



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CAPACIDAD DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TOXIGÉNICOS PARA FORMAR  
BIOPELÍCULAS EN ACERO INOXIDABLE Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA  
DEL GEN *BAP*.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:  
**ABSALON JESUS TAMAYO ESTEVEZ**

ASESOR:  
DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CAPACIDAD DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TOXIGÉNICOS PARA FORMAR  
BIOPELÍCULAS EN ACERO INOXIDABLE Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA  
DEL GEN *BAP*.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:  
**ABSALON JESUS TAMAYO ESTEVEZ**

ASESOR:  
DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Capacidad del *Staphylococcus aureus* toxigénicos para formar biopelículas en acero inoxidable y su relación con la presencia del gen *bap*.**

Que presenta el pasante: **Absalon Jesus Tamayo Estevez**

Con número de cuenta: **409017812** para obtener el Título de la carrera: **Ingengería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Agosto de 2015.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
<b>VOCAL</b>	I.A. Francisco Javier López Martínez	
<b>SECRETARIO</b>	I.A. Miriam Álvarez Velasco	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Dolores Molina Jasso	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm\*

## AGRADECIMIENTOS:

A mi **papá** por su apoyo cuando nada me salía bien, sobre todo en el paso más difícil de la carrera en cuarto semestre, donde no había pasado ninguna materia.

A mi **mamá** que nunca se dejó de preocupar por mí sobre todo al final de la tesis.

A la doctora **Clara Inés** por su exigencia de quien aprendí muchas cosas.

A la maestra **Sofía González** quien me ayudo a preparar las muestras de microscopia electrónica.

A la maestra **Gisela** por su apoyo en las pruebas de *PCR* y en la extracción de *ADN*.

Al **taller de carne de campo 4** por la donación de los conejos para la obtención de plasma utilizado para la prueba de coagulasa.

Al **CINVESTAV** por la donación de las cepas control de *S.aureus*.

A el **Hospital Infantil de México** por la donación de las cepas que me aislaron de *S.aureus*.

A **Berenice, Jessenia y Felipe** con quienes trabaje en el laboratorio quienes me ayudaron en el trabajo en lo que podían como en tomar fotografías.

Al doctor **Ernesto Moreno** por su sencillez y su demás equipo de trabajo por un semestre único junto con mis amigos **Marco, Gina, Priscila y Ninel** del taller de cereales por alguna extraña razón impartido en **C3** en el **CAT** con quienes me dio gusto convivir estuve ahí por cuestiones ajenas a mí voluntad sin embargo, fue mi último semestre me dejó recuerdos muy gratos que quedaran en mi mente por siempre.

A todos los que con los que me tuve que enfrentar, por nunca dejarme, demostrándoles que siempre es posible lograr todo, aunque nunca fue fácil, sin dejar de hacer sacrificios y a veces ganándome solo enemigos, pero ser único hace la diferencia.

A todos los de mi generación **33** de alimentos que me mostraron su respeto y algunas veces su admiración, pero en especial a mis amigos y amigas con quienes conviví la mayor parte del tiempo durante mi estancia en la Facultad quienes siempre estuvimos unidos, junto con muchas desveladas seguidas, muchas emociones, muchas decepciones, convivencias, muchas enseñanzas y momentos irrepetibles entre otras cosas que vivimos juntos como una pequeña familia a:

- ✘ **Araceli:** por su amistad sincera.
- ✘ **Aidé:** por su sencillez y tranquilidad que siempre admire.
- ✘ **Aldo Ebany:** por su sinceridad en cada momento que conviví con él.
- ✘ **Marco:** por su apoyo durante mi estancia en la facultad y sus enseñanzas.
- ✘ **Juan:** por su lealtad y su grata compañía.
- ✘ **Dacia:** por ser una persona confiable y su apoyo.
- ✘ **Karen:** por poner empeño y esmero siempre admirable.
- ✘ **Manuel:** por siempre distinguirse por su responsabilidad y perseverancia en las cosas que se proponía con quien me dio gusto trabajar.
- ✘ **Yadir:** por ser mi amigo incondicional desde el primer semestre que lo conocí.
- ✘ **Laura y Karina:** quienes me demostraron su apoyo incondicional, aunque la convivencia con ellas fue poca.

A mi mejor amigo **Oscar Corona San Juan** quien lo conozco desde la secundaria ya que , siempre me ayudó en lo que podía cuando lo necesite en todos momentos pocos como él con lo que me ha mostrado su más sincera amistad incondicional y quien además, me ayudo en la impresión de esta Tesis.

A todos mis amigos **Oscar, Jorge, Rocha** y mis amigas **Diana, Susana, Araceli** del **CEC y TEM** a los cuales, algunos nunca volví a ver, y a todos a los que he olvidado mencionar de mi generación entre ellos a **Enrique** que siempre se distinguió por siempre ser optimista, algunos de los cuales ya son **Ingenieros** del **I.P.N.** a **Bernardo y Carlos** quienes marcaron mí vida hasta el día de hoy, por los buenos momentos que nunca olvidare, hasta ahora recuerdo y en especial a **Miriam Hernández Braulio** con que la quien me la pase muy bien el tiempo que pase con ella esperando que me recuerde dónde quiera se encuentre, dándose cuenta que cumplí uno de mis sueños si alguna vez encuentra esta Tesis.

"PARA SIMPRE EL GRATO SABOR

DEL ORGULLO DE HABER

ESTADO EN LA UNAM"

## EPÍGRAFES:

"No solo es la  
presencia física, sino  
también la  
emocional"

**Absalon Tamayo.**

"No va ser fácil llegar a la  
orilla nada que valga la  
pena lo es"

**Iván Noble.**

"Saber que se puede, creer que se pueda, quitarse los miedos sacarlos afuera"

"No soy el mejor tampoco el peor tan solo soy lo que soy"

**Diego Torres.**

" El tiempo solo es un pretexto que han inventado los viejos "

**Joaquín Sabina.**

## CONTENIDO

RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN .....	16
1. ANTECEDENTES.....	17
<u>1.1. <i>Staphylococcus aureus</i></u> .....	18
<u>1.1.1. Distribución</u> .....	18
<u>1.1.2. Patogenicidad</u> .....	19
<u>1.1.3. Descripción del microorganismo</u> .....	20
<u>1.1.3.1. Morfología</u> .....	20
<u>1.1.3.2. Composición</u> .....	20
<u>1.1.3.3. Gram</u> .....	21
<u>1.1.3.4. Crecimiento</u> .....	21
<u>1.1.4. Toxinas</u> .....	22
<u>1.1.4.1. Clasificación</u> .....	24
<u>1.1.4.2. Importancia en la industria de alimentos</u> .....	28
<u>1.1.4.3. Enfermedad que provocan</u> .....	30
<u>1.1.4.4. Tratamientos de inactivación</u> .....	30
<u>1.2. Biopelículas</u> .....	31
<u>1.2.1. Descripción</u> .....	32
<u>1.2.2. Formación</u> .....	33
<u>1.2.2.1. Biopelículas estafilocócicas</u> .....	37
<u>1.2.2.2. Formación</u> .....	37
<u>1.2.2.3. Composición</u> .....	39
<u>1.2.2.4. Matriz y proteínas de las biopelículas</u> .....	39
<u>1.2.2.5. Condiciones que promueven el desprendimiento</u> .....	40

_____ 1.2.2.6. Orientación del desprendimiento .....	40
_____ 1.2.3. Factores ambientales .....	41
_____ 1.2.4. Importancia .....	42
_____ 1.2.5. Características del gen <i>bap</i> .....	43
_____ 1.2.6. Importancia del gen <i>bap</i> .....	43
_____ 1.2.7. Control.....	44
___ 1.3. Métodos de diferenciación genotípica .....	44
2. OBJETIVOS.....	47
3. METODOLOGÍA .....	48
___ 3.1. Toma de muestras .....	48
___ 3.2. Aislamientos y purificación de posibles <i>S.aureus</i> .....	48
___ 3.3. Identificación de <i>S.aureus</i> con pruebas tintoriales, bioquímicas y de fermentación.....	48
_____ 3.3.1. Pruebas tintoriales .....	48
_____ 3.3.2. Pruebas bioquímicas.....	49
_____ 3.3.3. Pruebas de fermentación de .....	51
___ 3.4. Detección de la capacidad de formar biopelículas en caldo BHI.....	52
___ 3.5. Detección de la capacidad de formar biopelículas con microscopia electrónica .....	52
___ 3.6. Detección de la capacidad de formar biopelículas con cristal violeta .....	53
___ 3.7. Extracción de <i>ADN</i> .....	53
___ 3.8. Detección del gen <i>bap</i> mediante la técnica de <i>PCR</i> .....	55
_____ 3.8.1. Electroforesis para el gen <i>bap</i> .....	55
___ 3.9. Detección del gen <i>sea</i> mediante la técnica de <i>PCR</i> .....	56
_____ 3.9.1. Electroforesis para el gen <i>sea</i> .....	57

<u>3.10.</u> Detección de la capacidad de formar biopelículas en placas de acero inoxidable .....	58
<u>3.11.</u> Determinación del efecto del desinfectante en placas de acero inoxidable .....	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
<u>4.1.</u> Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus</i> .....	59
<u>4.2.</u> Formación de biopelículas .....	61
<u>4.2.1.</u> <i>Staphylococcus</i> .....	61
<u>4.2.1.1.</u> Extracción de <i>ADN</i> .....	68
<u>4.2.1.2.</u> Detección del gen <i>bap</i> mediante la técnica de <i>PCR</i> .....	70
<u>4.2.1.3.</u> Detección del gen <i>sea</i> mediante la técnica de <i>PCR</i> .....	72
<u>4.2.1.3.1.</u> Prueba de Coagulasa .....	73
<u>4.3.</u> Susceptibilidad de las biopelículas formadas <i>Staphylococcus</i> al desinfectante en placas de acero inoxidable.....	76
CONCLUSIONES .....	80
RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	82

## Lista de tablas

Tabla 1. Características de las enterotoxinas estafilocócicas	25
Tabla 2. Genes de las enterotoxinas estafilocócicas	26
Tabla 3. Microorganismos aislados de biopelículas en la industria alimentaria	31
Tabla 4. Bacterias con capacidad de producir biopelículas	32
Tabla 5. Mecanismos del desprendimiento de las biopelículas estafilocócicas	38
Tabla 6. Tinción de Gram	49
Tabla 7. Identificación de los <i>Staphylococcus</i>	59
Tabla 8. Continuación de identificación de los <i>Staphylococcus</i>	60
Tabla 9. <i>Staphylococcus</i> capaces de formar biopelículas en tubos de caldo BHI	61
Tabla 10. Cepas de <i>Staphylococcus</i> seleccionadas para la extracción de su ADN	68
Tabla 11. Amplificación del gen <i>bap</i> en las cepas de <i>Staphylococcus</i>	70
Tabla 12. Amplificación del gen <i>sea</i> en las cepas de <i>Staphylococcus</i>	72
Tabla 13. <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva	73
Tabla 14. <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa	73
Tabla 15. Aplicación del desinfectante a 3000ppm en las cepas de <i>Staphylococcus</i>	76

## Lista de figuras

Figura 1. Genes que codifican las enterotoxinas estafilocócicas	24
Figura 2. Secuencia de la formación de las biopelículas	33
Figura 3. Representación de la formación de las biopelículas	34
Figura 4. Fases de regulación del <i>quorum sensing</i>	37
Figura 5. Modelo conocido del desprendimiento estafilocócico	38
Figura 6. Proteína <i>bap</i>	43
Figura 7. Etapas de la amplificación mediante <i>PCR</i>	46
Figura 8. Esquema de los pasos básicos de un protocolo de <i>PCR</i>	46
Figura 9. Siembra de bacterias por estriado	48
Figura 10. Capacidad de los <i>Staphylococcus</i> para formar biopelículas	62
Figura 11. Biopelícula formada en caldo BHI por una cepa de <i>Staphylococcus</i> aislada	62
Figura 12. Fotografía de las bacterias sin capacidad de formar biopelículas con la técnica de cristal violeta observadas con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de <i>40X</i>	63
Figura 13. Fotografía de la biopelícula formadas una cepa de <i>Staphylococcus</i> después de 3 días de incubación con la técnica de cristal violeta y vista con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de <i>40X</i>	63
Figura 14. Fotografías de las biopelículas formadas una cepa de <i>Staphylococcus</i> después de 5 días de incubación con la técnica de cristal violeta y vistas con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de <i>40X</i>	64
Figura 15. Fotografía las biopelículas formadas por una cepa de <i>Staphylococcus</i> después, de 5 días de incubación con la técnica de cristal violeta y vista con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de <i>100X</i>	64
Figura 16. Fotografía de una biopelícula formada por una cepa de <i>Staphylococcus</i> después de 5 días de incubación y observadas con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM6010LA con un aumento de <i>230X</i>	65
Figura 17. Fotografía de una biopelícula formada por una cepa de <i>Staphylococcus</i> a los 5 días de incubación y observada con un microscopio electrónico de barrido de marca JEOL modelo JSM6010LA con un aumento de <i>1,000X</i>	65

Figura 18. Confirmación por electroforesis en gel agarosa al 1% de la extracción de <i>ADN</i> de los <i>Staphylococcus</i> productores de las biopelículas	69
Figura 19. Prueba de coagulasa	74
Figura 20. <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva y negativa	74
Figura 21. Capacidad de las cepas de <i>Staphylococcus</i> para formar biopelículas en placas de acero inoxidable	77
Figura 22. Confirmación de la sobrevivencia de los <i>Staphylococcus</i> en Agar Chapman	77

## RESUMEN

Los manipuladores de alimentos que tienen contacto directo con los alimentos, es necesario que realicen, buenas prácticas de higiene, ya que poseen microorganismos como el *Staphylococcus aureus*, que está presente en las vías respiratorias, la piel y algunas cepas pueden causar intoxicaciones estafilocócicas asociadas con los alimentos.

Los *Staphylococcus aureus* se pueden encontrar en diferentes superficies de los equipos, como el acero inoxidable grado alimenticio, ya que al ser utilizadas continuamente, pueden favorecer la formación de biopelículas, debido a que éstas se forman cuando no hay una limpieza adecuada, lo cual aumenta el riesgo de la formación de la biopelícula.

Por otra parte, si no hay un buen control en la formación de biopelículas se pueden producir pérdidas económicas, porque se impide el flujo de calor en las superficies, se incrementa la resistencia del fluido en las superficies, aumentando la corrosión, con lo que se lleva a una disminución de energía, por lo tanto una pérdida en la productividad, por lo cual, es importante evitar en lo posible la formación de la biopelícula mediante una limpieza adecuada de las personas que tienen contacto directo con los alimentos y de los equipos de acero inoxidable de grado alimenticio que tienen contacto con estos.

## INTRODUCCIÓN

La importancia de la higiene personal de los manipuladores de los alimentos, a lo largo de todas las operaciones, es extremadamente importante para la prevención de las intoxicaciones estafilocócicas, ya que el hombre constituye la principal fuente de contaminación de los alimentos con los microorganismos productores de esta enfermedad (Nickerson & Sinskey, 1972).

Cuando los manipuladores de los alimentos abandonan su trabajo en el proceso de fabricación, de cocción o de distribución de alimentos, con el fin de atender las necesidades personales, para tomarse un pequeño descanso, deben de obligatoriamente lavarse y desinfectarse las manos antes de reintegrarse a sus ocupaciones habituales. Es de gran importancia para prevención de brotes de intoxicación estafilocócica por ingestión de alimentos, la separación del personal con infección en las manos y que vayan a tener contacto directo con los alimentos. Dentro de este personal se incluyen a los que presenten erosiones y heridas purulentas, así como los que padezcan forunculosis (Nickerson & Sinskey, 1972).

Cuando los alimentos contienen pocas bacterias patógenas, tienen lugar un mayor crecimiento de las bacterias competitivas, o sea, las que causan las alteraciones de los alimentos y no causan enfermedad (Nickerson & Sinskey, 1972). Sin embargo, si las bacterias patógenas tienen la oportunidad de desarrollarse estas pueden desprenderse de las manos, cuchillos, ropas y otros utensilios. Esto puede inducir contaminación cruzada especialmente en la cocina y en alimentos listos para consumir (Bathia & Zahoor, 2007).

## 1. ANTECEDENTES

La presencia de un número elevado de *Staphylococcus aureus* en los alimentos refleja una higiene defectuosa por mala manipulación (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

Los brotes estafilocócicos tienen lugar cuando, de una forma u otra forma, los alimentos se han manipulado de modo inadecuado, esto quiere decir que los alimentos han estado, al menos durante algunas horas, a temperaturas superiores a 6.6°C (44°F). En consecuencia, esta enfermedad se podría controlar aplicando las temperaturas necesarias de refrigeración a lo largo de todo el proceso de fabricación de los alimentos, a no ser que vayan a ser consumidos inmediatamente (Bathia & Zahoor , 2007).

Cuando los estafilococos se desarrollan en exceso es imposible que todos se destruyan al aplicar diferentes procesos de cocción en los alimentos. No obstante, suele ocurrir que las temperaturas alcanzadas durante la cocción maten a la mayor parte de estos microorganismos. Sin embargo, es posible que los alimentos que llevaron a un proceso de cocción se mantengan durante periodos de tiempo largos, a temperaturas que permitan el crecimiento de estafilococos. Es interesante recordar que, una vez producida la toxina por el estafilococo, no es posible destruirla por procedimientos de cocción ordinarios, aunque los propios organismos sucumban ante el calor aplicado (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

El mantenimiento de los alimentos sobre las mesas constituye un eslabón de la cadena de preparación de los alimentos importante, debido a que estos con frecuencia son manipulados deficientemente. Sin embargo, en las mesas no deben de almacenarse grandes cantidades de alimentos en un solo recipiente, a no ser que estos se mantengan a temperaturas de 60°C (140°C). De lo contrario, existe la posibilidad de un enfriamiento, lo que podría permitir temperaturas adecuadas para evitar el crecimiento de organismos productores de enfermedades transmitidas por alimentos (Nickerson & Sinskey, 1972).

## **1.1. *Staphylococcus aureus***

El término *Staphylococcus* del griego *staphyle*=racimo y *kokkos*=granos, lo usó por primera vez Ogston en el año 1880 (Fueyo Mendoza, 2008).

El género *Staphylococcus* pertenece al Phylum 2 del Dominio *Bacteria*; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales*; y Familia *Staphylococcaceae* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). Además, el género está formado por 19 especies, de las que algunas son patógenas oportunistas tanto para hombres como para animales y entre estas se encuentra el tipo, *Staphylococcus aureus* o también llamado "estafilococo dorado" (Fueyo Mendoza, 2008).

