

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INFORME FINAL DEL PROYECTO
DE RESIDENCIA PROFESIONAL

Proyecto

“Caracterización de factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* y la expresión del gen *icaADBC* que regula la formación de biofilm en superficies inertes”

Especialidad

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Autor

PÉREZ NÁJERA VIRIDIANA CANDELARIA

No. De control

06270233

Asesor Interno

QBP. Aura Flores Pérez

Asesor externo

Dr. Juan José Varela Hernández

Revisores

Dra. Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe

Dr. Reiner Rincón Rosales

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a; Julio del 2011

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. JUSTIFICACIÓN	6
3. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos particulares	7
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA	8
5. PROBLEMAS A RESOLVER	9
6. ALCANCES Y LIMITACIONES	10
7. FUNDAMENTO TEÓRICO	11
7.1 La industria láctea y las queserías en México	12
7.1.1 La industria láctea en Jalisco.....	12
7.2 Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	14
7.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
7.4 Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	15
7.4.1 Enterotoxinas.....	16
7.4.2 Formación de biofilm	16
7.4.3 Regulación de la adherencia y relación con la virulencia.....	18
7.5 Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
7.6 Detección de cepas productoras de biofilm.....	20
7.6.1 Determinación fenotípica para la formación de biofilm.....	21
7.6.2 Método del tubo para detectar la adherencia de <i>S. aureus</i> (Christensen).....	23
7.6.3 Cuantificación de la biopelícula en ensayos de poliestireno	24
7.6.4 Detección molecular de factores de virulencia.....	24
8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	25
8.1 Recolección de muestras	25
8.1.1 Criterios de inclusión.....	25

8.1.2 Ubicación y características	25
8.2 Calculo de tamaño de la muestra.....	27
8.3 Procedimiento.....	28
8.4 Aislamiento y cuantificación de <i>S. aureus</i>	28
8.5 Caracterización fenotípica de la producción de biopelículas	30
8.5.1 Método de cultivo en Agar Rojo Congo (CRA).....	30
8.6 Detección de factores de virulencia de <i>S. aureus</i> provenientes de superficies.....	30
8.6.1 Extracción del material genético para la identificación de enterotoxinas	31
8.6.2 Extracción del material genético para la identificación del gen <i>icaADBC</i>	31
8.6.3 Cuantificación.....	31
8.6.4 Condiciones de la PCR para la identificación de genes enterotoxigénicos	32
8.6.5 Detección del operón <i>icaADBC</i>	34
8.6.6 Electroforesis.....	34
8.6.7 Análisis de los resultados	35
9. RESULTADOS	36
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
12. ANEXOS	44
12.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa	46
12.1.1 Enzima DNA polimerasa.....	46
12.1.2 Cloruro de magnesio.....	47
12.1.3 Buffer de PCR 10 X	47
12.2 Elaboración de la mezcla de PCR.....	47
12.3 Electroforesis.....	48
12.3.1 Gel de agarosa	49
12.4 Registro de cepas positivas enterotoxigénicas.....	50
12.5 Diagramas de flujo	51

1. INTRODUCCIÓN

En México la industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de los alimentos (INEGI, 1999), actualmente existen poco mas de 1300 establecimientos que elaboran queso, sin embargo la gran mayoría son pequeñas empresas de carácter artesanal. Se comercializan 200 mil toneladas al año de quesos frescos de los cuales 60 mil toneladas, que representan el 30 %, son elaborados con materia prima sin pasteurizar y con deficiencias higiénicas (Castro y col., 2007). Entre estos últimos a veces se advierten tecnologías y condiciones muy primitivas, en donde el alimento se encuentra expuesto a una diversidad de fuentes de contaminación, con frecuente abuso de la temperatura durante el almacenamiento y comercialización (Fernández, 2000).

Una manera en la que el alimento puede contaminarse con patógenos es a través del contacto directo con equipos durante el procesamiento de alimentos. Las contaminaciones generadas por los equipos como son: bombas, tuberías, tanques generalmente son causadas por el mal lavado e higiene del equipo. El estado de conservación y limpieza de los moldes, equipo y utensilios, el control de la fauna e higiene de los trabajadores, suelen ser determinantes en la inocuidad de los quesos (Suzanne y col., 2000). El hombre y los animales son las fuentes más importantes de *Staphylococcus aureus* y el principal reservorio en el ganado bovino se localiza en los cuartos de la glándula mamaria de la vaca, y con frecuencia ocurre una transmisión horizontal de la bacteria entre el ganado durante la ordeña (Torres, 2002; López y col., 2006).

