USA)



A.2.2.a. Metodología de aislamiento

La siembra de las muestras de leche en agar sangre se realizó añadiendo 100 μ l de leche con una pipeta automática (utilizando puntas de pipeta estériles para cada muestra) y extendiendo esta cantidad por la superficie de las placas con la ayuda de un asa de Drigalski. Posteriormente estas placas se incubaron a 37 °C durante 24-72 horas. Al cabo de este tiempo se realizó una selección de las colonias cuya morfología celular correspondía con las de cocos Gram positivos, catalasa positivos.

La tinción de Gram se llevó a cabo preparando los reactivos según la descripción dada por Harrigan y McCance (1979). La actividad catalasa se comprobó tomando una colonia con un asa de platino y emulsionándola en unas gotas de peróxido de hidrógeno al 10%; la aparición de burbujeo, por la liberación de oxígeno, se consideró como reacción positiva.

Las colonias seleccionadas se resembraron en agar sangre para obtener cultivos puros. Al cabo de 24-48 horas de crecimiento se volvió a comprobar que las características de los microorganismos eran las esperadas, procediéndose al almacenamiento de las mismas en un medio de congelación hasta su estudio posterior.

A.2.3. Conservación en congelación

Los microorganismos aislados se almacenaron en un medio de congelación.

Medio de almacenamiento en congelación:

- Triptona (Difco).....10 g
- Leche descremada en polvo (Nestlé).....20 g
- Glicerol (Panrsac).....80 ml
- Agua destilada.....320 ml

Se esterilizó en el autoclave a 110 °C durante 10 minutos. Posteriormente se distribuyó asepticamente en tubos estériles de poliestireno de 3 ml de capacidad. Los tubos se inocularon dos veces con asas de platino bien cargadas con el microorganismo a conservar y se congelaron a -20 °C.

A.2.4. Identificación

Estos microorganismos se diferencian mediante la prueba de la coagulasa, para diferenciar las biovariedades coagulasa positivas de las negativas.

A.2.4.a. Coagulasa

Para la realización de esta prueba se utilizó plasma-EDTA de conejo liofilizado (Difco), el cual se reconstituyó siguiendo las especificaciones del fabricante, repartiéndose después en cantidades de 0,5 ml en tubos estériles de 10 x 0,7 cm. Los tubos con el plasma rehidratado se inocularon con una o dos gotas de un cultivo de los distintos microorganismos en BHI de 18 horas, se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C. La lectura de la prueba se hizo a intervalos de tiempo de 1, 2, 3, 4 y 24 horas, de manera que los microorganismos que no coagulaban el plasma a las 24 horas, se consideraron coagulasa negativos. Como control negativo se utilizó un tubo de plasma que se inoculó con BHI estéril (Devriese y Hájek, 1980). Cada

microorganismo se testó al menos dos veces.

A.2.4.b. Identificación de las especies coagulasa positivas

Staphylococcus aureus (Kloos y Schleifer, 1986), Staphylococcus intermedius (Hájek, 1976) y Staphylococcus hyicus (Devriese et al., 1978; Hájek et al., 1986) son las tres especies que en Medicina Veterinaria muestran reacciones positivas en la prueba de la coagulasa en tubo. Estas tres especies pueden identificarse utilizando el esquema propuesto por Devriese y Hájek (1980) (tabla III.2.) para la identificación de los estafilococos patógenos aislados de animales. A estas tres especies hay que añadir la recientemente descrita Staphylococcus delphini (Varaldo et al., 1988).

Este esquema, además de la coagulasa, incluye cuatro pruebas principales, que permiten diferenciar estas especies coagulasa positivas entre sí; estas pruebas son:

- Pigmentación de las colonias: se utilizó el medio de agar "DNasa" (Difco) y se siguieron las recomendaciones de Devriese y Hájek (1980). Los microorganismos se sembraron por estría en la superficie del medio y se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. Se consideraron como pigmentadas las colonias que mostraban algún tipo de coloración.

- Actividad hemolítica: esta actividad se estudió en el medio "Blood Agar Base" (Difco) suplementado con un 5-7% de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid). Los microorganismos se sembraron por estría y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se realizó una primera lectura. Después se almacenaron a

Tabla III.2. Esquema para la identificación de las especies coagulasa positivas del género Staphylococcus. (Devriese y Hájek, 1980; modificado).

ESPECIES	CARACTERISTICAS PRINCIPALES				CARACTERISTICAS ADICIONALES		
	Pigmentos	Hemólisis	ADNasa	Clumping F.	Acetoina	Hialuronidasa	Manitol
<u>S. aureus</u>	+ ¹	+	+ ¹	+	+ ¹	+	+
<u>S. intermedius</u>	-	+	D	D	-	-	-
<u>S. hyicus</u>	-	-	+	-	-	+	-
<u>S. delphini</u>	-	+	-	-	-	#	-

Pigmentos y Hemólisis: todos los tipos e intensidades.

ADNasa; fuerte efecto. Clumping F.: Clumping Factor.

Manitol: anaeróbicamente.

[+]: más del 90 % de las cepas son positivas.

[-]: no se han encontrado cepas positivas entre las probadas.

[D]: resultados diferentes.

[#]: no determinado.

[1]: cepas de S. aureus aisladas de aves pueden ser ADNasa y acetoina negativas o débilmente positivas.

4 °C durante 12-18 horas y se efectuó una segunda lectura con el fin de constatar la posible presencia de hemólisis, también llamada efecto esfingomielinasa.

- Fuerte efecto ADNasa: la prueba se realizó en el medio de agar "DNasa" (Difco) para cuya preparación se siguieron las recomendaciones del fabricante. Los microorganismos se sembraron en estrias radiales y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La lectura se efectuó inundando, durante unos minutos, las placas con HCl 0,1 N. La producción del enzima se puso de manifiesto por la aparición de un halo transparente alrededor de la estria de crecimiento, quedando el resto de la placa opaca por la precipitación del ADN no despolimerizado.

- Factor de agregación ("clumping factor"): para su realización se depositó una gota de una solución salina fisiológica estéril en un portaobjetos, suspendiendo sobre ella varias colonias del microorganismo a estudiar. A esta suspensión se le añadió una gota de plasma-EDTA (Difco) reconstituido, mezclándola perfectamente con la suspensión de células, utilizando para ello un asa de platino; la aparición de grumos en toda la suspensión se consideró como reacción positiva.

A.2.4.c. Identificación de las especies coagulasa negativas

Para la identificación de estas especies recurrimos al "Api-Staph System" (Biomérieux). Este método se basa en la realización de una batería de 19 pruebas bioquímicas y un control negativo, que se encuentran de forma deshidratada dispuestas en una serie de pequeñas celdillas. La inoculación de los test se realizó añadiendo a cada celdilla

una pequeña cantidad (150-200 μ l) de una suspensión de la cepa problema. La batería de pruebas se incubó a 37 °C durante 24 horas. Las pruebas de que consta cada tira son las siguientes: producción de ácido a partir de glucosa, fructosa, manosa, maltosa, lactosa, trehalosa, manitol, xilitol y melibiosa, rafinosa, xilosa, sacarosa, alfa-metil-D-glucosa y N-acetil glucosa, reducción de nitratos a nitritos, fosfatasa alcalina, Voges-Proskauer, arginina deshidrolasa y ureasa.

La inoculación se practicó siguiendo las instrucciones del fabricante y la interpretación se realizó utilizando el programa de ordenador "APILAB". El sistema de identificación del "Api-Staph System" está basado en la clasificación de Kloos y Schleifer (1975).

A.3. INDUCCION A LA PRODUCCION DE EE Y TSST-1

A.3.1. Material

Se siguió la técnica de celofán sobre agar (Hallander, 1965) para la cual se empleó:

- Tubo de diálisis (Spectrapor) de 73 mm de diámetro inflado y 115 mm de diámetro plano, cuya pared era de un grosor de 0,074 mm.

- Infusión de cerebro y corazón (BHI) (Pronadisa): para su preparación se suspendieron 37 g del producto deshidratado en un litro de agua destilada, se homogeneizó, y se distribuyó en tubos. Posteriormente los tubos se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos.

- Agar de infusión de cerebro y corazón: se utilizó BHI (Pronadisa) al cual se añadió agar bacteriológico (Oxoid). Para prepararlo se añadieron 37 g de BHI y 15 g de agar a un litro de agua destilada. Posteriormente se calentó en baño de agua en ebullición hasta la total disolución de los componentes y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Después de que se enfriara el medio de cultivo hasta 45-50 °C se distribuyó en placas de petri de plástico estériles.

A.3.2.Método

En la producción de EE se siguió el método de celofán sobre agar descrito por Hallander (1965) y modificado por Jarvis y Lawrence (1970). Para su realización se cortó papel de celofán de un tubo de diálisis en círculos de tamaño algo superior al de una placa de petri de 9 cm de diámetro. Alternando un círculo de celofán con otro de igual tamaño de papel de filtro humedecido para facilitar su separación, se recubrieron con papel de aluminio, esterilizándose posteriormente en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez estériles se depositaron asepticamente los círculos de celofán sobre la superficie de las placas de agar BHI con la ayuda de unas pinzas ejerciendo presión con las mismas para que la adhesión al medio fuera correcta.

La siembra de las placas se realizó depositando sobre la membrana 200 μ l de un cultivo en BHI de 48-72 horas de la cepa y se extendió con la ayuda de un asa de Drigalski. Posteriormente se incubaron las placas a 37 °C durante 48 horas en posición no invertida, al cabo de las cuales se retiraron las células y los productos que se hallaban sobre la membrana mediante la adición de 2,5 ml de una solución de Na_2HPO_4 0,01 M, arrastrándose mediante un asa de Drigalski.

La suspensión arrastrada se sedimentó en una centrífuga de mesa a 2.000 rpm durante 10 minutos, analizándose el sobrenadante (extracto) para detectar la presencia de EE. Las membranas de celofán fueron recicladas lavándose primero con agua corriente, luego con agua destilada, y por último, con agua desionizada.

B. MUESTRAS DE ALIMENTOS

B.1. ALIMENTOS UTILIZADOS

Se emplearon los siguientes 5 tipos de alimentos, todos ellos comerciales: leche, yogur, queso, mayonesa y salchichas.

B.2. INOCULACION DE LOS ALIMENTOS CON EE

Se utilizaron EE purificadas cedidas por el "Food Research Institute" (Wisc. Mad.). Se distribuyeron 100 g de cada uno de los alimentos en dos contenedores (50 g por contenedor), añadiéndose 90 μ l de una concentración de 100 μ g/ml de cada una de las EE a cada muestra, dando una concentración final de 9 μ g de EE por muestra.

B.3. EXTRACCION DE EE A PARTIR DE LOS ALIMENTOS

B.3.1. Material

Los reactivos que se emplearon para este objetivo fueron:

- HCl 6N.
- NaOH 5N.
- Cloroformo.
- Carbowax 20.000 (Fluka).

Dentro de los aparatos utilizados destacan los agitadores magnéticos y la centrifuga (Sorval, RC-SB).

B.3.2. Método

Para la extracción de las EE de los alimentos se siguió el método descrito por Reiser et al. (1974). Este método consta de los siguientes pasos:

- 1) Añadir, en algunos casos, agua destilada; así se añadieron 50 ml a las muestras de queso y salchichas, 25 ml a las de yogur y mayonesa, y no se añadió agua a las muestras de leche.
- 2) Cuando la muestra era semisólida se agitó vigorosamente a fin de conseguir una mezcla homogénea de ambas fases, pero cuando era sólida (queso y salchichas) hubo que proceder a triturar, con la ayuda de un homogeneizador de brazo vertical.
- 3) A continuación se realizó una precipitación ácida, ajustando el pH a 4,5 con HCl 6N en aquellos casos en que éste era superior a dicho valor.

4) Se vertió el contenido en tubos de centrifuga de acero inoxidable de 280 ml de capacidad, procediéndose a centrifugar las muestras a $23.430 \times g$ durante 25 minutos a $4^{\circ}C$.

5) Se despreció el precipitado, ajustándose el sobrenadante a pH 7,5 con NaOH 5N.

6) Después de medir el volumen con una probeta se añadió cloroformo para obtener una concentración del 15% v/v, a fin de conseguir la extracción de los lípidos; se dejó esta mezcla en un agitador magnético a 100 rpm durante 3 a 5 minutos.

7) Posteriormente a la realización de otra centrifugación de iguales características que la anterior, el sobrenadante fue filtrado lentamente a través de una tela de batista, a fin de retirar el cloroformo.

8) Se concentró la muestra mediante diálisis frente a Carbowax 20.000 (Fluka) hasta que el volumen era aproximadamente de 10 ml.

De cada una de las dos muestras, una de ellas se sometió a un proceso de extracción completo y en la otra el proceso se realizó sólo hasta la neutralización con NaOH 5N (proceso de extracción parcial).



C.DETECCION DE EE Y TSST-1

C.1.TECNICA ELISA

C.1.1.Material

El material empleado para la realización de esta técnica fue el siguiente:

- Placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Microtiter).
- Pipeta multicanal (8 canales) graduable de 50 a 250 μ l (Titertek).
- Pipetas digitales graduables de distintos volúmenes (1-50 μ l, 50-250 μ l, 200-1.000 μ l) (Gilson).
- Lector de ELISA (Dynatech, modelo MR 580).

C.1.2.Reactivos y tampones

* Tampón carbonato sódico 0,01 M, pH 9,6.

Solución A.....1) NaHCO_3 (Panreac).....0,84 g
2) Agua destilada.....1.000 ml
Solución B.....1) Na_2CO_3 (Panreac).....1,06 g
2) Agua destilada.....1.000 ml

Se añadió la solución B sobre la A, con agitación constante, hasta alcanzar el valor de pH de 9,6.

* Solución tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7,2.

- 1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac).....1,78 g
- 2) NaCl (Panreac).....9,0 g
- 3) Agua destilada.....1.000 ml

Después de disolver los componentes se ajustó el pH a 7,2 con HCl 6N. Se puede conservar en refrigeración.

* Solución PBS-Tween.

Se preparó añadiendo 1 ml de Tween-20 (Panreac) por cada litro de PBS 0,01 M.

* Solución de sustrato.

a) Solución tampón citrato:

Solución A (ácido cítrico 0,11 M):

- 1) Ácido cítrico (Panreac).....2,14 g
- 2) Agua destilada.....100 ml

Solución B (fosfato disódico 0,02 M):

- 1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac).....3,56 g
- 2) Agua destilada.....100 ml

Para su preparación se añadió la solución B sobre la A hasta que se consiguió un pH de 5,0. Se conservó a temperatura de refrigeración.

b) Solución de uso (sustrato)

- 1) Ortofenildiamina (OPD) (Sigma)...60 mg
- 2) Solución tampón citrato.....100 ml
- 3) H_2O_2 (30%) (Panreac).....40 μl

Esta solución se preparó inmediatamente antes de su uso y no se puede conservar.

* Las toxinas, tanto crudas como purificadas, y sus correspondientes antisueros fueron cedidos por el "Food Research Institute" (Wis. Madison).

* Suero normal de conejo (SNC): se utilizaron dos conejos de raza Nueva Zelanda sin inocular, a los que se extrajo sangre mediante una bomba de vacío. Para realizar la sangría se depiló el recorrido de la vena marginal de la oreja, se limpió con alcohol y se procedió a dar un corte transversal mediante una hoja de bisturí a dicha vena; posteriormente se introdujo un recipiente conectado a una bomba de vacío que se ajustaba en la oreja y en el que se encajaba un tubo de centrifuga de 50 ml. Cuando se obtuvo el volumen deseado (generalmente 25 ml) se retiró el recipiente y se aplicó una torunda de algodón en el lugar de la incisión. La sangre se dejó coagular a 4 °C durante 24 horas; transcurrido este tiempo se procedió a verter el suero en tubos de centrifuga y se realizó el centrifugado de las muestras (23.430 x g durante 20 minutos). Después de este paso, el sobrenadante fue sometido a un proceso de inactivación del complemento mediante una incubación del suero a 56 °C durante 30 minutos en un baño María.

C.1.3. Marcaje de las inmunoglobulinas con peroxidasa

C.1.3.a. Material

El marcaje de las inmunoglobulinas específicas se realizó con el enzima peroxidasa para lo cual se utilizó:

- Peroxidasa de rábano picante (tipo VI Sigma).
- Carbonato sódico 0,3 M, pH 8,1:
 - 1) NaHCO_3 (Panreac).....12,6 g
 - 2) Agua destilada.....500 ml
 El pH se ajusta con HCl 1 N y con NaOH 2 N.
- Fluorodinitro benceno (FDNB) (Fluka) al 1%: se preparó disolviendo 1 g de FDNB en 100 ml de alcohol absoluto.
- M-periodato sódico 0,08 M (Sigma): para su preparación se disolvieron 0,856 g en 50 ml de agua destilada.
- Etilen glicol 0,16 M (Merck): se diluyeron 0,9 ml de etilen glicol en 9,1 ml de agua destilada.
- Borohidrato sódico (Fluka).
- Tampón carbonato sódico 0,01 M, pH 9,6 (ver apartado C.1.2.)
- Solución tampón PBS pH 7,2 (ver apartado C.1.2)
- Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma).

C.1.3.b.Método

Para la conjugación de las inmunoglobulinas con el enzima elegido se siguió la técnica de Nakane y Kawasoi (1974) con ligeras modificaciones en el sentido de reducir el número de pasos, puesto que se observó que no mejoraban la sensibilidad ni determinaban la aparición de reacciones inespecíficas en la técnica.

La metodología seguida fue la siguiente:

- 1) Se disolvieron 5 mg de peroxidasa de rábano picante en 1,0 ml de NaHCO_3 0,3 M, pH 8,1 (preparado inmediatamente antes de su uso).

2) A la solución anterior se le añadió 0,1 ml de una solución de FDNB al 1% en alcohol absoluto, con el fin de bloquear los grupos alfa y epsilon amino, así como los grupos hidroxilo de la peroxidasa. De esta forma se evita que esta se conjuga consigo misma pero permitiendo a la vez la formación de bases de Schiff con los grupos alfa y epsilon amino de las proteínas disponibles.

3) Una vez agitada suavemente la mezcla en un agitador orbital durante una hora, se añadió 1,0 ml de m-periodato sódico 0,08 M en agua destilada, continuando la agitación durante otros 30 minutos. La oxidación de la porción glucídica de la molécula de peroxidasa por este compuesto permita la formación de aldehídos que dan lugar a las bases de Schiff, puentes entre el enzima y los anticuerpos.

4) Se añadió a continuación 1,0 ml de etilén glicol 0,16 M en agua destilada, con el objeto de frenar la reacción y se mezcló mediante agitación suave durante una hora a temperatura ambiente.

5) A continuación se introdujo la solución en un tubo de diálisis (tipo 8/32) y se dializó frente a 3 volúmenes de un litro de tampón carbonato sódico 0,01 M, pH 9,5 a 4 °C con el objetivo de restablecer la actividad enzimática perdida.

6) Al día siguiente se añadieron 10 mg de inmunoglobulina G purificada, disuelta en 1,0 ml de tampón carbonato 0,01 M, pH 9,5. La mezcla se agitó suavemente por espacio de 2 a 3 horas a temperatura ambiente.

7) Se añadió a continuación 5 mg de borohidrato sódico, permitiendo que reaccionaran durante 3 a 18 horas a 4 °C, y así estabilizar las bases de Schiff formadas.

8) Tras dializar la solución a 4 °C frente a PBS 0,01 M, pH 7,2 durante 18 horas, se procedió a distribuir el conjugado en alícuotas adecuadas según la potencia del mismo.

9) Para su conservación se añadieron 10 mg/ml de BSA y se almacenó a -20 °C.

C.1.4. Método

Una vez obtenidos los extractos se procedió a determinar la producción de EE y TSST-1 de los estafilococos, utilizando la técnica ELISA doble "sandwich" de anticuerpos (DAS) (Freed *et al.*, 1982) por la cual el antígeno reacciona tanto con los anticuerpos que tapizan la placa de microtitulación como con los que están conjugados con el enzima, obtenidos ambos en el mismo animal.

La realización de esta técnica consta de las siguientes etapas:

1) Diluir las inmunoglobulinas en tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6 a la concentración de 7,5 µg/ml. Esta dilución se realizó a partir de una solución madre (las concentraciones de cada una de las Ig G específicas utilizadas se muestran en la tabla III.1.).

2) Añadir 100 µl de las Ig diluidas a 7,5 µg/ml en todos los pocillos, excepto en las filas denominadas A

y H (extremos superior e inferior respectivamente) que se rellenaron con 200 μ l de agua corriente, a fin de evitar la desecación.

3) Cubrir la placa con una lámina de parafilm y su tapa correspondiente e incubar a 37 °C en agitación (100 rpm) durante 14-18 horas.

4) Lavar la placa 3 veces consecutivas con PBS-Tween, dejando reposar el tampón de lavado durante 5 minutos cada vez, para luego retirarlo con sacudidas enérgicas. Después del último lavado se seca la placa golpeando la misma contra un papel de filtro doblado.

5) Añadir los extractos, a los que previamente se había añadido una cantidad igual de SNC dejando incubar la mezcla 18 horas a 4 °C, por duplicado (100 μ l por pocillo) excepto en los pocillos patrón reservados para añadir, también por duplicado, las distintas diluciones de la EE o de la TSST-1 patrón correspondiente. Estas diluciones se realizaron en PBS-Tween y fueron las siguientes: 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 ng/ml respectivamente. Los extractos y la EE o TSST-1 patrón se incubaron durante 3 horas en agitación (100 rpm) a 37 °C.

6) Lavar 3 veces con PBS-Tween.

7) Añadir el conjugado anti-EE o anti-TSST-1; éste se diluye en PBS-Tween a las concentraciones óptimas (tabla III.4.) añadiendo 50 μ l por pocillo e incubando 30 minutos en agitación a 37 °C.

8) Lavar 3 veces con PBS-Tween.

Tabla III.3. Concentraciones iniciales de las inmunoglobulinas específicas (Ig).