### **1.1.1. Distribución**

*Staphylococcus aureus* está presente en sitios externos, tales como fosas nasales o la piel así como en la cara. Al menos 50 % de las personas poseen este microorganismo en las fosas nasales, garganta, heces y manos, distribuyéndose a otras zonas del cuerpo y vestimenta (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000). Son el mayor causante de infecciones adquiridas e infecciones nosocomiales (Bathia & Zahoor , 2007). Generalmente son inocuos en condiciones normales. Sin embargo, al perderse la continuidad en la piel o mucosas y romperse las barreras naturales de defensa del organismo, se favorece la invasión bacteriana y en consecuencia el riesgo de desarrollar infecciones, como abscesos, bacteriemia, neumonía, meningitis, infecciones en el tracto urinario como osteomielitis y endocarditis e incluso choque séptico en cualquier lugar del organismo, en pacientes con alteraciones inmunológicas o enfermedades debilitantes pueden ser mortales (Lowy, 1998; Elliot, 1999; O'Gara J, 2001; Mandell et al., 2000).

Los alimentos expuestos a la manipulación humana tienen la posibilidad de contaminarse con el *Staphylococcus aureus* y ser un riesgo su consumo. Este se encuentra en diversos alimentos crudos: como carnes de abastos y aves, si no se tiene un control en las últimas etapas de sacrificio y la preparación de diferentes productos, seguido además de un almacenamiento incorrecto (falta de refrigeración adecuada) estos se pueden contaminar

fácilmente. Otra forma de contaminación de los productos es a través del equipo de procesado que, a veces puede estar, colonizado por cepas toxígenas de *Staphylococcus aureus*. Siendo este resistente a la desecación, por lo cual puede mantenerse en algunas zonas de los equipos de procesado, difícilmente accesibles a la limpieza. También son frecuentes en los sistemas de ventilación. En algunas explotaciones avícolas se han encontrado cepas del *Staphylococcus aureus* resistentes al cloro (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

### **1.1.2. Patogenicidad**

Las enfermedades producidas por el consumo de los alimentos es una de las mayores preocupaciones en todo el mundo y constituyen uno de los problemas de salud más relevantes. Las ETA de origen infeccioso pueden estar asociadas a agentes virales, parasitarios y bacterianos (Manfredi et al., 2010). Alrededor de 1500 millones de casos de diarrea asociados a 3 millones de muertes ocurren anualmente en el mundo en menores de 5 años. Entre el 15% y el 70% de estas diarreas son el resultado directo de la contaminación química o biológica que presentan algunos de los alimentos que se comercializan en los diferentes países. Se estima que, solo en E.E.U.U., cada año se presentan entre 3.3 y 12.3 millones de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), con un costo asociado de 6.5 a 34.9 millones de dólares anuales (Buzby & Roberts, 1997). Entre las bacterias que originan estas enfermedades, *Staphylococcus aureus* ocupa un papel destacado como agente etiológico de una de las gastroenteritis más frecuentes por consumo de alimentos contaminados. Esta afección se conoce como intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) (Sivila, 2000).

La presencia de *Staphylococcus aureus*, en los alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, debido a inadecuadas prácticas de manufactura, o por la utilización de materia prima contaminada (Bean et al., 1996).

Entre los alimentos implicados en brotes de ETA asociados a *Staphylococcus aureus* se encuentran la leche y sus derivados (Manfredi et al., 2010). Este no es considerado un agente altamente letal debido a su baja mortalidad. Sin embargo, algunos *Staphylococcus aureus* cuando crecen pueden producir toxinas. Las toxinas que son excretadas a partir de esos microorganismos, son mencionadas como exotoxinas normalmente ejercen efectos en el tracto intestinal y son llamadas enterotoxinas. Las toxinas estafilocócicas son consideradas como una amenaza debido a su estabilidad a las altas temperaturas (100°C por 1h) (Bathia & Zahoor , 2007).

### **1.1.3. Descripción del microorganismo**

#### **1.1.3.1. Morfología**

El *Staphylococcus aureus* es un organismo de forma esférica u ovide, inmóvil en los medios de cultivo líquidos o en suspensiones se agrupan en forma de racimos, formando parejas o agrupaciones de racimos, formando 4 parejas o agrupaciones pequeñas y a veces, forma de cadenas cortas. Sus células individuales tienen un diámetro de 0.8 a 1µm (Nickerson & Sinskey, 1972). En los medios no selectivos sus colonias son grandes, opacas, lisas, circulares, enteras y a veces pueden presentar bordes ligeramente ondulados, coloración amarilla o blanca (Bailon et al., 2003).

#### **1.1.3.2. Composición**

La pared de la célula del *Staphylococcus aureus* está compuesta por macromoléculas como peptidoglicanos, polianiones de ácidos teicoicos (**TAs**) y proteínas de superficie que es esencial para su sobrevivencia (Chen et al., 2012a). Su pared celular es el componente básico, que le confiere forma y estabilidad a este microorganismo el peptidoglicano representa el 50 % de la pared. Este es un polímero polisacárido compuesto por subunidades alterantes de N-acetilmurámico [con una cadena de 4 aminoácidos: L-alanina, D-glutámico, L-lisina, D-alanina y N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces  $\beta$ -(1-4)]. Las cadenas peptídicas laterales unidas al residuo de ácido murámico, están ligadas en forma cruzada por un puente de pentaglicina debido a la L-lisina de una cadena y a la D-alanina de otra cadena

(Mandell et al., 2000). Además, la pared de la célula del *Staphylococcus aureus* es resistente a lisozima y sensible a lisostafina, las cuales tienen especificidad y se unen a los puentes de pentaglicina del *Staphylococcus spp* (Bathia & Zahoor, 2007).

Otros componentes incluyen los ácidos teicoicos que contribuyen con alrededor del 40% al peso de la pared celular. Algunos de ellos (formados por una secuencia alternativa de ribitolfosfato) están unidos de forma covalente al péptidoglicano y otros (unidades repetidas de glicerol fosfato) a la membrana citoplasmática. La adherencia a la mucosa nasal es mediada por los ácidos teicoicos. Embebida en la capa externa del péptidoglicano está la proteína A (tamaño 42.000 Daltons) presente en cantidades variables en distintas cepas. Entre las adhesinas asociadas a la pared celular que promueven la adherencia de la bacteria a las células del hospedador, están las proteínas de unión a la fibronectina y al colágeno. Finalmente muchas cepas están recubiertas por una capa externa de polisacáridos, que suele considerarse como una cápsula o capa viscosa (Mandell et al., 2000).

#### **1.1.3.3. Gram**

Los estafilococos son cocos Gram positivos, oxidasa negativa y catalasa positiva. La mayor parte de las cepas virulentas son hemolíticas, fermentan manitol. Tienen la facultad de coagular el plasma (Bailon et al., 2003). Los estafilococos crecen mejor en presencia de oxígeno, pero también lo pueden hacer en su ausencia, por lo que son anaerobios facultativos. Además el *Staphylococcus aureus* licúa la gelatina y reduce los nitratos a nitritos (Nickerson & Sinskey, 1972).

#### **1.1.3.4. Crecimiento**

El estafilococo es un microorganismo poco exigente y de fácil desarrollo. Crece entre 7-47.8°C, y su temperatura óptima es de 35-37°C. La producción de enterotoxina se realiza entre 10-46°C, con temperatura óptima a 37-45°C. Respecto al pH se multiplica a valores comprendidos entre 4 y 9.8 con un óptimo de 6-7. Crece entre amplios límites de aw, aunque dependiendo siempre del pH y

la temperatura de incubación. El crecimiento del germen se realiza a una  $a_w$  comprendida entre 0.83 y 0.99; para la elaboración de toxinas requiere de 0.86-0.99  $a_w$  (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

El *Staphylococcus aureus* es una especie que soporta el crecimiento con límites de sal en medios artificiales de 0%-20%. En los alimentos la tolerancia es similar, aunque el límite superior puede ser algo más bajo por la presencia de otros factores inhibidores. En muchos alimentos, con concentraciones de sal superiores a 5%-7%, la reducción del germen es muy pequeña (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000). Este es un pobre competidor y presenta grandes riesgos en los alimentos cuando la flora normal de los alimentos ha sido inhibida, destruida, cocinada y salada. Es un organismo muy adaptable y puede vivir en una amplia variedad de ambientes (Tone et al., 2007).

Las medidas para evitar el desarrollo de los *Staphylococcus aureus* en alimentos son:

- Destruirlos por calor antes de que se multipliquen.
- Frenar su multiplicación con una temperatura inferior a 6 °C.
- Respetar la cadena de frío.

(Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

#### **1.1.4. Toxinas**

Son las responsables de aparición de síntomas de intoxicaciones estafilocócicas (*estafiloenterotoxicosis*) ocasionado por la ingestión de alimentos contaminados. Esta es más frecuente cuando un alimento terminado se contamina como consecuencia de manipulaciones poco escrupulosas por parte del personal que mantiene los alimentos varias horas temperaturas entre 20-40°C. En esta fase temperatura/tiempo, si un *Staphylococcus aureus* ha llegado al alimento a través de malas manipulaciones del portador, se multiplica abundantemente y elabora toxinas. Sin embargo, no todos los *Staphylococcus aureus* son capaces de producir toxinas.

Las medidas para evitar que se produzca una *estafiloenterotoxiosis* son:

- Utilizar productos crudos sanos
- Evitar la colonización del alimento manteniéndolo por debajo de 6 °C.
- En los productos crudos fermentados como quesos y embutidos el control se debe realizar en la fase de la fermentación (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

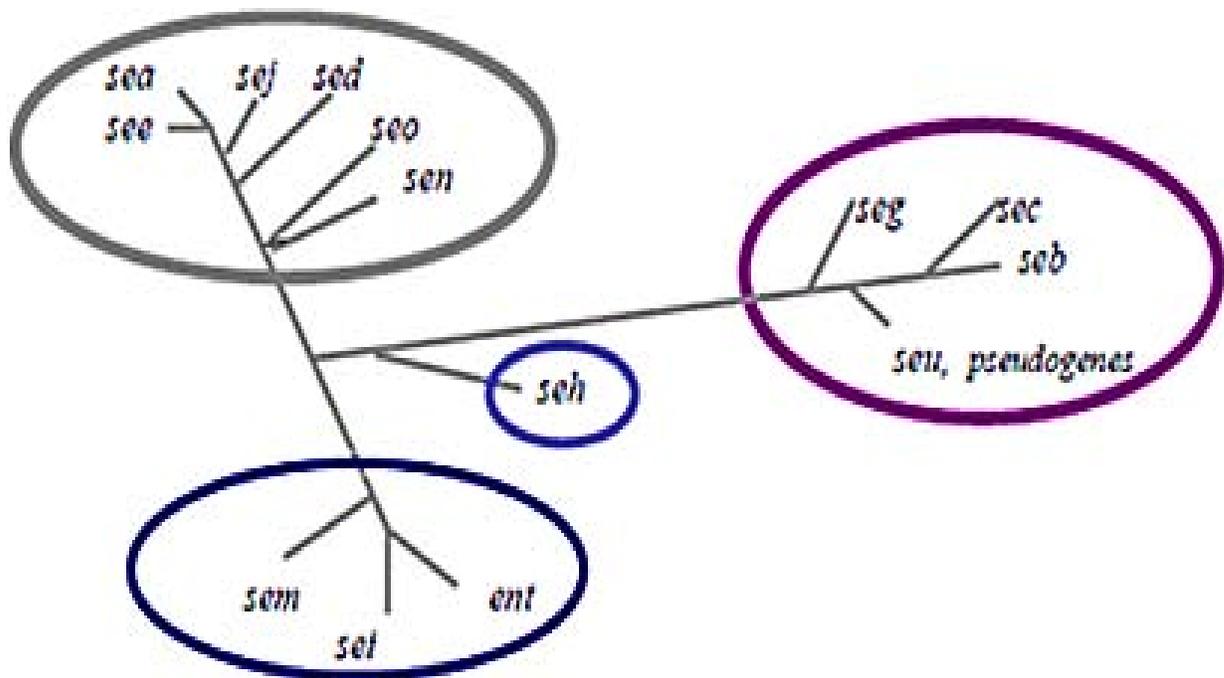
La enfermedad que producen las toxinas estafilocócicas se debe a la acción tóxica de las toxinas preformadas en el alimento. Pues, el crecimiento del *Staphylococcus aureus* no se libera en el intestino, sino que la toxina ingerida activa unos receptores en el intestino que generan unos impulsos que son los que excitan el centro subcortical del vómito. Las toxinas que producen los algunos *Staphylococcus aureus* no actúan como toxinas clásicas, sino más bien como neurotóxicas. La cantidad de estas necesarias para que se desencadene la intoxicación depende del peso y la sensibilidad del individuo; se estima, en general, en 0.1 *microgramo/kg* en el hombre. Se producen principalmente en la fase postexponencial del crecimiento bacteriano y su expresión genética está controlada por al menos tres sistemas de regulación: *agr* (*accessory gene regulador*), *sar* (*staphylococcal accessory*) y un sistema de represión catabólica (Fueyo Mendoza, 2008).

Por otra parte, hay una relación alta entre la producción de enterotoxinas estafilocócicas del *Staphylococcus aureus* y la producción de coagulasa. De hecho, la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* vinculadas con intoxicación alimentaria estafilocócica son productoras de coagulasa, por lo cual es esta la principal característica fenotípica que se debe determinar en los aislamientos provenientes de alimentos (Mac Faddin, 2003).

Las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) son un grupo de moléculas de una sola cadena de peso molecular bajo (27,000-34,000 Daltons) termotolerantes. Estas toxinas causan las intoxicaciones por alimentos, severas alergias y enfermedades autoinmunes. Independientemente del serotipo, todas causan vómitos y gastroenteritis siendo estables al calor, poseen conformaciones similares con circuitos de disulfuro (Bihac et al., 1996). Para su producción se necesita un tiempo largo de incubación (20 horas). Otros factores que afectan su periodo de incubación son el pH, aw y el substrato (Bathia & Zahoor , 2007).

#### 1.1.4.1. Clasificación

Han sido reconocidas 18 enterotoxinas, con distintos serotipos, denominadas como A, B, C (esta última con 5 variantes C1, C2, C3, Covina y Cbovina), D, E, G, H ,I (las 3 últimas con variantes), J, K, L, M, N, O, P, Q, R y U cada una de ellas es codificada por un gen que se denomina por el prefijo *se* seguido de la letra a la que corresponde la enterotoxina (*sea-seu*, inicialmente se denominaban *ent*). Las más comunes asociadas con intoxicación por alimentos son la A y la D (Croz et al., 1974). Tanto las enterotoxinas como sus genes presentan diferente grado de homología, y se ha propuesto la siguiente organización de los genes:



**Figura 1.** Genes que codifican las enterotoxinas estafilocócicas

**Tabla 1.** Características de las enterotoxinas estafilocócicas

<b>Tipos de enterotoxinas</b>	<b>Longitud precursor (aa)</b>	<b>Longitud madurez (aa)</b>	<b>Masa molecular (KDa)</b>	<b>PI</b>	<b>Referencia</b>
A	257	233	27.10	7.3	(Betley & Mekalanos, 1985; Betley & Mekalanos, 1988).
B	266	239	28.33	8.6	(Johns & Kahn , 1988).
C1	266	239	27.53	8.6	(Bohach & Schlievert, 1987).
C2	266	239	27.53	7.8	(Schlievert & Bohach, 1989).
C3			27.56	8.1	(Hovde et al., 1993).
C <sub>bovino</sub>			27.61	7.6	(Marr et al., 1993).
C <sub>oveja</sub>			27.51	7.6	(Marr et al., 1993).
C <sub>cabra</sub>			27.60	7.0	(Chang & Bergdoll, 1979).
D	258	228	26.36	7.4	(Chang & Bergdoll, 1979; Bayles & Iandolo, 1989).
E	257	230	26.42	7.0	(Couch et al., 1988).
G	258	233	27.04	5.7	(Munson et al., 1998).
H	241	218	25.21	Nd	(Su & Wong , 1996).
I	242	218	24.92	Nd	(Munson et al., 1998).
J	268	245	28.56	8.6	(Zhang et al., 1998).
K	242	219	25.53	6.5	(Norvick et al., 2001).
L	240	215	24.59	8.6	(Fitzgerald et al., 2001).
M	239	217	24.84	6.2	(Bonneville et al., 2001).
N	258	227	26.06	6.9	(Bonneville et al., 2001).
O	260	232	26.77	6.5	(Bonneville et al., 2001).

**Fuente:** (Bathia & Zahoor , 2007).

**Tabla 2.** Genes de las enterotoxinas estafilocócicas

<b>Gen</b>	<b>Localización genética</b>	<b>Referencia</b>
<i>Sea</i>	Profago	(Betley & Mekalanos, 1985; Borst, 1994).
<i>Seb</i>	Plásmido y cromosoma	(Shafer & Iandolo, 1978; Shalita et al., 1989; Altboum et al., 1985).
<i>SecI</i>	Plásmido	(Altboum et al., 1985).
<i>Sec<sub>bovino</sub></i>	Isla de patogenicidad	(Fitzgerald et al., 2001).
<i>Sed</i>	Plásmido ( <i>pIB-485</i> )	(Bayles & Iandolo, 1989).
<i>See</i>	Fago defectuoso	(Couch et al., 1988).
<i>Seg</i>	Grupo de genes cromosomales ( <i>egc</i> )	(Bonnevillie et al., 2001).
<i>Sei</i>	Cromosoma <i>egc</i>	(Bonnevillie et al., 2001).
<i>Sej</i>	Plásmido ( <i>pIB-485</i> )	(Zhang et al., 1998).
<i>Sek</i>	Isla de patogenicidad	(Novick et al., 1985; Fitzgerald et al., 2001).
<i>Sel</i>	Isla de patogenicidad	(Fitzgerald et al., 2001).
<i>Sem</i>	Cromosoma <i>egc</i>	(Bonnevillie et al., 2001).
<i>Sen</i>	Cromosoma <i>egc</i>	(Bonnevillie et al., 2001).
<i>Seo</i>	Cromosoma <i>egc</i>	(Bonnevillie et al., 2001).

**Fuente:** (Bathia & Zahoor , 2007).

### **Enterotoxinas estafilocócicas A (SEA)**

Son las más comunes enterotoxinas implicadas en la intoxicación por el consumo de alimentos contaminados (Holmberg & Blake, 1984), están formadas por el gen *sea* (Huang et al., 1987) compuesto a su vez por 120 pares de bases (Johnson et al., 1990; Suarez et al., 2008). Finalmente, hay 3 diferentes subtipos con 3 puntos isoelectrónicos diferentes (Schad et al., 1995).

### **Enterotoxinas estafilocócicas B (SEB)**

Son las enterotoxinas que con menos frecuencia se han relacionado con intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

### **Enterotoxinas estafilocócicas C (SEC)**

Son un grupo de proteínas altamente conservadas (Bergdoll et al., 1965). Hay 3 diferentes subtipos C1, C2 y C3. Este último difiere de los subtipos C2 y C1 por el número de aminoácidos que son 4 y 9 respectivamente. Finalmente, el subtipo C3 se encuentra codificado por el gen *sec3* estrechamente relacionado con el gen del subtipo C1, que posee una secuencia igual en el 98% de su estructura (Couch & Betley, 1989).