S. aureus ocupa el segundo lugar de brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) en Francia (Rosec y col., 2002). En el estado de Jalisco, hasta el 2008 se han notificado 5,800 casos de intoxicación alimentaría destacando así la importancia de este patógeno al ser uno de los cuatro agentes responsables de brotes de ETAs más importantes en nuestro país (CENAVECE EPIDEMIOLOGIA, 2008). *S. aureus* posee varios factores de virulencia asociados con la pared celular y extracelulares, los cuales contribuyen a favorecer la patogenicidad de cada cepa de esta especie (Sayed y col., 2006; Normanno y col., 2004).

La formación de biofilm es de gran preocupación en el área médica, en sistemas de distribución de agua e industrias alimentarias (Wen-Chi y col., 2009). Los biofilms están estructurados principalmente por grandes colonias de bacterias sésiles incrustadas en una

matriz polimérica extracelular o glicocálix (López y col., 2006). Las bacterias en biofilm son más resistentes a las operaciones de desinfección y terapias antimicrobianas que bacterias planctónicas haciendo que estos tratamientos sean menos efectivos o inefectivos (Wen-Chi y col., 2009). La producción de Biofilm usualmente ocurre en dos pasos, el paso inicial es la adhesión a la superficie, facilitado por polisacáridos adhesivos y/o polisacáridos con múltiples proteínas (incluyendo autolisinas) y la acumulación de células con producción de polisacárido de adhesión intercelular (PAI), sintetizado por el operón *ica*. Se han descrito varios genes relacionados con la producción de biofilm en *S. aureus*: el operón *icaADBC* y el gen *bap* (biofilm-associated proteína) (Ubeda y col., 2000).

Este trabajo trató de contribuir con información científica, estudiando a un patógeno de interés en la industria láctea: *Staphylococcus aureus*, como una fuente de contaminación en superficies inertes. Determinando genes enterotoxigénicos clásicos (A-E) y no clásicos (G-J) causantes de intoxicaciones alimentarias y la presencia del gen *icaADBC*, mediante PCR-multiplex, como productor de biofilm. Los aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente por el cultivo en Agar Rojo Congo (CRA) descrito por Freeman et al., para diferenciar la morfología de las colonias entre cepas formadoras y no-formadoras de biofilm, ya que producen colonias rugosas y lisas, respectivamente.

2. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación aporta información científica de utilidad para la industria láctea y al enfoque basado en riesgo. La FAO (Food and Agriculture Organization) recomienda que se tomen en cuenta factores de riesgo para orientar el proceso de inspección en los que se encuentran: programas de monitoreo de contaminantes, datos históricos de no cumplimiento y factores de riesgo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos.

Esto se consigue al caracterizar el comportamiento genotípico y fenotipo de *S. aureus* relacionado a la producción de enterotoxinas (SEs) y biopelículas en las superficies inertes que favorecen la contaminación directa al producto durante el proceso de elaboración. Los factores de riesgo de ETAs son de apoyo a la industria láctea para la implementación de sistemas de aseguramiento de la calidad que le permitan mantener la inocuidad de su producto disminuyendo pérdidas económicas generadas por producto contaminado, teniendo un impactando en las ETAs.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* y determinar la variabilidad en la expresión del gen *icaADBC* que regula la formación de biofilm en superficies inertes.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar cepas de *Staphylococcus aureus* de superficies inertes.
2. Caracterizar genes enterotoxigénicos (*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei* y *sej*) en cepas de *S. aureus* provenientes de superficie inertes dentro de la industria láctea.
3. Amplificar el gen *icaADBC* mediante PCR- Multiplex.
4. Determinar la frecuencia fenotípica de *S. aureus* productor de biofilm en superficies inertes seleccionadas.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA

Este proyecto de Residencia Profesional se realizó en el Centro Universitario de la Ciénega (CUCI) que se encuentra en la ciudad de Ocotlán, Jalisco siendo éste un centro universitario descentralizado de la universidad de Guadalajara. Se localiza en Carretera Ocotlán-Tototlán Km. 3.3, C.P. 47840, Apartado Postal No. 106, Ocotlán, Jalisco, México en Av. Universidad Núm. 1115, colonia linda vista.

El Centro Universitario de la Ciénega es el principal centro de estudios de la región, tiene como misión atender la demanda de servicios educativos de los siguientes municipios de Jalisco: Jamay, Ocotlán, Poncitlán, Tototlán, Zapotlán del Rey, La Barca, Atotonilco el Alto, Degollado, Ayotlán, Jocotepec, Juanacatlán, Chápala, Ixtlahuacán de los Membrillos, Tuxcueca, Tizapán El Alto y El Salto.