INMUNOGLOBULINA ESPECÍFICA	CONCENTRACION INICIAL (mg/ml)
IgG-EE-A	18,5
IgG-EE-B	6,8
IgG-EE-C ₁	18,6
IgG-EE-D	26,4
IgG-EE-E	34,4
IgG-TSST-1	30,0

Tabla III.4. Diluciones de uso óptimas del conjugado.

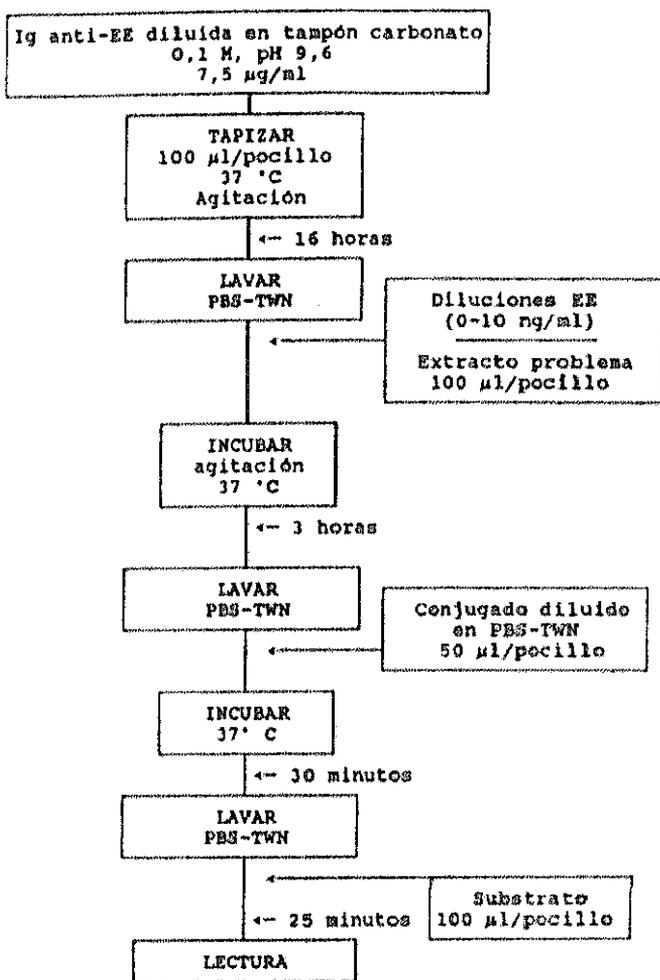
CONJUGADO	DILUCION EMPLEADA (μ l)
C-EE-A	1:250
C-EE-B	1:300
C-EE-C	1:300
C-EE-D	1:300
C-EE-E	1:300
C-TSST-1	1:300

9) Añadir la solución de sustrato en la cantidad de 100 μ l por pocillo, permitiendo que se oxide el cromógeno.

10) Leer la placa mediante el lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. El tiempo que pasa desde la adición del sustrato hasta la lectura suele ser de 5 a 25 minutos.

El cálculo de la concentración de EE o de TSST-1 presentes en el extracto se realizó por comparación de la absorbancia de ésta con la obtenida con la EE o TSST-1 patrón de esa misma placa, calculándola de forma teórica con un programa incorporado en la calculadora científica Texas Instruments TI-56. Tras introducir los valores de la absorbancia para cada dilución de la EE patrón se podía hallar el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta y la intercepción en el eje de ordenadas, así como la concentración de EE o de TSST-1 para cualquier valor de absorbancia. Hay que tener en cuenta que el extracto se encontraba diluido al 50%, por el hecho de añadir el SNC, y por esta razón, debemos multiplicar por dos los resultados obtenidos.

Cada extracto se probó para la posible presencia de las EE (A, B, C, D y E) y para la toxina TSST-1. Se consideró como producción positiva las concentraciones superiores a 2 ng/ml.



PBS-TWN: PBS 0,01 M, pH 7,2 + Tween 20 al 0,1%

Diagrama III.1. Diagrama de flujo de la secuencia de pasos en el método ELISA.

C.2. TECNICA DE TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA

C.2.1. Material

El material necesario para la realización de esta técnica es el siguiente:

- Sistema de electroforesis semiautomático, consistente en una unidad de separación y control, y una unidad de desarrollo "Phast System" (Pharmacia).
- Cubeta de transferencia eléctrica (LKB, modelo 2005 Transphor).
- Agitador orbital.
- Pipetas digitales.
- Geles ultrafinos (45 x 35 x 0,5 mm) de electroforesis SDS-poliacrilamida "Phast Gel Gradient 8-25" (Pharmacia).
- Tiras de tampones para los geles SDS "Phast Gel SDS Buffer Strips" (Pharmacia).
- Aplicadores de muestra "Phast Gel Sample Applicator 8/1" (Pharmacia).
- Kit de calibración peso molecular del tipo bajo peso molecular "LMW" (Pharmacia).
- Soporte de madera y cuerda de piano (0,2 m/m).

C.3.2. Reactivos y tampones

Los reactivos y tampones utilizados fueron:

* Tampón de transferencia 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,3:

- 1) Tris (hidroximetil) aminoetano (Merck)...15,1 g
- 2) Glicina (Merck).....76,06 g
- 3) Metanol (Merck).....1.000 ml
- 4) Agua destilada4.000 ml

Este tampón no se debe ajustar con HCl; se puede conservar hasta un mes a 4 °C.

* Tampón de bloqueo: es un tampón fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M, Tween-20 al 0,5%, pH 7,3.

- Solución A..1) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Panreac).....1,38 g
- 2) NaCl (Panreac).....8,76 g
 - 3) Agua destilada.....1.000 ml

- Solución B..1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)....1,78 g
- 2) NaCl (Panreac).....8,76 g
 - 3) Agua destilada.....1.000 ml

Se añade la solución B sobre la A hasta llegar al pH indicado y posteriormente se añaden 5 ml de Tween-20 por litro.

* Tampón de lavado: NaCl 0,15 M, Tween-20 al 0,5%:

- 1) NaCl (Panreac).....8,76 g
- 2) Tween-20 (Panreac).....5,0 ml
- 3) Agua destilada.....1.000 ml

* Tampón de muestra: PBS 0,01 M, pH 7,3, 10% SDS, 10% 2-mercaptoetanol; el PBS se preparó igual que para el tampón de bloqueo. Para preparar este tampón se disolvió 1 g de SDS (Fluka) en 10 ml de PBS 0,01 M, pH 7,3 y posteriormente se añadió 1 ml de 2-mercaptoetanol (Fluka). A este tampón se le añadieron 5 μ l de azul de bromofenol (Fluka) al 0,005%.

* Solución de substrato-diaminobencidina (DAB):

- 1) Tampón de bloqueo (sin Tween-20).....100 ml
- 2) DAB (Sigma).....50 mg
- 3) H₂O₂ 33% (Panreac).....100 μ l

* Solución de substrato-4 cloro-1 naftol.

Tampón 20 mM Tris, 0,5 M NaCl:

- 1) Tris (hidroximetil) aminoetano (Merck)..0,24 g
- 2) NaCl (Panreac).....1,46 g
- 3) Agua destilada.....100 ml

Para preparar esta solución se disuelven 10 mg de 4-cloro-1-naftol (Fluka) en 3,3 ml de metanol (Panreac) en frío; posteriormente se añaden 16,7 ml de tampón Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, conteniendo 10 μ l de H₂O₂ al 33% en frío; esta solución se usa inmediatamente y no se conserva.

* Toxinas e inmunoglobulinas específicas (las mismas que las empleadas para la realización de la técnica ELISA).

* Conjugado anti-especie: suero obtenido en cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugadas con peroxidasa (Dakopatts).

* Sistema avidina-biotina: compuesto por un conjugado de peroxidasa-estreptoavidina (BRL) y anticuerpos de cabra biotinados anti-inmunoglobulinas de conejo (BRL).

* Proteína A (Sigma).

* Membranas inmovilizantes: NC de 2 casas comerciales ("Schleicher & Schull" y Millipore) y PVDF (Millipore).

C.2.2.a. Soluciones utilizadas en la tinción con azul de Coomassie

a) Solución de tinción: solución de "Phast Gel Blue R" (Pharmacia) al 0,1% en 30% de metanol (Panreac) y 10% de ácido acético (Panreac) en agua destilada.

- Solución "stock": se disolvió una tableta de "Phast Gel Blue R" en 80 ml de agua destilada y se agitó durante 5-10 minutos; posteriormente se añadieron 120 ml de metanol (Panreac) y se agitó durante 2-3 minutos (esto hace una solución del 0,2%).

- Solución final: se mezcló una parte de la solución "stock" filtrada (50 ml) con una parte de 20% de ácido acético (Panreac) en agua destilada (40 ml de agua destilada y 10 ml de ácido acético); esta

solución se preparó el mismo día de la realización de la electroforesis y no se puede reciclar.

b) Solución de desteñido: 30% de metanol (Panreac) y 10% de ácido acético (Panreac) en agua destilada. Se prepararon 100 ml (90 de metanol, 10 de ácido acético y 100 de agua destilada).

c) Solución de conservación: 10% de glicerol (Panreac) y 10% de ácido acético (Panreac) en agua destilada; se prepararon 100 ml (10 de glicerol, 10 de ácido acético y 80 de agua destilada); esta solución ayuda a mantener el gel flexible y resistente.

C.2.3. Preparación de la muestra para una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

Se añaden 10 μ l de la solución de muestra a 90 μ l de la muestra (así la concentración final de SDS y mercaptoetanol es, en ambos casos, del 1%). Esta mezcla se introdujo en un tubo Eppendorf y se sometió a un tratamiento térmico de 100 °C durante 5 minutos. La muestra se preparó poco antes de realizar la electroforesis pero también se puede mantener congelada a -20 °C.

C.2.4. Métodos

Para conseguir la optimización de la técnica de transferencia electroforética se utilizaron distintas diluciones de EE y TSST-1 purificadas a unas concentraciones de 500, 200, 100, 50, 20, 10 y 5 ng/ml. Una vez comprobados los mejores resultados con las distintas variaciones empleadas en los pasos de electroelución e inmunodetección se

utilizó la técnica optimizada para analizar EE y TSTT-1 crudas y purificadas (a una concentración de 100 ng/ml), Kit de bajo peso molecular, extractos de alimentos, extractos de cepas patrones de Staphylococcus aureus, extractos de estafilococos aislados de mastitis y proteína A (a una concentración de 100 ng/ml). En el caso de los extractos de alimentos se utilizaron extractos blanco y extractos con o sin proceso completo de extracción.

Para realizar la electroforesis se utilizaron aplicadores de 8 muestras utilizando, excepto en el proceso de optimización, la muestra número 1 para la EE patrón, y las restantes 7 muestras para los extractos a analizar.

C.2.4.a. Electroforesis SDS-poliacrilamida

La electroforesis se realizó siguiendo las instrucciones del "Phast System":

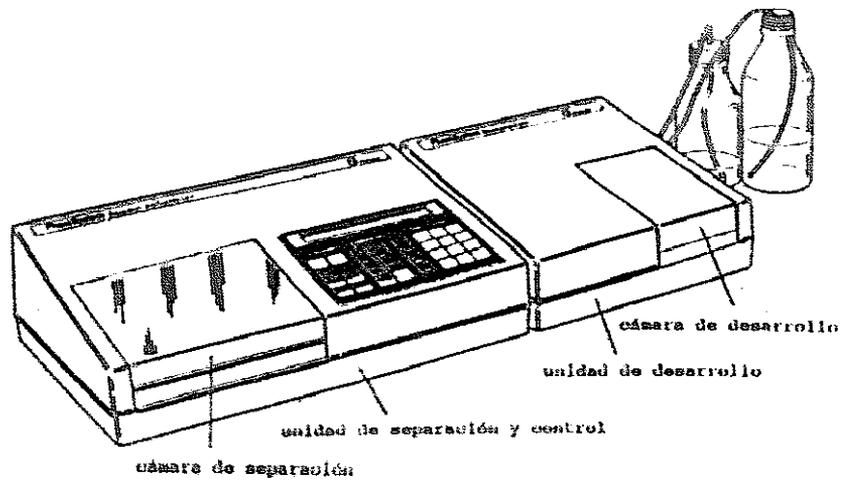
- Enfriar la cama de los geles (situada en la unidad de separación y control) hasta 15 °C.
- Añadir 100 µl de agua destilada en el área donde vamos a colocar los geles.
- Sacar el gel de su envoltura y separarlo de la cubierta protectora de plástico con la ayuda de unas pinzas.
- Depositar el gel en el lugar correspondiente de la unidad de separación y control, evitando la formación de burbujas.
- Secar la zona que bordea al gel con un papel de filtro.
- Colocar el soporte de las pastillas de tampón.
- Introducir las pastillas de tampón en su soporte, utilizando guantes para evitar la contaminación debida

a las proteínas de los dedos.

- Bajar la unidad de electrodos y comprobar que éstos contactan con las tiras de tampón.
- Cortar una tira de Parafilm y aplicarla sobre el molde de las muestras (utilizando guantes) para producir unas depresiones en el Parafilm.
- Llenar las depresiones con las muestras utilizando una micropipeta (aproximadamente 5 μ l por pocillo) evitando la formación de burbujas.
- Depositar el aplicador de muestras sobre el conjunto Parafilm-molde (por capilaridad ascienden las muestras al aplicador).
- Colocar el aplicador de muestras en el lugar correspondiente de la unidad de separación y control.
- Realizar la electroforesis bajo las siguientes condiciones: 250 v, 10.0 mA, 3.0 w, 15 °C hasta completar 65 vh; la electroforesis dura aproximadamente 30 minutos.

C.2.4.b.Tinción azul de Coomassie

Utilizamos la técnica de tinción con azul de Coomassie. Se realizó una electroforesis SDS-poliacrilamida, incluyendo un kit de bajo peso molecular y EE purificadas de todos los tipos, además de TSST-1, a una concentración de 50 μ g/ml; posteriormente colocamos el gel en la unidad de desarrollo y se procedió a realizar el método de tinción con azul de Coomassie para geles SDS-poliacrilamida. Para todo ello se siguieron las instrucciones del "Phast System".



PhastSystem

Fig. III.1. Representaciones del sistema de electroforesis Phast System (Pharmacia), que ilustran dicho sistema y la metodología en su utilización. (Pharmacia, 1986).

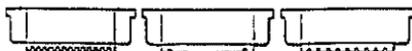
Tiras de tampón PhastGel



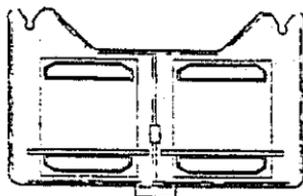
Molde de muestras PhastGel



Medio de separación PhastGel

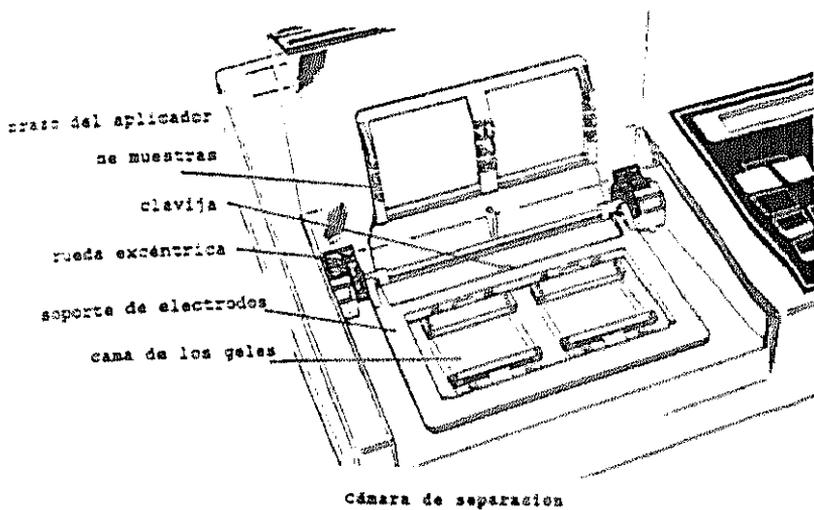


Aplicadores de muestra PhastGel

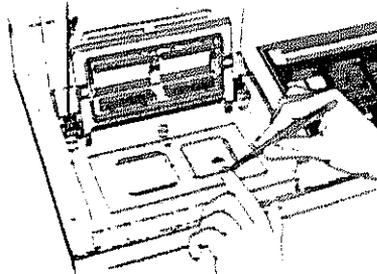


Soporte de tiras de tampón PhastGel

Fig. III.1. Continuación.



rueda excéntrica
 en posición superior



Colocación de los geles

Fig. III.1. Continuación.

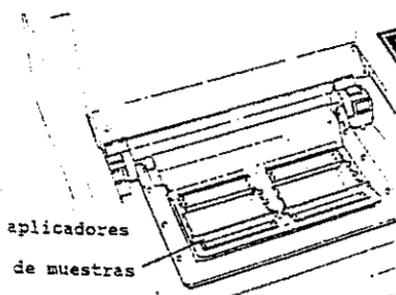
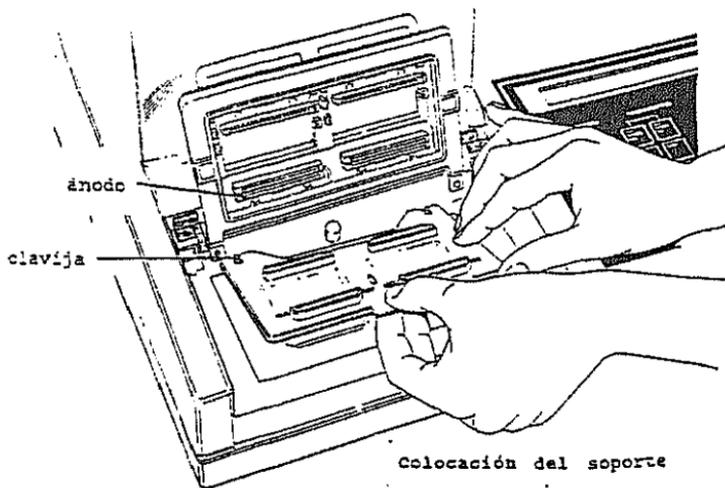


Fig. III.1. Continuación.

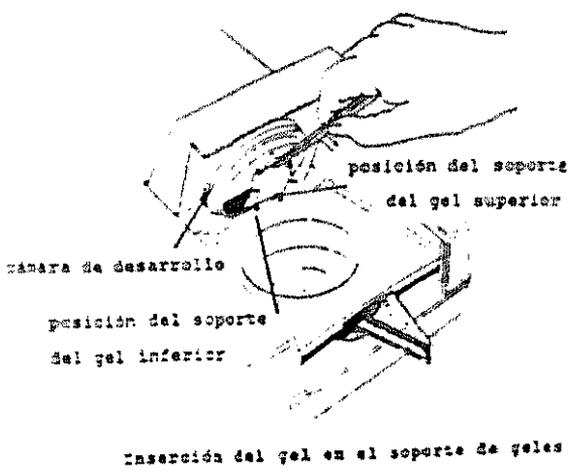
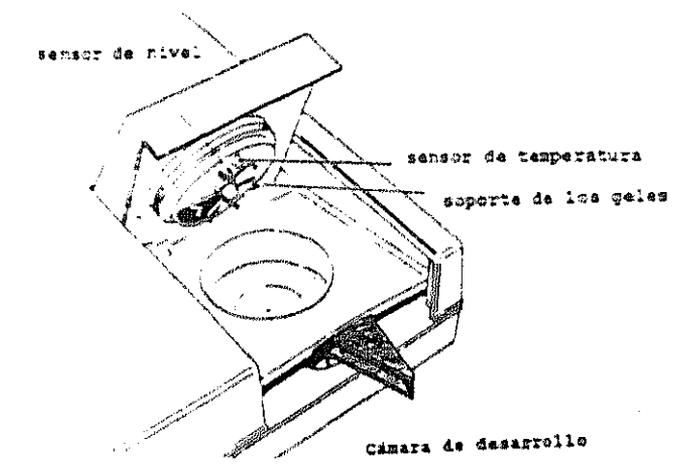
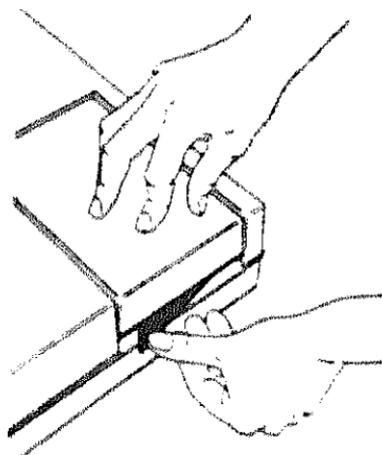


Fig. III.1. Continuación.



Cierre de la tapa
de la cámara de desarrollo

Fig. III.1. Continuación.

El método de azul de Coomassie consta de los siguientes pasos:

- 1) Solución de tinción: 8 minutos.
- 2) Solución de lavado/desteñido: 5 minutos.
- 3) Solución de lavado/desteñido: 8 minutos.
- 4) Solución de lavado/desteñido: 10 minutos.
- 5) Solución preservadora: 5 minutos.

Todos los pasos se realizaron a 50 °C y el tiempo total de duración es de aproximadamente 40 minutos.