### **Enterotoxinas estafilocócicas D (SED)**

Son las segundas enterotoxinas más comunes asociadas con intoxicaciones por alimentos contaminados, están formadas por el gen *sed* compuesto por 258 aminoácidos (Bayles & Iandolo, 1989) y son dependientes de las moléculas de  $Zn^{+2}$  (Balan & Rasooly, 2000).

### **Enterotoxinas estafilocócicas E (SEE)**

Todas tienen una secuencia homóloga en 81% a las enterotoxinas estafilocócicas A y están formadas por el gen *see* (Couch et al., 1988).

### **Enterotoxinas estafilocócicas G (SEG)**

Son formadas por el gen *seg* compuesto por 233 aminoácidos (Munson et al., 1998).

### **Enterotoxinas estafilocócicas H (SEH)**

Son las más recientes enterotoxinas descubiertas con masa molecular de 27,300 Daltons y con una secuencia terminal única de  $NH_2$  (Su & Wong, 1995).

### **Enterotoxinas estafilocócicas I (SEI)**

Son formadas por el gen *sei* compuesto por 242 aminoácidos (Munson et al., 1998).

#### **1.1.4.2. Importancia en la industria de alimentos**

La salubridad de un alimento respecto *Staphylococcus aureus* depende de la presencia de sus enterotoxinas, pero no del microorganismo en sí. Siendo este un germen indicador de mala manipulación de los alimentos. La contaminación de los alimentos con *Staphylococcus aureus* suele ser consecuencia de escasas o malas prácticas de higiene en alguna o algunas de las fases de la cadena alimentaria. Si esto se une a un almacenamiento posterior del alimento a temperatura y tiempo que permitan el crecimiento del germen, tiene lugar la elaboración de enterotoxinas capaces de generar intoxicaciones, si el alimento es consumido. Sin embargo, se puede minimizar el riesgo de consumir alimentos contaminados con *Staphylococcus aureus* impidiendo la preparación y manipulación de alimentos a personas infectadas o enfermas (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).

Los alimentos que usualmente están involucrados en una intoxicación por consumo de pueden variar ampliamente dependiendo del país. Debido a las diferencias en el consumo y en los hábitos de consumo de cada país. Algunos alimentos involucrados con intoxicaciones por *Staphylococcus aureus* incluyen carne, productos cárnicos, aves de corral, productos de huevo, ensaladas con huevos, atún, pollo, papas, macarrones, panadería, sándwiches, chocolates claros, leche y productos lácteos. Los alimentos que durante su preparación requieren una considerable manipulación y se guardan en temperaturas significativamente elevadas son frecuentemente involucrados en una intoxicación alimentaria. El *Staphylococcus aureus* existe en la leche, en humanos y animales. Sin embargo, este puede ser transferido hacia las superficies en contacto con los alimentos por medio del el aire y el polvo (Argudín et al., 2010). Aunque, la principal causa de contaminación de alimentos son los manipuladores, porque los *Staphylococcus aureus* pueden sobrevivir en ellos, ya que los manipuladores contaminan los alimentos en un 83% y las manipuladoras en 57% (Soriano et al., 2002).

Los motivos por los cuales los alimentos pueden ser causa de intoxicación, son debido a:

- Habitualmente no hay una flora contaminante que compita con el *Staphylococcus aureus*; de lo contrario esta bacteria crece sin obstáculos, produciendo niveles tóxicos de enterotoxinas antes de que puedan crecer otros microorganismos.
- La aw de los alimentos es lo suficientemente baja como para que no puedan crecer otros microorganismos Gram positivos y Gram negativos. De esta forma también se reduce la flora competitiva, favoreciendo con ello el crecimiento del *Staphylococcus aureus*.
- Los alimentos que son manipulados, proporcionan que se contaminen con *Staphylococcus aureus*. Además, que la elaboración se hace a temperatura ambiente y durante un tiempo más o menos largo lo que facilita el crecimiento de esta especie bacteriana, en cuyo caso, aunque el producto elaborado se someta a calentamiento culinario, éste no será capaz de inactivar las toxinas existentes (Pascual Anderson & Calderon Pascua, 2000).
- Los alimentos que no han tenido un almacenado correcto a una temperatura de calentamiento adecuada 60°C, 140°F o por debajo de 7.2°C, 45°F (Bathia & Zahoor , 2007).

La notificación de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos causa un gran impacto en la sociedad, porque pone en evidencia la fragilidad de los sistemas de control de los alimentos, y en menor medida, de los sistemas preventivos de salud. En la mayoría de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos es difícil relacionar la fuente de intoxicación con los pacientes afectados, y más difícil aún es establecer el origen de la contaminación de los alimentos involucrados, sobre todo si consideramos que, en general, el lote del alimento involucrado en un brote de enfermedades transmitidas por alimentos no se encuentra en el expendio cuando las personas afectadas manifiestan los síntomas. Es por ello que muchos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos pasan inadvertidos (Manfredi et al., 2010).

Aunque no hay un método de prevención para evitar el riesgo de intoxicación por alimentos contaminados con *Staphylococcus aureus* pueden tomarse algunas medidas como:

- Lavarse las manos con jabón y agua.
- Lavarse las manos después de tratar a otras personas.
- Lavarse con sacate por 30 segundos o más correctamente.
- El jabón antibacterial no ofrece más limpieza que otros jabones, el tiempo de exposición de lavado es más importante.
- Usar toallas desechables para secarse las manos.
- Cambiarse de ropa continuamente cuando se manipulan los alimentos.

(Bathia & Zahoor , 2007).

#### **1.1.4.3. Enfermedad que provocan**

Depende de la cantidad, del tipo y la toxicidad de la toxina. Los síntomas típicos aparecen después de 1-6h pueden variar a partir de ligeros o moderados a severos incluyendo dolor abdominal, vómito, diarrea, fiebre, deshidratación y en casos severos incluso la muerte, ya que causan alteraciones en el tracto gastrointestinal, infiltración neurobiológica, acumulación de sangre en el epitelio y en las membranas del estómago (Lee et al., 1996). Aunque, la mayoría de los enfermos se recuperan en 24-48h sin necesidad de tratamiento, aunque las personas debilitadas, los niños y los ancianos pueden requerir atención hospitalaria (Brizzio, 2009; López et al., 2008).

#### **1.1.4.4. Tratamientos de inactivación**

- **Irradiación**

Esta no es considerada como un tratamiento para eliminarlas (Modi et al., 1990).

- **Química**

Se ha usado jabón o hipoclorito (HOCl) por un tiempo de 10-15min, para enterotoxinas estafilocócicas A se ha usado 9 $\mu$ g de HOCl y 70ng de buffer de fosfato (Suzuki et al., 2002).

## 1.2. Biopelículas

Los microorganismos que están en contacto con las superficies pueden ser causa de problemas debido a la formación de biopelículas, las cuales pueden contener patógenos lo que constituye un reservorio de contaminación, incrementando el riesgo de contaminación microbiana en plantas de alimentos (Herrera et al., 2007). Se han aislado diferentes bacterias que producen biopelículas en diferentes lugares de procesamiento de alimentos.

**Tabla 3.** Microorganismos aislados de biopelículas en la industria alimentaria

Lugares	Microorganismos	Referencias
Plantas de procesamiento de lácteos y líneas de pasteurización	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella sp</i> <i>S.aureus</i>	(Sharma & Anand, 2002).
Plantas de helado y cintas transportadoras o unidad de alimentación	<i>L.monocytogenes</i> <i>Shigella</i>	(Gunduz & Tuncel, 2006).
Industria de pesca y procesamiento del caviar	<i>Neisseriaceae</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Vibrio</i>	(Bagge-Ravn et al., 2007).
Industria de camarón	<i>Pseudomonas</i> <i>P.fluorescens</i> <i>P.putida</i>	(Guobjornsdottir et al., 2005).

**Fuente:** (Xianming & Xinna, 2009).

Las múltiples interacciones de los compuestos de las superficies de las células determinan la formación de biopelículas que contribuyen a la adherencia a superficies celulares y a materiales inertes (Mandell et al., 2000). Algunas bacterias son capaces de formar biopelículas, tanto Gram positivas como Gram negativas, ya sean patógenas o no. (Kloter et al., 2000; Koneman et al., 2000).

**Tabla 4.** Bacterias con capacidad de producir biopelículas

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Salmonella ssp</i>
<i>Listeria ssp</i>

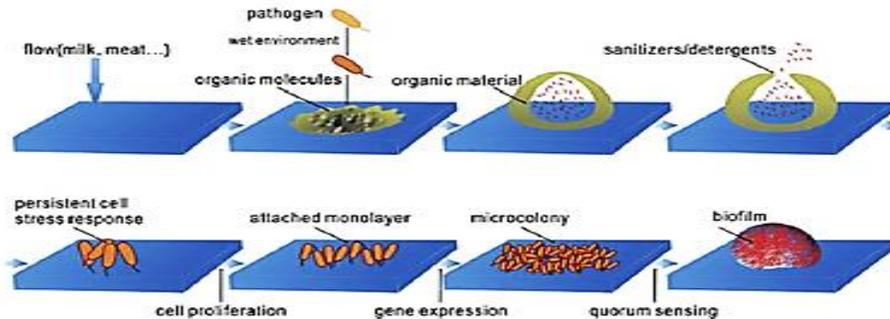
**Fuente:** (Hernández & Novales., 2007).

### 1.2.1. Descripción

La biopelícula es una población de bacterias envuelta por una matriz glucoprotéica con la capacidad de adherirse a las superficies. Estas colonias son semejantes a las observadas en los hongos, en las que el micelio forma una intrincada red en constante comunicación entre sí y con el medio externo. Se puede observar que en la biopelícula hay microcolonias rodeadas de canales llenos de agua, y su función es semejante a la de un sistema circulatorio primitivo, permitiendo el acceso de nutrientes, la eliminación de desechos y la comunicación con otras microcolonias (Lowy, 1998; Pascual ,2002; Mandell et al., 2000; Koneman et al., 2000).

Cuando una biopelícula está en proceso de formación los factores que influyen son: las propiedades de los sustratos, superficies y mecanismos genéticos entre otros. Una comunidad de éstas puede estar compuesta por una sola especie de bacteria o por varias especies que forman una capa simple o estructuras tridimensionales. La matriz de la biopelícula está altamente organizada en ecosistemas en canales con agua que están dispersos y puede proporcionar pasajes para intercambio de nutrientes, metabolitos y residuos (Herrera et al., 2007). La matriz no sólo permite el intercambio de metabolitos entre microcolonias y el exterior, sino que además les confiere una barrera protectora contra

ambientes adversos, como falta de nutrientes, anaerobiosis, presencia de anticuerpos y antibióticos. Sin embargo, las bacterias sacrifican su capacidad de crecimiento y desplazamiento dentro de la biopelícula (Mandell et al., 2000).



**Figura 2.** Secuencia de la formación de las biopelículas

Los requerimientos esenciales para el crecimiento de una biopelícula es que tenga sustrato. Sin embargo, se ha notado que reduciendo el aprovechamiento de nutrientes, la cantidad de agua, reducción de la presión osmótica llegan a tener menos bacterias. La comunicación intercelular dentro de la biopelícula es rápidamente simultánea hacia arriba y abajo regulado por la expresión de los genes con adaptación temporal como variación del fenotipo y la habilidad de sobrevivir a condiciones deficientes de nutrientes. Cerca del 99% de la población de bacterias que hay en el mundo son capaces de formar biopelículas en varias etapas de crecimiento, en diversas capas y con numerosas bacterias (Silva Meira et al., 2012).

### 1.2.2. Formación

En los años 90's Consterton et al. destacó la importancia de una biopelícula debido a que las bacterias formaban comunidades de bacterias resistentes a agentes antimicrobianos (Consterton et al., 1999).

Los mecanismos involucrados en la formación de una biopelícula son:

#### 1.-Ataque de las células de las bacterias

Durante el primer paso, se dan las interacciones entre la bacteria y el tipo de material de la superficie, algunas fuerzas que influyen en estas interacciones son: hidrofobicidad, electrostática y fuerzas de Van der Waals. En esta fase la bacteria adsorbe pasivamente al material de la superficie. Muchos modelos teóricos tratan de describir la relación que hay entre la adhesión bacteriana, el grado de hidrofobicidad de la superficie celular y el tipo de material de la superficie (Legeay et al., 2006).

## 2.-Adherencia y acumulación de las células en capas múltiples

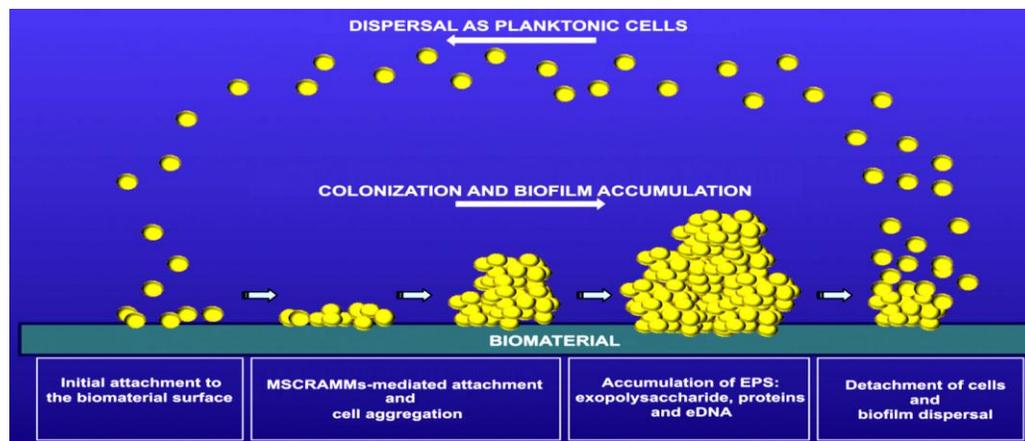
El segundo paso, la biopelícula se establece progresivamente en la superficie colonizada (Speziale et al., 2009).

## 3.-Maduración

En esta fase de maduración la biopelícula se desarrolla la estructura completa de la biopelícula (Arciola et al., 2012).

## 4.-Desprendimiento de las células de la biopelícula para iniciar un nuevo ciclo

En el cuarto paso, las bacterias previamente encerradas se protegen en las estructuras de la biopelícula regresando a su forma inicial, listo para una iniciar una nueva fase invasiva (Arciola et al., 2012).



**Figura 3.** Representación de la formación de las biopelículas

Sin embargo, Characklis y Marshal (Characklis & Marshal, 1990) describen el proceso del desarrollo de la biopelícula de acuerdo a los siguientes pasos:

### 1.- Formación inicial de la capa de acondicionamiento

Se inicia cuando la biopelícula empieza a crecer, compuesta por algunas partículas, orgánicas o inorgánicas. Esta capa de acondicionamiento se modifica el sustrato cambiando la accesibilidad de la bacteria. La carga en la superficie, la tensión y la potencia pueden alterar favorablemente las interacciones entre el sustrato y la formación de una bicapa. El sustrato provee de nutrientes para el crecimiento de la comunidad de bacterias (Garret et al., 2008).

## 2.- Adhesión reversible

Las células plantónicas microbianas son transportadas a partir del volumen de líquido condicionando otras superficies por medio de las fuerzas físicas o por apéndices bacterianos como flagelos. Una fracción de células llega a adsorberse reversiblemente en la superficie. Factores como la energía disponible, la funcionalidad de la superficie, la orientación bacteriana, la temperatura y condiciones de presión que se presentan en el medioambiente contribuyen a la adhesión bacteriana. Si la fuerza de repulsión es más grande que las fuerzas de atracción, la bacteria llegará a desprenderse de la superficie. Las fuerzas físicas asociadas con la adhesión son: las fuerzas de Van der Waals, las interacciones estéricas y las interacciones electrostáticas (Gallardo et al., 2002).

## 3.- Adhesión irreversible

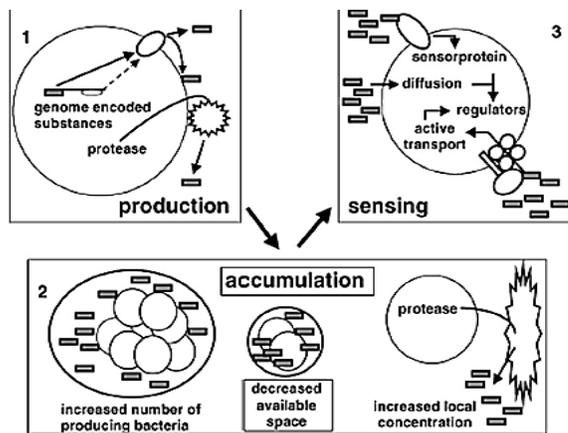
En términos reales, el número de células adsorbidas permanecen inmobilizadas y llegan a adsorberse irreversiblemente. Esto ha sido sostenido debido a los apéndices de la bacteria (flagelos, fimbrias o pili) vencen las fuerzas físicas repulsivas eléctricas de la doble capa. Estos apéndices de la bacteria tienen contacto con la doble capa dando como resultado reacciones de oxidación e hidratación para consolidar el enlace entre bacteria y la superficie. Algunas evidencias han mostrado que la adhesión microbiana depende fuertemente de las propiedades hidrofóbicas-hidrofílicas de las interacciones de la superficie (Lui et al., 2004).

## 4.- Crecimiento de la población

Al reproducirse las bacterias, las células hijas se difunden hacia el interior y exterior a partir del punto de ataque unión de los grupos formados. Típicamente tales interacciones y crecimiento de los grupos dentro del desarrollo de la biopelícula dan origen a la forma de un hongo. La estructura del hongo se cree que permite el paso de nutrientes a la profundidad de la biopelícula. Después de una fase *lag* inicial, hay un rápido incremento de la población. Esto depende de las condiciones físicas y químicas del medioambiente, de los nutrientes y del sustrato. Sin embargo, hay diferencias entre la expresión de los genes que producen las bacterias planctónicas y las sésiles. Por ejemplo, en las bacterias sésiles la producción de los apéndices es inhibida en la superficie, debido a que la motilidad es restringida y no necesaria (Dunne, 2002).

## 5-. Etapas finales en el desarrollo de la biopelícula

En esta fase las células de las bacterias regulan sus actividades fisiológicas mediante un proceso llamado *quorum sensing* (Blasser, 1999). En este proceso hay señales químicas usadas que estimulan expresiones genéticas, mecánicas y precursores enzimáticos, que funcionan debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una señal de "yo estoy aquí", de tal manera que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración de esta señal. Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. Los gérmenes que utilizan este proceso elaboran y secretan moléculas señalizadoras, llamadas autoinductores las principales moléculas empleadas para comunicarse con las demás bacterias son las acil homoserina lactonas, que predominan en bacterias Gram negativas, mientras que oligopéptidos modificados prevalecen en gérmenes Gram positivos. Las bacterias también poseen un receptor que puede detectar específicamente el autoinductor respectivo. Cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor (Nazar, 2007). Este proceso se da en fases: en el primer paso una molécula de señalización específica se produce dentro de la célula bacteriana a través de la envoltura bacteriana. En la segunda etapa, las señalizaciones de las moléculas se acumularan fuera de la bacteria. En el tercer paso la bacteria usa reguladores, estos se unen específicamente a las moléculas de señalizaciones externas de las bacterias interactuando con proteínas las cuales empiezan a fosforilarse; señalizando a las moléculas que pasaran por difusión a través de la membrana. Una vez dentro los enlaces regulan las proteínas. Las señales de moléculas empiezan a modificarse y exportar moléculas en la bacteria. Sin embargo, esto solo ocurre cuando hay una concentración de las moléculas con un nivel predefinido dando lugar a la expresión de los genes (Podbielski & Bernd, 2004).