Ofrece 23 programas docentes, de los cuales 3 son de técnico superior universitario, 16 de licenciaturas, 3 de maestría y 1 de doctorado. La población escolar consta de 5,024 alumnos, 16 en programas de Técnico Superior, 4,930 en Licenciatura y 65 de maestría. El personal académico que atiende esta matrícula es de 412, de los cuales 149 son profesores de tiempo completo. Otros de los productos ofrecidos por el centro universitarios es sus múltiples aportaciones a la sociedad en cuanto trabajos científicos con interés en el área biomédica, agropecuaria, industrial, veterinaria y sociales.

El presente proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología, el cual se encuentra adscrito al departamento de ciencias médicas y de la vida, el cual depende de la división de desarrollo biotecnológico. Todas las actividades metodológicas utilizadas en el trabajo, tales como sembrado de microorganismos, pruebas bioquímicas, pruebas confirmatorias, extracción de ADN, cuantificación, PCR, electroforesis y análisis de resultados se desarrollaron en el laboratorio de Microbiología, con asesoría del Dr. Juan José Varela Hernández.



5. PROBLEMAS A RESOLVER

- Conocer la microbiota patógena en superficies inertes en la línea de producción de quesos como un riesgo de contaminación.
- Determinar la capacidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de superficies inertes por producir enterotoxinas clásicas y no clásicas.
- Evidenciar la expresión fenotípica del biofilm en las cepas *aureus* aisladas de superficies inertes de la industria láctea.
- Conocer la frecuencia de posesión del gen *icaADBC* en las cepas que amplificaron para enterotoxinas.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

Al terminar el proyecto de residencia profesional, se lograron aislar y caracterizar tanto bioquímica como molecularmente cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de enterotoxinas, de superficies inertes en queserías de la región Ciénega del estado de Jalisco. Posteriormente se determinaron las características fenotípicas y genotípicas de *S. aureus* productores de biopelículas, basándose en técnicas previamente estandarizadas por el doctor investigador a cargo. No se detectó el gen *ica*, esto probablemente debido a la existencia de rutas metabólicas independientes del mismo, como lo marca Pérez-Ordoyo, (2010). No se pudieron obtener datos representativos de la frecuencia fenotípica y genotípica de *S. aureus* en superficies inertes, por la falta de tiempo y confirmación por parte de las queserías a muestrear, por lo que quedó pendiente completar el tamaño de muestra calculado, así como aplicar otros métodos para identificar la formación de biofilm, las cuales serán realizados por el mismo responsable de la investigación o a quien designe. De acuerdo a lo anterior y en base a los objetivos planteados al inicio del presente trabajo, se logró cubrir satisfactoriamente el objetivo general del proyecto de residencia, ya que al ser un tema extenso se requiere de años de investigación por lo que puede ser considerado una limitante no imputable a los autores de este trabajo. El seguimiento de este proyecto contribuirá a establecer estrategias de control en las industrias lácteas, considerando un riesgo de contaminación la formación de biofilm en superficies inertes que estén en contacto con el producto.

7. FUNDAMENTO TEÓRICO

7.1 La industria láctea y las queserías en México

La industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de los alimentos en México (Castro y col., 2007), actualmente existen poco más de 1,300 establecimientos que elaboran queso, sin embargo la gran mayoría son pequeñas empresas de carácter artesanal. Se comercializan 200 mil toneladas al año de quesos frescos, de las cuales 60 mil toneladas, que representan el 30%, son elaborados con materia prima sin pasteurizar y con deficiencias higiénicas. Entre estos últimos a veces se advierten tecnologías y condiciones muy primitivas, en donde el alimento se encuentra expuesto a una diversidad de fuentes de contaminación, con frecuente abuso de la temperatura durante el almacenamiento y comercialización. Una deficiente calidad sanitaria de los alimentos se traduce en daños de variada naturaleza para las poblaciones implicadas. Los daños incluyen presentación de enfermedades transmitidas por los alimentos, gastos de atención médica, menoscabo de calidad de vida, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos, daño al turismo y causa de muerte (Fernández, 2000).

7.1.1 La industria láctea en Jalisco

En México, la producción lechera se desarrolla en todo su territorio, pero durante el periodo (1992-2001) se concentró en seis estados, los que contribuyeron conjuntamente con el 56% de la producción nacional (destacándose Jalisco, Durango y Coahuila, quienes conjuntamente participaron con el 26%) como observa en la Fig. 1. El estado de Jalisco tiene menos inventario de ganado de leche que Coahuila y Durango, sin embargo participa con el 17.8% de la producción de leche aportando un 8% más que Coahuila y Durango y 9.5% que Chihuahua (SAGARPA).