C.2.4.c. Electroelución

Después de realizar la electroforesis se realizó la electroelución que consta de las siguientes etapas:

- Equilibrar el gel en el tampón de transferencia durante 5 minutos.
- Colocar el gel sobre un soporte de madera, fijándolo al mismo mediante unas chinchetas.
- Retirar mediante una espátula la parte del gel que se encuentra por encima del frente de las muestras y la zona de empaquetamiento.
- Separar el gel de su soporte plástico (con la ayuda de una cuerda de piano) empezando a separar desde la zona de gradiente de alta concentración hacia la zona de empaquetamiento. (Fig. III.2).
- Aplicar una membrana, equilibrada en tampón de transferencia, sobre el gel. El conjunto gel-membrana se coloca entre dos papeles de filtro y este conjunto, siempre con el gel en el lado del cátodo y la membrana del lado del ánodo (las proteínas migran desde el polo negativo al positivo), se sitúa entre dos palas de

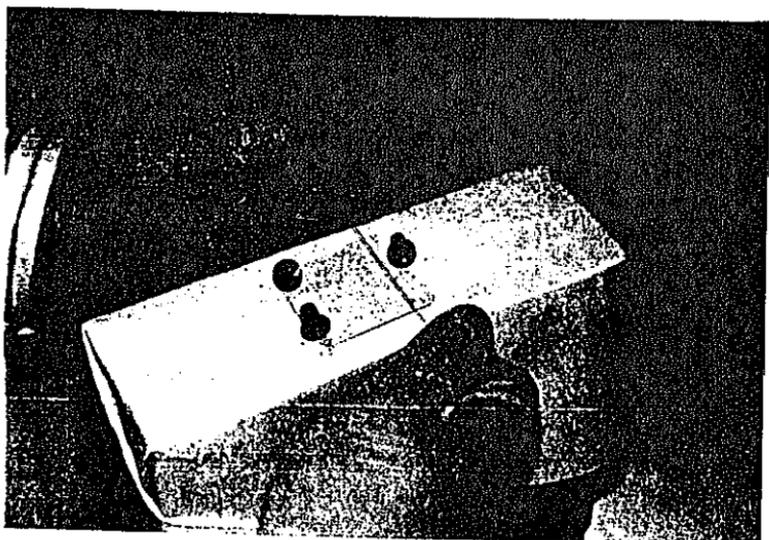


Fig. III.2. Separación del gel de su soporte plástico.

esponjas y se introduce en la cubeta de transferencia.

Para realizar la electroelución y la inmunodetección se siguió un esquema o metodología basado en el método de Towbin et al. (1979) y las instrucciones del "Phast System", haciendo variaciones en cada uno de los pasos, con el objetivo de optimizar la técnica.

Dado el elevado número de elementos para probar (tipo de membrana, tiempo de electroelución, voltaje de la electroelución, etc.), el número de combinaciones posibles era muy elevado por lo que se varió cada vez uno sólo de los elementos manteniendo constantes el resto. Esto es, dentro de las posibilidades de cada elemento se mantuvo uno fijo en todas las pruebas, excepto cuando se probó dicho elemento. Por ejemplo: como membrana de referencia se utilizó la NC de la marca "Schleicher & Schull", que se empleó en todas las pruebas salvo cuando comparábamos los diferentes tipos de membranas.

Condiciones de electroelución: la cubeta de transferencia utilizada permitía variar el voltaje (indicado en tantos por ciento) con lo cual se modificaba la intensidad de la corriente eléctrica. Como voltaje de referencia se utilizó el de 60%. Para optimizar la técnica se emplearon también los siguientes voltajes: 10, 20, 30, 40, 50, 70 y 80%. El tiempo de electroelución de referencia fue de 45 minutos; otros tiempos probados fueron: 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos.

Membranas inmovilizantes: como membrana de referencia utilizamos la NC de la marca "Schleicher & Schull"; otras membranas testadas fueron: NC Millipore y PVDF.

Bloqueo de la matriz inmovilizante: una vez realizada la electroelución se separó el gel de la membrana y se procedió a realizar el bloqueo de la misma mediante la incubación de la matriz inmovilizante en el tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

C.2.4.d. Inmunodetección

Para realizar la inmunodetección se realizaron los siguientes pasos:

1) Incubación con los anticuerpos específicos: como referencia se utilizó una dilución 1:1.000 preparada poco antes de su uso, de los anticuerpos diluidos en tampón de bloqueo. El tiempo de incubación de referencia fue de 120 minutos. Otras diluciones de los anticuerpos utilizadas fueron las de 1:250, 1:500, 1:2.000, 1:5.000; también se emplearon los tiempos de incubación de 30, 60 y 180 minutos.

2) Lavado: después de la incubación con los anticuerpos, la membrana se sometió a 3 lavados de 5 minutos cada uno con la solución de lavado.

3) Conjugado: se utilizó un suero anti inmunoglobulinas de conejo, obtenido en cerdo, marcado con peroxidasa a una dilución de referencia de 1:1.000 y con un tiempo de incubación de referencia de 60 minutos. Otras diluciones empleadas fueron: 1:250, 1:500, 1:2.000 y 1:5.000 y otros tiempos de incubación: 30, 120 y 180 minutos. Las diluciones del conjugado se prepararon poco antes de su uso diluyéndolas en tampón de bloqueo.

4) Lavado: se realizaron 3 lavados de 5 minutos con la solución de lavado.

5) Substrato: se utilizó como referencia el DAB si bien también se comparó con el 4-cloro-1-naftol.

Sistema avidina-biotina: como alternativa a la utilización del conjugado anti especie se utilizó un sistema avidina-biotina consistente en un suero anti inmunoglobulinas de conejo conjugado a biotina y de avidina conjugada a peroxidasa. Se probaron diluciones de 1:250, 1:500, 1:1.000, 1:2.000 y 1:5.000; todas las diluciones se realizaron en tampón de bloqueo y se prepararon poco antes de su uso. Las diluciones eran las mismas para cada uno de los dos elementos; esto es, si la dilución del suero anti inmunoglobulinas de conejo biotinadas era de 1:250 la dilución de la avidina conjugada a peroxidasa era también de 1:250.



Tabla III.5. Valores empleados dentro de cada uno de los parámetros que integran la técnica de transferencia electroforética.

PARAMETRO	VALOR REFERENCIA	OTROS VALORES USADOS
Voltaje	60 %	10, 20, 30, 40, 50, 70 y 80 %
Tiempo electroelución	45 minutos	15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos
Membrana inmovilizante	NC Schleicher & Schull	NC Millipore y PVDF
Ac. específicos (dilución)	1:1.000	1:250, 1:500, 1:2.000 y 1:5.000
Ac. específicos (tiempo)	120 minutos	30, 60 y 180 minutos
Conjugados específicos (dilución)	1:1.000	1:250, 1:500, 1:2.000 y 1:5.000
Conjugados específicos (tiempo)	60 minutos	30, 120 y 180 minutos
Substrato	DAB	Cloronaftol
Sistema Avidina-Biotina		1:250, 1:500, 1:1.000, 1:2.000 y 1:5.000

NC: Nitrocelulosa
 Ac.: Anticuerpos.
 DAB: Diaminobencidina.

Capítulo IV: RESULTADOS Y DISCUSION



A. UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA PARA LA DETECCIÓN DE EE Y TSST-1

A.1. COMPROBACION DEL PESO MOLECULAR Y DEL GRADO DE PUREZA DE LAS EE Y TSST-1 PATRONES MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-POLIACRILAMIDA

A.1.1. Resultados

Se realizó una electroforesis SDS-poliacrilamida incluyendo 8 muestras: EE de los distintos tipos (A-E) y TSST-1 purificadas a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y un kit de bajo peso molecular (Pm) preparado según las instrucciones del fabricante. Para la tinción de las proteínas en el gel se utilizó la técnica del azul de Coomassie. Tanto en las EE, como en la TSST-1, apareció una sola banda a la altura de la banda de migración de la anhidrasa carbónica (Pm 30.000) (Fig. IV.1.).

A.1.2. Discusión

El uso de los geles SDS-poliacrilamida permite conocer el grado de pureza de una proteína, el número de subunidades y su Pm (Shapiro *et al.*, 1967; Webern y Osborn, 1969). Esta técnica presenta varias ventajas, entre las que destacan:

- 1) Simplicidad.
- 2) Se requieren pequeñas cantidades de proteína.
- 3) Alta resolución.

En este método se obtiene el Pm de la proteína a estudiar mediante la comparación de su movilidad electroforética con la de las proteínas estándar de Pm

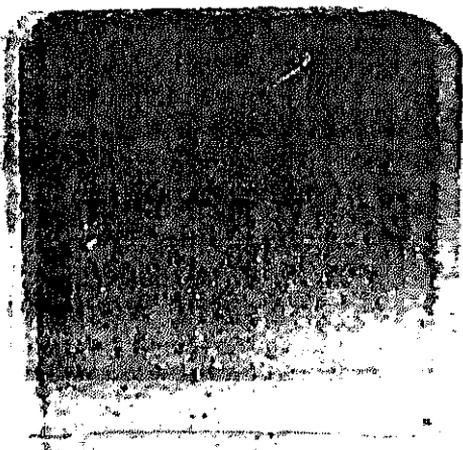


Fig. IV.1. Electroforesis SDS-poliacrilamida. De izquierda a derecha: muestra 1, patrón de bajo PM (de abajo hacia arriba: fosforilasa b -94.000-, albúmina -67.000-, ovoalbumina -43.000-, anhidrasa carbónica -30.000-, inhibidor tripsina -20.000- y α -lactalbumina -14.000-); muestras 2, 3 y 4, EE-A purificada (50 μ g/ml); muestras 5 y 6, EE-B purificada (50 μ g/ml); 7 sin muestra; muestra 8, EE-A cruda (50 μ g/ml).

conocido. La utilidad de esta técnica se basa en la capacidad del SDS de interactuar y desnaturalizar una amplia variedad de proteínas (Reynolds y Tanford, 1970a y b). Las proteínas son disociadas en sus subunidades polipeptídicas, en el caso de que las posean, debido a la acción del SDS y del 2-mercaptoetanol. Las subunidades o las proteínas nativas se unen a la misma cantidad de SDS por unidad de peso (1,4 g de SDS por g de proteína -Hames, 1981-) y adquieren una carga neta negativa.

Las proteínas nativas tienen diferentes cargas, tamaño y P_m pero bajo la acción del SDS se reducen y se convierten en complejos SDS-proteínas. Estos complejos tienen una carga constante por unidad de masa. Se ha determinado que la movilidad electroforética de una proteína depende de la carga, del P_m y de la conformación. Sin embargo, la mayoría de los complejos SDS-proteína tienen la misma carga y conformación, con lo que las diferencias en la movilidad electroforética se deben, exclusivamente, a diferencias en el P_m .

Se utilizaron geles con gradiente de poliacrilamida debido a su mayor resolución: en estos geles hay un progresivo descenso en la movilidad de las proteínas debido al descenso en el tamaño de los poros de la poliacrilamida, aumentando así la separación de las proteínas en función de su P_m .

El sistema de electroforesis utilizado ("Phast System") se ha comparado positivamente con la técnica de SDS-poliacrilamida clásica, presentando una mejora evidente en las proteínas cuyo peso molecular está comprendido entre 11 y 70 Kd (Stierle *et al.*, 1990). Este sistema también ha demostrado su utilidad para la diferenciación a

identificación bacteriana (Slayne et al., 1990).

La presencia de una sola banda, y a la altura de la banda de la anhidrasa carbónica, demuestra que tanto las EE como la TSST-1 patrones poseen un elevado grado de purificación.

A.2.OPTIMIZACION DE LA TECNICA

A.2.1.Resultados

Los resultados positivos en la transferencia electroforética aparecen como una banda, debida a una reacción antígeno-anticuerpo, a la altura de la banda de la proteína patrón.

Los datos obtenidos en la optimización de la técnica vienen reflejados en las tablas IV.1. a IV.9.

Utilizando las condiciones óptimas para la realización de este método, esto es: 50% de voltaje, 60 minutos de tiempo de electroelución, nitrocelulosa de la casa "Schleicher & Schull", dilución de 1:500 y 60 minutos de incubación, tanto para los anticuerpos específicos como para el conjugado, y DAB como sustrato, se pudieron detectar 10 ng/ml de EE o TSST-1. Los resultados, referidos a la sensibilidad de la técnica, fueron similares tanto para los distintos tipos de EE, como para la TSST-1.

Tabla IV.1. Optimización del Voltaje. (Amperaje expresado en Amperios - A -).

Voltaje (%)	Amperaje (inicial-final)	EE o TSST-1 detectada (ng/ml)
10	0,05 A-0,06 A	500
20	0,10 A-0,12 A	200
30	0,13 A-0,15 A	100
40	0,15 A-0,20 A	100
50	0,25 A-0,30 A	100
60	0,30 A-0,35 A	100
70	0,35 A-0,45 A	100
80	0,40 A-0,70 A	100

Tabla IV.2. Optimización del tiempo de electroelución.

Tiempo de electroelución (minutos)	Concentración de EE o TSST-1 detectada (ng/ml)
15	200
30	200
45	100
60	50
90	50
120	50
150	50

Tabla IV.3. Concentración de EE o TSST-1 detectada en las distintas membranas inmovilizantes utilizadas.

Membrana inmovilizante	Concentración de EE o TSST-1 detectada (ng/ml)
Nitrocelulosa Millipore	200
PVDF	100
Nitrocelulosa Schleicher & Schull	50

Tabla IV.4. Optimización de la dilución de anticuerpos.

Dilución de anticuerpos	Concentración de EE o TSST-1 detectada (ng/ml)
1:250	50
1:500	50
1:1.000	100
1:2.000	100
1:5.000	200

Tabla IV.5. Optimización de la dilución del conjugado.

Dilución de conjugado	Concentración de EE o TSST-1 detectada (ng/ml)
1:250	50
1:500	50
1:1.000	100
1:2.000	100
1:5.000	200

Tabla IV.6. Optimización del tiempo de incubación de los anticuerpos.

Tiempo de incubación de los anticuerpos (minutos)	Concentración de EE o TSST-1 detectada (ng/ml)
30	200
60	100
120	100
180	100

Tabla IV.7. Optimización del tiempo de incubación del conjugado.

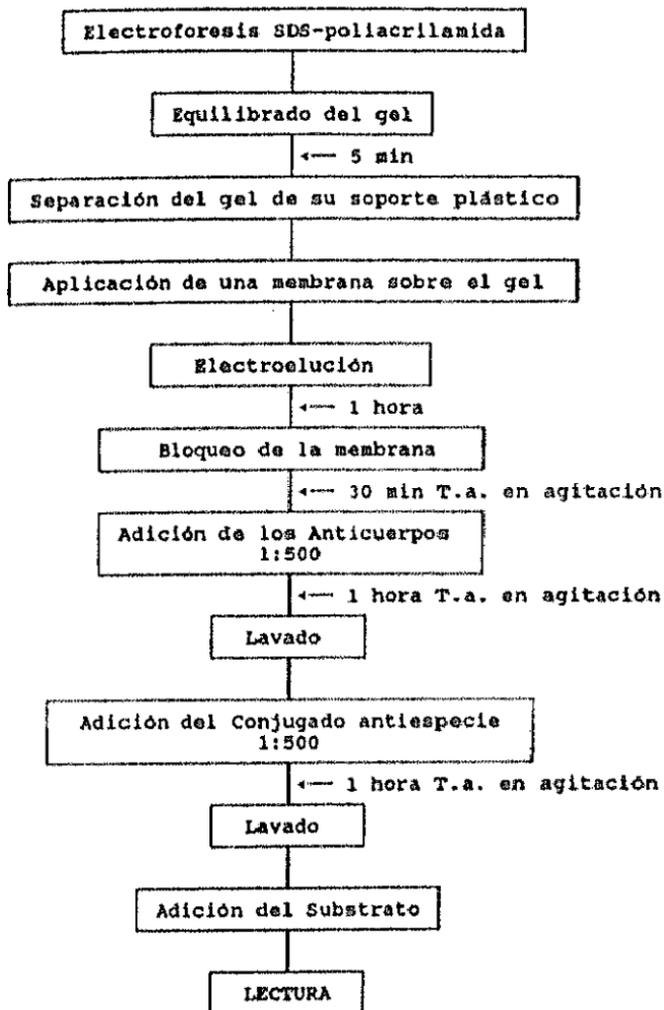
Tiempo de incubación del conjugado (minutos)	Concentración de EE o TSST-1 detectada (ng/ml)
30	200
60	100
120	100
180	100

Tabla IV.8. Capacidad de detección de EE o TSST-1 por parte de los dos sustratos empleados.

Sustrato	Concentraciones de EE o TSST-1 detectadas
Cloronaftol	200 ng/ml
DAB	50 ng/ml

Tabla IV.9. Sistema Avidina-Biotina.
(igual dilución para Ac biotinados y para Avidina-peroxidasa)

Dilución	Cantidad de EE o TSST-1 detectada
1:250	50 ng/ml
1:500	50 ng/ml
1:1.000	100 ng/ml
1:2.000	100 ng/ml
1:5.000	200 ng/ml



T.a.: Temperatura ambiente.

Diagrama IV.1. Diagrama de flujo en la secuencia de pasos en el método de Transferencia Electroforética (T.E.).

A.2.2. Discusión

Vamos a estudiar cada uno de los elementos por separado:

1) Voltaje: con voltajes muy pequeños (10 y 20%) la cantidad de proteína transferida a la matriz inmovilizante fue escasa. Sin embargo, a partir de un voltaje del 30% (0,30 A de intensidad de corriente) no se observaron diferencias en los resultados, lo que demuestra que no se necesitan voltajes elevados para conseguir una buena elución de las proteínas. Por tanto, se pueden utilizar voltajes a partir del 30%, éste incluido.

2) Tiempo de electroelución: los resultados demuestran que a partir de 60 minutos no se produce una mejora en los mismos. Generalmente, para eluir polipéptidos de bajo Pm se necesitan 2 horas y para eluir los de alto Pm se necesitan, al menos, 6 horas. Sin embargo, se consiguió una buena elución de las proteínas en una hora debido a que se utilizaron geles de un espesor mucho menor (0,5 mm) a los habitualmente empleados (1-1,5 mm), lo que facilitó la elución de las proteínas.

3) Membranas inmovilizantes: los mejores resultados se obtuvieron con la NC de la casa "Schleicher & Schull". Peores resultados se consiguieron con el PVDF y con la NC de Millipore. La NC tiene una capacidad de unión a proteínas que puede llegar a 250 $\mu\text{g}/\text{cm}$, mientras que la del PVDF es de 190 $\mu\text{g}/\text{cm}$. Esto explicaría los resultados ligeramente inferiores obtenidos con las membranas de PVDF. Con la matriz que peores resultados se obtuvieron fue con la NC de Millipore; una explicación a este hecho pudiera ser que la NC de esta casa comercial incluye acetato de celulosa, el cual reduce la capacidad de la matriz para

unirse a proteínas (Towbin et al., 1979).

4) Diluciones y tiempo de incubación del anticuerpo específico y del conjugado: es importante conocer la dilución más alta, y por tanto la de menor concentración, con la que se obtienen los mejores resultados. La dilución de 1:500, tanto para el anticuerpo específico como para el conjugado, resultó ser la que permitió detectar la menor concentración de EE o de TSST-1. Con la dilución de 1:250 se obtuvo idéntico resultado que con la de 1:500, pero con el lógico inconveniente de un mayor gasto de reactivos. A partir de 60 minutos de incubación, tanto del anticuerpo específico como del conjugado, no se observaron mejoras en los resultados. Por tanto, los tiempos de incubación empleados son muy breves.

5) Sustrato: con el DAB se obtuvieron unos resultados muy superiores a los obtenidos con el cloronaftol. Estos datos coinciden con los obtenidos por Blas y Cherwinski (1983). Sin embargo, el DAB presenta el inconveniente de su peligrosidad (hay que manejarlo con guantes y mascarilla) dado que es un posible cancerígeno.

6) Sistema avidina-biotina: los resultados obtenidos con este sistema no supusieron una mejora sobre los conseguidos con un suero antiespecie convencional. Debido a su superior coste económico y al hecho de que precisa una incubación más (primero se incuba la membrana con el conjugado anti copulado a la biotina y posteriormente con la peroxidasa copulada con la avidina) es preferible emplear el suero anti marcado con peroxidasa.

Combinando las condiciones óptimas se pudieron detectar 10 ng de EE o TSST-1 por ml. Esta sensibilidad es superior a

la obtenida mediante las técnicas de inmunodifusión (Casman y Bennett, 1965; Robbins *et al.*, 1974), que son las habitualmente empleadas en la detección de las EE, e inferior a la obtenida por los métodos de ensaioinmunoensayo (Kauffman, 1980; Olsvik *et al.*, 1982; Freed *et al.*, 1982).

A.2.2.a.Ventajas

1) Dado que el límite de detección es superior al método de inmunodifusión doble en porta (Casman y Bennett, 1965) que es el método recomendado en el "Official Methods of Analysis" (1990) de la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), cumple los requisitos propuestos por Bergdoll *et al.* (1976) en el sentido de que la sensibilidad de la técnica utilizada para detectar las EE no debe ser inferior a la de la empleada por las agencias reguladoras.

2) Hay que destacar el escaso gasto en reactivos, dado que se necesitan volúmenes muy pequeños (20 ml aproximadamente) para incubar las matrices inmovilizantes, en comparación con las cantidades requeridas para los geles y membranas habitualmente empleados (de un tamaño bastante superior al de los geles comerciales utilizados en este trabajo).

Al reducido gasto en reactivos hay que añadir el pequeño volumen de muestra requerido para realizar el análisis (sólo se necesitan 5 µl). Esto representa una ventaja con respecto a otras técnicas, como por ejemplo ELISA "sandwich" (Freed *et al.*, 1982) en el que se utilizan 100-200 µl de muestra, teniendo este hecho gran importancia en el caso de disponer de pequeños volúmenes de extractos de alimentos.

3) Esta técnica permite procesar un elevado número de muestras dado que se pueden correr dos geles al mismo tiempo en la unidad de separación y control del "Phast System" y se pueden realizar dos series seguidas (en total 4 geles) dada la escasa duración de la electroforesis (30 minutos aproximadamente). En cada gel se incluyen 8 muestras (una para la EE o TSST-1 patrón y 7 muestras problema) y por ello se pueden analizar 28 muestras por día. Además, existe la posibilidad de utilizar aplicadores de 12 muestras, en lugar de los de 8 utilizados en este trabajo.

La técnica ELISA es la única que permite procesar una mayor cantidad de muestras que la transferencia electroforética. Con los métodos de inmunodifusión, inmunofluorescencia y hemoaglutinación, el número de muestras posibles a analizar es muy inferior.