**Figura 4.** Fases de regulación del *quorum sensing*

## 6- Muerte de la biopelícula

La fase de muerte se da cuando se rompe la biopelícula. Sin embargo, en esta fase algunas bacterias son capaces de producir enzimas que usan para degradar los polisacáridos que sujetan a la biopelícula, liberando entonces a las bacterias de la superficie para colonizar otros sustratos frescos (Sutherland, 1999).

### 1.2.2.1. Biopelículas estafilocócicas

Una de las bacterias que más se estudia en el mundo actualmente por su capacidad de producir biopelículas es el *Staphylococcus aureus* (Hernández & Novales., 2007).

### 1.2.2.2. Formación

El desarrollo de una biopelícula estafilocócica se da en 3 etapas:

#### 1-Ataque

El primer paso, el *Staphylococcus aureus* expresa una serie de proteínas de superficie llamadas *MSCRAMMs* (componentes de la superficie microbiana que reconocen a las moléculas de la matriz) (Patti et al., 1994) para adherirse a diferentes superficies (Otto, 2008).

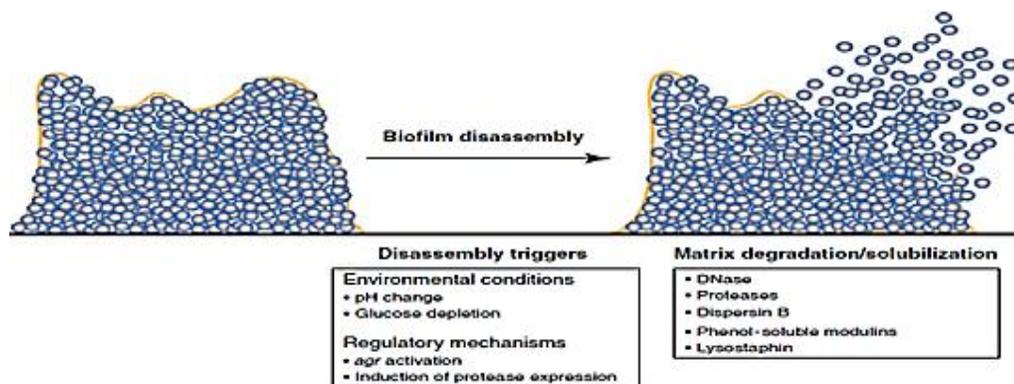
#### 2-Maduración

Se caracteriza por la adherencia intercelular que se logra debido a moléculas como proteínas adhesivas. En esta fase se forman estructuras tridimensionales específicas llamadas "torres" entre ellas hay canales llenos de líquidos que transportan los nutrientes necesarios de las capas más profundas de las biopelículas (Costerton et al., 1995).

#### 3-Desprendimiento

Una vez que se desarrolla completamente la biopelícula estafilocócica está puede desprenderse (también llamado desprendimiento o dispersión) a través de procesos mecánicos y procesos de activación. Este proceso envuelve múltiples pasos incluyendo

la degradación de la matriz extracelular y cambios físicos que preparan a las células para condiciones fuera de la biopelículas. Sin embargo, hay algunos otros factores que contribuyen al desprendimiento como son: las condiciones ambientales, ya que provocan la activación de mecanismos que traen como consecuencia el desprendimiento del *Staphylococcus aureus* de la biopelícula. Además, de factores genéticos (Boles & Horswill, 2008).



**Figura 5.** Modelo conocido del desprendimiento estafilocócico

**Tabla 5.** Mecanismos del desprendimiento de las biopelículas estafilocócicas

Especies	Proceso	Mecanismo	Referencias
<i>S.aureus</i> y <i>S.epidermidis</i>	Activación del sistema <i>agr</i>	Expresión de factores que regulan el sistema <i>agr</i>	(Boles & Horswill, 2008)
<i>S.aureus</i>	Polisacárido de adherencia intercelular ( <i>PIA</i> )	Activación del sistema <i>agr</i>	(Boles & Horswill, 2008)
<i>S.aureus</i>	Inducción de la expresión de la proteasa celular	Corte de proteínas de la matriz	(Marti, 2010)
<i>S.aureus</i>	Cambio de pH	Reactivación del sistema <i>agr</i> y otros sistemas de regulación	(Boles & Horswill, 2008)

**Fuente:** (Boles & Horswill, 2011).

### **1.2.2.3. Composición**

La composición precisa de las biopelículas depende de las cepas de *Staphylococcus aureus*, es decir de los nutrientes disponibles, estados fisiológico y las condiciones físicas que prevalecen (Boles & Horswill, 2008).

Algunas cepas se basan en polisacáridos en formaciones de biopelículas robustas, otras forman biopelículas con polisacáridos independientes con matrices compuestas con proteínas y *DNA* (O’Gara, 2007; Izano, 2008). Las proteínas constituyen el segundo mayor componente de las biopelículas (Boles & Horswill, 2008).

### **1.2.2.4. Matriz y proteínas de las biopelículas**

Las biopelículas estafilocócicas están encerrados en una matriz extracelular compuesta por proteínas, polisacáridos extracelulares y *ADN*, está le provee protección a el ataque de las células o la exposición de agentes antimicrobianos. Un componente importante de las biopelículas es el *ADN* que tiene como papel servir de forma estructural al *S.aureus* en las biopelículas facilitando las interacciones superficie-célula y célula-célula (Boles & Horswill, 2011).

Por otra parte, el 15% de las biopelículas está compuesto por células microbianas, envueltas por la matriz extracelular en las cuales hay canales que transportan un volumen de fluido en el flujo conectivo de la comunidad bacteriana (Arciola et al., 2012).

El mecanismo de formación de la biopelícula se basa en la habilidad del *Staphylococcus aureus* de expresar una variedad de proteínas de adhesión que colonizan gran número de diferentes superficies. Esas proteínas principalmente se encuentran ancladas a la pared celular del *Staphylococcus aureus*, sirve de sostén de las células dentro de las biopelículas probablemente interactuando con otras proteínas de superficies las células vecinas. En la matriz extracelular de las biopelículas también alberga proteínas que están implicadas en la formación de biopelículas como la proteína *Bap* (proteína asociada con la formación de biopelículas) descubierta por Cucarella et al. (Cucarella et al., 2001).

### **1.2.2.5. Condiciones que promueven el desprendimiento**

Con las condiciones favorables la mayoría de las biopelículas liberan células en forma continua presentando mayores desprendimientos después de periodos de crecimiento prolongados (Yarwood, 2004). Además, se ha inducido el desprendimiento de las biopelículas de *S.aureus* con cambios ambientales en su crecimiento mediante la remoción de la glucosa. Sin embargo, en condiciones normales el crecimiento de la biopelícula se da cuando la glucosa está presente, ya que reprime el sistema *agr*, debido a que cuando la glucosa se agota en el medio se reactiva el sistema *agr* con la producción de enzimas que degradan la matriz resultando en el desprendimiento de las biopelículas (O’Gara, 2007). Aunque, más allá del agotamiento de la glucosa, se sabe poco sobre la contribución de otras condiciones ambientales en el mecanismo del desprendimiento. Por otra parte, existe la evidencia de que diversos factores inducen la formación de biopelículas de *Staphylococcus*, como la presencia de aminos, condiciones de anaerobiosis, incremento en la concentración de azúcares como glucosa y diversas concentraciones de antibióticos (Curtin et al., 2003).

### **1.2.2.6. Orientación del desprendimiento**

La diversidad de los componentes de las biopelículas como el *DNA* y polisacáridos son susceptibles a un rango amplio de enzimas como la *proteínasa K* y *tripsina* que dispersan el *Staphylococcus aureus* (O’Neill, 2007), otra es la *dnasa I* que ha servido en la dispersión de las biopelículas formadas por el *Staphylococcus aureus* (Mann, 2009; Izano, 2008) y el *dispersin B*, producida por el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kaplan et al., 2003) que inhibe la formación de las biopelículas promoviendo el desprendimiento del *S.aureus* siendo esta una  *$\beta$ -hexosaminidasa* que hidroliza los enlaces glicosídicos (Ramasubbu, 2005), debido a esto hay gran interés en utilizar a esta como agente antibiopelícula (Kaplan, 2010), sin embargo la habilidad del *Staphylococcus aureus* para formar biopelículas con polisacáridos independientes sugiere que podría tener limitaciones (Boles & Horswill, 2011).

### 1.2.3. Factores ambientales

Los principales son:

- **pH**

Los cambios en el pH pueden marcar efectos en el crecimiento de las bacterias esto es frecuentemente usado para la producción de detergentes y desinfectantes para matarlas. Sin embargo, las bacterias responden a cambios de pH tanto internos como externos en diferentes procesos celulares, como en la secreción de sustancias exopoliméricas (polisacáridos). Aunque, el pH depende de cada bacteria es alrededor de 7 para la mayoría de las bacterias (Oliveira et al., 1994).

- **Propiedades reológicas y adhesivas**

Las biopelículas se comportan como fluidos viscoelásticos exhibiendo deformaciones viscosas elásticamente irreversibles y reversibles. A las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), les atrae el alginato, xantana, goma gellana debido a la adhesión de hidrógeno a partir de geles viscoelásticos hidratados fuertemente. Estas propiedades les proporcionan fuerzas a las biopelículas teniendo, así una estabilidad mecánica (Villanin et al., 2000).

- **Temperatura**

La temperatura óptima para el crecimiento de microorganismos está asociada con los nutrientes, lo que resulta en la formación de la biopelícula. Esta a su vez, depende de la presencia y la reacción de las enzimas, las cuales controlan el desarrollo de sistemas físicos y bioquímicos. La temperatura también se relaciona con la rapidez de la reacción y el movimiento del desarrollo de las células. Además, la temperatura ambiental afecta las propiedades físicas de los componentes dentro de la célula. Sin embargo, los últimos reportes se demuestra que a una temperatura baja se aumenta la posibilidad de adhesión debido a la interacción entre la bacteria y el sustrato (Nisbet et al., 1984). Por su parte, Marion-Ferey et al. (Marion-Ferey et al., 2002) observaron el efecto de las temperaturas altas (80-90°C) en cuanto a las temperaturas de eliminación de las biopelículas, pero descubrieron que estas temperaturas no eran efectivas para remover el biopelículas debido a "efectos de respaldo" y que a en temperaturas altas se incrementa la adherencia natural de las biopelículas en las superficies (Garret et al., 2008).

#### **1.2.4. Importancia**

Las células de las biopelículas son las más resistentes a la desecación, similar a la sobrevivencia encontrada durante la exposición al estrés a desinfectantes. La formación de biopelículas en las plantas de procesamiento de alimentos son un alto riesgo al originar contaminaciones cruzadas a partir de las manos, esponjas, utensilios usados en los alimentos y las superficies de los equipos usados empleados (Silva Meira et al., 2012).

La superficie de elección en la mayoría de los casos en la industria alimentaria el acero inoxidable, ya que es estable a una variedad de temperaturas, relativamente inertes y resistentes a la corrosión (Verran et al., 2000) pero, al utilizar superficies de acero inoxidable se pueden desgastar (Verran et al., 2008), lo cual puede provocar un aumento en la adhesión bacteriana (Kusumaningrum et al., 2002), debido a esto es importante realizar una adecuada limpieza y métodos de desinfección, aunque se ha visto que a pesar del uso de limpiadores y desinfectantes en el procesamiento industrial alimenticio, la adhesión bacteriana no ha sido prevenida y por lo tanto la formación de la biopelícula no tiene un límite. El crecimiento de estas resulta en costos elevados en limpieza y mantenimiento, también pueden causar serios problemas en ingeniería impidiendo el flujo de calor, incrementando la resistencia del fluido favoreciendo la corrosión llevando a una pérdida de energía y perdiendo productividad (Silva Meira et al., 2012).

Sin embargo, las biopelículas pueden ser buenas en algunos casos como en el uso de remoción de contaminantes, metales, agentes radioactivos (Barkay & Schaefer, 2001), compuestos nitrogenados (Li et al., 2003) y en la industria del agua se utiliza para la purificación (Sekoulov & Brinke Seiferth, 1999).

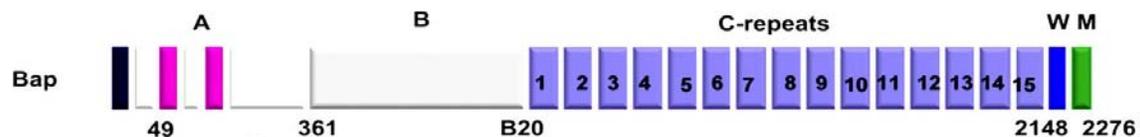
El *Staphylococcus aureus* es uno de los más frecuentes patógenos transmitidos por alimentos encontrados en plantas de procesamiento de alimentos (Pastoriza et al., 2002), su adherencia en las superficies ocasiona la formación de biopelículas (Xianming & Xinna, 2009). Sin embargo, estos organismos no solo se asocian con procesos de sacrificios, sino también de procesamiento de los alimentos (Tone et al., 2007).

### 1.2.5. Características del gen *bap*

La proteína *Bap* es un miembro del grupo de 100 proteínas que conservan la estructura y características funcionales en diversas especies de bacterias, las cuales juegan un papel importante en el desarrollo de las biopelículas. Ésta contiene 2276 aminoácidos asociados a las bacterias Gram positivas. Ésta a su vez se compone por N-terminales divididos en regiones. La región A esta compuesta por 2 repeticiones de 32 aminoácidos separados por 26 aminoácidos. La región B contiene 458 aminoácidos sin repeticiones, hasta ahora con una función desconocida. En la región central se encuentra la región C formada por C-dominantes compuestos a su vez por 16 repeticiones de 86 aminoácidos importantes en la adhesión bacterial. Finalmente, hay un segmento de C-terminales que poseen una pared compuesta por membranas (WM) (Lasa & Penadés, 2006).

El gen *bap* se ha encontrado en diferentes especies de estafilococos como:

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus hyicus* (Tormo et al., 2005).



**Figura 6.** Proteína *Bap*

### 1.2.6. Importancia del gen *bap*

Todos los estafilococos aislados que albergan la proteína *Bap* tienen la característica de producir biopelículas muy fuertes y adherentes (Cucarella et al., 2001).

### 1.2.7. Control

Las biopelículas son una gran preocupación en los sectores de alimentos, muchos estudios se han realizado con el fin de obtener una mejor comprensión de su desarrollo y difusión. En consecuencia, estudios también han llegado a tomarse medidas de prevención. El más importante es evitar la formación de biopelículas por medio de la limpieza y desinfección de tal manera que no permita que las células se unan firmemente (apego reversible) al ponerse en contacto con superficies (Midelet & Carpentier, 2004).

#### Desinfectantes

Los agentes químicos reaccionan con las sustancias poliméricas extracelulares hidratadas (EPS) de las biopelículas. Estas se han eliminado después de tratamientos con agentes químicos (Simões et al., 2005).

- **Peróxidos**

Entre los más usados es el  $H_2O_2$  debido a su capacidad de oxidación basado en la producción de radicales libres que afectando a la matriz de la biopelícula, se ha encontrado ser eficaz contra biopelículas (De Carvalho, 2007) conocido por ser una solución segura que no causa reacciones alérgicas (Rideout et al., 2005) y se puede utilizar en concentraciones altas sin afectar la calidad del producto (Kim et al., 2000). Se ha demostrado que mata biopelículas maduras en concentraciones entre 0.08% y 0.2% (Shikongo Nambabi, 2011) y para erradicar completamente las biopelículas se utiliza en una concentración del 5% por 15 min (Robbins et al., 2005).

### 1.3. Métodos de diferenciación genotípica

Se utilizan para clasificar las bacterias, además de ser de gran utilidad para establecer relaciones sobre intoxicaciones por alimentos y rutas epidemiológicas clasificándose en:

- **Análisis de restricción**

Se lleva a cabo mediante el estudio de fragmentos de *ADN in vitro* por digestión con endonucleasas para su posterior separación electroforética (Fueyo Mendoza, 2008)

- **Análisis de amplificación**

Se basa en la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* para aplicarse en la amplificación de secuencias conocidas (Fueyo Mendoza, 2008).

## **Métodos basados en la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)***

La reacción consiste en la amplificación enzimática *in vitro* de un fragmento de *ADN* pudiendo llegar a copiarse hasta  $10^6$  veces. Para ello son necesarios: un *ADN* molde, desoxirribonucleótidos (*dNTPs*), una *ADN* polimerasa termorresistente y uno (para secuencias aleatorias) o dos (para secuencias conocidas) oligonucleótidos, de 10 a 20 pares de nucleótidos complementarios a una región de la secuencia a amplificar. Estos oligonucleótidos reciben el nombre de iniciadores, cebadores o *primers*, y por lo tanto la elección de la temperatura ( $T_a$ ) determinara la especificidad de los fragmentos de *ADN* (Williams et al., 1990). Este proceso se compone de varias etapas:

- **Fase de desnaturalización**

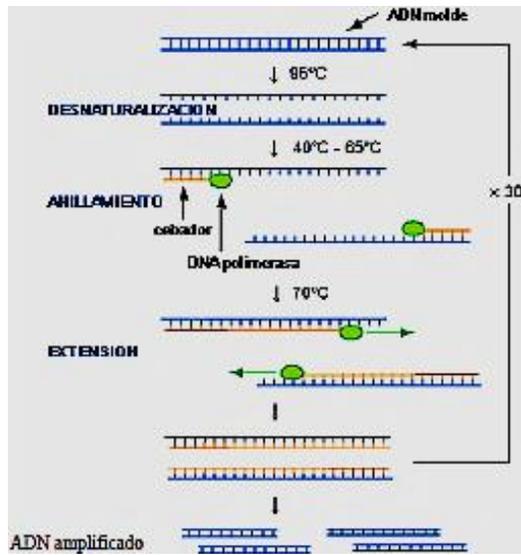
Consiste en la separación de las dos hebras del *ADN* molde con una elevada temperatura (Fueyo Mendoza, 2008).

- **Fase de unión o anillamiento**

Se inicia cuando la temperatura disminuye permitiendo a los *primers* reconocer a sus secuencias complementarias en las cadenas de *ADN* (Fueyo Mendoza, 2008).

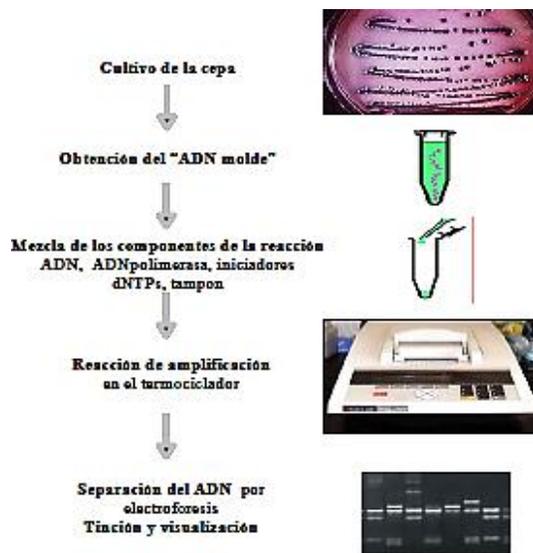
- **Fase de elongación**

Comienza cuando la *ADN* polimerasa se une al *primer* sintetizando una hebra complementaria gracias a la incorporación de los nucleótidos. Este ciclo se repite un número determinado de veces alrededor de 30-35 veces con cadenas recién sintetizadas actuando como molde. Esta sucesión de ciclos da lugar a un incremento exponencial del número de copias del fragmento de *ADN* delimitado por los *primers* (Fueyo Mendoza, 2008).



**Figura 7.** Etapas de la amplificación mediante *PCR*

Posteriormente, se puede visualizar el patrón de bandas con los fragmentos de *ADN* amplificados mediante electroforesis en gel agarosa teñido con bromuro de etidio o en gel poliacrilamida con tinción de plata (Williams et al., 1990).



**Figura 8.** Esquema de los pasos básicos de un protocolo de *PCR*

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo General

Detectar el gen *bap* en cepas de *Staphylococcus aureus* toxigénicos a partir de exudados mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*) para determinar su relación con la formación de las biopelículas.

### Objetivos Particulares

1. Aislar e identificar cepas de *S.aureus* mediante pruebas bioquímicas y tintoriales.
2. Seleccionar las cepas capaces de producir biopelículas más fuertes mediante su formación en medio de cultivo líquido y microscopia electrónica de transmisión.
3. Comprobar la capacidad de las cepas de *S.aureus* seleccionadas para producir biopelículas mediante pruebas *“in vitro”*.
4. Detectar la presencia del gen *bap* para comprobar su implicación en la capacidad de formación de las biopelículas en cada cepa mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*).
5. Detectar la presencia del gen *sea* causante de la intoxicación alimentaria en las cepas de *S.aureus* aisladas mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Toma de muestras

##### Procedimiento

Se tomaron 82 exudados de diferentes personas con hisopos estériles y con solución salina transportándose en tubos estériles.

#### 3.2. Aislamientos y purificación de posibles *S.aureus*

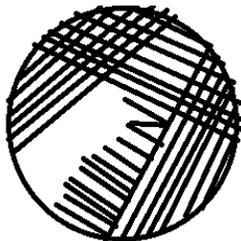
##### Procedimiento

Se sembró cada exudado bucofaríngeo en Agar Chapman incubándose 24h a 37°C.

Se seleccionaron las colonias amarillas 3-5 colonias de cada muestra.

Las colonias seleccionadas del Agar Chapman se sembraron en Agar Biotriptasa.

Se tomaron las colonias amarillas sembradas por estriado.



**Figura 9.** Siembra de bacterias por estriado

#### 3.3. Identificación de *S.aureus* con pruebas tintoriales, bioquímicas y de fermentación

##### 3.3.1. Pruebas tintoriales

##### Tinción de Gram

##### Procedimiento

En un portaobjeto se marcaron los círculos donde se colocó la bacteria.

- Se disolvió en agua destilada estéril una pequeña muestra de la bacteria.
- Se dejó secar la muestra.
- Se fijó al calor.
- Se dejó enfriar.
- Se realizó un tren de tinción con el siguiente orden y tiempos:

**Tabla 6.** Tinción de Gram

<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Procedimiento</b>
Cristal violeta	1 min	Se enjuagó
Lugol	1 min	Se decantó
Alcohol-acetona	20 s	Se enjuagó
Safranina	1 min	Se enjuagó

- Se dejó secar.
- Se observó al microscopio en un objetivo de *100X* con aceite de inmersión para ver cocos en racimos de color violeta (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005).

### **Uso del microscopio marca OLYMPUS**

#### **Procedimiento**

- Cada frotis se observó utilizando un microscopio de luz compuesto.
- Se agregó unas gotas de aceite de inmersión en el portaobjeto.
- Se enfocó la muestra con el objetivo *40X*, después con el objetivo *100X* se observó la morfología y color de las bacterias (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005).

### **3.3.2. Pruebas bioquímicas**

#### **Prueba de Catalasa**

##### **Procedimiento**

- Se tomó una gota de agua oxigenada al 3% en un portaobjeto y se puso en contacto con la bacteria tomada con un palillo estéril de un cultivo de 24h.
- Si la bacteria poseía esta enzima, actuaba sobre el agua oxigenada liberando agua y

oxígeno, observándose en la formación de burbujas (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005)

### **Prueba de Oxidasa**

#### **Procedimiento**

- Se tomó la bacteria con un palillo estéril.
- Se colocó sobre papel filtro puesto en una caja Petri en una área estéril previamente humedecido con el reactivo N, N, N tetrametil-p-fenilendiamina diluido en H<sub>2</sub>O destilada.
- La prueba fue positiva, si formaba un color morado indicando que la bacteria poseía la enzima citocromo oxidada (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005).

### **Prueba de Coagulasa**

#### **Procedimiento**

- Se obtuvo plasma de conejo esterilizado por filtración, utilizando una membrana de 0.22µm.
- Se sembró la bacteria en 0.5ml de caldo BHI por 24h a 37°C y se mezcló con 0.5ml de plasma.
- Se incubó en baño María a 37 °C por 4-24h.
- Se observó la formación o no de un coágulo (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005)

### **Prueba de O/F**

#### **Procedimiento**

- Se sembró cada la bacteria en 2 tubos de O/F uno sin aceite mineral y otro con aceite mineral.
- Se incubaron los 2 tubos por 24h a 37°C.
- Se observaron si los tubos cambiaron de color, ya que si la bacteria sembrada creció sin aceite mineral tuvo la capacidad de desarrollarse en presencia de oxígeno (oxidativo) y si la bacteria sembrada creció con aceite mineral, tuvo la capacidad de desarrollarse sin presencia de oxígeno (fermentador) (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005).

### **Prueba de MIO**

- Se sembró cada bacteria en un tubo de MIO.
- Se incubó por 24h a 37°C.
- La prueba fue positiva, si se observó un cambio de color indicando que la bacteria poseía la capacidad enzimática de descarboxilar la ornitina (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005).

### **Prueba VP**

- Se sembró cada bacteria en un tubo con caldo RM-VP.
- Se incubó cada tubo por 24h a 37°C.
- Se añadió primero 6 gotas de  $\alpha$ -naftol al 5% y después se agregó 3 gotas de KOH al 40%.
- Se agitó el tubo y se dejó reposar durante 10 min.
- La prueba fue positiva, si se observó un cambio de color indicando que la presencia de diacetilo (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005).

### **Prueba de Urea**

- Se sembró cada bacteria en un tubo con caldo urea.
- Se incubó cada tubo por 24h a 37°C.
- La prueba fue positiva, si se observó un cambio de color indicando que la bacteria poseía la enzima ureasa (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005).

### **3.3.3. Pruebas de fermentación de**

**D-celobiosa, D-manitol, D-melecitosa, D-manosa, D-galactosa, D-fructosa, D-threalosa, D-xilosa, Maltosa, L-arabinosa y Sacarosa**

#### **Procedimiento**

- Se sembró cada bacteria en un tubo con caldo rojo fenol junto con cada uno de los **azúcares\***.
- A continuación, se incubó cada tubo por 24h a 37°C.

La prueba fue positiva, si se observó un cambio de color indicando que la bacteria tuvo la capacidad de degradar el azúcar.

\***Azúcares:** D-celobiosa, D-manitol, D-melecitosa, D-manosa, D-galactosa, D-fructosa, D-threalosa, D-xilosa, Maltosa, L-arabinosa y Sacarosa (Álvarez Manrique & Mendoza Elvira, 2005; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

### **3.4. Detección de la capacidad de formar biopelículas en caldo BHI**

#### **Procedimiento**

Se sembró la bacteria en caldo BHI.

Se verificó la presencia de la biopelícula por la formación o no de una capa en la parte superior del cultivo adherido sobre las paredes del tubo, después su incubación a 37°C durante 1 semana (Chen et al., 2012b).

### **3.5. Detección de la capacidad de formar biopelículas con microscopía electrónica**

#### **Procedimiento**

Se inoculó la bacteria formadora de la biopelícula en caldo BHI.

Se seleccionó una cepa de *Staphylococcus aureus* formadora de una biopelícula en un tubo de caldo BHI.

Se esterilizó una caja de Petri con un portaobjetos, en donde se colocaron unas rejillas circulares de cobre, con grosor de 20nm y un diámetro de 3mm, formadas a su vez por 400 agujeros con un tamaño de abertura de 75µm y sobre estas se colocó la muestra.

Se incubó cada rejilla durante 5 días a 37°C.

Se tomó cada rejilla con unas pinzas.

Se colocó en el portamuestras un pedazo de cinta doblecara conductible a los costados.

A continuación, se colocó sobre el portamuestras un poco de tintura de plata.

Después, el portamuestras con las rejillas se expuso a vacío durante 10s.

- Se observó cada rejilla a 1,000 aumentos con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL y modelo JSM-6010LA.
- Se tomaron fotografías con una cámara digital (Gallardo González et al., 2003).

### **3.6. Detección de la capacidad de formar biopelículas con cristal violeta**

#### **Procedimiento**

- Se inoculó la bacteria formadora de la biopelícula en caldo BHI durante 24h a 37°C.
- Se vació el caldo BHI en una caja Petri que contenía un cubreobjetos estéril.
- Se incubaron las cajas Petri durante 3 días y 5 días a 37°C.
- Se tomó el cubreobjetos con unas pinzas.
- Se lavó el cubreobjetos con agua destilada 3 veces.
- Se dejó secar el cubreobjetos.
- Se tiñó el cubreobjetos con cristal violeta durante 10min.
- Se dejaron secar las muestras.
- Se colocó cada cubreobjetos en un portaobjetos.
- Se observó al microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS en un objetivo de 40X para observar la agrupación indicadora de la formación de la biopelícula.
- A continuación, se tomaron fotografías (Lasa et al., 2005).

### **3.7. Extracción de ADN**

#### **Procedimiento**

- Se sembró la bacteria en Agar Luria Bertani.
- Se incubó por 24h a 35 °C.
- Se recogió ¼ de una caja de Agar Luria Bertani con un asa estéril de vidrio.
- Se colocó en 1ml de *TE* 1X.
- Se centrifugó por 5min a 7000rpm.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió en 200µL de *TE* 1X y 20µL/ml de *lisozima*.

- Se incubó por 3h a 37 °C.
- Para lograr la degradación de las proteínas se agregó 300µL de *TE* 1X, 30µL de *SDS* al 10% y 2µL/ml de *proteínasa K*.
- Se mezcló suavemente.
- Se incubó nuevamente por 1h a 37 °C.
- Para la eliminación de los péptidos, además de lípidos se añadió 84µL de *NaCl* 5M y 60µL de *CTAB* 0.7M.
- Se mezcló suavemente.
- Después se incubó por 1h a 65 °C.
- Se adicionó 300µL de fenol cloroformo frío al 24:1.
- Se mezcló suavemente 5min.
- Se centrifugó por 5min a 8000rpm.
- Se separó en fases, se tomó el sobrenadante, se evitó tomar la parte del centro y se eliminó el desecho.
- Se lavó el sobrenadante con fenol cloroformo frío al 24:1 hasta que se vio transparente.
- Se agregó 200µL de etanol absoluto para lograr la precipitación del *ADN*.
- Se mezcló por inmersión lenta hasta que se formó una tela blanca.
- Para que se pegara a la pared del tubo se centrifugó por 5min a 7000rpm.
- Se lavó el precipitado cubriéndolo con etanol absoluto.
- Se centrifugó por 5min a 8000rpm.
- Se marcó dónde quedó el *ADN*.
- Se decantó nuevamente.
- Se secó sobre una toalla boca abajo a 25 °C.
- Se resuspendió nuevamente con 200µL de *TE* 1X.
- Se almacenó el *ADN* a -20 °C.
- Para la confirmación de la extracción de *ADN* se realizó una electroforesis en gel agarosa al 1% (Poutou et al., 2005).

### 3.8. Detección del gen *bap* mediante la técnica de PCR

#### □ Procedimiento

- Para la selección de la concentración de los *primers*. Se evaluaron diferentes concentraciones desde 0.25mM, 0.5mM, 0.75mM y 1mM.
- Y a continuación, se realizó una electroforesis en gel agarosa al 1%.
- Después, se tomaron fotografías con un analizador de imagen digital marca KODACK y modelo LOGIC 100.
- Y de acuerdo, a las fotografías tomadas se seleccionó la concentración de los *primers* 0.75mM.
- Para la preparación de la concentración 0.75mM de los *primers*, se tomó en frío 2.5μL de ADN, 12.5μL de Mix para PCR, 6.2μL de H<sub>2</sub>O inyectable y 1.9μL de cada uno de los siguientes *primers*: 5'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC-3' y 5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3'.
- Se centrifugó por 3s a 7000rpm y a continuación se llevó a cabo el siguiente ciclo en el termociclador: predesnaturalización 2 min a 94 °C, desnaturalización 30s a 94 °C, alineamiento 30s a 56 °C, extensión 50s a 72 °C en 40 ciclos y una elongación final 7min a 72 °C.
- Se utilizó como control negativo la cepa de *S.aureus* Cowan (Darwish & Asfour, 2013).

#### 3.8.1. Electroforesis para el gen *bap*

#### □ Procedimiento

- Para el análisis de los productos de amplificación se utilizó un gel agarosa al 1% teñido con 7μL/ml de bromuro de etidio.
- Se vació el gel agarosa en la cámara de electroforesis y se colocó un peine antes de que gelificara para formar los pozos.

- A continuación, se esperó la gelificación del gel y se quitó el peine.
- Se vació el amortiguador *TBE* 1X hasta cubrir el gel en la cámara de electroforesis.
- Se colocó en cada uno de los 13 pozos formados en el gel la mezcla de 5 $\mu$ L/ml del producto de *PCR* con 2 $\mu$ L/ml del colorante blue orange y el último pozo la mezcla 2 $\mu$ L/ml del colorante blue orange con 3 $\mu$ L/ml del marcador de peso molecular de la marca *Promega*#G316A, sin derramar en el contenido de cada pozo en gel.
- Finalmente los productos fueron separados a 60 V por 1h.
- Finalizada la electroforesis, el gel al 1% fue visualizado en un transiluminador UV marca SYNGENE y modelo GVM20.
- A continuación, se tomaron fotografías con un analizador de imágenes digital marca KODACK y modelo LOGIC 100 (Darwish & Asfour, 2013).

### **3.9. Detección del gen *sea* mediante la técnica de *PCR***

#### **□ Procedimiento**

- Para la selección de la concentración de los *primers*. Se evaluaron diferentes concentraciones desde 0.25mM, 0.5mM, 0.75mM y 1mM.
- Y a continuación, se realizó una electroforesis en gel agarosa al 3.5%.
- Después, se tomaron fotografías con un analizador de imagen digital marca KODACK y modelo LOGIC 100.
- Y de acuerdo a las fotografías tomadas se seleccionó la concentración de los *primers* 0.5mM.
- Para la preparación de la concentración 0.5mM de los *primers*, se tomó en frío 3 $\mu$ L de *ADN*, 12.5 $\mu$ L de Mix para *PCR*, 7 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O inyectable y 1.25 $\mu$ L cada uno de los siguientes *primers*: 5'-TTGGAAACGGTTAAAACGAA-3' y 5'-GAACCTTCCCATCAAAAACA-3'.

- Se centrifugó por 3s a 7000rpm y a continuación se llevó a cabo el siguiente ciclo en el termociclador: predesnaturalización 4min a 94 °C, desnaturalización 2min a 94 °C, alineamiento 2min a 49 °C, extensión a 1min a 72 °C en 30 ciclos y un último ciclo de extensión 7min a 72 °C.
- Se utilizó como control negativo la cepa de *S.aureus* Cowan (Johnson et al., 1990; Suarez et al., 2008).

### **3.9.1. Electroforesis para el gen *sea***

#### **□ Procedimiento**

- Para el análisis de los productos de amplificación se utilizó un gel agarosa al 3.5% teñido con 7μL/ml de bromuro de etidio.
- Se vació el gel agarosa en en la cámara de electroforesis y se colocó un peine antes de que gelificara para formar los pozos.
- A continuación, se esperó a que el gel gelificara y se quitó el peine.
- Se vació el amortiguador *TBE* 1X hasta cubrir el gel en la cámara de electroforesis.
- Se colocó en cada uno de los 13 pozos formados en el gel la mezcla de 5μL/ml del producto de *PCR* con 2μL/ml del colorante blue orange y el último pozo con la mezcla compuesta por 2μL/ml del colorante blue orange con 3μL/ml del marcador de peso molecular de la marca *Promega*#G316A, sin derramar el contenido de cada pozo en gel.
- Finalmente los productos fueron separados a 60 V por 1h.
- Finalizada la electroforesis, el gel al 3.5% fue visualizado en un transiluminador **UV** marca SYNGENE y modelo GVM20.
- Se tomaron fotografías con un analizador de imágenes digital marca KODACK y modelo LOGIC 100 (Suarez et al., 2008).

### **3.10. Detección de la capacidad de formar biopelículas en placas de acero inoxidable**

#### **□ Procedimiento**

- Se utilizaron 17 placas de acero inoxidable por prueba y se colocaron en tubos con 4.5ml de caldo BHI.
- Para formar la biopelícula, en cada tubo de BHI con las placas se inoculó con 1ml de un cultivo de 24h.
- Finalmente, se incubaron los tubos de BHI con las placas por 5días a 37°C (Rodríguez Rodríguez, 2012).

### **3.11. Determinación del efecto del desinfectante en placas de acero inoxidable**

#### **□ Procedimiento**

- Ya formada la biopelícula en los tubos de BHI con las placas de acero inoxidable, se retiró en esterilidad cada placa.
- Se colocó cada placa en cajas Petri estériles con 20ml de agua destilada y a continuación, se agitó.
- Se tomó cada placa y se colocó en 20ml de Bioxitral (desinfectante) a 3000ppm durante un tiempo de 30min y un tiempo de 1h.
- Se retiró cada placa del Bioxitral.
- Y a continuación, se transfirió cada placa a 20ml de neutralizante durante 40min.
- Después, se colocó cada placa en 4.5ml de caldo BHI y se incubó a 37 °C por 5días.
- Finalmente, se confirmó la viabilidad de los microorganismos sembrándolos en Agar Chapman incubados a 37 °C por 24h (Rodríguez Rodríguez, 2012).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Aislamiento e identificación de *Staphylococcus*

A partir de las 82 muestras se aislaron y se identificaron 17 cepas de *Staphylococcus*: 8 *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus*, 4 *Staphylococcus schelieferi* subespecie *coagulans*, 1 *Staphylococcus haemolyticus*, 1 *Staphylococcus lugdunensis*, 2 *Staphylococcus schleiferi* subespecie *schleiferi* y 1 *Staphylococcus saprophyticus* subespecie *saprophyticus* mostrados en la tablas 7 y 8.