4) Otra de las mejoras con respecto a otras técnicas de detección es su rapidez. Son suficientes 4 ó 5 horas para concluir el análisis. Esto supone un avance con respecto a la técnica ELISA "sandwich" (Freed *et al.*, 1982) en la cual hay que realizar un tapizado con anticuerpos la tarde anterior al procesado de las muestras y se requieren de 6 a 8 horas del día siguiente para finalizar el método. Esta mejora es mucho más evidente en el caso de la inmunodifusión doble en porta (Casman y Bennett, 1965), incluso con la modificación introducida por Reiser *et al.* (1974) con la que se necesitaban 3 días para realizar la lectura.

5) Sin embargo, la principal ventaja con respecto a las restantes técnicas de detección es su elevada especificidad. En esta prueba para dar un resultado positivo, debe haber además de una reacción antígeno-anticuerpo, una identidad en cuanto al peso molecular del antígeno detectado por esos

anticuerpos (las sustancias que presentan reacciones cruzadas y las que producen interferencias son diferenciadas en la electroforesis).

Hay que tener en cuenta que las reacciones antígeno-anticuerpo, en principio, son específicas, pero existen reacciones cruzadas con otros antígenos que dan lugar a falsos positivos. Así, Fey *et al.* (1984) al comparar los distintos tipos de ELISA utilizados en la detección de las EE destacaron como inconvenientes de la técnica ELISA "sandwich" la aparición de uniones no específicas causadas por la formación de agregados en el conjugado, así como los problemas debidos a los falsos positivos causados por proteína A (problema común a otras técnicas de detección de EE y TSST-1).

Donnelly *et al.* (1967) mencionaron los problemas encontrados en las técnicas de gel difusión en el sentido de la aparición de zonas y anillos atípicos. Por su parte, Bergéil *et al.* (1976) discutieron los problemas encontrados al realizar la técnica de aglutinación, destacando la aparición de aglutinaciones no específicas.

6) La transferencia electroforética presenta además una gran objetividad en la interpretación de los resultados, algo que no se produce siempre en las pruebas de inmunodifusión doble en porta para la detección de EE, en las cuales se pueden producir líneas patrones atípicas ("Official Methods of Analysis", 1990) y en las técnicas de inmunofluorescencia.

En el campo de las EE y TSST-1 la técnica de transferencia electroforética sólo se ha utilizado hasta la fecha para estudios de especificidad y reacciones cruzadas

cuando se prueban anticuerpos monoclonales (Edwin et al., 1986) y para detectar anticuerpos séricos frente a las EE y TSST-1 (Whiting et al., 1989).

Las causas por las que la transferencia electroforética ha tenido limitaciones a la hora de utilizarla en el análisis de un elevado número de muestras han sido:

- Problemas en la utilización de geles convencionales (laboriosos de fabricar y muy frágiles).

- Tiempo de realización elevado, tanto en la realización de la electroforesis, como en la electroelución (Burnette -1981- indicó que se necesitan de 20 a 24 horas para conseguir una buena elución de las proteínas desde geles SDS-poliacrilamida) y como en los tiempos de incubación de los reactivos. Kakita et al. (1982) indicaron que se necesitan hasta 3 días para concluir el análisis.

- Importante gasto de reactivos.

Estos problemas no se presentan si se utilizan los geles del "Phast System" dado que los geles son comerciales, el tiempo necesario para la conclusión del análisis es escaso y el gasto de reactivos no es elevado. Esta técnica de electroforesis presenta las siguientes ventajas sobre los sistemas clásicos:

- 1) Ser semiautomática.
- 2) Altamente reproducible.
- 3) Sencillez de manejo.

Tabla IV.10. Cuadro comparativo de las principales técnicas de detección de EE y TSST-1. El número de cruces indica la mayor o menor idoneidad respecto al criterio señalado.

CRITERIOS	TECNICA DE DETECCION			
	ELISA	RIA	I.D.	T.E.
Sensibilidad	++++	++++	++	+++
Especificidad	+++	+++	++	++++
Capacidad de procesar gran n° muestras	++++	+++	++	+++
Rapidez	+++	+++	+	++++

I.D.: Inmunofluorescencia.

T.E.: Transferencia Electroforética.

Hasta la fecha, la transferencia de proteínas combinada con el sistema de electroforesis "Phast System" sólo se ha utilizado para la detección de anticuerpos antivirales en suero y fluido cerebroespinal en animales de laboratorio (Sigmund *et al.*, 1988).

A.3. ESTUDIO DE LA DETECCIÓN DE EE Y TSST-1 CRUDAS Y DE LAS POSIBLES REACCIONES CRUZADAS DE LAS EE ENTRE SI Y CON LA TSST-1

A.3.1. Resultados

Se probaron los diferentes tipos de EE y la TSST-1 crudas frente a sus sueros homólogos (EE-A con los anticuerpos frente a dicha EE). En todos los casos apareció una sola banda a la altura de las EE o TSST-1 purificadas.

También se examinaron cada uno de los diferentes tipos de EE y la TSST-1 con los anticuerpos frente a las otras EE y TSST-1. Esto es, la EE-A cruda se probó frente a los anticuerpos anti-EE B, C, D y E y también con los anticuerpos específicos de la TSST-1. En ningún caso aparecieron bandas.

A.3.2. Discusión

Los resultados demuestran la alta especificidad de los anticuerpos empleados dado que no se produjeron reacciones cruzadas entre los distintos tipos de EE y la TSST-1 y al hecho de la aparición de una sola banda al utilizar EE sin purificar.

Sin embargo, puede aparecer, además de la banda específica, dos bandas de Pm inferior producidas por la fragmentación de la EE por un fenómeno de digestión enzimática debida a tripsina, quimotripsina y proteasas contaminantes. Esta rotura produce dos fragmentos, uno carboxi-terminal y otro amino-terminal, cuyos pesos moleculares sumados equivalen al Pm de la EE intacta (Lin et al., 1988). El hecho de que no existan diferencias en la utilización de EE y TSST-1 purificadas o crudas permitiría utilizar a estas últimas como patrones.

Otra ventaja de este método es la de no necesitar antígeno purificado para su realización a diferencia del RIA (Bergdoll y Reiser, 1980) y del ELISA competitivo (Fey et al., 1984).

A.4. ESTUDIO DE LOS POSIBLES FALSOS POSITIVOS DEBIDOS A LA PROTEÍNA A

A.4.1. Resultados

La proteína A apareció como una banda de un Pm superior (cerca de 60.000) al correspondiente a las EE y TSST-1 (Fig. IV.2).

A.4.2. Discusión

La proteína A representa un inconveniente para las técnicas de detección de EE y TSST-1 utilizadas hasta la fecha. Esto se debe a la capacidad que tiene esta proteína de unirse de forma inespecífica a la porción Fc de las inmunoglobulinas (Notermans y Koper, 1979) lo que da lugar a falsos positivos. Para evitar estos falsos positivos se

utilizan diversos métodos (Koper *et al.*, 1980; Freed *et al.*, 1982; Fey *et al.*, 1984) que suponen un incremento en el tiempo requerido para realizar el análisis.

En la técnica de transferencia electroforética no se produce este problema debido al distinto Pm de las EE y TSST-1 con respecto a la proteína A. Sin embargo, el Pm de la proteína A calculado utilizando técnicas de sedimentación y cromatografía de exclusión molecular (42.000) no coincide con el que se obtiene al realizar una electroforesis SDS-poliacrilamida (Bjork, 1972).

Este autor comprobó que la proteína A migraba entre las posiciones de la ovoalbúmina y la seroalbúmina humana con un Pm de 56.000. A pesar de ello, los resultados no eran reproducibles en todos los casos: si la proteína A se mantenía una semana a 7 °C se observaba en la electroforesis una banda difusa. La explicación dada por Bjork (1972) fue que esta proteína se desvía del comportamiento general de las proteínas en las soluciones de SDS. Esto puede ser una consecuencia de una conformación peculiar de esta proteína debido a su conformación muy extensa.

Lapeyre *et al.* (1987) comprobaron, al utilizar una técnica de transferencia electroforética con anticuerpos monoclonales, que extractos crudos de EE-C se revelaban en forma de una banda de 29 Kd y varias bandas no específicas de un Pm superior, que se deberían a la proteína A y a otras proteínas extracelulares.

A.5.DETECCION DE EE Y TSST-1 EN EXTRACTOS DE CEPAS PATRONES Y EN ALIMENTOS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS

A.5.1.Resultados

Se probaron distintas cepas patrones productoras de uno o varios tipos de EE y/o de TSST-1. En todos los casos se confirmó la producción de las EE o TSST-1 por parte de esas cepas (Fig. IV.2.).

En el caso de los alimentos artificialmente contaminados se pudieron detectar las EE añadidas a los mismos. No se observaron diferencias entre los extractos con o sin proceso completo de extracción. Los extractos blanco (extractos de alimentos sin contaminar) no dieron lugar a reacciones inespecíficas (no aparecieron en ningún caso bandas).

Después de realizar el proceso de extracción en los alimentos, se concentraron las muestras mediante diálisis con Carbowax 20.000, hasta alcanzar un volumen de 10 ml aproximadamente. Sin embargo, en algunas ocasiones los extractos se concentraban en exceso, y se observaba la aparición de turbidez en la muestra. Para evitar este problema se procedió a centrifugar las muestras (200 rpm durante 10 minutos) para eliminar el material grosero.

En el caso de las muestras de queso, aún después de centrifugar, el sobrenadante siguió turbio. Si a pesar de centrifugar la muestra, el contenido sigue estando algo viscoso, es recomendable diluir la muestra en Na_2HPO_4 0,01 M hasta 10-15 ml para evitar que el frente no corra bien al realizar la electroforesis. Estos problemas se suelen presentar en los extractos de salchichas, queso y mayonesa en mayor medida que en los de leche o yogur.

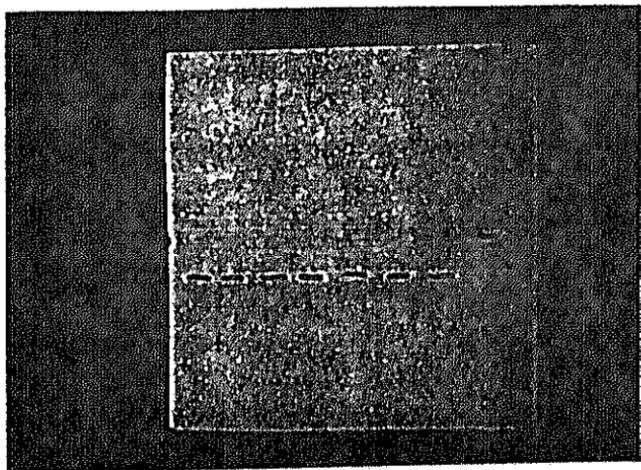


Fig. IV.2. Tráferencia electroforética. De izquierda a derecha: muestra 1, EE-B patrón (100 ng/ml); muestras 2 y 3, extracto de la cepa FRI-150; muestras 4 y 5, extracto de la cepa FRI-379; muestras 6 y 7, extracto de la cepa FRI-1173; muestra 8, proteína A (100 ng/ml).

A.5.2. Discusión

Los análisis de las cepas patrones dieron los resultados esperados, detectándose las EE y/o TSST-1 notificados en la literatura.

No hubo diferencias entre los resultados obtenidos con los extractos con proceso completo de extracción y con proceso parcial de extracción. Esto parece indicar la escasa interferencia que producen los lípidos (eliminados en el proceso de extracción completa por la acción del cloroformo) en la detección de EE mediante la técnica de transferencia electroforética.

Los extractos blanco, tanto los obtenidos con proceso completo como parcial de extracción, no dieron lugar a falsos positivos. Esto supone una gran ventaja con respecto a otras técnicas de detección de EE que presentan reacciones no específicas con los extractos alimentarios.

Así, en la hemoaglutinación pasiva reversible (RPHA) se producen aglutinaciones no específicas debidas a componentes de extractos alimentarios (Bennett *et al.*, 1973). Este fenómeno se observa principalmente en los extractos de origen cárnico (Bergdoll *et al.*, 1976). En el caso de la aglutinación pasiva reversible con partículas de látex (RPLA), Park y Szabo (1986) destacaron la posibilidad de falsos positivos cuando se utilizan extractos de queso. Este hecho fue también observado por Wieneke y Gilbert (1987) en un queso elaborado con leche de oveja y por Fujikawa e Igarashi (1988). Estos autores comentaron el problema de que los extractos de queso siguen turbios a pesar de centrifugarlos, lo que produce reacciones inespecíficas en

este test.

Casman y Bennett (1965) destacaron los problemas encontrados en la detección de EE en extractos alimentarios mediante las técnicas de inmunodifusión:

- 1) Los extractos de carne pueden oscurecer el agar.
- 2) Los extractos de alimentos pueden causar líneas de precipitación no debidas a una reacción específica con anticuerpos; esto constituye un problema en los test de gel difusión simple y doble en tubo.

También se ha observado que extractos de alimentos pueden oscurecer el agar en la prueba de gel difusión doble en porta cuando se utilizan procedimientos de aumento de la sensibilidad (Casman *et al.*, 1969). Este oscurecimiento del agar impediría la visualización de las líneas de precipitación.

En el RIA se deben realizar controles de alimentos blanco tan similares como sea posible a los alimentos que se van a analizar para la detección de las EE (Miller *et al.*, 1978). La necesidad de dichos controles viene dada por las variaciones en la inhibición en la detección de las EE y en la adsorción no específica por diferentes alimentos.

En el caso de la técnica ELISA, ciertos componentes alimentarios pueden producir pérdidas en la especificidad y la sensibilidad (Kuo y Silverman, 1980). También Essink *et al.* (1985) destacaron el hecho de que en los extractos de alimentos que contienen lisozima, como el mejillón, producen falsos positivos en la técnica de ELISA "sandwich". Esto es debido a que la lisozima se une a las proteínas de bajo punto isoelectrico como es el caso de las inmunoglobulinas.

Además de falsos positivos, se pueden producir interferencias en la detección de EE (dificultad en la detección de EE presente en los alimentos) debido a componentes de los extractos alimentarios. Así, Fujikawa e Igarashi (1988) señalaron que en la prueba de RPIA se deben eliminar materiales interfirientes, como la gelatina y los lípidos. Por su parte, Wieneke y Gilbert (1987) no pudieron detectar la EE presente en una muestra de queso mediante la técnica de gel difusión.

Sin embargo, los principales problemas de interferencias por componentes alimentarios se producen en el RIA de fase sólida debido a proteínas de elevado P_m (Johnson *et al.*, 1973; Genigeorgis y Kuo, 1976; Pober y Silverman, 1977). Bukovic y Johnson (1975) calcularon en hasta un 16% las inhibiciones no específicas de la unión de EE-C, marcada con ¹²⁵I, a tubos tapizados con anticuerpos frente a dicha EE debido a extractos alimentarios.

B. IDENTIFICACION Y PRODUCCION DE EE Y TSST-1 POR ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE MASTITIS

B.1. IDENTIFICACION

B.1.1. Identificación de las especies de estafilococos coagulasa positivos (ECP)

B.1.1.a. Resultados

En la tabla IV.11. se indica la identificación de las cepas aisladas de mastitis, así como la especie animal de la que se aislaron. De los 121 estafilococos aislados 81 fueron Staphylococcus aureus (66,9%). No se encontraron ninguna de las otras especies de ECP. La identificación de las especies coagulasa positivas se realizó basándose en el esquema propuesto por Devriese y Hájek (1980) para la identificación de los estafilococos patógenos aislados de animales. Las cepas A-34 y A-101 poseían algunas características de S. aureus, pero presentaban ausencia de hemólisis y débil efecto ADNasa; estas cepas fueron identificadas mediante el sistema "API-Staph" como Staphylococcus aureus.

B.1.1.b. Discusión

El esquema utilizado para la identificación de estas especies (Devriese y Hájek, 1980) no incluye la especie Staphylococcus delphini de reciente descripción (Varaldo *et al.*, 1988), y que presenta como características principales, aparte del hecho de ser una especie coagulasa positiva, la de haber sido aislada de lesiones purulentas en la piel de delfines y la de ser negativa en la prueba de la ADNasa.

Tabla IV.11. Identificación de las cepas estudiadas de *Streptococcus* spp. aisladas de mastitis.
 Producción de la y/o TSS1-1 por parte de dichas cepas.
 Resultados de ELISA expresados en ng/ml y de Transferencia Electroforética (T.E.) como positivos o negativos.

REF.	IDENTIFICACION	ORIGEN	EMERSONINAS Y TSS1-1													
			ES A		ES B		ES C		ES D		ES E		TSS1-1			
			ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.		
A-3	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	15,0	+	-	-	-	-	-	10,0	+	
A-10	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	16,6	+	-	-	-	-	-	18,2	+	
A-11	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	18,2	+	-	-	-	-	-	24,4	+	
A-15	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	22,0	+	-	-	-	-	-	23,6	+	
A-16	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	24,2	+	-	-	-	-	-	26,0	+	
A-17	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	25,0	+	-	-	-	-	-	35,0	+	
A-19	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-22	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,4	+	
A-24	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,8	+	
A-25	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,8	+	
A-27	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-33	<i>S. SERRAVALLE</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-31	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-33	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-34	<i>S. MITIS</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-37	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	24,8	+	-	-	-	-	-	28,4	+	
A-38	<i>S. MITIS</i>	OVINO	-	-	-	-	25,4	+	-	-	-	-	-	26,4	+	
A-39	<i>S. SERRAVALLE</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla IV.11. Continuación.

REF.	IDENTIFICACION	ORDEN	ENSEMBLIZAS Y TOSOS													
			EE-A		EE-B		EE-C		EE-D		EE-E		TOSO-1			
			ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.		
A-40	<i>S. epidemidis</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-43	<i>S. epidemidis</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-54	<i>S. epidemidis</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	18,5	*	-	-	-	-	-	31,4	*
A-56	<i>S. epidemidis</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-57	<i>S. epidemidis</i>	VACUNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-60	<i>S. aureus</i>	CAPRINO	-	-	-	-	-	19,2	*	-	-	-	-	-	56,0	*
A-61	<i>S. aureus</i>	CAPRINO	-	-	-	-	-	22,6	*	-	-	-	-	-	9,4	*
A-62	<i>S. aureus</i>	CAPRINO	-	-	-	-	-	13,4	*	-	-	-	-	-	-	-
A-71	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	26,2	*	-	-	-	-	-	19,0	*
A-72	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	25,8	*	-	-	-	-	-	34,2	*
A-79	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	*
A-80	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	26,2	*	-	-	-	-	-	22,6	*
A-81	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	21,6	*	-	-	-	-	-	16,0	*
A-82	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	22,6	*	-	-	-	-	-	16,0	*
A-91	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	24,6	*	-	-	-	-	-	16,0	*
A-92	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-94	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	*
A-95	<i>S. aureus</i>	OVINO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla IV.11. Continuación.

CEPAS ESTUDIADAS			ENTEROTOXINAS Y TSST-1											
REF.	IDENTIFICACION	ORIGEN	EE-A		EE-B		EE-C		EE-D		EE-E		TSST-1	
			ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.
A-96	<i>S. aureus</i>	ovino	26,6	+	-	-	-	-	-	-	8,6	+	-	-
A-97	<i>S. aureus</i>	ovino	-	-	-	-	25,6	+	-	-	-	-	23,2	+
A-98	<i>S. simulans</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-99	<i>S. hyicus</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-101	<i>S. aureus</i>	caprino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-102	<i>S. aureus</i>	caprino	24,4	+	-	-	-	-	-	-	8,4	+	-	-
A-104	<i>S. epidermidis</i>	caprino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-107	<i>S. aureus</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,2	+
A-110	<i>S. aureus</i>	ovino	20,6	+	-	-	16,0	+	-	-	-	-	37,0	+
A-111	<i>S. hyicus</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-112	<i>S. aureus</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-113	<i>S. aureus</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-114	<i>S. aureus</i>	ovino	24,4	+	-	-	11,8	+	-	-	8,8	+	40,0	+
A-117	<i>S. aureus</i>	caprino	25,2	+	-	-	13,2	+	-	-	8,8	+	34,8	+
A-118	<i>S. aureus</i>	ovino	-	-	-	-	11,6	+	-	-	-	-	32,4	+
A-119	<i>S. epidermidis</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,4	-
A-121	<i>S. aureus</i>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-123	<i>S. aureus</i>	vacuno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla IV.11. Continuación.

CEPAS ESTUDIADAS			ENSAYOS Y TEST-1											
REF.	IDENTIFICATION	GRUPO	SE-A		SE-B		SE-C		SE-D		SE-E		TEST-1	
			ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.
A-124	S. maritima	VACUNO												
A-125	S. maritima	VACUNO												
A-126	S. maritima	VACUNO												
A-129	S. maritima	VACUNO											32.7	*
A-131	S. maritima	OVINO			9.8	*	24.7	*					27.4	*
A-132	S. maritima	OVINO												
A-133	S. maritima	OVINO												
A-137	S. maritima	CAPRINO	15.6	*									18.2	*
A-138	S. maritima	CAPRINO	15.6	*										
A-142	S. maritima	OVINO					25.9	*					24.4	*
A-145	S. maritima	CAPRINO					32.8	*					23.4	*
A-147	S. maritima	OVINO					18.8	*					24.0	*
A-148	S. maritima	OVINO					22.8	*					18.8	*
A-149	S. maritima	OVINO					14.8	*					28.6	*
A-150	S. maritima	OVINO			8.2	*	18.0	*					23.6	*
A-153	S. maritima	VACUNO					7.2	*					23.2	*
A-155	S. maritima	VACUNO											18.8	*
A-158	S. maritima	VACUNO											18.2	*

REF.	COUNTRY	CROP	PERCENTAGE OF TOTAL PRODUCTION												
			1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960		
A-161	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-162	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.6
A-163	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32.4
A-170	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-180	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-181	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-182	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.4
A-183	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.8
A-184	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.6
A-185	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.8
A-186	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14.2
A-187	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.6
A-188	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25.8
A-189	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.2
A-190	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25.8
A-191	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.1
A-200	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.6
A-201	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-202	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-203	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-204	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-205	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-206	U.S.S.R.	Wheat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 24. 29. Contaminación.