**Tabla 7.** Identificación de los *Staphylococcus*

C*	B	G	Co	C	O	O/F	MIO	V	M	S	T	U	Ce	F	MI	Ma	Ga	X	Me	A	Bacterias
M	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
N	+	+	-	+	-	+/+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>S. lugdunensis</i>
O	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
P	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
G	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
U	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
41B	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
42D	+	+	+	+	-	+/+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
42F	+	+	-	+	-	+/+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>S.</i> <i>haemolyticus</i>

**Tabla 8.** Continuación de identificación de los *Staphylococcus*

C*	B	G	Co	C	O	O/F	MIO	V	M	S	T	U	Ce	F	MI	Ma	Ga	X	Me	A	Bacterias	
44	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
46E	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
46 G	+	+	-	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i> sub <i>saprophyticus</i>
57 <sup>a</sup>	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
59B	+	+	-	+	-	+/+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. schelieferi</i> sub <i>schleiferi</i>
66	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
70 <sup>a</sup>	+	+	+	+	-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
70B	+	+	-	+	-	+/+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. schelieferi</i> sub <i>schleiferi</i>

**C\***=Cepas aisladas, **B**=Formación de biopelícula en caldo BHI, **G**=Gram, **Co**=Coagulasa,

**C**=Catalasa, **O**=Oxidasa, **O/F**=Óxido-Fermentación, **MIO**=Movilidad-Indol-Ornitina,

**V**=Voges Proskauer, **M**=Maltosa, **S**=Sacarosa, **T**=D-threolosa, **U**=Urea,

**Ce**=D-celobiosa, **F**=D-fructosa, **MI**=D-manitol, **Ma**=D-maltosa, **Ga**=D-galactosa,

**X**=D-xilosa, **Me**=D-melecitosa, **A**=L-arabinosa y *S.*= *Staphylococcus*.

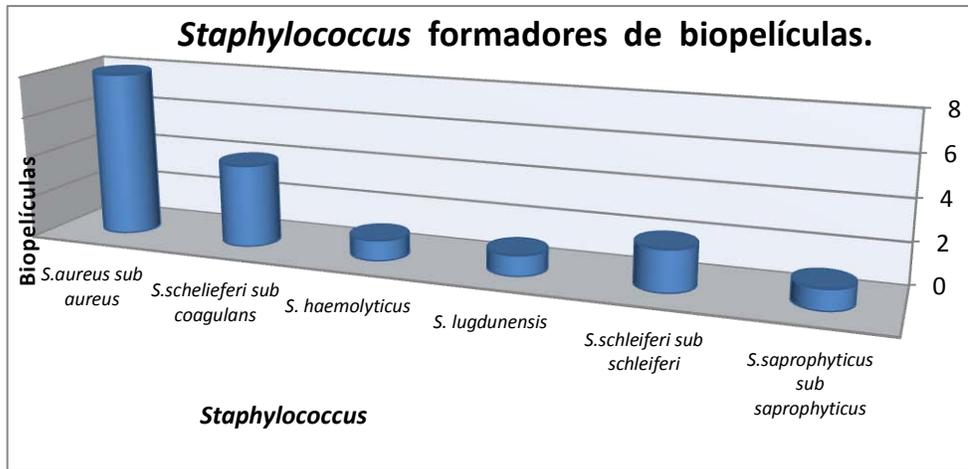
## 4.2. Formación de biopelículas

### 4.2.1. *Staphylococcus*

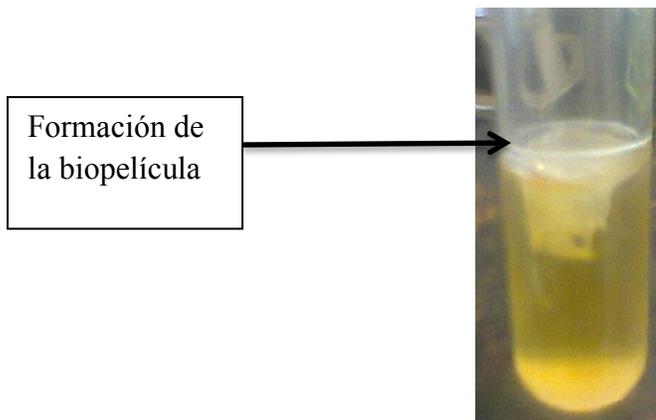
Las 17 cepas de *Staphylococcus* identificadas formaron biopelículas abundantes en caldo BHI mostrado en la tabla 9.

**Tabla 9.** *Staphylococcus* capaces de formar biopelículas en tubos de caldo BHI

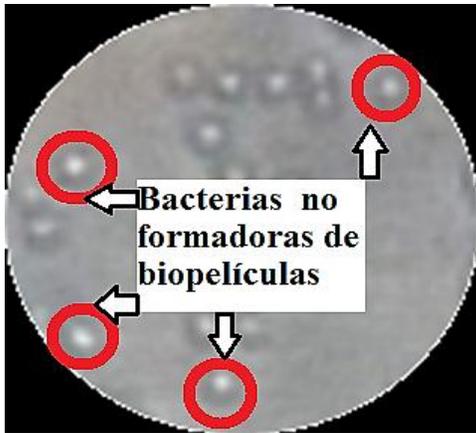
<i>Staphylococcus</i>		Biopelículas
1) M	<i>S.aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
2) N	<i>S. lugdunensis</i>	+
3) O	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
4) P	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
5) G	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
6) U	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
7) 41B	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
8) 42D	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
9) 42F	<i>S. haemolyticus</i>	+
10) 44	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
11) 46E	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
12) 46G	<i>S. saprophyticus</i> sub <i>saprophyticus</i>	+
13) 57 <sup>a</sup>	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
14) 59B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	+
15) 66	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
16) 70 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
17) 70B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	+



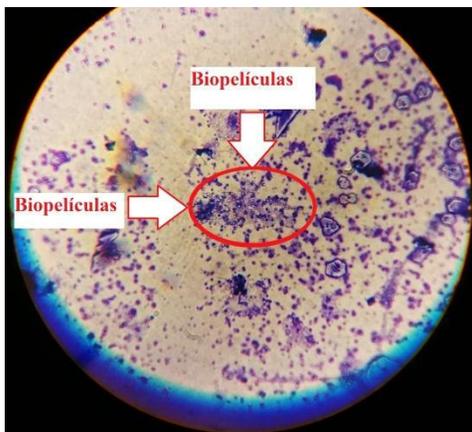
**Figura 10.** Capacidad de los *Staphylococcus* para formar biopelículas



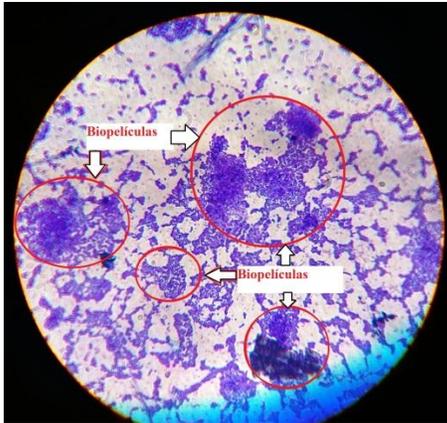
**Figura 11.** Biopelícula formada en caldo BHI por una cepa de *Staphylococcus* aislada



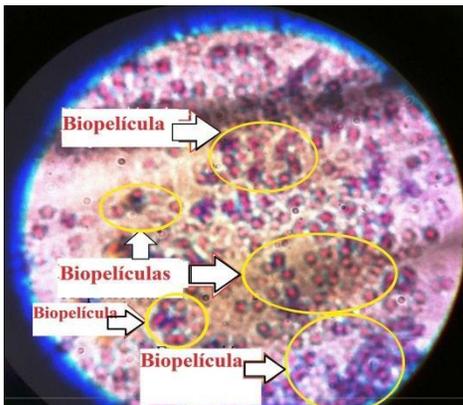
**Figura 12.** Fotografía de las bacterias sin capacidad de formar biopelículas con la técnica de cristal violeta observadas con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de  $40X$



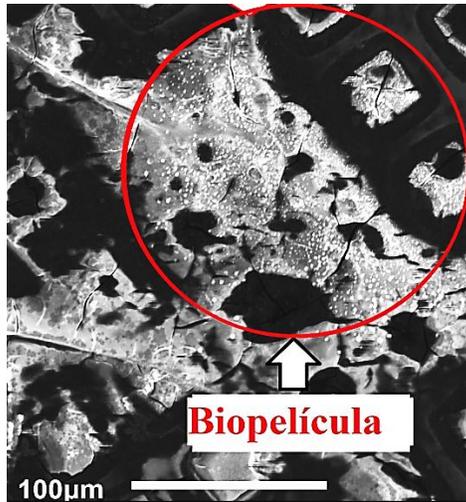
**Figura 13.** Fotografía de la biopelícula formada por una cepa de *Staphylococcus* después de 3 días de incubación con la técnica de cristal violeta y vista con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de  $40X$



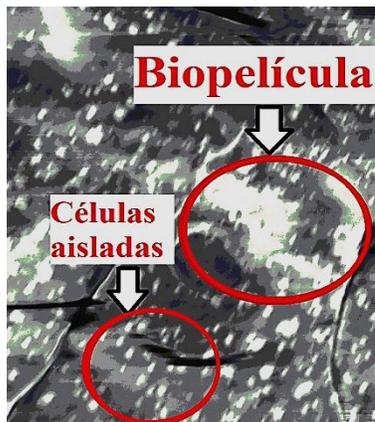
**Figura 14.** Fotografías de las biopelículas formadas una cepa de *Staphylococcus* después de 5 días de incubación con la técnica de cristal violeta y vistas con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de *40X*



**Figura 15.** Fotografía las biopelículas formadas por una cepa de *Staphylococcus* después, de 5 días de incubación con la técnica de cristal violeta y vista con un microscopio de luz compuesto marca OLYMPUS con un aumento de *100X*



**Figura 16.** Fotografía de una biopelícula formada por una cepa de *Staphylococcus* después de 5 días de incubación y observadas con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM6010LA con un aumento de 230X



**Figura 17.** Fotografía de una biopelícula formada por una cepa de *Staphylococcus* a los 5 días de incubación y observada con un microscopio electrónico de barrido de marca JEOL modelo JSM6010LA con un aumento de 1,000X.

De acuerdo a la figura 11 se muestra que los *Staphylococcus* son capaces de formar las biopelículas en el caldo BHI. Y aunque, todas las cepas aisladas de *Staphylococcus* tuvieron la capacidad de formar biopelículas con un comportamiento parecido la formación de una biopelícula sin embargo, cambió con en el transcurso de los días. Por lo que, para

la formación de una biopelícula el tiempo es importante, ya que por ejemplo al cabo de 3 días los *Staphylococcus* se empiezan a juntar para formar algunas biopelículas aisladas como se muestra en la figura 13 que son visualizadas en un microscopio compuesto de luz con un aumento de 40X y teñidas con cristal violeta, por lo tanto, se cree que se inicia la primera fase de una formación de una biopelícula estafilocócica, ya que la biopelícula empieza a crecer ya que, el sustrato le provee los nutrientes necesarios para el desarrollo de la comunidad de las bacterias (Dunne, 2002). Por lo cual, las bacterias comienzan a adherirse a varios puntos de las superficies (Otto, 2008).

Por el contrario, en la figura 14 se muestra el comportamiento de una biopelícula al cabo de 5 días, pero visualizadas en un microscopio compuesto de luz con un aumento de 40X y teñidas con cristal violeta donde se observa que los *Staphylococcus*, se juntan en varios grupos grandes formando comunidades de microorganismos que posiblemente se adhieran a las superficies a través de diferentes polisacáridos (Lasa et al., 2005).

Por otra parte, en la figura 15 se muestra la agrupación característica de una biopelícula formada por los *Staphylococcus* a los 5 días, pero visualizadas en un microscopio compuesto de luz con un aumento de 100X y teñidas con cristal violeta donde se muestra que hay varias agrupaciones de cocos en diferentes áreas de la figura y posiblemente se encuentra en los inicios de la fase de maduración de la biopelícula ya que, empieza a crecer nutriéndose a través de canales permitiendo su reproducción y facilitando el medio para que otras bacterias se puedan ir adhiriendo (Consterton et al., 1995). Además, en la figura 16 también se muestra la biopelícula formada por los *Staphylococcus* a los 5 días de incubación aunque, visualizada con microscopia electrónica de barrido con un aumento de 230X.

Finalmente, en la figura 17, se observa con microscopia electrónica de barrido con un aumento de 1,000X la biopelícula formada a los 5 días y posiblemente con el desprendimiento de células microbianas que pueden colonizar diferentes superficies para iniciar de nuevo una biopelícula estafilocócica (Boles & Horswill, 2008). Por otra parte, en esta etapa las células microbianas crecen en muchos grupos, ya que son muy resistentes, por lo cual son capaces de sobrevivir a diferentes procesos como un proceso de limpieza e incluso a la aplicación de un desinfectante (Xianming & Xinna, 2009). Por lo

que, es más difícil de eliminar una biopelícula con mayor antigüedad, ya que, las bacterias se desarrollan en mayor cantidad, por lo cual llegan a causar problemas de contaminación y por eso, es importante tener un plan de limpieza y desinfección, porque, las bacterias formadoras de biopelículas se pueden desarrollar rápidamente si encuentran las condiciones y nutrientes adecuados para su desarrollo aumentado el riesgo de la formación de la biopelícula madura de más difícil eliminación (Salgado et al., 2003). Aunque, algunas de las bacterias formadoras de las biopelículas en esta etapa tienen la capacidad expresar una gran cantidad de genes que están involucrados en la formación de una biopelícula (Xianming & Xinna, 2009).

En contraste a lo anterior, en la figura 12 se muestra bacterias no formadoras de biopelículas, pero visualizadas en un microscopio compuesto de luz con un aumento de 40X, para demostrar que no todas las bacterias son capaces de formar biopelículas ya que, algunas bacterias se encuentran aisladas o solas, porque, no todas las bacterias son capaces de formar una biopelícula (Dalton & March, 1998). Sin embargo, entre las bacterias que son capaces de desarrollar una biopelícula se encuentra el *Staphylococcus aureus*, ya que esta es una de las bacterias que con mayor frecuencia causa infecciones asociadas al uso de implantes en el ámbito hospitalario, así como otros dispositivos, en su mayoría formados por acero inoxidable (Arciola et al., 2012). Y en la industria de alimentos las superficies de acero inoxidable tipo 304, son utilizadas por ser un material de gran resistencia a la corrosión y de gran estabilidad fisicoquímica pero, también son susceptibles a la formación de las biopelículas (Xianming & Xinna, 2009).

Por otra parte, hay otros factores que influyen en la formación de la biopelícula como son las propiedades físicas de los sustratos, las propiedades fisicoquímicas y las condiciones ambientales (Xianming & Xinna, 2009). Ya que, hay investigaciones en donde se muestra que las características físicas de las superficies, donde se procesan los alimentos, pueden facilitar la adhesión de las células que posteriormente formaran la biopelícula (Bryers, 1987). Aunque también, en otras investigaciones se demuestra que algunas propiedades fisicoquímicas de las superficies influyen en la adhesión bacteriana como las fuerzas de atracción y repulsión ya que, son las que facilitan la adhesión celular de las

bacterias hacia las diferentes superficies a través de sus estructuras como son las capsulas, glicocálix y fimbrias (Xianming & Xinna, 2009).

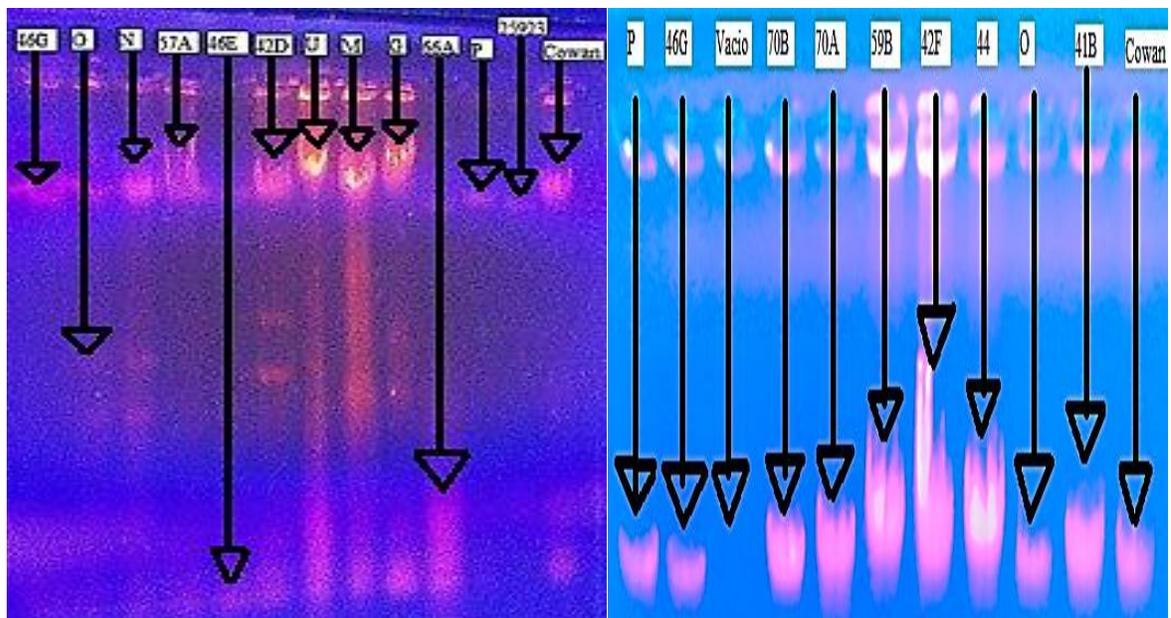
Por otra parte, según lo mostrado en otros reportes entre los factores ambientales se encuentran varios como la temperatura, el pH y los nutrientes juegan un papel importante en el desarrollo de las biopelículas formadas por las bacterias (Herald & Zottola, 1998).

#### 4.2.1.1. Extracción de ADN

A las 17 cepas de *Staphylococcus* se les extrajo su ADN y se confirmó en una electroforesis en un gel agarosa al 1% según la tabla 10.

**Tabla 10.** Cepas de *Staphylococcus* seleccionadas para la extracción de su ADN

<i>Staphylococcus</i>	
1) M	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
2) N	<i>S. lugdunensis</i>
3) O	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
4) P	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
5) G	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
6) U	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
7) 41B	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
8) 42D	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
9) 42F	<i>S. haemolyticus</i>
10) 44	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
11) 46E	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
12) 46G	<i>S. saprophyticus</i> sub <i>saprophyticus</i>
13) 57 <sup>a</sup>	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
14) 59B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>
15) 66 <sup>a</sup>	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>
16) 70 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>
17) 70B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>



**Figura 18.** Confirmación por electroforesis en gel agarosa al 1% de la extracción de *ADN* de los *Staphylococcus* productores de las biopelículas

#### 4.2.1.2. Detección del gen *bap* mediante la técnica de PCR

Las 17 cepas aisladas de *Staphylococcus*, resultaron negativas al gen *bap* según la tabla 11.