DEPÓSITOS ESTUDIADOS			CONTAMINANTES Y TENDENCIAS													
REF.	IDENTIFICACION	ORIGEN	EE-A		EE-B		EE-C		EE-D		EE-E		TEND.			
			ELISA	T.S.	ELISA	T.S.	ELISA	T.S.	ELISA	T.S.	ELISA	T.S.	ELISA	T.S.		
A-207	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-212	S. ponderosa	Capit. Dep.					17 B	*						57 B		
A-213	S. ponderosa	Capit. Dep.	27 B	*			19 B	*						58 A		
A-214	S. ponderosa	Capit. Dep.					20 A	*						62 B		
A-215	S. ponderosa	Capit. Dep.	25 B	*			13 A	*						60 B		
A-216	S. ponderosa	Capit. Dep.					16 A	*						61 A		
A-217	S. ponderosa	Capit. Dep.					18 B	*						63 A		
A-218	S. ponderosa	Capit. Dep.												62 A		
A-224	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-225	S. ponderosa	Capit. Dep.	34 B	*	11 B	*	10 B	*								
A-226	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-243	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-244	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-247	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-254	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-255	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-259	S. ponderosa	Capit. Dep.														
A-266	S. ponderosa	Capit. Dep.														

Tabla IV. 11. Continuación.

CEPAS ESTUDIADAS			ENTEROTOXINAS Y TSST-1											
REF.	IDENTIFICACION	ORIGEN	EE-A		EE-B		EE-C		EE-D		EE-E		TSST-1	
			ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.
A-262	<u>S. xylosum II</u>	ovino	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-263	<u>S. aureus</u>	vacuno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-264	<u>S. aureus</u>	vacuno	-	-	-	-	18,6	+	-	-	-	-	21,8	+
A-265	<u>S. aureus</u>	vacuno	-	-	-	-	6,4	-	-	-	-	-	16,4	+
A-267	<u>S. aureus</u>	vacuno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-268	<u>S. epidermidis</u>	vacuno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-270	<u>S. aureus</u>	vacuno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-279	<u>S. aureus</u>	vacuno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-281	<u>S. aureus</u>	vacuno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-290	<u>S. epidermidis</u>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-291	<u>S. epidermidis</u>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-294	<u>S. epidermidis</u>	ovino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-299	<u>S. aureus</u>	ovino	-	-	8,0	+	17,0	+	-	-	-	-	21,8	+

Dentro de los ECP aislados exclusivamente Staphylococcus aureus. En ninguno de los brotes estudiados se aisló ni Staphylococcus intermedius ni Staphylococcus hyicus.

B.1.2. Identificación de las especies de estafilococos coagulasa negativos (ECN)

B.1.2.a. Resultados

La identificación de estas especies se realizó utilizando el sistema de identificación "API-Staph". Se aislaron 40 ECN que representan el 33,1% del total de los estafilococos aislados. La distribución por especies viene reflejada en la tabla IV.12.

B.1.2.b. Discusión

El estudio del género Staphylococcus en los animales domésticos se ha concentrado fundamentalmente en la especie Staphylococcus aureus, mientras que han sido muy pocas las investigaciones encaminadas a la caracterización de las especies coagulasa negativas. Sin embargo, numerosos autores han subrayado el papel de los ECN en la producción de mastitis subclínicas: Gutierrez et al. (1982) en ovejunas, Devriese (1979) en vacas, y Foutrel (1984a y b) en cabras.

Se aislaron 40 ECN de los 18 brotes de mastitis estudiados. A pesar de ello, no se pudo imputar, al menos con exclusividad, ninguno de estos brotes a ECN dado que en todos los casos se aislaron conjuntamente con microorganismos de un poder patógeno ampliamente reconocido (S. aureus, estreptococos, corinebacterias, coliformes, etc.).

Tabla IV.12. Distribución por especies de los estafilococos estudiados con respecto a las especies animales de las que se aislaron.

MICROORGANISMO	ESPECIE	ESPECIE ANIMAL			Total	Total
		Ovina	Caprina	Bovina		
ECP	<u>S. aureus</u>	43	12	26	81	40
ECN	<u>S. epidermidis</u>	8	3	5	16	
	<u>S. xylosus</u>	3	1	8	12	
	<u>S. simulans</u>	2	1	-	3	
	<u>S. chromogenes</u>	3	-	-	3	
	<u>S. sciuri</u>	-	1	-	1	
	<u>S. lentus</u>	1	-	-	1	
	Sin identificar	1	3	-	4	
Total		61	21	39	121	

Para la identificación de estas especies se utilizó el sistema "API-Staph". Algunos investigadores han comprobado la utilidad de este sistema para la identificación de los ECM comparándolo con el esquema propuesto por Kloos y Schleifer (1975). Dentro de los trabajos realizados en este sentido destacan los de los siguientes autores:

- Gemmel y Dawson (1982) realizaron un estudio en 100 ECM de diversas fuentes clínicas y obtuvieron un 90% de homología entre ambos métodos.
- Giger et al. (1984) comprobaron, en la identificación de 120 ECM, que los resultados coincidían en un 82,3% de los casos.
- Langlois et al. (1984) examinaron ECM aisladas de leche de vaca obteniendo un 91,2% de correlación.

Además de estos trabajos, Harvey y Gilmore (1985) en un estudio realizado en estafilococos aislados de leche cruda de vaca, utilizaron un esquema propio para la identificación de estos microorganismos y compararon sus resultados con los obtenidos con el "API-Staph". Para el 99% de las cepas estudiadas los resultados fueron homólogos e incluso diversas cepas que no pudieron ser identificadas por el sistema propuesto por estos autores, sí lo fueron por el sistema "API-Staph".

Este sistema comercial presenta las siguientes ventajas sobre los sistemas clásicos de identificación:

- Importante ahorro de tiempo al no tener que preparar baterías de pruebas bioquímicas.

- Inclusión de un control negativo que reduce el número de falsos resultados (Langlois et al., 1984).

- Posibilidad de utilizar un sistema informático que nos proporciona el porcentaje de seguridad en la identificación y la calidad de la misma. Además, en los casos de débil discriminación entre 2 ó 3 especies, se indican los test que se pueden utilizar para llegar a una correcta identificación.

Uno de los problemas en la taxonomía de los ECN es la imposibilidad de identificar algunas cepas (Adegoke, 1985). En el presente trabajo, 4 de 40, es decir un 10%, de los ECN no pudieron ser encuadrados dentro de ninguna de las especies de estafilococos que pueden ser identificadas por el sistema "API-Staph". Este hecho puede ser debido a que algunas de estas cepas no pertenezcan a ninguna de las especies de ECN ya descritas. Este fenómeno está dando lugar a la creación de nuevas especies o subespecies de coagulasa negativas (Langlois et al., 1984). Así, de las 19 especies, tanto coagulasa negativas como positivas, descritas por Kloos y Schleifer (1986) se ha pasado a 27 (Kloos, 1990); sin embargo, ninguna de las especies recientemente descritas se han encontrado en la leche o productos lácteos de los animales domésticos (Gilmour y Harvey, 1990).

También se debe tener en cuenta que el origen de los aislamientos puede variar las características bioquímicas de las especies de ECN (Langlois et al., 1990). Estas diferencias pueden alterar la identificación de los aislamientos de origen animal, dado que los sistemas de identificación están basados en aislamientos clínicos humanos.

B.1.3. Distribución de los estafilococos por especies animales

B.1.3.a. Resultados

La distribución de las cepas de *S. aureus* y de ECN con respecto a la especie animal en la que se produjo el aislamiento viene reflejada en la tabla IV.12.

B.1.3.b. Discusión

No se va a tratar, por ser ampliamente reconocida, el papel de *Staphylococcus aureus* en las mastitis de los animales domésticos. Por tanto, esta discusión se referirá a los ECN. Así, *S. epidermidis* y *S. hibernicus* son microorganismos que se presentan habitualmente en la leche de vaca (Devriese, 1979), de cabra (Poutrel, 1984) y de oveja (Gutiérrez et al., 1982).

Debido al ordeño pueden encontrarse en la leche microorganismos presentes en la mama y en el pezón; éste es el caso de *S. sciuri* y *S. lentus* que se presentan principalmente en ovejas y cabras (Devriese et al., 1980) y de estas dos especies de coagulasa negativa además de *S. xylosum* en vacas (Devriese, 1979).

También pueden estar presentes en la leche y la piel de ubres y pezones de animales domésticos las especies *S. chromogenes* y *S. xylosum*. Así, Valle et al. (1980) encontraron estas especies de ECN, entre otras, en un estudio realizado en cabras.

B.2. PRODUCCION DE EE Y TSST-1

B.2.1. Resultados

En la tabla IV.11. se especifica la producción de EE y TSST-1 por las diversas cepas de estafilococos aislados de mastitis.

En las tablas IV.13. a IV.19. se reflejan los siguientes datos:

- Relación de la producción de EE y TSST-1 con las distintas especies de estafilococos (tabla IV.13.).
- Producción de EE y TSST-1 en relación a la especie animal (tabla IV.14.).
- Combinaciones en la producción de EE y/o TSST-1 (tabla IV.15.).
- Correspondencia en la producción de EE-C y TSST-1 (tabla IV.16.).
- Número de estafilococos productores de EE en relación a la especie animal de la que se aislaron (tabla IV.17.).
- Número de estafilococos productores de EE y/o TSST-1 en relación a la especie animal de la que se aislaron (tabla IV.18.).
- Precedencia de las cepas de ECN que resultaron positivas en la producción de EE y/o TSST-1 (tabla IV.19.).

Tabla IV.13. Relación de la producción de EE y TSST-1 con las distintas especies de estafilococos.

ENTEROTOXINA O TSST-1	MICROORGANISMOS PRODUCTORES	TECNICA	
		ELISA	T.H.
EE-A	<i>S. aureus</i>	10	10
	ECM	-	-
	Total	10	10
EE-B	<i>S. aureus</i>	4	4
	ECM	-	-
	Total	4	4
EE-C	<i>S. aureus</i>	46	44
	ECM	2	2
	Total	48	46
EE-D	<i>S. aureus</i>	-	-
	ECM	-	-
	Total	-	-
EE-E	<i>S. aureus</i>	4	4
	ECM	-	-
	Total	4	4
TSST-1	<i>S. aureus</i>	54	53
	ECM	8	7
	Total	62	60

Tabla IV.14. Producción de EE y TSST-1 en relación a la especie animal.

EE o TSST-1	ESPECIE ANIMAL					
	Ovina		Caprina		Bovina	
	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.	ELISA	T.E.
EE-A	6	6	4	4	-	-
EE-B	4	4	-	-	-	-
EE-C	36	36	5	5	7	5
EE-D	-	-	-	-	-	-
EE-E	2	2	2	2	-	-
TSST-1	41	39	6	6	15	15

Tabla IV.15. Combinaciones en la producción de EE y/o TSST-1.

EE o TSST-1	Resultados positivos	
	ELISA	T.E.
EE-A	1	1
EE-C	1	2
TSST-1	14	15
EE-A + EE-E	2	2
EE-A + TSST-1	1	1
EE-C + TSST-1	38	35
EE-A + EE-B + EE-C	1	1
EE-A + EE-C + TSST-1	3	3
EE-B + EE-C + TSST-1	3	3
EE-A + EE-C + EE-E + TSST-1	2	2

Tabla IV.16. Correspondencia en la producción de EE-C y TSST-1.

EE y/o TSST-1	Resultados positivos	
	ELISA	T.R.
EE-C	2	3
TSST-1	16	17
EE-C + TSST-1	46	43

Tabla IV.17. Número de estafilococos productores de EE en relación a la especie animal de la que se aislaron.

MICROORGANISMO	ESPECIE ANIMAL						Total	
	Ovina		Caprina		Bovina		ELISA	T.R.
	ELISA	T.R.	ELISA	T.R.	ELISA	T.R.		
ECP	37	37	8	8	5	3	50	48
ECN	-	-	-	-	2	2	2	2
Total	37	37	8	8	7	5	62	50

Tabla IV.18. Número de estafilococos productores de EE y/o TSST-1 en relación a la especie animal de la que se aislaron.

MICROORGANISMO	ESPECIE ANIMAL						Total	
	Ovina		Caprina		Bovina		ELISA	T.R.
	ELISA	T.R.	ELISA	T.R.	ELISA	T.R.		
ECP	40	40	8	8	11	11	69	69
ECN	1	2	1	1	4	4	8	7
Total	41	42	9	9	15	15	67	66

Tabla IV.19.: Procedencia de las cepas de ECN que resultaron positivas en la producción de EE y/o TSST-1.

Microorganismo (n° de aislamientos)	Especie animal	Producción de EE o TSST-1
<u>S. xylosus</u> (2)	Bovina	EE-C + TSST-1
<u>S. xylosus</u> (2)	Ovina	TSST-1
<u>S. xylosus</u> (1)	Bovina	TSST-1
<u>S. sciuri</u> (1)	Caprina	TSST-1
<u>S. epidermidis</u> (1)	Bovina	TSST-1
<u>S. epidermidis</u> (1)	Ovina	TSST-1 *

* Resultado registrado exclusivamente con la técnica ELISA.

3.1.2. Discusión

3.1.2.a. Comparación de los resultados obtenidos por ELISA y transferencia electroforética

Como se pueda apreciar en las tablas IV.11. y IV.13., los resultados obtenidos mediante estas dos técnicas presentan una correspondencia prácticamente absoluta. Así, la correspondencia de resultados en las EE de los tipos A, B, D y E es total.

Exclusivamente en el caso de la EE-C y la TEST-1 hubo pequeñas diferencias; más concretamente, 4 cepas que dieron valores positivos mediante la técnica de ELISA (dos en el caso de la EE-C, A-119 y A-143, y otras dos en el de la TEST-1, A-162 y A-265) no pudieron ser detectadas como productoras de estas toxinas por transferencia electroforética. Este hecho se pueda explicar por la diferencia en el límite de detección de las técnicas de transferencia electroforética y de ELISA; este es el caso de las cepas A-119 y A-162 cuyos resultados fueron inferiores a 10 ng/ml, o bien por posibles falsos positivos de la técnica ELISA, como podría ser el caso de las cepas A-143 y A-265.

Algunas cepas cuyos resultados fueron inferiores a 10 ng/ml por la técnica ELISA fueron positivas mediante el método de transferencia. Esto puede ser debido a que la cuantificación realizada por ELISA no fuera del todo correcta. Uno de los problemas de diluir los extractos con BNC es el de que este suero contenga anticuerpos bloqueantes que compitieran por el antígeno con los anticuerpos del tapizado. Por ello, se puede detectar menos EE que la realmente existente.

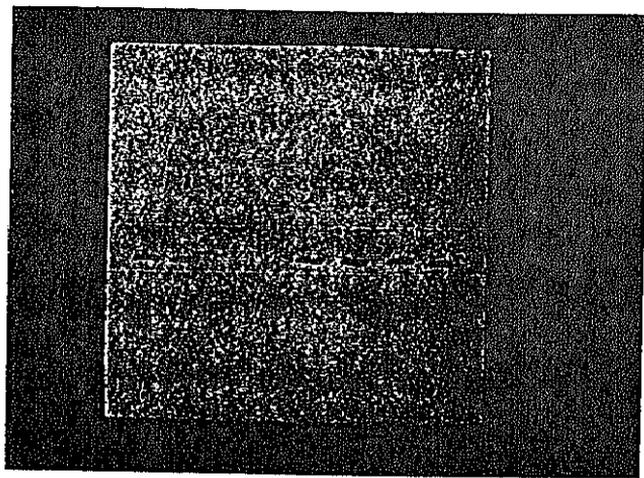


Fig. IV.3. Transferencia electroforética. Detección de EE-C en extractos de cepas aisladas de mastitis. De izquierda a derecha: muestra 1, EE-C patrón (100 ng/ml); muestra 2, cepa A-54; muestra 3, cepa A-56; muestra 4, cepa A-57; muestra 5, cepa A-60; muestra 6, cepa A-61; muestra 7, cepa A-62; muestra 8, cepa A-71.

Es de destacar la favorable comparación de la técnica de transferencia electroforética con la técnica de ELISA, sobre todo si se tiene en cuenta que esta última, según algunos autores (Tranter y Brehm, 1990), es la idónea para la detección de EE.

B.2.2.b. Enterotoxigenicidad de los estafilococos aislados de mastitis

El número de estafilococos enterotoxigénicos, incluyendo la TSET-1, fue del 55,3% por ELISA y del 54,5% por transferencia electroforética. Si no se incluye la TSET-1, estos porcentajes disminuyen al 43,0% y 41,3% respectivamente.

Como se pueda apreciar en la tabla IV.13., la EE más producida fue la del tipo C, seguida de la EE-A; en menor medida se produjeron las EE-B y E, y en ningún caso se encontró la EE-D. Cabe destacar el alto porcentaje de cepas productoras de TSET-1 (51,3% mediante ELISA y 49,6% por transferencia electroforética). El hecho de que la EE-C sea la más producida coincide con los resultados obtenidos por Hájek (1978), Gutiérrez *et al.* (1982), Buysse y Dilasser (1984) y Valle *et al.* (1990) confirmando que este tipo de EE es la predominante en las cepas de estafilococos aislados de animales, a diferencia de las cepas de origen humano, en las que el tipo predominante es la EE-A (Bergdoll, 1989).

En ovejas el porcentaje de estafilococos enterotoxigénicos fue del 60,6% tanto por ELISA como por transferencia electroforética (sin incluir a la TSET-1). Este porcentaje resultó ser ligeramente inferior a los obtenidos por Hájek (1978), Olsvik *et al.* (1981), Gutiérrez *et al.* (1982) y Bautista *et al.* (1988) cuyos valores

oscilaban entre el 61,4 y el 81,8%. La EE más producida fue la del tipo C (59,0% de cepas productoras). Este resultado coincide con los de Hájek (1978) y Gutiérrez et al. (1982), pero difiere del obtenido por Bautista et al. (1988). Esta diferencia en cuanto a la producción se puede explicar por el diferente origen de las cepas (Bautista et al., 1988): las cepas aisladas por Hájek lo fueron de ubres o fosas nasales, las de Bautista et al. (1988) de leche cruda y las de Gutiérrez et al. (1982) así como las muestras estudiadas en este trabajo lo fueron de leche mastítica. En menor número se identificaron las EE de los tipos A, B y E, y en ningún se identificó la EE-D.

En cabras el porcentaje de estafilococos enterotoxigénicos desciende al 38,1% (ELISA y transferencia electroforética). Este valor es inferior al obtenido por Valle et al. (1990) -48,8%- en leche de cabras sanas.

En el caso de los estafilococos aislados de leche de vaca el porcentaje de cepas enterotoxigénicas fue del 17,9% por ELISA y del 12,8% por transferencia electroforética, encontrando exclusivamente la EE-C. Este valor fue ligeramente superior a los obtenidos por Casman (1965), Casman et al. (1967) y Harvey y Gilmour (1985), cuyos resultados oscilaban entre el 2,6 y el 9,4%. Aún así, el porcentaje de estafilococos enterotoxigénicos es muy inferior al obtenido en ovejas, hecho que coincide con los datos citados por Bautista et al. (1988).

Mención especial merece la TSST-1. Se detectó la producción de esta toxina en, aproximadamente, el 50% de las cepas estudiadas. Por especies, las cepas más productoras fueron las aisladas de oveja (67,2% por ELISA y 63,9% por transferencia electroforética), seguidas de las de vaca

(38,4% por ELISA y transferencia electroforética) y por último las de cabra (28,5% por ELISA y transferencia electroforética).

Hasta el momento, se han hecho pocos estudios sobre esta toxina en estafilococos de origen animal. Dentro de estos trabajos cabe destacar los de Jones y Wiencke (1986), Olsvik *et al.* (1987) y Adekeye *et al.* (1989). Jones y Wiencke (1986) aislaron TSST-1 de cepas de estafilococos procedentes de mastitis bovina y sugirieron la posibilidad de que esta toxina contribuyera al desarrollo de enfermedades en animales. Esta sugerencia también fue realizada por Valle *et al.* (1991) basándose en el alto porcentaje (44,2%) de estafilococos aislados de leche cruda de cabra productora de TSST-1, y es reforzada con los resultados obtenidos en este trabajo. Olsvik *et al.* (1987) encontraron que un 41,4% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis ovina y bovina producían TSST-1. Por su parte, Adekeye *et al.* (1989) comprobaron que un 28,6% de las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina producían esta toxina.

Hay que destacar que se encontró un elevado número de cepas que producían conjuntamente la EE-C y la TSST-1, independientemente de si estas cepas produjeron o no algún otro tipo de EE. Este hecho ha sido observado por un elevado número de autores (Gutiérrez *et al.*, 1982; Jones y Wiencke, 1986; Morgan *et al.*, 1986). También es relevante el dato de que 15 cepas por ELISA y 14 por transferencia electroforética produjeron exclusivamente TSST-1.

Estos resultados revelan el peligro potencial que suponen las mastitis estafilocócicas para la salud del consumidor. Precisamente es la leche de los animales mastíticos la principal fuente de EE por estafilococos de

origen animal (Bergdoll, 1989).

B.2.2.c. Producción de EE y TSST-1 por ECP

El porcentaje de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos fue del 71,8% (ELISA y transferencia electroforética) si se incluye la TSST-1, y si no del 61,7% (ELISA y transferencia electroforética). Por especies animales, los *S. aureus* más enterotoxigénicos, sin incluir la TSST-1, fueron los aislados de ovejas (86,0% tanto por ELISA como por transferencia electroforética), seguidos por los de cabra (66,6% tanto por ELISA como por transferencia electroforética) y por último los de vaca (19,2% por ELISA y 11,5% por transferencia).

En ovejas el alto porcentaje de cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas coincide con los datos obtenidos por Gutiérrez et al. (1982) y son algo superiores a los de Hajek (1978). Los porcentajes fueron del 79,7% para los primeros y del 60,0% para el segundo. El tipo de EE más producido fue el tipo C, lo que difiere de los resultados obtenidos por Bautista et al. (1988), aunque estos autores explicaron que el tipo predominante de EE variaba según el origen de las cepas estudiadas (Bautista et al., 1988 las aislaron de leche cruda y no de leche mastítica).

En el caso de las cepas de *S. aureus* aisladas de cabra, los resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos por Buisser et al. (1987) -75%- en animales mastíticos y por Valle et al. (1990) -49,7%- en leche de cabras sanas, si bien son superiores a los obtenidos por Harvey y Gilmour (1988) -35%- en leche cruda de cabras; si sólo consideramos a la especie *S. aureus*, el porcentaje de producción de EE es del 66,6% (ELISA y transferencia electroforética), mientras que si se tienen en cuenta a la totalidad de los

estafilococos este valor cae hasta el 18,1% (ELISA y transferencia electroforética). Los resultados difieren en cuanto a los tipos de EE encontrados: Harvey y Gilmour (1988) y Buysse et al. (1987) sólo identificaron la EE-C, mientras que en este trabajo y en el realizado por Valle et al. (1990) se identificaron, además de la EE-C, las EE de los tipos A y E.

La escasa producción de EE por parte de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis de vaca coincide con los resultados obtenidos por Casman (1965), Casman et al. (1967) y Harvey y Gilmour (1981).

En cuanto a la TSST-1, los porcentajes de *Staphylococcus aureus* productores de esta toxina fueron del 66,4% por ELISA y del 65,4% por transferencia electroforética. Por especies animales las cepas más productoras fueron las aisladas de ovejas (88,1% por ELISA y 84% por transferencia electroforética), seguidas por las de vaca (42,1% por ELISA y transferencia electroforética), y por último, las de cabra (41,6% por ELISA y transferencia electroforéticas). Los valores obtenidos en esta última especie animal son significativamente inferiores a los obtenidos por Valle et al. (1991) en ECP aislados de cabras sanas (76,2%).

Hay que destacar que más del 50% de las cepas de *S. aureus* aisladas, independientemente de la especie animal, producen EE-C y/o TSST-1, lo que demuestra el elevado riesgo que supone la presencia de estos microorganismos en la leche de los animales domésticos.

B.2.2.d. Producción de EE y TSST-1 por ECN

Existen en la literatura escasas referencias sobre la producción de EE por cepas coagulasa negativas, y menos aún si se refieren a cepas aisladas de leche. Dentro de éstas destacan las de Bautista *et al.* (1980) y Valle *et al.* (1990).

Los porcentajes de ECN enterotoxigénicos, incluyendo la TSST-1, varían del 20% (ELISA) al 17,5% (transferencia electroforética) y si no incluimos a la TSST-1, este valor desciende al 5% (ELISA y transferencia electroforética). Este porcentaje es inferior al obtenido por Valle *et al.* (1990) -13,6%- en estafilococos coagulasa negativos aislados de leche cruda de cabra.

El porcentaje de ECN productores de EE y/o TSST-1 fue del 16,6% (ELISA) o del 11,1% (transferencia electroforética) en ovejas, 11,1% (ELISA y transferencia electroforética) en cabras y 30,7% (ELISA y transferencia electroforética) en vacas. Si no se incluye a la TSST-1, exclusivamente dos cepas aisladas de vacuno produjeron EE, más concretamente la del tipo C. Es de destacar que los ECN más enterotoxigénicos fueron los de vacuno cuando los *S. aureus* aislados de esta especie eran menos productores de EE que los de oveja y cabra.

Los porcentajes de producción de TSST-1 por especies animales fueron del 16,6% (ELISA) y del 11,1% (transferencia electroforética) en ovejas, 11,1% (ELISA y transferencia electroforética) en cabras, y 30,7% (ELISA y transferencia electroforética) en vacas. En el caso de las cepas aisladas de cabras los resultados son similares a los obtenidos por Valle *et al.* (1991) -13,6%- en ECN aislados de leche de

cabras sanas.

Las cepas productoras de EE-C fueron 3 *S. xylosum* (A-84 y A-182) aislados de vacuno que también produjeron TSST-1. Además de estas 3 cepas, produjeron TSST-1 3 cepas de *S. xylosum* (2 de oveja - A-94 y A-191 - y 1 de vaca - A-41 -), 1 cepa de *S. agalactiae* de cabra (A-201) y 3 cepas de *S. epidermidis* (una de vaca - A-129 - y otra de oveja - A-119 -, aunque esta última sólo fue positiva por ELISA).

Todas estas especies ya han sido descritas como productoras de EE y/o TSST-1. Así, Bautista *et al.* (1988) describieron la especie *S. xylosum* como productora de EE, *S. agalactiae* lo fue por Valle *et al.* (1990) y *S. epidermidis* ha sido descrito como productor por varios autores (Bergdell *et al.*, 1981; Crass y Bergdell, 1986a; Olsvik *et al.*, 1982; Bautista *et al.*, 1988; Valle *et al.*, 1990).

La existencia de tan pocas referencias en la literatura sobre la producción de EE por cepas de ECM pueda ser debida a dos hechos:

- 1) La creencia generalizada a partir del trabajo de Evans *et al.* (1958) de que la producción de EE es propia de los ECP y, por tanto, de la menor atención que las biovariedades coagulasa negativas han recibido.
- 2) Las técnicas de detección de EE empleadas no eran lo suficientemente específicas ni sensibles.

Kreiswirth *et al.* (1987) propusieron 3 premisas para poder asegurar la producción de EE y/o TSST-1 por parte de los ECM. Estas premisas fueron:

- 1) Correcta identificación de las cepas.
- 2) Demostrar rigurosamente la producción de EE o TSST-1.
- 3) Detectar el gen productor de EE o TSST-1 mediante técnicas de hibridación.

A pesar de no poder realizar, al no disponer de los medios necesarios, la detección de los genes productores, sí se han cumplido los otros dos requisitos. Así, en este trabajo no sólo se ha realizado la prueba de la coagulasa para incluir a las cepas estudiadas como ECN, sino que se ha llegado a la identificación a nivel de especie. Así, Crass y Bergdoll (1986a) se basaron exclusivamente en la prueba de la coagulasa para identificar las cepas productoras de TSST-1 como ECN.

Esto evitaría los problemas de una incorrecta interpretación de la prueba de la coagulasa (Kreiswirth et al. -1987- encontraron que dos cepas caracterizadas por Bergdoll como coagulasa negativas y productoras de TSST-1 eran en realidad coagulasa positivas) y la posibilidad de trabajar con cepas mutadas de Staphylococcus aureus que no expresaran esta cualidad.

Sobre la segunda premisa, se han utilizado dos técnicas distintas, una de las cuales, la transferencia electroforética, es probablemente el método inmunológico de detección más específico.

A la vista de los resultados obtenidos, los ECN aún cuando son bastante menos enterotoxigénicos que las cepas de S. aureus, sí deben tenerse en cuenta cuando se estudian brotes de intoxicación por EE.

V.A. CONCLUSIONES

Primera. A la vista de los resultados obtenidos la técnica de transferencia electroforética combinada con un sistema de electroforesis semiautomático constituye un método idóneo para la detección de EE y TSST-1. Esta técnica se puede comparar favorablemente al método ELISA que es, probablemente, el mejor sistema descrito hasta ahora de detección de EE y TSST-1.

Segunda. Dentro de las ventajas de la técnica de transferencia electroforética destacan su sensibilidad, escaso gasto de reactivos, limitado tiempo de conclusión del análisis y elevada especificidad. Por tanto, este método se puede utilizar como único sistema de detección de EE y TSST-1, o al menos, como técnica de confirmación.

Tercera. La identificación de las especies de estafilococos coagulasa positivos aisladas de mastitis de animales domésticos no plantea dificultades. Sin embargo, la identificación de las especies coagulasa negativas no es posible en todos los casos, y ello a pesar del gran número de nuevas especies descritas en los últimos años.

Cuarta. El porcentaje de cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* aisladas de ovejas fue algo superior al de las aisladas de cabras, y en ambos casos, muy superior al de las aisladas de vacas. Se confirmó que la EE-C es el tipo de EE predominante en cepas de

estafilococos aisladas de animales. Estos datos revelan que la leche mastítica de los animales domésticos constituye un peligro importante como fuente de estafilococos enterotoxigénicos, con el consiguiente riesgo de producción de intoxicaciones por EE.

Quinta. Se confirma la producción de EE por parte de las cepas coagulasa negativas. A pesar del número escaso de cepas enterotoxigénicas y de las cantidades de producción reducidas, estos estafilococos deben tenerse en cuenta a la hora de estudiar brotes de intoxicación por EE.

Sexta. La elevada producción de TSST-1, en la mayoría de los casos en combinación con la EE-C, por parte de las cepas de S. aureus, y en menor medida por las cepas coagulasa negativas, demuestra que estas cepas productoras de TSST-1 pueden ser una fuente importante de contagio del síndrome del choque tóxico al hombre.

IV. B. RESUMEN

En el presente trabajo se ha desarrollado una técnica de transferencia electroforética aplicada a la detección de EE y TSST-1. Este método presenta múltiples ventajas como son un nivel de sensibilidad adecuado, escaso gasto de reactivos, tiempo de realización breve, posibilidad de procesar un gran número de muestras, elevada especificidad y gran objetividad en los resultados.

Además de ello, esta técnica demostró su utilidad en la detección de EE y TSST-1 en extractos de cepas patrones y en extractos de alimentos artificialmente contaminados, así como la ausencia de falsos positivos debidos a la proteína A.

El hecho de que no se utilicen de forma rutinaria las técnicas de transferencia electroforética se debe a la laboriosidad de fabricar los geles de electroforesis, así como al importante gasto de reactivos y tiempo empleado en realizar la técnica. Estos problemas se evitan al utilizar un sistema de electroforesis semiautomático con geles comerciales, evitándose el tiempo empleado en su fabricación. Debido al hecho de ser geles ultrafinos y a su reducido tamaño, el tiempo de elución es mucho más breve y también el gasto de reactivos es muy inferior.

Comparada esta técnica con las habitualmente empleadas (inmunodifusión, RIA y ELISA) presenta varias ventajas y desventajas. Con respecto a la inmunodifusión, todo, salvo la necesidad de disponer del aparato de electroforesis, son ventajas: superior sensibilidad, mayor rapidez y gran especificidad. En el caso del RIA, presenta una menor sensibilidad pero posee las ventajas de una mayor rapidez y de la ausencia tanto de interferencias como de falsos positivos. Sin embargo, es la necesidad de utilizar material radiactivo lo que ha hecho que, siempre que sea posible, se evite utilizar la técnica de RIA.

Por último, la comparación con la técnica de ELISA, posiblemente el mejor sistema de detección de EE y TSST-1 descrito, demuestra que la técnica de transferencia

electroforética desarrollada por nosotros es algo más rápida y más específica; sin embargo, el método ELISA presenta una superior sensibilidad y la posibilidad de procesar un mayor número de muestras. Como resumen se podría concluir que si el número de muestras a analizar no es muy elevado se puede utilizar la técnica de transferencia electroforética como único método de detección de EE y TSST-1, pero si este número es muy elevado se podría utilizar primero el método ELISA, y posteriormente como técnica de confirmación el método de transferencia electroforética.

La segunda parte del trabajo ha consistido en comprobar la producción de EE y TSST-1 por parte de estafilococos aislados de mastitis de ovejas, cabras y vacas. Se identificaron 121 cepas, 81 pertenecientes a la especie S. aureus y 40 a las especies de estafilococos coagulasa negativas. Es de destacar que, a pesar del elevado número de especies coagulasa negativas hoy reconocidas, todavía existen cepas que no pueden encuadrarse dentro de ninguna especie utilizando los sistemas de identificación actuales.

Para la detección de EE y TSST-1 se utilizaron las técnicas de ELISA doble "sandwich" y la de transferencia electroforética desarrollada por nosotros, existiendo una correspondencia casi absoluta en los resultados.

En cuanto a los estafilococos coagulasa positivos, aislamos exclusivamente la especie Staphylococcus aureus, confirmando los datos citados en la bibliografía en cuanto a la superior capacidad enterotoxigénica de las cepas aisladas de ovejas y cabras sobre las de vaca. También se corroboró el hecho de que sea la EE-C el tipo

de EE predominante en el caso de estafilococos de origen animal. Estos datos confirman el peligro que supone la leche de los animales mastíticos para la salud del consumidor.

Aunque existen autores que dudan del poder enterotoxigénico de las especies coagulasa negativas, se estudio la posible producción de EE por parte de los mismos. A pesar de que el número de cepas productoras de enterotoxinas fue muy reducido y su nivel de producción escaso, los estafilococos coagulasa negativos deben tenerse en cuenta a la hora de estudiar brotes de intoxicación por EE.

Se estudio también la producción de TSST-1 por parte de los estafilococos aislados de mastitis. Es de destacar la elevada proporción de cepas productoras de esta toxina, generalmente en combinación con la EE-C, por parte de las cepas de Staphylococcus aureus. Las cepas coagulasa negativas, aunque en menor medida que las cepas de Staphylococcus aureus, produjeron esta toxina en una cantidad muy superior a la de las EE.



SUMMARY

In the present work we have developed a blotting technique for the detection of staphylococcal enterotoxins (SET) and TSST-1. This method has different advantages as an adequate sensitivity, uses small amounts of reagents, is completed in short time, a large number of samples can be processed, shows high specificity and is very objective.

This technique was very useful for detecting SET and TSST-1 from extracts from type strains and from contaminated foods, and false positive results due to protein A were avoided.

Blotting is not routinely used due to the difficulty of preparing electrophoresis gels, the large volume of reagents used and time required. These problems are avoided when using a semiautomatic electrophoresis system with commercial gels, already prepared. As they are ultra-thin, elution is much faster and less reagents are used.

When this technique is compared to those currently used (Immunodiffusion, RIA and ELISA) it shows advantages and disadvantages. As respects immunodiffusion, the only disadvantage of blotting is the need for an electrophoresis machine. The advantages are a higher sensitivity, it is faster and more specific. RIA is more sensitive but slower, and may show false positive results, as well as requires radioactive material.

Lastly, when compared to ELISA, probably the best method for detecting SET and TSST-1, our blotting technique is somewhat faster and more specific; however, the ELISA method shows a higher sensitivity and the ability of processing a higher number of samples. In conclusion, we propose that if the number of samples is not very high, blotting can be used as the only method for detecting SET and TSST-1, but if this number is very high, ELISA might be used as first screening method, confirming the positives with blotting.

The second part of the work has involved the detection of SET and TSST-1 produced by staphylococci isolated from ewe, goat and cow mastitis. We have identified 121 staphylococci, 81 coagulase positive and 40 coagulase negative. We would like to emphasize that, in spite of the high number of coagulase negative species described, there are still strains which cannot be ascribed to any of these species using the available systems of identification.

We compared ELISA double sandwich and the blotting technique developed by us for detecting SET and TSST-1. The correspondence was almost complete.

Staphylococcus aureus was the only coagulase positive species identified. More enterotoxigenic strains were found amongst ewes and goats than in cows, agreeing with data reported by others. Our data also confirm that SE-C is the main enterotoxin produced by ruminants. These data confirm the danger posed by milk from mastitic animals to public health.

Though the number of enterotoxigenic coagulase negative strains and the level of production was low, coagulase negative strains have to be analyzed when studying intoxication by staphylococcal enterotoxins.

TSST-1 production was also studied in staphylococci isolated from mastitis. The high number of producing strains has to be emphasized, usually in combination with SE-C. This was specially true in S. aureus; coagulase negative strains also produced this toxin in a higher proportion than SET.

Capitolo VI: BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- * ADESONE, G.O. (1985). Characterization of some unclassifiable strains of staphylococci isolated from goats and sheep. *J. Appl. Bacteriol.* **58**: 257-262.
- * ADEYEMO, J., O. OLSEVIK and K. JOSEPH. (1989). Production of toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* strains from various sources in Nigeria, Norway and Denmark. Review of Infectious Diseases. **11** (suppl.1): S327-S328.
- * ADEYEMO, A.A., S.R. TATINI and D.O. HOOVER. (1984). Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* **2**: 487-495.
- * ALTU, B. and M.S. BERGDOLL. (1988). Characterization of staphylococci from patients with toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2427-2428.
- * ALTSCHUL, Z., I. NATHAN and S. SARID. (1985). Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxin B and C₁ production in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **52**: 516-521.
- * ALVINE, J.C., D.J. KEMP and G.R. STARK. (1977). Method for detection of specific DNA in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**: 5330-5334.
- * ALVINE, J.C., D.J. KEMP, S.A. PARKER, J. REISER, J. REHART, G.R. STARK and G.M. WALK. (1979). Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods in Enzymology.* **66**: 230-242.
- * ANGIOTTI, R. (1969). Citado por Niskanen (1977b).
- * ARNHEIM, N. and E.M. SUTHERN. (1977). Heterogeneity of the ribosomal genes in mice and men. *Cell.* **11**: 363-370.
- * AVENA, R.M. and M.S. BERGDOLL. (1967). Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. *Biochem.* **6**: 1474-1480.
- * BARKER, P. and S.A. ROSE. (1989). Rapid detection of staphylococcal enterotoxins in foods with a modification of the reversed passive latex agglutination assay. *J. Appl. Bacteriol.* **67**: 395-399.
- * BARRY, A.L., R.V.F. LACHICA and P.V. ACRISON. (1973). Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.* **25**: 696-697.
- * BATHIN, V.K., K. CHANDER and B. RAMANATHAN. (1982). Characterization of deoxyribonuclease positive enterococci isolated from milk and milk products. *J. Food Prot.* **55**: 340-353.
- * BATTIGER, S., W.J. NEWMALL and R.B. JONES. (1982). The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Methods.* **58**: 307-307.
- * BAUTISTA, L., P. GATA, M. MEDINA and M. MURIEZ. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 566-569.
- * BAYLES, K.W. and J.J. IANDELLO. (1989). Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* **171**: 4799-4806.
- * BEISEL, U. (1984). Protein blotting. *Electrophoresis.* **5**: 3-18.

- * BENNETT, R.W., S.A. KEOSEYAN, S.R. TATINI, M. THOTA and W.S. COLLINS. (1973). Staphylococcal enterotoxins: a comparative study of serological detection methods. *Can. Ins. Food Sci. Technol.* **6**: 131-134.
- * BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA and G.H. DACK. (1959). Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. *Arch. Biochem. Biophys.* **85**: 62-69.
- * BERGDOLL, M.S., F.S. CHU, I.-Y. HUANG, C. ROWE and T. SHIH. (1965). Staphylococcal enterotoxin B. III. The physicochemical properties and N- and C-terminal amino acid sequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **112**: 104-110.
- * BERGDOLL, M.S., K.F. WEISS and M.J. MUSTER. (1967). The production of staphylococcal enterotoxin by coagulase negative microorganisms. *Bacteriol. Proc.* pp. 12.
- * BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.W. ROBBINS and K.F. WEISS. (1971). Identification of enterotoxin E. *Infect. Immun.* **4**: 593-595.
- * BERGDOLL, M.S. (1972). The nature of bacterial toxins. *Clin. Toxicol.* **3**: 441-451.
- * BERGDOLL, M.S. and R.W. ROBBINS. (1973). Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. *J. Milk Food Technol.* **36**: 610-612.
- * BERGDOLL, M.S., I.-Y. HUANG and E.J. SCHANTZ. (1974). Chemistry of staphylococcal enterotoxins. *Agricultural and Food Chem.* **22**: 9-13.
- * BERGDOLL, M.S., R. REISER and J. SPITZ. (1976). Staphylococcal enterotoxins. Detection in food. *Food Technol.* **30**: 80-84.
- * BERGDOLL, M.S., A.L. MOLETO, R.F. REISER and R.W. ROBBINS. (1979). Citado por Bergdoll (1983).
- * BERGDOLL, M.S. and R. REISER. (1980). Application of radioimmunoassay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *J. Food Prot.* **43**: 68-72.
- * BERGDOLL, M.S., B.A. CRASS, R.F. REISER, R.W. ROBBINS and J.P. DAVIES. (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome Staphylococcus aureus isolates. *Lancet.* **1**: 1017-1021.
- * BERGDOLL, M.S. (1983). Enterotoxins. En C.S.F. Eamon y C. Adlam (Eds). "Staphylococci and staphylococcal infections", Vol. II, pp. 559-598. Academic Press Inc., London Ltd.
- * BERGDOLL, M.S. and P.N. SCHLIEVERT. (1984). Toxic shock syndrome toxin. *Lancet*, **11**: 691.
- * BERGDOLL, M.S. (1985). The staphylococcal enterotoxins-an update. *Zentralbl. Bakteriol. Suppl.* **14**: 247-254.
- * BERGDOLL, M.S. (1989). Staphylococcus aureus. En Michael P. Doyle (Ed). "Foodborne bacterial pathogens". pp. 463-523. Mark Dekker, Inc. New York and Basel.
- * BETLEY, M.J. and J.J. MEKALANOS. (1985). Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. *Science.* **222**: 185-187.
- * BETLEY, M.J. and J.J. MEKALANOS. (1988). Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* **170**: 34-41.
- * BITTNER, M., P. KUPFERER and C.F. MORRIS. (1980). Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* **102**: 459-471.