**Tabla 11.** Amplificación del gen *bap* en las cepas de *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i>			Gen <i>bap</i>
1.	M	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
2.	N	<i>S. lugdunensis</i>	-
3.	O	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
4.	P	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
5.	G	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
6.	U	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
7.	41B	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
8.	42D	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
9.	42F	<i>S. haemolyticus</i>	-
10.	44	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
11.	46E	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
12.	46G	<i>S. saprophyticus</i> sub <i>saprophyticus</i>	-
13.	57 <sup>a</sup>	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
14.	59B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	-
15.	66 <sup>a</sup>	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
16.	70 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
17.	70B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	-

Con los resultados se muestra que no se obtuvo el tamaño de banda esperado para el gen *bap* (970 pb) en ninguna de las 17 cepas de *Staphylococcus*. Debido a que, la formación de las biopelículas es un proceso complejo que involucra a varios genes así, como diversas proteínas que modulan el control sobre la formación de las biopelículas y una de las más importantes asociadas con la formación de las biopelículas compuestas por los *Staphylococcus ssp* es la proteína *bap* (Cucarella et al., 2001).

Por otra parte, en la matriz de la biopelícula se encuentran diversos elementos que coordinan y regulan la síntesis de una proteína larga como la *bap* (Trotonda et al., 2005). Aunque, también depende de las condiciones ambientales (Tormo et al., 2005).

Sin embargo, el gen *bap* casi no ha sido encontrado en cepas aisladas de estafilococos provenientes de humanos lo cual, llevó a algunos autores a sugerir que no todas las cepas aisladas de estafilococos atacan de la misma forma a las superficies ya que, tienen estrategias específicas (Latasa et al., 2006). Y aunque, se ha encontrado existencia de la presencia del gen *bap* en estafilococos de humanos, tal hallazgo no significa que el gen siempre se ha expresado. Por lo tanto, deben de realizarse más experimentos para investigar si la proteína *bap* es realmente funcional e importante en estos microorganismos en la formación de una biopelícula (Potter et al., 2009).

Aunque por otra parte, en la actualidad se requiere la identificación de otros genes esenciales implicados en el proceso de formación o mantenimiento de una biopelícula (Lasa et al., 2005). Ya que, el proceso de la formación de la biopelícula es muy complejo no solo depende de bases genéticas, sino también depende de factores como propiedades del sustrato además, de factores ambientales como el pH, temperatura y diferentes nutrientes (Xianming & Xinna, 2009).

#### 4.2.1.3. Detección del gen *sea* mediante la técnica de PCR

En las 17 cepas aisladas de *Staphylococcus*, no se encontró en ninguna de ellas el gen *sea* según la tabla 12.

**Tabla 12.** Amplificación del gen *sea* en las cepas de *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i>		Gen <i>sea</i>
1) M	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
2) O	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
3) P	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
4) G	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
5) U	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
6) 41B	<i>S. aureus</i> sub <i>auereus</i>	-
7) 42D	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
8) 44	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
9) 46E	<i>S. aureus</i> sub <i>auereus</i>	-
10) 57	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
11) 66	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-
12) 70 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-
13) 42F	<i>S. haemolyticus</i>	-
14) N	<i>S. lugdunensis</i>	-
15) 46G	<i>S. saprophyticus</i> sub <i>saprophyticus</i>	-
16) 59B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	-
17) 70B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	-

#### 4.2.1.3.1. Prueba de Coagulasa

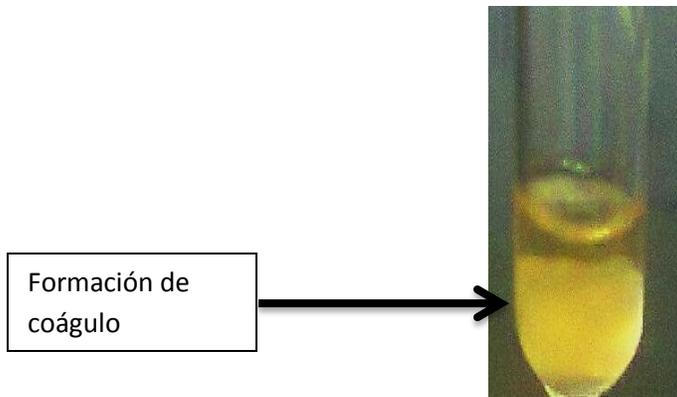
De las 17 cepas aisladas de *Staphylococcus*, 12 formaron un coágulo y 5 no lo formaron, según lo mostrado en las tablas 13 y 14.

**Tabla 13.** *Staphylococcus* coagulasa positiva

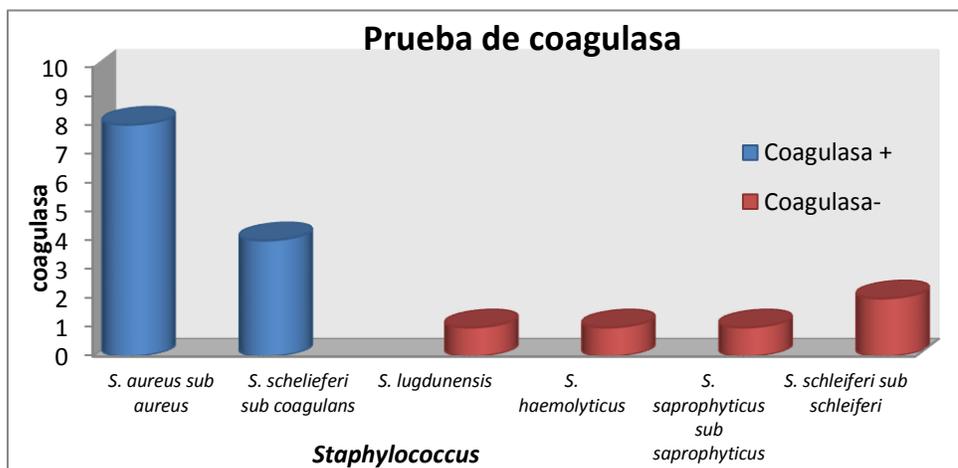
<i>Staphylococcus</i>		Coagulasa
1. M	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
2. O	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
3. P	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
4. G	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
5. U	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
6. 41B	<i>S. aureus</i> sub <i>auereus</i>	+
7. 42D	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
8. 44	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+
9. 46E	<i>S. aureus</i> sub <i>auereus</i>	+
10. 57	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
11. 66	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+
12. 70 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+

**Tabla 14.** *Staphylococcus* coagulasa negativa

<i>Staphylococcus</i>		Coagulasa
1) N	<i>S. lugdunensis</i>	-
2) 42F	<i>S. haemolyticus</i>	-
3) 46G	<i>S. saprophyticus</i> sub <i>saprophyticus</i>	-
4) 59B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	-
5) 70B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	-



**Figura 19.** Prueba de coagulasa



**Figura 20.** *Staphylococcus* coagulasa positiva y negativa

De acuerdo a los resultados mostrados, en la figura 20 se resume lo mostrado anteriormente en las tablas 13 y 14, en donde se muestra que de 12 de las 17 cepas de estafilococo resultaron coagulasa positiva como se ilustra en la figura 19 y solo 5 cepas que resultaron coagulasa negativas, esta es prueba es importante porque, en algunos laboratorios se realizan pruebas enzimáticas para detectar la producción de coagulasa como medida presuntiva detectar las cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicas (Beuchat et al., 2001).

Por lo tanto, es importante tener en cuenta que las enterotoxinas estafilocócicas son una de las principales causas de intoxicación alimentaria, por eso su detección es importante su diagnóstico así, como el rastreo de productos contaminados (Suarez et al., 2008).

Por otra parte, Boothby et al. destacaron que la producción de coagulasa representa una alternativa confiable para la identificación de *Staphylococcus aureus*, aparte de no requerir muchos recursos, ni tiempo, ni dinero para su realización, pero su correlación con la producción de enterotoxinas no siempre es posible, ya que hay cepas de *Staphylococcus aureus* no toxigénicas (Boothby et al., 2008). Sin embargo, otros autores como Jablonsky y Bohac indican que la situación se agrava con la aparición de nuevas cepas enterotoxigénicas, que son coagulasa negativas, las cuales podrían considerarse mutantes de especies de *Staphylococcus aureus* productoras de enterotoxinas (Jablonsky & Bohac, 1997).

Por lo anterior, la evaluación directa de las enterotoxinas resulta muy importante. Y por eso existen varios métodos para su detección, incluyendo diversos métodos entre ellos los inmunoenzimáticos (*ELISA*) y los de radioinmunoensayo (*RIA*), pero con sensibilidad variable. Aunque, también existe la técnica de *PCR* la cual resulta una alternativa valiosa para identificar las cepas enterotoxigénicas, ya que tiene un alto grado de especificidad y en el caso de las enterotoxinas que producen los *Staphylococcus aureus* es ampliamente utilizado (Johnson et al., 1990).

Sin embargo, después de analizar las 17 cepas de *Staphylococcus* no se obtuvo el tamaño de banda esperado (120 pb) para el gen *sea*. Aunque, en los últimos años se ha demostrado, la efectividad de una técnica como la de *PCR* para detectar diferentes enterotoxinas como la enterotoxina A. Esto es importante debido, a que la cantidad mínima para causar síntomas en un paciente es de menos de 1µg, por lo cual es importante tener un método sensible como la técnica de *PCR* (Beuchat et al., 2001).

Por otra parte, en algunos reportes se ha discutido a cerca de, si la producción de coagulasa se relaciona con los genes que codifican la enterotoxina A en cepas de *S.aureus* que es la más común implicada en la intoxicación por el consumo de alimentos contaminados (Holmberg & Blake, 1984). Ya que anteriormente, se tenía establecido que había una relación de la presencia de la enterotoxina A con la presencia de la enzima coagulasa pero, se ha propuesto que no siempre que las cepas de *Staphylococcus* que son coagulasa positivas son capaces de producir enterotoxinas A (Suarez et al., 2008). Sin embargo, esto no se demostró en el trabajo realizado. Aunque, hay otros reportes donde se

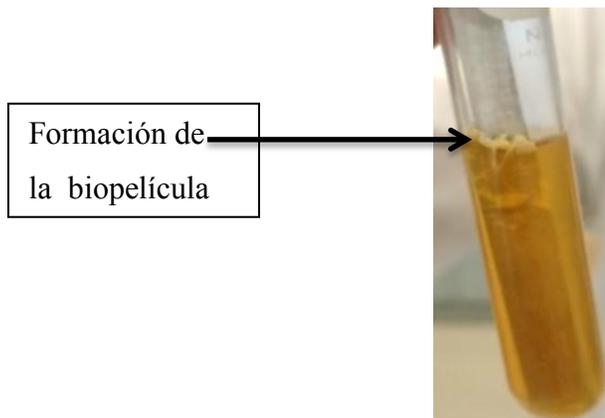
ha encontrado cepas de *S.aureus* coagulasa negativas, pero con enterotoxinas positivas (Udo et al., 1999).

Por lo tanto, es preferible utilizar el análisis directo con técnicas como la prueba de *PCR*, ya que al utilizar pruebas presuntivas o indirectas no son confiables para evidenciar si las cepas de *Staphylococcus aureus* son capaces de producir enterotoxinas o no (Suarez et al., 2008).

#### 4.3. Susceptibilidad de las biopelículas formadas *Staphylococcus* al desinfectante en placas de acero inoxidable

**Tabla 15.** Aplicación del desinfectante a 3000ppm en las cepas de *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i>		Desinfectante después de 30min	Desinfectante después de 60min
1. M	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+	+
2. O	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+	-
3. P	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+	-
4. U	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+	+
5. 41B	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	+	+
6. 44	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-	-
7. 46E	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-	-
8. 70 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> sub <i>aureus</i>	-	-
9. G	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-	-
10. 42D	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-	-
11. 57 <sup>a</sup>	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	-	-
12. 66 <sup>a</sup>	<i>S. schelieferi</i> sub <i>coagulans</i>	+	-
13. N	<i>S. lugdunensis</i>	-	-
14. 42F	<i>S. haemolyticus</i>	+	-
15. 46G	<i>S. saprophyticus</i> sub <i>saprophyticus</i>	-	-
16. 59B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	+	-
17. 70B	<i>S. schleiferi</i> sub <i>schleiferi</i>	-	-



**Figura 21.** Capacidad de las cepas de *Staphylococcus* para formar biopelículas en placas de acero inoxidable



**Figura 22.** Confirmación de la sobrevivencia de los *Staphylococcus* en Agar Chapman

De acuerdo a los resultados anteriores se muestra que de las 17 cepas de *Staphylococcus* formadoras de biopelículas solo 8 cepas de *Staphylococcus* sobrevivieron al exponerlas 30min al desinfectante como se ilustra en la figura 21. Sin embargo, Rodríguez Rodríguez muestra resultados similares ya que, demostró que no es suficiente el tiempo de exposición de 30min al mismo desinfectante y a la misma concentración para eliminar una biopelícula (Rodríguez Rodríguez, 2012).

Por otra parte, de acuerdo a los datos anteriormente mostrados en la tabla 15, se muestra que 14 de las 17 cepas de *Staphylococcus* formadoras de la biopelículas analizadas fueron sensibles a al exponerlas durante 1 hora al mismo desinfectante y a la misma concentración ya que, solo sobrevivieron 3 cepas de *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus*, esto demuestra que las bacterias con capacidad de formar una biopelícula más fuerte en las placas de acero inoxidable no son fáciles de eliminar ya que, se observó crecimiento después del contacto con el desinfectante como se muestra en la figura 22. Aunque, en otras investigaciones concuerdan con los resultados obtenidos donde se mostró que las biopelículas formadas por el *Staphylococcus aureus* en superficies de acero inoxidable también fueron resistentes a la aplicación de un desinfectante comercial (Gibson et al., 1999).

Sin embargo, de acuerdo con los datos anteriores mostrados en la tabla 15 se demuestra que algunas de las cepas de *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus* lograron sobrevivir, debido a que, los estafilococos que se encuentran dentro de una biopelícula son más resistentes porque, una biopelícula a las bacterias les provee protección contra condiciones ambientales hostiles como la aplicación de determinadas concentraciones de un desinfectante (Bernardi et al., 2007). Por lo cual, las biopelículas formadas por las bacterias son difíciles de erradicar (Lasa et al., 2005).

Por otra parte, un factor importante en formación de una biopelícula es el tiempo, ya que para la eliminación de una biopelícula más vieja se necesita un mayor tiempo de exposición a un desinfectante y por lo tanto una mayor cantidad de desinfectante como se demostró anteriormente en donde una biopelícula de 5 días ya podría considerar vieja, lo cual concuerda con otras investigaciones (Silva Meira et al., 2012).

Aunque, la situación se complica cuando se forma una biopelícula porque, esta se da cuando no hay una buena limpieza por parte del personal que manipula los equipos de acero inoxidable (Verran et al., 2008). Ya que, las superficies de los equipos usados al no ser bien limpiadas, hay una mayor posibilidad de los alimentos sean contaminados porque, en las superficies de los equipos se pueden colocan diferentes alimentos como el jamón, el pavo, la carne, el pescado y los productos derivados del mismo, la leche y los productos

lácteos, las ensaladas, las natillas, las empanadas y los aderezos de las ensaladas que han sido causa de intoxicaciones alimentarias (Frazier & Westhoff, 1993).

Por lo anterior, aumenta el riesgo de contraer enfermedades por el consumo de alimentos contaminados, cuando no se tiene cuidado en el manejo de los alimentos, lo cual indicaría fallas en la manipulación de los alimentos (ICMSF, 1982).

Por lo tanto, se recomienda tomar medidas preventivas para reducir estos problemas en medida de lo posible con la higiene del manipulador de alimentos a la hora de la preparación de los alimentos (Bathia & Zahoor , 2007).

Por lo cual, es importante el llevar a cabo programas de limpieza para evitar la formación de las biopelículas en los equipos de acero inoxidable (Xianming & Xinna, 2009).

## CONCLUSIONES

\*Se aislaron e identificaron 17 cepas de *Staphylococcus* con diferentes especies capaces de formar biopelículas.

\*Las especies de las cepas aisladas e identificadas mediante pruebas bioquímicas y tintoriales fueron: 8 cepas *S. aureus* subespecie *aureus*, 4 *S. schelieferi* subespecie *coagulans*, 2 *S. schleiferi* subespecie *schleiferi*, 1 *S. lugdunensis*, 1 *S. haemolyticus* y 1 *S. saprophyticus* subespecie *saprophyticus*.

\*Se confirmó la capacidad de los estafilococos de producir biopelículas mediante la técnica de cristal violeta y microscopía electrónica de barrido.

\*No se detectó la presencia del gen *bap* en ninguna de las 17 cepas de *Staphylococcus* capaces de formar biopelículas.

\*El gen *sea* tampoco fue encontrado en ninguna de las 17 cepas de *Staphylococcus* capaces de formar biopelículas.

\*Aunque, no se detectó el gen *bap* en las 17 cepas de *Staphylococcus* todas formaron biopelículas, lo cual parece indicar que la formación de la biopelícula no depende de la presencia de este gen. Sin embargo, algunos autores han reportado que este gen se ha relacionado en los inicios de su formación.

## RECOMENDACIONES

\*Debido a que la formación de la biopelícula tiene una regulación genética compleja sería conveniente profundizar en el estudio de otros genes a parte del gen *bap*.

\*Se sugiere trabajar con otros genes diferentes del gen *sea* enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* como *seb*, *sec*, *sed* y *see* porque, a la fecha se han reportado nuevos casos de intoxicaciones provocadas por alimentos contaminados y que además, pueden ser capaces de formar biopelículas.

\*Se recomienda seguir con el estudio de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas a partir de alimentos, ya que posiblemente sea más fácil encontrar enterotoxinas en alimentos que en las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altboum , Z., Hertman , I., & Sarid , S. (1985). Penicillinase plasmid linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*(47), 514-521.
- Álvarez Manrique, C. I., & Mendoza Elvira, S. E. (2005). *Manual básico de bacteriología*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Pietro , S., Montanaro, L., & Costerton, W. J. (2012). Review biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular. *Biomaterials*(33), 5967-5982.
- Argudín, Á. M., Mendoza, M. C., & Rodicio, R. M. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*(2), 1751-1773.
- Atanassova , V., Meindl , A., & Ring, C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham: a comparison of classical culturing detection and *RFLP-PCR*. *International Journal of Food Microbiology*(68), 105-113.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*(87), 239-250.
- Bailón Lira, L., Meléndez González, C. R., & Sandoval Cervantes, A. (2003). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Balan , N., & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*(61), 1-10.

- Barkay, T., & Schaefer, J. (2001). Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*(4), 23-318.
- Bathia, A., & Zahoor, S. (2007). *Staphylococcus aureus* enterotoxins:review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*(3), 188-197.
- Bayles, K., & Iandolo, J. (1989). Genetic and molecular analysis of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *Journal Bacteriology*(171), 4799-4806.
- Bean, N., Goulding, J., Lao, C., & Angulo, F. (1996). Surveillance for foodborne disease outbreaks. *MMWR Surveill Summ*(45), 1-66.
- Bergdoll, M. S., Borga, C. R., & Avena, R. M. (1965). Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *Journal Bacteriology*(90), 1481-1485.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2001). New York: Springer-Verlag.
- Bernardi, A., Pizzolitto, E., & Pizzolitto, A. (2007). Detection of slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from central venous catheter. *Revista de Ciencia Farmaceutica Aplicada*(28), 57-66.
- Betley, M., & Mekalanos, J. (1988). Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *Journal Bacteriology*(170), 34-41.
- Betley, M., & Mekalanos, J. (1985). Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*(229), 185-187.
- Beuchat, L., Doyle, M., & Montville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos*. España: Acribia.
- Bihac, G., Staujacher, C., Ohlendorf, D., Chi, Y., Vath, G., & Schlievert, P. (1996). The staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin family. *Advanced Experimental Medicine Biology*(391), 131-154.
- Blasser, B. L. (1999). How bacteria talk to each other:regulation of gene expression by *quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*(2), 7-582.

- Bohach, G., & Schlievert, P. (1987). Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 and relatedness to other pyrogenic toxins. *Molecular Genetics and Genomics*(209), 15-20.
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology*(9), 449-455.
- Boles, B., & Horswill, A. (2008). *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Plos Pathogens*(4), 1-10.
- Bonneville , M., Bes, M., Jarraud, S., Peyrat, M., Lim, A., F, V., y otros. (2001). *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *Journal Immunology*(166), 669-677.
- Boothby, J., Geniceorgis, C., & Fanelli, M. (1998). Tandem coagulase/thermonuclease agar method for detection of *S.aureus*. *Applied Environ Microbiology*(37), 298-232.
- Borst, D. (1994). Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with sea allele class. *Infection and Immunity*(62), 113-118.
- Brizzio, A. (2009). *Aplicación de una PCR múltiple para la identificación de cepas de Staphylococcus aureus toxigénicas*. Universidad Nacional de San Martín, Tesis de Maestría en Microbiología Molecular, Argentina.
- Bryers, J. D. (1987). Biologically active surfaces: processes governing the formation and presence of biofilms. *Biochemistry Progress*(2), 57-68.
- Buzby , J. C., & Roberts, T. (1997). Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World Health Stat Q*(50), 57-66.
- Chang , H., & Bergdoll, M. (1979). Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry*(18), 1937-1942.
- Characklis, W., & Marshal, K. (1990). Biofilms. *New York:John Wiley and Sons*, 341-394.
- Chen, L.-C., Chen Wen-Dee, C., Chen Hui-Hang, H., Shih-Bin, L., Chen, W.-J., & Yao-Wen, C.-J. (2012a). Influence de alinine uptake on *S.aureus* surface charge and its

- susceptibility to two cationic antibacterial agents, nisin and low molecular weight chitosan. *Food Chemistry*, 135, 2397-2403.
- Chen, P., Abercrombie, J. J., Jeffrey, N., & Leung, K. (2012b). An improved medium for growing *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*(90), 115–118.
- Costerton, J., Stewart, P., & Greenberg, E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*(284), 1318-22.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., & Lappin-Scott, H. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology*(49), 711–745.
- Couch, J. L., & Betley, M. J. (1989). Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggest that intergenic recombination cause antigenic variation. *Journal Bacteriology*(171), 4507-4510.
- Couch, J., Soltis, M., & Betley, M. (1988). Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *Journal Bacteriology*(170), 2954-2960.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., & Lasa, I. (2001). *Bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal Bacteriology*(83), 2888-2896.
- Curtin, J. C. M., Fleming, G., Keelehan, J., & Colleran, E. (2003). Linezolid compared with eperzolid, vancomycin, and gentamicin in an in vitro model of antimicrobial lock therapy for *Staphylococcus epidermidis* central venous catheter-related biofilm infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*(47), 3145-3148.
- Czop, J., Gould, S., & Bergdoll, M. (1974). Enterotoxin synthesis by the staphylococci. *Annual New York Academic SCI*(236), 307-316.
- Dalton, H., & March, P. (1998). Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology*(9), 5-252.

- De Carvalho, C. C. (2007). Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Patents on Biotechnology*(1), 49-57.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion :seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*(15), 66-155.
- Elliott, T. (1999). Can antimicrobial central venous catheters prevent associated infection. *Journal Haematology*(107), 235-241.
- Fitzgerald, J., Monday, S., Foster, T., Bohach, G., Hartigan, P., Meaney, W., y otros. (2001). Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *Journal Bacteriology*(183), 63-70.
- Frazier, W. C., & Westhoff, D. C. (1993). *Microbiología de los alimentos* (4 ed.). Zaragoza: Acribia.
- Fueyo Mendoza, J. (2008). *Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en Staphylococcus aureus de diferentes orígenes: tipos y relaciones*. Universidad de Oviedo, Tesis Doctoral, España.
- Gallardo Moreno, A. M., Gonzalez Martín, M. L., & Perez Girarldo, C. (2002). The measure temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *Journal of Colloid and Interface Science*(271), 8-351.
- Gallardo González, S., Venegas Ruíz, M. R., & Baumgarten Hernández, M. E. (2003). *Guía practica para principiantes en técnicas de preparación de muestras para microscopía electrónica*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Garret, R. T., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress In Natural Science*(18), 1049-1056.

- Gibson , H., Taylor, J., Hall, K., & Holah, J. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*(87), 41-44.
- Gotz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*(43), 1367-1378.
- Gunduz, G. T., & Tuncel, G. (2006). Biofilm formation in a ice cream plant . *Antonie Van Leewenhoek*(89), 329-336.
- Guobjornsdottir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. (2005). Microbial adhsion to processing lines for fish and cooked shrimp:influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotecnology*(43), 55-61.
- Herald , P. J., & Zottola, E. A. (1998). Scanning electron microscopic examination of *Yersinian enterolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH value. *Journal of Food Science*(51), 445-448.
- Hernández, B. J., & Novales., G. M. (2007). Biofilm:¿amenaza latente o factor de protección? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*(1), 22-28.
- Herrera J.J.R., Cabo M.L., González A. , Pastoriza L, & Pazos I. (2007). Adhesion y detachment kinetics of several strain of *S.aureus* subsp. *aureus* under three diferent experimental conditions. *Food Microbiology*(24), 585-591.
- Holmberg, S., & Blake, P. (1984). Staphylococcal food poisoning in the United States. *Journal JAMA*(251), 487-489.
- Hovde, C., Hackett, S., & Bohach, G. (1990). Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Molecular and General Genetics MGG*(220), 329-333.
- Huang, I. Y., Hughes, J. L., Bergdoll, M. S., & Schantz, E. J. (1987). Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. *Journal Biology Chemical*(262), 7006-7013.

- ICMSF. (1982). *Microorganisms in Foods 1*. Their significance and methods of enumeration.
- Izano, E. a. (2008). Differential roles of *poly-N-acetylglucosamine* surface polysaccharide and extracellular *DNA* in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*(18 ), 470–476.
- Jablonsky, L., & Bohac, G. (1997). *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*(6), 353-376.
- Johns , J. M., & Kahn , S. (1988). Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *Journal Bacteriology*(170), 4033-4039.
- Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R., & Rozee , K. R. (1990). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*(3), 426-430.
- Kaplan, J. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous *B hexosaminidase*. *Journal Bacteriology*(185), 4693-4698.
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*(89), 205–218.
- Kim, T., Silva, J., Chamul, R., & Chen, T. (2000). Influence of ozone, hydrogen peroxide, or salt on microbial profile, TBARS and Color of channel Catfish filets. *Journal of Food Science*(65), 1210-1213.
- Kolter , R., Kaplan , H., & O’Toole , G. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*(54), 50-68.
- Koneman , E., Allen , S., Dowell , V., & Janda, W. (2000). *Staphylococcus en diagnóstico microbiológico* (4ª ed.). Argentina: Panamericana.

- Kusumaningrum H. D., Van Putten, M. M., Rombouts, F. M., & Beumer, R. R. (2002). Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. *Journal of Food Protection*(65), 61–65.
- Lasa, I., & Penadés, J. R. (2006). *Bap*: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*(157), 99–107.
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., Valle, J., García, B., Latasa, C., Vergara, M., y otros. (2005). Análisis genético del proceso de formación de biofilms en *Staphylococcus aureus*: identificación de nuevas dianas para el tratamiento de infecciones persistentes sobre implantes. *Análisis de Sistemas Sanitarios Navar*(28), 141-142.
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2006). Biofilm associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*(11), 849-857.
- Lee, W., Sakai, T., Lee, M., Hamakawa, M., Lee, S., & Lee, I. (1996). An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan. *International Journal Food Microbiology*(29), 141-148.
- Legeay, G., Poncin-Epaillard , F., & Arciola , C. (2006). New surfaces with hydrophilic/ hydrophobic characteristics in relation to (no)bioadhesion. *International Journal Artif Organs*(29), 61-453.
- Li, L., Dai-cheng, L., Hong-bin, H., Chang-fa , W., Ji-feng , Z., & Hong-jun, Y. (2012). Analysis of biofilm formation and associated gene detection in *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis. *African Journal of Biotechnology*(8), 2113-2118.
- Li, Y., Zeng, Y., & Yun, H. (2003). Evaluation of gas chromatography-mass spectrometry in conjunction with chemometric resolution for identification of nitrogen compounds in crude oil. *Talanta*(61), 6-71.
- López, C., Feltri, A., Leotta, G., González, G., Manfredi, E., Gottardi, G., y otros. (2008). Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Revista Argentina de Microbiología*(40), 198-203.

- Lowy, F. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal Medicine*(339), 520-532.
- Lui, Y., Yang , S., & Xu, H. (2004). The influence of cells and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal Biotechnology*(110), 6-251.
- Mac Faddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana.
- Mairon-Ferey, K., Pasmore, M., & Stoodley , P. (2002). Biofilm removal from silicone tubing:an assesment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *Journal of Hospital Infection*(53), 64-71.
- Mandell , G., Bennett , J., & Dolin , R. (2000). *Staphylococcus*, in *Principles and practice of infectious diseases* (5<sup>a</sup> ed.). España: El Sevier.
- Manfredi , E., Leotta , G., & Rivas , M. (2010). PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Revista Argentina de Microbiología*(42), 212-5.
- Mann, E. (2009). Modulation of *DNA* release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Plos One*(5822), 1-12.
- Marr, J., Lyon, J., Roberson, J., Lupher, M., Davis , W., & Bohach, G. (1993). Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infection and Immunity*(61), 4254-4262.
- Marti, M. (2010). Extracellular proteases inhibit proteindependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect*(12), 55–64.
- Midelet, G., & Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*(97), 262-270.

- Modi, N., Rose , S., & Tanner , H. (1990). The effects of irradiation and temperature on immunological activity of staphylococcal enterotoxin A. *International Journal Food of Microbiology*(11), 85-92.
- Munson , S., Tremaine , M., Betley , M., & Welch , R. (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*(66), 3337-3348.
- Nazar, C. (2007). Bacterial biofilms. *Revista de Otorrinolaringología Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67(1), 61-72.
- Nickerson, J. T., & Sinskey, A. J. (1972). *Traducción por el doctor Iguacel Tormo, Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración*. (J. Iguacel Tormo, Trad.) España: American El Sevier Publising.
- Nisbet, B. A., Sutherland, I. W., & Bradshaw, I. J. (1984). A new gel forming bacterial polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*(4), 94-377.
- Novick, R., Schlievert, P., Orwin , P., Leung , D., & Donahue , H. (2001). Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infection and Immunity*(69), 360-366.
- O'Neill, E. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from devicerelated infections. *Journal of Clinical Microbiology*(45), 1379–1388.
- O’Gara J, H. H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology*(50), 582-587.
- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and *beyond*: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*(270), 179–188.
- Oliveira , R., Melo, L., & Oliveira, A. (1994). Polysaccharases production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. *Colloids and Surfaces* (2), 6-41.

- Otto, M. (2008). *Staphylococcal* biofilms. *Currents Topics in Microbiology and Immunology*(322), 207–228.
- Pascual , A. (2002). Pathogenesis of catheter related infections: lessons for new designs. *Clinical Microbiology and Infection*(8), 256-264.
- Pascual Anderson, M. d., & Calderon Pascua, V. (2000). *Microbiología alimentaria metodología analítica para alimentos y bebidas* (2nd ed.). Madrid, España: Díaz de Santos.
- Pastoriza L., Cabo M.L., Bernárdez M., Herrera J.R., & Sampedro G. (2002). Combined effects of modified atmosphere packaging and lauric acid on the stability of pre-cooked fish products during refrigerated storage. *European Food Research and Technology*(215), 189-193.
- Patti , J., Allen, B., McGavin , M., & Höök, M. (1994). *MSCRAMM*-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology*(48), 585-617.
- Peng, J., Tsai, W., & Chou, C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal Food of Microbiology*(77), 8-11.
- Podbielski, A., & Bernd, K. (2004). Cell density — dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *International Journal of Infectious Diseases*(8), 81—95.
- Potter, A., Ceotto, H., Giambiargi-deMarval, M., Netto dos Santos, R. K., Nes, F. I., & Bastos Freire, C. d. (2009). The gen *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus ssp.*strains form nosocomial infections. *Journal of Microbiology*(47), 319-326.
- Poutou, R., Burbano, M., Sierra, S., Torres, K., Carrascal, A. K., & Mercado, M. (2005). Estandarización de la extracción de *ADN* y validación de la *PCR* múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Revista de la Facultad de Ciencias*(2), 61-78.

- Prattena, J., Foster, S. J., Chan, P. F., Wilson, M., & Nairb, S. P. (2001). *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes and Infection*(3), 633–637.
- Ramasubbu, N. e. (2005). Structural analysis of *dispersin B*, a biofilm releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal Molecular Biology*(349), 475–486.
- Rideout, K., Teschke, K., Dimich-Ward, H., & Kennedy, S. (2005). Considering risks to healthcare workers from glutaraldehyde alternatives in high-level disinfection. *The Journal of Hospital Infection*(59), 4-11.
- Robbins, J. B., Fisher, C., Moltz, A., & Martin, S. (2005). Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*(68), 494-498.
- Rodríguez Rodríguez, E. (2012). *Evaluar la capacidad de un sanitizante cítrico para remover biopelículas y/o reducir la carga microbiana en equipos de acero inoxidable en un taller de cárnicos*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Salgado , C., Calfee, D., & Farr, B. (2003). Intervention to prevent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* transmittion in health care facilities:what words. *Clinical Microbiology Newslett*(25), 44-137.
- Schad, E. M., Zaitseva, I., Zaitsev, V. N., Dohlsten, M., & Kalland , T. (1995). Crystal structure of superantigen staphylococcal enterotoxin type A. *The EMBO Journal*(14), 3292-3301.
- Schlievert, P., & Bohach, G. (1989). Conservation of the biological active portions of staphylococcal enterotoxin C1 and C2. *Infection and Immunity*(57), 2249-2252.
- Sekoulov, I., & Brinke Seiferth, S. (1999). Application of biofiltration in the crude oil processing industry. *Water Science and Technology*(34), 6-71.

- Shafer , W., & Iandolo, J. (1978). Chromosomal *locus* for staphylococcal enterotoxin B. *Infection and Immunity*(20), 273-278.
- Shalita , Z., Hertman , I., & Sand , S. (1977). Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *Journal Bacteriology*(129), 317-325.
- Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/diary processing industry a case. *Food Control*(13), 469-477.
- Shikongo Nambabi, M. (2011). Control of bacterial contamination during marine fish processing. *Journal of Biology*(3), 215-220.
- Silva Meira da Gramile Quênia, Medeiros Barbosa de Isabella, Aguiar Athayde Alves Júlia Ana, Siqueira-Júnior de Pinto José , & Leite de Souza Evandro. (2012). Influence of the temperature and surface kind of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*(25), 469-475.
- Simões, M., Pereira, M., & Vieira, M. (2005). Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Research*(39), 5142-5152.
- Sivila, S. (2000). Ministerio de Salud, Argentina. Argentina: Manual de Normas y Procedimientos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- Soriano, J., Font , G., Molto, J., & Males , J. (2002). Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends in Food Science and Technology*(13), 60-67.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza , G., & Di Poto , A. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiology*(4), 1337-52.
- Su , Y., & Wong , A. (1996). Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme linked immunosorbent assay. *Journal Food Protection*(59), 327-330.

- Su, Y., & Wong, A. (1995). Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*(61), 1438-1443.
- Suarez, M. J., Arias, L. M., & Gamboa, M. (2008). Detección de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su correlación con las pruebas de coagulasa y termonucleasa. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*(58), 1-8.
- Sutherland, I. W. (1999). Polysaccharides for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*(38), 28-319.
- Suzuki, T., Itakuura, J., Watanabe, M., Ohta, M., & Sato, Y. (2002). Inactivation of staphylococcal enterotoxin A with an electrolyzed anodic solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (50), 230-234.
- Tone Mari, R., Solveig, L., Askild, H., & Trond, M. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*(116), 372–383.
- Tormo, M., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I., & Penades, J. (2005). *Bap*-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer. *Microbiology*(151), 2465-2475.
- Trotonda, M. P., Marti, M., Valle, J., Manna, A. C., Cheung, A. L., Lasa, I., y otros. (2005). *SarA* positively controls *Bap*-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Journal Bacteriology*(187), 5790-5798.
- Udo, E., Al Bustan, M., Jacoboc, L., & Chugh, T. (1999). Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci in a restaurant workers from Kuwait city may be potential cause of food poisoning. *Journal Medical Microbiology*(48), 819-823.
- Verran, J., Airey, P., Packer, A., & Whitehead, K. A. (2008). Microbial Retention on Open Food Contact Surfaces and Implications for Food Contamination. *Advances in Applied Microbiology*(64), 223-241.

- Verran, J., Rowe , D. L., Cole, D., & Boyd , R. D. (2000). The use of the atomic forcé microscope to visualise and measure wear of food contact surfaces. *International Biodeterioration & Biodegradation*(46), 99–105.
- Villanin Simonnet, A., Milas , M., & Rinaundo, M. A. (2000). New bacterial exopolysaccharide. *Influence of Thermal Treatments on the Confirmation and Structure*(27), 77-87.
- Williams, J., Rafalski, J., Tingey, S., Livak, K., & Kubelin, A. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*(18), 6531-6535.
- Xianming, S., & Xinna, Z. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*(20), 407-413.
- Yarwood, J. (2004). *Quorum sensing in Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal Bacteriology*(186), 1838–1850.
- Zhang , S., Iandolo , J., & Stewart , G. (1998). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiology Letters*(168), 227-233.