- * BJORRE, I. (1972). Some physicochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. **22**: 579-584.
- * BLAS, A.L. de and N.M. CHERWINSKI. (1983). Detection of antigens on microcellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. Anal. Biochem. **133**: 214-219.
- * BOLEN, J.W., J.A. GARFINKLE and R.A. COMSTOCK. (1982). Detection and quantitation of Newcastle disease virus proteins in infected chicken embryo cells. Appl. Environ. Microbiol. **43**: 199-209.
- * BOLSTADGE, M.C. and G. ROTH. (1985). Enterotoxigenicity of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and milk products. South African J. Dairy Tech. **18**: 97-99.
- * BOOL, F.M., A. OGDEN and C. SANCHEZ-BOTIJA. (1969). Diagnosis of ASFV by immunofluorescence. Aust. J. Inf. Dispositiol. **12**: 819-839.
- * BORJA, C.R. and M.S. BERGDOLL. (1967). Purification and partial characterization of enterotoxin G produced by *S. aureus* strain 137. Biochem. **6**: 1467-1473.
- * BORJA, C.R., E. FANNING, I.-Y. HUANG and M.S. BERGDOLL. (1972). Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin. Eur. J. Biol. Chem. **247**: 2456-2463.
- * BULMER-HERTZBERGER, S.A., N.M. SCHL-VOS, D.A.A. MOSEBEL and H. MGA. (1981). Pales-negative results in examining foods for staphylococcal thermostable. Antonie van Leeuwenhoek. **47**: 245-266.
- * BOWEN, G. J. SEIBERGER, U.K. LAEMMLI and H. WEINTRAUB. (1980). The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. Nucleic Acids Res. **8**: 1-20.
- * BRAUN, D.R., L. PEREIRA, S. MORRIS and B. ROZMAN. (1983). Application of denatured, electrophoretically separated and immobilized lysates of herpes simplex virus-infected cells for detection of monoclonal antibodies and for studies of properties of viral proteins. J. Virol. **50**: 103-112.
- * BROCKHURDIE, J.C. and M.S. BERGDOLL. (1971). Outbreak of foodborne gastroenteritis due to a coagulase negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. New England J. Med. **285**: 541-543.
- * BURGOYE, J.A. and N.M. JOHNSON. (1975). Staphylococcal enterotoxin G: serological immunoassay. Appl. Microbiol. **30**: 798-791.
- * BURNETS, W.N. (1981). "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified microcellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. **111**: 195-203.
- * BUTSER, M.L. de and F. DILASSER. (1984). Enterotoxin production by staphylococci isolated from goats' milk. Les maladies de la chèvre. Colloque International, Mont (France). 9-11 Octobre 1984.
- * BUTSER, M.L. de, F. JANIN and F. DILASSER. (1985). Contamination of ewe cheese with *Staphylococcus aureus*: study of an outbreak of food poisoning. Zentralblatt für Bakteriologie, Microbiologie und Hygiene. I Supplemente **14**: 677-678.
- * BUTSER, M. L. de, F. DILASSER, R. MAMMEL and M.S. BERGDOLL. (1987). Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. Int. J. Food Microbiol. **5**: 301-309.
- * CASHAN, E.P. (1960). Further serological studies of staphylococcal enterotoxins. J. Bacteriol. **72**: 849-856.
- * CASHAN, E.P. (1965). Staphylococcal enterotoxin. Ann. N. Y. Acad. Sci. **128**: 824-835.

- * CASMAN, E.P. and R.W. BEVNET. (1963). Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.* **11**: 181-182.
- * CASMAN, E.P. (1967). Staphylococcal food poisoning. *Health Lab. Sci.* **6**: 209-226.
- * CASMAN, E.P., R.W. BEVNET, A.E. DODDY and J.A. ISSA. (1967). Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.* **94**: 1875-1882.
- * CASMAN, E.P., R.W. BEVNET, A.E. DORSEY and I.E. STONE. (1969). The membrane-slide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Lab. Sci.* **8**: 185-198.
- * CHANG, K.-C. and W.S. BERGDOLL. (1979). Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Stoches.* **18**: 1937-1942.
- * CHESBRO, M.R. and K. ALBORN. (1967) Enzymatic detection of the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol.* **11**: 1150-1159.
- * CHESBRO, R.A. and N.W. POTTER. (1976). Stability of staphylococcal enterotoxin A to selected conditions encountered in foods. *J. Food Sci.* **41**: 906-909.
- * CHOW, A.W. and K.W. BARTLETT. (1963). Lethality and abscess formation in mice by *Staphylococcus aureus* from toxic shock syndrome patients and healthy controls. Abstract in *Ann. Abstracts of the Clinical Society from Microbiology Annual Meeting*. 1963: 92.
- * CLARKE, L., E. NITZMAN and J. CARSON. (1979). Selection of specific clones from colony banks by screening with radioactive antibody. *Methods in Enzymology*. **68**: 438-442.
- * COXON, J.L., M.P. SUTTS and N.J. BETLEY. (1980). Cloning and nucleotide sequence of the Type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* **170**: 375-402.
- * GRAB, S.A. and M.S. BERGDOLL. (1986a). Involvement of coagulase negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 43-45.
- * GRAB, S.A. and M.S. BERGDOLL. (1986b). Involvement of staphylococcal enterotoxins in nonmenstrual toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 1138-1139.
- * DANK, S.H. (1949). Citrate per Surgalis *AS* **81**. (1953).
- * DANL, J. (1966). *Staphylococcus aureus* in raw milk. *Dansk Veterinaertidsskrift*. **69**: 533-534.
- * DANIELSSON, M.-L. and S. WELLSBERG. (1977). The biochemical reactivity of enterotoxin and non-enterotoxin producing staphylococci. *Acta Vet. Scand.* **18**: 266-273.
- * DAVIS, E.J. (1964). Disc electrophoresis II: methods and applications to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- * DAVIS, J.P., P.J. CHEENEY, P.J. WARD, M. LEVINTURE and the investigation and laboratory team. (1980). Toxic shock syndrome. Epidemiologic Features: recurrence, risk factors and prevention. *N. Engl. J. Med.* **303**: 1429-1439.
- * DELEPBLATRE, P. and M.M. CHAI. (1979). Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4 °C: characterization of two additional chlorophyll *a*-protein complexes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **76**: 111-115.
- * DENNY, S.L., J.V. MUNGER and W. SCHERR. (1971). Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl. Microbiol.* **21**: 1064-1066.

- * DEVEREUX, L.A., V. HAJEK, P. OEDING, S.A. MEYER and K.W. SCHLEIFER. (1978). *Staphylococcus aureus* (Synonymy 1955) comb. nov. and *Staphylococcus aureus* subsp. *chromogenicus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 682-690.
- * DEVEREUX, L.A. (1979). Identification of clumping-factor negative staphylococci isolated from swine udders. *Res. Vet. Sci.* **27**: 313-320.
- * DEVEREUX, L.A. and V.O. KEACOCKE. (1979). A comparison of methods and the validity of deoxyribonuclease tests for the characterization of staphylococci isolated from animals. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 369-393.
- * DEVEREUX, L.A. and V. HAJEK. (1980). A review. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 1-11.
- * DEVEREUX, L.A., K.W. SCHLEIFER and G.O. ADEGOKE. (1983). Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 41-55.
- * DOLMAN, C.E. and R.J. WILSON. (1940). The kitten test for *Staphylococcus enterotoxin*. *Can. Public Health J. February 1940*: 68-71.
- * DONNELLY, C.B., J.E. LESLIE, L.A. BLACK and E.N. LEWIS. (1947). Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.* **13**: 1362-1367.
- * DUBIN, G., S.R. TATINI and S.K. MANISHARAN. (1986). Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C₁, D and E. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1253-1257.
- * SNOWLER-ROSE, B.B., R.W. JOHNSTON, M.E. HARRIS and V.M. LEE. (1980). Rapid detection of staphylococcal thermostable exfoliatin on ceilings of naturally contaminated fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 13-18.
- * BRICKSON, P.F., L.N. MINIER and R.G. LAMER. (1982). Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunoradiographic detection of antigens. *J. Immunol. Methods.* **91**: 281-289.
- * BERRIBANO, J.M., M.J. PASTOR and J.M. SANCHEZ-VIZCAINO. (1980). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.* **41**: 1118-1122.
- * BERRIBANO, J.M., M.J. PASTOR, M. ARIAS y J.M. SANCHEZ-VIZCAINO. (1990). Confirmación de sueros positivos a ELISA-pestes porcinos africanas mediante la técnica de "immunoblotting", utilización de proteínas inducidas por el virus, con pesos moleculares comprendidos entre 25 y 33 kilodaltons, en el desarrollo de un "kit" de diagnóstico. *Med. Vet.* **7**: 135-141.
- * ESSINK, A.W.G., G.J.M.W. ARKESTEIJN and S. NOTERMANS. (1985). Interference of lysozyme in the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Immunol. Methods.* **80**: 91-96.
- * EVANS, J.B., L.G. BUEFFNER and C.F. NIVEN. (1950). Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. *J. Bacteriol.* **60**: 481-486.
- * FAY, N., H. PFISTER and G. RUEGG. (1984). Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *J. Clin. Microbiol.* **12**: 34-38.
- * FRED, R.C., M.L. EVENSON, R.F. REIDER and W.S. BERGDOLL. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1349-1355.

- * FRIEZE, J.W. (1986). Toxins as virulence factors of Gram-positive pathogenic bacteria of veterinary importance. In J.A. Roth (Ed). "Virulence mechanisms of bacterial pathogens". pp. 284-288.
- * FRIEDL, E. and S.J. MERCER. (1986). Nonmenstrual toxic shock syndrome. *Obstet. Gynecol. Surg.* **61**: 356-347.
- * FRIEDMAN, M.E. and J.O. WHITE. (1965). Immunofluorescent demonstration of cell-associated staphylococcal enterotoxin S. *J. Bacteriol.* **89**: 1155.
- * FUKUDA, K. and X. IGARASHI. (1983). Rapid latex agglutination test for the detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 2545-2548.
- * FUND, D.V.C. and J. WAGNER. (1971). Capillary tube assay for staphylococcal enterotoxins A, B and C. *Appl. Microbiol.* **21**: 559-561.
- * GARDNER, M.R. and G.H. RICHARDSON. (1971). Capillary tube immunological assay for staphylococcal enterotoxins. *Appl. Microbiol.* **21**: 626-627.
- * GARBE, P.L., R.J. ARCO, A.L. REINHOLD, L.M. GRAVIS, P.S. NATES, A.W. HINTERMEYER, F.W. STANBURN and C.V. BOONCE. (1985). ~~Staphylococcal enterotoxins~~ isolated from patients with thrombocytopenic toxic shock syndrome. *JAMA.* **253**: 2543-2542.
- * GARCIA, M.L., E. MORINO and M.S. BERGOLD. (1985). Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 548-553.
- * GEMMELL, C.S. and J.E. DAWSON. (1982). Identification of coagulase-negative staphylococci with the API Staph system. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 874-877.
- * GEMMINGS, C. (1974). Citado por Wiseman (1977b).
- * GEMMINGS, C. and I.K. YEO. (1976). Recovery of staphylococcal enterotoxins from foods by affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 274-279.
- * GERBOWITZ, J.M. and G.E. PALADE. (1982). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.* **132**: 306-309.
- * GERBOWITZ, J.M. and G.E. PALADE. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **133**: 1-19.
- * GERWIGER, M. (1987a). The occurrence of pathogenic and enterotoxin-producing staphylococci in post's milk. *Tierärztliche Umschau.* **42**: 189-193.
- * GERWIGER, M. (1987b). Food poisoning from enterotoxin-producing ~~staphylococcal~~ ~~enterotoxin~~ strains in UHT milk and a UHT flavoured milk. *Tierärztliche Umschau.* **42**: 98-100.
- * GIBSON, W. (1981). Protease-facilitated transfer of high-molecular-weight proteins during electrotransfer to nitrocellulose. *Anal. Biochem.* **118**: 1-3.
- * GIPPER, G., G.R. CRAMPTON and K.R. GUNOY. (1984). Comparison of the API Staph-Ident and OMS Staph-Test systems with conventional methods used for the identification of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 68-72.
- * GILBERT, C.F. (1986). Effects of staphylococcal enterotoxin E on the coagulation mechanism and leukocyte response in beagle dogs. A preliminary study. *Thrombosis et Diathesis et Haemorrhagica.* **56**: 697-706.

- * GILMOUR, A. and J. HARVEY. (1990). Staphylococci in milk and milk products. *J. Appl. Bacteriol. Symposium supplement*, 1479-1668.
- * GROBS, E.M., Z. WEIZMAN, S. PICARD, A. MATIS, R. SHEINMAN, H. PLATZNER and A. WOLFF. (1983). Mesenteric gastroenteritis due to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B from a goat with mastitis. *American J. Tropical Med. Hyg.* **28**: 103-104.
- * GUTIERREZ, L.M., J. MENES, M.L. GARCIA, B. MORENO and M.S. BERGOLD. (1982). Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. *J. Food Prot.* **55**: 1282-1286.
- * HAHN, L.F., P. PICKENHAM, W. LENZ and H. BRANDIS. (1986). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Immunol. Methods*. **92**: 25-29.
- * HAJEK, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 401-403.
- * HAJEK, V. (1978). Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 264-268.
- * HAJEK, V., L.A. DEVIÈSE, M. MORDASKI, M. GOODFELLOW, G. PULVERER and P.E. MARRAS. (1986). Elevation of *Staphylococcus aureus* subsp. *chromogenicus* (Devièse et al., 1978) to species status: *Staphylococcus chromogenicus* (Devièse et al., 1978) comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 169-173.
- * HALL, H.E., R. ANGILOTTI and K.H. LEWIS. (1965). Detection of the staphylococcal enterotoxins on food. *Health Lab. Sci.* **2**: 179-191.
- * HALLANDER, H.O. (1965). Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. *Acta Path. Microbiol. Scandinav.* **63**: 399-399.
- * HAMES, B.D. (1971). An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. *Ed. B.D. Hames and D. Rickwood (Eds). "Gel Electrophoresis of proteins: a practical approach".* pp. 6-16. IRL Press Limited, London, Washington D.C.
- * HARDOCK, K. and V.C.W. TSANG. (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* **133**: 157-162.
- * HARVEY, P.A., F.E. PENNINGER, J.M. MILLER and M.A. LOVETT. (1982). Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum*. *J. Immunol.* **128**: 1287-1291.
- * HARRISAN, W.F. y H.E. McCANCE. (1979). Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos. Ed. Academia León.
- * HARVEY, J. and A. GILMOUR. (1985). Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. *J. Appl. Bacteriol.* **59**: 207-221.
- * HARVEY, J. and A. GILMOUR. (1988). Isolation and characterization of staphylococci from goat's milk produced in Northern Ireland. *Letters Appl. Microbiol.* **7**: 79-82.
- * HART, H.P. and K. BUCKER. (1986). Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal. Biochem.* **152**: 386-389.
- * HAWKES, R., E. MIDAY and A. MATHE. (1982). Monoclonal antibodies identify novel secreted antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **79**: 2610-2614.
- * HAYMAN, E.G., E. ENQVALL, E. A'DEARM, G. BARNES, M. PHERSCHACHER and E. MUELLER. (1982). Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J. Cell Biol.* **95**: 20-23.

- * HEUKESHOVEN, J. and R. DERHIK. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, **6**: 103-112.
- * HO, G., W.H. CAMPBELL, M.S. BERGDOLL and E. CARLSON. (1989a). Production of a toxic shock syndrome toxin variant by Staphylococcus aureus strains associated with sheep, goats and cows. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1946-1948.
- * HO, G., W.H. CAMPBELL and E. CARLSON. (1989b). Ovine-associated Staphylococcus aureus protein with immunochemical similarity to toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 210-212.
- * KOCH, S.O. (1982). DNA-binding domains of fibronectin probed using Western blots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**: 1353-1358.
- * WOOPER, D.G., S.R. TATINI and J.B. MALTAIS. (1983). Characterization of staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 649-660.
- * HOWE, J.G. and J.W.B. HERSHEY. (1981). A sensitive immunoblotting method for measuring protein synthesis initiation factor levels in lysates of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **256**: 12836-12839.
- * HUANG, T.-Y., T. SHIH, C.R. BORJA, R.M. AVENA and M.S. BERGDOLL. (1967). Amino acid composition and terminal aminoacids of staphylococcal enterotoxin C. *Biochem. J.* **102**: 1480-1484.
- * HUANG, T.-Y. and M.S. BERGDOLL. (1970). The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. III. The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethylated enterotoxin B, and the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **245**: 3518-3525.
- * HUANG, T.-Y., E.J. SCHANTZ and M.S. BERGDOLL. (1975). Citado por Bergdoll (1983).
- * IANDOLO, J.J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxin of Staphylococcus aureus. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 375-402.
- * IANDOLO, J.J. and K. TWETEN. (1989). Purification of staphylococcal enterotoxins. *Methods in Enzymology*, **163**: 43-52.
- * JACOBSON, J.A., E. KASHORN and J.A. DALY. (1989). Risk of developing toxic shock syndrome associated with toxic shock syndrome associated with toxic shock syndrome toxin 1 following nongenital staphylococcal infection. *Rev. Infect. Dis.* **11**: 58-613.
- * JARVIS, A.V. and R.C. LAWRENCE. (1970). Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. *Appl. Microbiol.* **19**: 698-699.
- * JOHNS, H.B. Jr. and S.A. KHAN. (1988). Staphylococcal enterotoxin B is associated with a discrete genetic element. *J. Bacteriol.* **170**: 4033-4039.
- * JOHNSON, H.M., K.E. HALL and H. SIMONS. (1967). Enterotoxin B: serological assay in cultures by passive hemagglutination. *Appl. Microbiol.* **15**: 815-818.
- * JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC and P.E. KAUFFMAN. (1972). Antigenic cross reactivity of staphylococcal enterotoxins. *Infect. Immun.* **3**: 645-647.
- * JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC and P.E. KAUFFMAN. (1973). Staphylococcal enterotoxins A and B: solid-phase radioimmunoassay in food. *Appl. Microbiol.* **26**: 309-313.
- * JONES, T.O. and A.A. WIENEKE. (1986). Staphylococcal toxic shock syndrome. *Vet. Rec.* **119**: 435-436.

- * JEVIS, T.M. (1973). Multiphase Zone electrophoresis I: steady-state moving boundary systems formed by different electrolyte combinations. *Biochem. J.* **132**: 671-690.
- * JINZPECK, Z., A. SACZKA and M. GATOWSKA. (1980). Specific serum antibodies to enterotoxins A, B, C, D and E of *Staphylococcus aureus* in healthy man. *Zbl. Bakt. Suppl.* **10**: 879-888.
- * KANLEN, K.S., J.M. BOYCE, M.S. BEREDJEL, W.R. LOCKWOOD and H.R. YEMM. (1986). Foetal shock syndrome associated with TSST-1 producing coagulase negative staphylococci. *Am. J. Med. Sci.* **292**: 340-343.
- * KANITA, K., K. O'CONNELL and M.A. PERMUTT. (1982). Immunodetection of insulin after transfer from gels to nitrocellulose filters. A method of analysis in tissue extracts. *Diabetes* **31**: 688-692.
- * KASCHKA, O., A. LOMVITHAL, H. THOMAS and H. KOPPE. (1981). Serological identification of wound antisera after electrophoretic transfer. *J. Immunol. Meth.* **53**: 173-179.
- * KATO, E. and T. KUME. (1980). Enterotoxigenicity of bovine staphylococci isolated from California mastitis test positive milk in Japan. *Japanese J. Vet. Res.* **28**: 75-83.
- * KUNFFMAN, P.E. and R.M. JOHNSON. (1971). Stability of ¹²⁵I labeled staphylococcal enterotoxins in solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.* **22**: 776-779.
- * KUNFFMAN, P.E. (1980). Enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxins A. *J. A. O. A. C.* **66**: 1130-1143.
- * KAY, M.M.B., G.R. GOODMAN, K. SORENSEN, C.F. WHITFIELD, P. WONG, L. ZAKI and W. BRIDGEMAN. (1985). Dissociant cell antigen is immunologically related to band 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 1684-1688.
- * KLEGG, W.B. and K.W. SCHLEIFER. (1975). Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 82-88.
- * KLEGG, W.B. and K.W. SCHLEIFER. (1980). Genus IV. *Staphylococcus* Bersebaech 1884. In P.H.A. Sneath, M.S. Mair, N.B. Sharpe and J.G. Holt (Eds.), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol. 2, pp. 1013-1033. Williams and Wilkins, Baltimore.
- * KLEGG, W.B. (1988). Systematics and the natural history of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Symposium supplement*, 255-378.
- * KESPER, J.W., A.M. HAGENHAARS and S. NOTERMANS. (1989). Prevention of cross-reactions in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type 6 in culture filtrates and foods. *J. Food Safety* **2**: 33-45.
- * KRIZWORTH, D.W., P.M. SCHLEIFER and A.P. NOVICK. (1987). Evaluation of coagulase negative staphylococci for ability to produce toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 2808-2809.
- * KUM, J.K.S. and G.J. SILVERMAN. (1980). Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of staphylococcal enterotoxins in food. *J. Food Prot.* **33**: 604-607.
- * LACINCA, R.V.F., K.F. WEISS and R.H. DEBHEL. (1989). Relationships among coagulase, enterotoxin and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **59**: 926-927.
- * LACINCA, R.V.F., C. GENTIGORINI and P.D. HOEPRICH. (1971a). Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* **21**: 989-997.
- * LACINCA, R.V.F., P.D. HOEPRICH and C. GENTIGORINI. (1971b). Nuclease production and lysostaphin-susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other coagulase-positive cocci. *Appl. Microbiol.* **21**: 823-826.

- * LACHICA, R.V.F., P.D. HOEPRICH and C. GENIGEORGIS. (1972). Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Microbiol.* **23**: 168-169.
- * LANGLOIS, B.E., R.J. HARMON and K. AKERS. (1984). Identification of staphylococcus species of bovine origin with the DHS Staph-Trac system. *J. Clin. Microbiol.* **20**: 227-230.
- * LANGLOIS, B.E., A.K. PARLINDUNGAN, R.J. HARMON and K. AKERS. (1990). Biochemical characteristics of staphylococcus species of human and bovine origin. *J. Food Prot.* **53**: 119-126.
- * LAPEYRE, C., S.V. KAVERI and A.D. STROBERG. (1987). A novel approach to prevent the interference of protein A in immunoassays of enterotoxin. *Letters Appl. Microbiol.* **5**: 55-59.
- * LEE, A.C.-M., R.W. ROBBINS, R.F. REISER and H.S. BERGDOLL. (1980). Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins B, C₁ and C₂. *Infect. Immun.* **22**: 431-434.
- * LEE, C.Y., Y.S. HUANG, P.C. HU, V. GOMEL and A.C. MENGE. (1982). Analysis of sperm antigens by sodium dodecyl sulfate gel/protein blot radioimmunoassay method. *Anal. Biochem.* **123**: 14-22.
- * LIN, Y.-S., M.T. LARGEN, J.R. NEWCOMB and T.J. ROGERS. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for staphylococcal enterotoxin B. *J. Med. Microbiol.* **27**: 263-270.
- * LINDROTH, S. and A. NISKANEN. (1977). Double antibody solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **4**: 137-143.
- * LIU, C.T., R.T. de LAUTER and R.T. FAULKNER. (1977). Cardiovascular and hepatic responses of rhesus macaques to staphylococcal enterotoxin B. *Am. J. Vet. Res.* **38**: 1849-1854.
- * LOMBAI, G., L. JANDSI, F. KATOMA, P. MAJOR, H. MILCH, L. ORMAY and J. TAKACS. (1980). Properties and food hygiene importance of Staphylococcus aureus strains isolated from udders. *Archiv fur Lebensmittelhygiene.* **31**: 206-209.
- * LOTTER, L.P. and C.A. GENIGEORGIS. (1975). Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase negative enterotoxigenic cocci. *Appl. Microbiol.* **29**: 152-158.
- * McCOLLISTER, B.D., B.X. KREISVIRTH, R.P. NOVICK and P.M. SCHLIEVERT. (1990). Production of toxic shock syndrome-like illness in rabbits by Staphylococcus aureus 4508; association with enterotoxin A. *Infect. Immun.* **58**: 2067-2070.
- * McMICHAEL, J.C., L.M. GREISIGER and I. MILLMAN. (1981). The use of nitrocellulose blotting for the study of hepatitis B surface antigen electrophoresed in agarose gels. *J. Immunol. Methods.* **45**: 79-94.
- * MELLADO, R.P. (1985). Electroforesis de proteínas. En CSIC (Ed). "Ingeniería genética: manual de técnicas básicas". pp. 29-34.
- * MEYER, R.F. and H.J. PALMIERI. (1980). Single radial immunodiffusion method for screening staphylococcal isolates for enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 1080-1085.
- * NIERT, A.S.J.P.A.M. van, Th.M. van DUIN, J.H.M. VERHEIJOEN and A.J.N. SCHOTMAN. (1983). Staphylococcal enterotoxin B and Escherichia coli endotoxins: comparative observations in goats on fever and associated clinical hematologic and blood biochemical changes after intravenous and intramammary administration. *Am. J. Vet. Res.* **44**: 955-963.
- * NIERT, A.S.J.P.A.M. van, C.T.M. van DUIN and A.J.N. SCHOTMAN. (1984). Comparative observations of fever and associated clinical hematological and blood biochemical changes after intravenous administration of staphylococcal enterotoxins B and F (toxic shock syndrome toxin 1) in goats. *Infect. Immun.* **46**: 354-360.

- * MILLER, B.A., R.F. REISER and H.S. BERGDOLL. (1978). Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 421-426.
- * MORGAN, K.L., E. GRUFFYDD-JONES, A.A. WIENEKE, J. de AZAVEDO, P.J. CARROL and L.P. STEVENSON. (1986). Staphylococcal toxic shock syndrome. *Vet. Rec.* **112**: 559.
- * MORSE, S.A. and R.A. MAH. (1967). Microtiter hemagglutination-inhibition assay for staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Microbiol.* **13**: 58-61.
- * MULLERMAN, H.G., H.G.J. ter HART and W. van DIJK. (1982). Specific detection of inactive enzyme protein after polyacrylamide gel electrophoresis by a new enzyme-immunoassay method using unespecific antiserum and partially purified active enzymes: application to rat liver phosphodiesterase I. *Anal. Biochem.* **120**: 46-51.
- * NAKANE, P.K. and A. KAWAOKI. (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **22**: 1084-1091.
- * NIELSEN, P.J., K.L. MANCHESTER, M. TOMBIN, J. GORDON and G. THOMAS. (1982). The phosphorylation of ribosomal protein S6 in rat tissues following cycloheximide injection, in diabetes, and after denervation of diaphragm. *J. Biol. Chem.* **257**: 12316-12321.
- * NISKANEN, A. and S. LINDROTH. (1976). Preparation of labeled staphylococcal enterotoxin A with high specific activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 735-740.
- * NISKANEN, A. (1977a). Release of enterotoxin A and thermonuclease from growing and non-growing cells of Staphylococcus aureus. *J. Food Safety.* **1**: 119-128.
- * NISKANEN, A. (1977b). Staphylococcal enterotoxins and food poisoning. Production, properties and detection of enterotoxins. *Tech. Res. Centr. Finl.* pp. 83.
- * NISKANEN, A. and L. KOIRANEN. (1977). Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. *J. Food Prot.* **40**: 543-548.
- * NIYOHVIT, M, K.E. STEVENSON and R.F. Mc FEERS. (1978). Detection of staphylococcal enterotoxin B by affinity radioimmunoassay. *J. Food Sci.* **43**: 735-739.
- * NORRILD, B., B. PEDERSEN and B. ROIZMAN. (1981). Immunological reactivity of herpes simplex virus 1 and 2 polypeptide electrophoretically separated and transferred to diazobenzoyloxymethyl paper. *Infect. Immun.* **31**: 660-667.
- * NOTERMANS, S. and J.W. KOPER. (1979). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of Staphylococcus aureus enterotoxins. *Antonie van Leeuwenhoek.* **46**: 625.
- * O'DONNELL, I.J., D.D. SHUKLA and K.H. GOUGH. (1982). Electro-blot radioimmunoassay of virus-infected plant sap-A powerful new technique for detecting plant viruses. *J. Virol. Methods.* **5**: 19-26.
- * OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (15th EDITION). (1990). Staphylococcal enterotoxin in foods. Microside gel double diffusion test. En Kenneth Heirich (Ed). "Association of Official Analytical Chemists. Agricultural Chemical; Contaminants; Drugs". Vol. 1, pp. 451-455.
- * OLMSTED, J.B. (1981). Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J. Biol. Chem.* **256**: 11955-11957.
- * OLSON, J.C., E.P. CASHAN, E.F. BAER and J.E. STONE. (1970). Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. *Appl. Microbiol.* **20**: 605-607.

- * OLSVIK, O., B.P. BERDAL, K. FOSSUM and T. ONLAND. (1981). Enterotoxin production by Staphylococcus aureus related to the origin of the strains. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 89: 423-426.
- * OLSVIK, O., K. FOSSUM and B.P. BERDAL. (1982). Staphylococcal enterotoxin A, B and C produced by coagulase-negative strains within the family Micrococaceae. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 90: 443-444.
- * OLSVIK, O., J. ADEKYE and K. FOSSUM. (1987). Toxic shock toxin-1 production in Staphylococcus aureus strains of animal origin. 8th Annual Meeting ASM.
- * OMORI, G. and Y. KATO. (1959). A staphylococcal food poisoning caused by coagulase negative strain. Biken's J. 2: 92-96.
- * OTERO, A., H.L. GARCIA, M.C. GARCIA, B. MORENO and M.S. BERGOLL. (1990). Production of staphylococcal enterotoxins C₁ and C₂ and thermonuclease throughout the growth cycle. Appl. Environ. Microbiol. 56: 555-559.
- * PARK, C.E. M.B. EL DERA and M.K. RAYMAN. (1978). Evaluation of staphylococcal thermonuclease (Tnase) assay as a means of screening foods for growth of staphylococci and possible enterotoxin production. Can. J. Microbiol. 24: 1135-1139.
- * PARK, C.E. and R. SZABO. (1986). Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in foods. Can. J. Microbiol. 32: 723-727.
- * PARSONNET, J., A.E. HARRISON, S.E. SPENCER, A. READING, X.C. PARSONNET and E.H. KASS. (1987). Nonproduction of toxic shock syndrome toxin 1 by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 25: 1370-1372.
- * PASTOR, M.J., M.O. LAVIADA and J.M. SANCHEZ-VIZCAINO. (1989). Detection of african swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. Can. J. Vet. Res. 52: 105-107.
- * PASTOR, M.J., M. ARIAS and J.M. ESCRIBANO. (1991). Comparative study between two different antigens used in African swine fever antibody detection by ELISA. Am. J. Vet. Res. (en pressa).
- * PEFERDEM, M., R. NUYBRECHTS and A. DE LOOF. (1982). Vacuum-blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to nitrocellulose. FEBS Letters. 165: 369-372.
- * PHARMACIA A.B. (1986). Phast System. System Guide.
- * PLISZKA, A. and B. WINDYGA. (1972). Detection of staphylococcal enterotoxin B in foods by immunofluorescence method, Part I, Detection Roczn. Pzh. 23: 565-574.
- * POBER, Z. and G.J. SILVERMAN. (1977). Modified radioimmunoassay determination for staphylococcal enterotoxin B in food. Appl. Microbiol. 30: 525-529.
- * POUTREL, B. (1984a). Staphylococcus aureus subsp. lentus associated with goat mastitis. Am. J. Vet. Res. 45: 2084-2085.
- * POUTREL, B. (1984b). Udder infection of goats by coagulase negative staphylococci. Vet. Microbiol. 9: 131-137.
- * RAYMOND, S. and I. WEINTRAUB. (1959). Acrylamide gels as a supporting medium for zone electrophoresis. Science. 130: 711.
- * REICHERT, C.A. and D.T.C. TUNG. (1976). Thermal inactivation and subsequent reactivation of staphylococcal enterotoxin B in selected liquid foods. J. Milk Food Technol. 30: 516-520.

- * REINHART, H.P. and D. MALMLOD. (1982). Protein transfer from isoelectric focusing gels: the native blot. *Anal. Biochem.* **121**: 229-235.
- * REISER, J. and J. WARDALE. (1981). Immunological detection of specific proteins in total cell extracts by fractionation in gels and transfer to diisopropylthioester paper. *Eur. J. Biochem.* **124**: 569-575.
- * REISER, R.F., D. CONWAY and M.S. BERGDOLL. (1974). Detection of staphylococcal enterotoxins in food. *Appl. Microbiol.* **27**: 83-89.
- * REISER, R.F. and M.S. BERGDOLL. (1979). Cited por Bergdoll (1983).
- * REISER, R.F., R.M. ROBBINS, A.L. MOLETO, G.P. KNOX and M.S. BERGDOLL. (1980a). Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E_2 . *Infect. Immun.* **31**: 629-630.
- * ROHAET, J., J. REISER and G.R. STARK. (1979). Transfer of proteins from gels to diisobutylazocymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 3114-3120.
- * REYNOLDS, J.A. and C. FARFORD. (1970a). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **66**: 1002-1007.
- * REYNOLDS, J.A. and C. FARFORD. (1970b). The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* **235**: 3161-3163.
- * ROBBINS, R., S. GLAS and M.S. Bergdoll. (1974). Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.* **28**: 946-950.
- * ROBBINS, R.M. and M.S. BERGDOLL. (1984). Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot.* **57**: 172-176.
- * ROBERN, M., M. DIGBON, T. YANO and X. DICKIE. (1975). Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin E_2 . *Appl. Microbiol.* **31**: 928-929.
- * ROBERN, M. and F.M. GLEESON. (1978). The use of polyethylene glycol in radioimmunoassay of staphylococcal enterotoxins. *Can. J. Microbiol.* **24**: 765-766.
- * ROBERN, M., F.M. GLEESON and E.A. SZABO. (1978). Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxins A and B. *Can. J. Microbiol.* **24**: 436-439.
- * ROSENBERG, C., C. GANSKE and J. GORDON. (1983). A multicolor immunobinding assay for autoimmunity and the demonstration of novel antibodies against retroviral antigens in the sera of MSN mice. *J. Immunol. Methods.* **52**: 105-112.
- * ROSEN, S.Y., J.H. WINTER and A.L. EPSTEIN. (1983). Cited por Towbin y Gordon (1984).
- * RYBICKI, R.P. and M.H. von MEYER. (1982). Enzyme-assisted immune detection of plant virus proteins electroblotted onto nitrocellulose paper. *J. Virol. Methods.* **5**: 267-278.
- * SALOMON, L.L. and R.W. TEV. (1968). Assay of staphylococcal enterotoxin B by latex agglutination. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **122**: 539-542.
- * SARLIVIS, C.A. (1984). Improved blocking of nonspecific antibody binding sites on microcapillary membranes. *Electrophoresis.* **5**: 54-55.

- * SAUNDERS, G.C. and E.M. CLINARD. (1977). Application of the indirect enzyme-labeled antibody microtest to the detection and surveillance of animal diseases. *J. Infect. Dis.* **136**: 825B-826B.
- * SAUNDERS, G.C. and N.L. BARTLETT. (1977). Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 518-522.
- * SCHANTZ, E.J., V.G. ROESSLER, M.J. WOODBURN, J.M. LYNCH, H.M. JACOBY, S.J. SILVERMAN, J.C. GORMAN and L. SPERO. (1972). Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A. *Biochem.* **11**: 360-366.
- * SCHLIEVERT, P.M., K.H. SHANDS, B.B. DAN, G.P. SCHMID and R.O. WISHIMURI. (1981). Identification and characterization of an exotoxin from Staphylococcus aureus associated with toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* **143**: 509-516.
- * SCHMIDT, J.J. and L. SPERO. (1983). The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C₁. *J. Biol. Chem.* **258**: 6300-6305.
- * SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., S.M.P. FURLANETTO, A. WADER FILMO and G.D.Jr. ROSSI. (1986). Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in milk samples from mastitic cows. *Arb. Vet.* **2**: 69-74.
- * SHANDS, K.H., G.P. SCHMID, B.B. DAN, D. BLUM, R.J. GUIDOTTI, M.T. MARGRETT, K.L. ANDERSON, D.L. HILL, C.V. BROOME, J.D. BARD and D.W. FRASER. (1980). Toxic-shock syndrome in menstruating women. Association with tampon use and Staphylococcus aureus and clinical features in 52 cases. *N. Engl. J. Med.* **303**: 1436-1442.
- * SHAPIRO, A.L., E. VIRJELA and J.V. MAIZEL. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**: 815-820.
- * SHINGAKI, S., N. IGARASHI, H. FUJIKAWA, H. USHICODA, T. TERAYAMA and S. SAKI. (1981). Study on reversed passive latex agglutination for the detection of staphylococcal enterotoxins A-C. Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health. **32**: 128-131.
- * SIGMUND, H., N. ZEINBERGER and W.J. NEUBERT. (1988). Simple method for rapid and highly sensitive detection of antiviral-antibodies in serum and cerebrospinal fluid of small laboratory animals. *J. Virol. Meth.* **22**: 231-238.
- * SILVERMAN, S.J., A.R. KNOTT and H. HOWARD. (1968). Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods. *Appl. Microbiol.* **16**: 1019-1023.
- * SIMON, E. and G. TERPLAN. (1977). Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B mittels ELISA-Test. *Zbl. Vet. Med. B.* **24**: 842-844.
- * SLAYNE, H.A., M.J. ALDRED and V.G. WADE. (1990). A rapid, semi-automated SDS-PAGE identification system for oral anaerobic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 391-395.
- * SMITH, G.E. and H.D. SUMMERS. (1980). The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzoyloxymethyl-paper. *Anal. Biochem.* **109**: 123-129.
- * SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- * SPINOKA, S.M. and J.G. CANNON. (1985). Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Methods.* **81**: 161-165.
- * STELLWAG, E.J. and A.E. DAHLBERG. (1980). Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto diazobenzoyloxymethyl (DBM)-paper. *Nucleic Acids Res.* **8**: 299-317.

- * STORALE, M.E., S. COER and W.N. BOECKEN. (1990). Improved classification of pneumonias by semi-automated vitracin SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Clin. Infect. Dis. **11**: 168-173.
- * STONE, M.E. and R.C. NOWINSKI. (1980). Topological mapping of murine leukemic virus proteins by competition-binding assays with monoclonal antibodies. Virology. **100**: 370-387.
- * STRAS, B. (1968). Enterotoxicity of staphylococci isolated from milk of mastitic cows. Medycyna weterynaryjna. **22**: 368-379.
- * STRAS, B.C., T.C. BURSTER, R.F. HOPKINS III, R.N. NEUSAUER and N. BASIN. (1981). Identification of an Epstein-Barr virus nuclear antigen by immunofluorescence and radioimmunoelectrophoresis. J. Virol. **38**: 996-1004.
- * SUAREZ, G. y M.E. GOMEZ-LUCIA. (1981). Gastroenteritis por enterotoxina estafilococica. Laboratorio. **12**: 449-488.
- * SUGIYAMA, H., M.S. BERGDOLL and R.G. WILKERSON. (1960). Pergonaline and reserpine as antagonists for staphylococcal enterotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **105**: 168-172.
- * SUGIYAMA, H., M.S. BERGDOLL and G.M. DACK. (1962). Early development of a temporary resistance to the emetic action of staphylococcal enterotoxin. J. Infect. Dis. **111**: 234-238.
- * SUGIYAMA, H. and T. MATSUDA. (1963). Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. J. Infect. Dis. **111**: 330-336.
- * SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL and G.M. DACK. (1953). Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test. J. Lab. Clin. Med. **41**: 782-786.
- * SWAYNE, R., C.W. WRIGHT and S.A. BALDO. (1982). Detection of Ig B and Ig G binding proteins after electrophoretic transfer from polyacrylamide gels. J. Immunol. Methods. **92**: 183-194.
- * SYKES, J., M. DASH and K. BRACKMANN. (1981). Immunorecognition of proteins after electrophoretic transfer from gels to disc-paper: analysis of adenovirus encoded proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. **78**: 177-181.
- * TAB, J., A.C.J. de VRIES and R.G. BERNDSEN. (1984). A method for the quantitative determination of protein incorporated in solubilizable polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **138**: 284-290.
- * TATEKI, S.R., M.H. SOO, B.R. CORDS and R.W. BENNET. (1973). Heat-stable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxins in foods. J. Food Prot. **56**: 352-358.
- * TROTT, J., M. FISHOFF, F. KAPRAL and T. WELCH. (1978). Toxic shock syndrome associated with phage group E staphylococci. Lancet. **11**: 1116-1118.
- * TROTT, J.K., A. FRANCO-BUFF, D.V. LAWELLIN and M.L. VASIL. (1984). Phenotypic characteristics of staphylococcal strains associated with toxic shock syndrome. Infect. Immun. **52**: 339-344.
- * TOWBIN, H., T. STAHELIN and J. GORDON. (1979). Electroblotting of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 4350-4354.
- * TOWBIN, H., H.P. RAJAVIVE, N. HUSTER, D. LIVERANI and J. GORDON. (1982). Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. J. Biol. Chem. **257**: 12709-12713.
- * TOWBIN, H. and J. GORDON. (1984). Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. J. Immunol. Meth. **72**: 313-340.

- * TRANTER, H.S. and R.D. BRINN. (1990). Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 1099-1229.
- * TSANG, Y.C.V., Y. TAO, L. OUI and H. XUE. (1982). Citado por Toulin y Gordon (1984).
- * VANSTEEN, R.F., J. KEIHE and G.E. GROOT. (1981). Protein transfer to nitrocellulose filters. *FEBS Lett.* **134**: 193-196.
- * VALLÉ, F., E. GOMEZ-LUCIA, S. PIRIZ, J. GOYACHE, J.A. ORDEN and S. VADIALO. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1323-1326.
- * VALLÉ, F., S. VADIALO, S. PIRIZ, J. GOYACHE, J.A. ORDEN and E. GOMEZ-LUCIA. (1991). Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* (en prensa).
- * VARELAO, P.E., R. KLIPPEL, J. BIAVASCO, G. SATTI and K.H. SCHLIFER. (1988). *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 436-439.
- * VICTOR, R., J. SAHUSA, R.F. WEISS and R.N. DEIBEL. (1969). Relationships among coagulase, enterotoxin and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **13**: 124-127.
- * WALLIS, G., J.A. MELNICK and C.P. GRISA. (1979). Concentration of viruses from water by membrane chromatography. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 414-437.
- * WARREN, J.A., L. SPERO and J.F. HETZLER. (1971). Isothermal denaturation of aqueous staphylococcal enterotoxin B by guanidine hydrochloride, urea and acid pH. *Biochem.* **11**: 1678-1683.
- * WEREN, K. and M. OSORN. (1960). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **235**: 4406-4412.
- * WEDGE, E. and G. SVENBERT. (1986). Effects of the blocking agents bovine serum albumin and Tween 20 in different buffers on immunoblotting of brain proteins and marker proteins. *J. Immunol. Meth.* **88**: 233-237.
- * WEED, L.A., A.G. NISBAEL and R.N. MARGER. (1943). Citado por Bergdoll (1969).
- * WHITFORD, J.L., P.R. BOSTER and A.V. CROW. (1989). Determination by Western blot (immunoblot) of seroconversions by toxic shock syndrome (TSS) toxin 1 and enterotoxin A, B or C during infection with 78S- and non-78S-associated *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **57**: 231-234.
- * WISBERG, A.A. and R.J. GILBERT. (1987). Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *Enter. J. Food Microbiol.* **6**: 135-143.
- * WILSON, G.M. (1979). Studies and critique of amido black 10 B, Coomassie blue R and fast green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **92**: 263-276.
- * WISBERG, J. (1982). Shiverer peripheral myelin contains P₂. *Nature.* **298**: 471-472.
- * WYKOFF, M. D. ROBBARD and A. CHAMBERS. (1977). Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems: properties of the stack, valid Rf-measurement, and optimized procedure. *Anal. Biochem.* **78**: 439-452.
- * YAMADA, S., H. JOGASHI and T. TERAYAMA. (1972). Improved reversed passive hemagglutination for simple and rapid detection of staphylococcal enterotoxins A-E in food. *Microbiol. Immunol.* **21**: 679-682.

* YUEN, K.C.L., T.K. JOHNSON, R.E. DENELL and R.A. CONSIGLI. (1982). A silver-staining technique for detecting minute quantities of proteins on nitrocellulose paper: retention of antigenicity of stained proteins. *Anal. Biochem.* 126: 398-402.