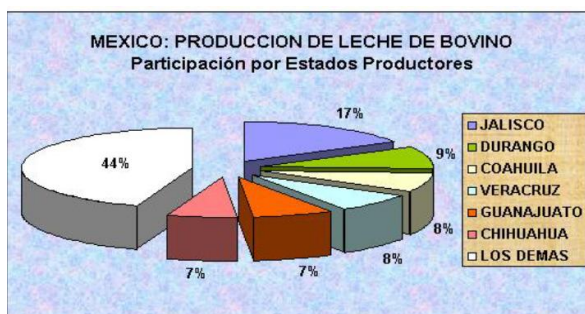


Fig. 1. Producción de leche de bovino

Las regiones del estado de Jalisco dedicadas a la producción de leche son la de los Altos y la ciénega de Chapala, mientras que las dedicadas a la producción de carne se ubican en la costa, valles y sierras del estado (Fig. 2). A nivel local el municipio de Ocotlán destaca la producción de leche (10 514.62 miles de litros) y ganado en pie bovino, sin embargo a nivel estatal ninguno de estos productos figura por su volumen de producción dentro de los 10 primeros sitios (OEIDRUS, 2006). En el cuadro 1 se describe el sistema de producción de leche en las diferentes regiones del estado de Jalisco.

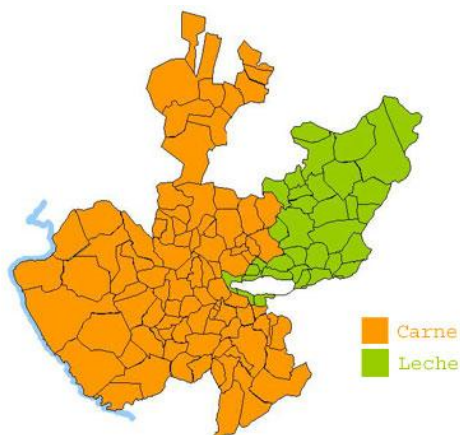


Fig. 2. Producción de Leche y Carne en Jalisco

Cuadro 1. Caracterización del sistema de producción de la leche en el estado de Jalisco

Región	Tipo de ganado	Producción (L) de leche en 24 h	Manejo NRS	Tamaño del Hato	Tipo de ordeña
Centro	Holstein 100 %	15 L	10 % técnico 90 % empírico	15 u/p	3 % manual 97 % mecánico
Altos	Holstein 80 % 20 % doble propósito	8 L	Extensión con suplementación de carne (pastoreo) y empírico	40 u/p	80 % manual 20 % mecánico
Ciénega	Holstein 100 %	16 L	20 % estabulado 80 % semiestabulado estacional 90% empírico 10 % asesoría	25 u/p	35 % manual 65 % mecánico

7.2 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) es un gran y extenso problema de salud pública en países desarrollados y en desarrollo. Las ETA crean una enorme carga social y económica sobre las comunidades y sus sistemas de salud. En los Estados Unidos las enfermedades causadas por patógenos se estimaron un costo de US \$35 billones anualmente (1997) en gastos médicos y pérdida de la productividad. La incidencia global de ETA es difícil de estimar, pero se ha estimado que en el 2005 cerca de 1.8 millones de personas murieron por enfermedades diarreicas. Una gran porción de estos casos pudieron ser atribuidos a alimentos y agua para beber contaminada. En los países industrializados, el porcentaje de la población que sufre enfermedades asociadas a los alimentos en los últimos años es de un 30% (WHO, 2007). En los Estados Unidos el 60% de las personas hospitalizadas por infecciones bacterianas son asociados a los alimentos y el 67% del estimado de muertes asociadas a los alimentos (FDA, 1997).

En América latina y el Caribe se produjeron entre 1993 y el 2002 un total de 6,476 brotes de ETAs, que provocaron 231,888 casos y 318 muertes (PANALIMENTOS, 2003). En México entre 1997 y 1999 se registraron un poco más de 200 defunciones debidas a intoxicaciones alimentarias (OPS, 2000) y según el sistema nacional de epidemiología se estimó que en el 2005 se tuvieron un total de 40,599 casos de intoxicaciones alimentarias bacterianas, siendo más frecuentes en los meses calientes (mayo-septiembre) con un promedio de 4,000 casos por mes (SSA, 2005). La participación de *S. aureus* ocupa el segundo lugar como causa de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Francia, después de *Salmonella* y de forma similar a *Clostridium perfringens* (Rosec y col., 2002). En el estado de Jalisco, hasta el 2008 se notificaron 5,800 casos de intoxicación alimentaria destacando así la importancia de este patógeno al ser uno de los cuatro agentes más importantes responsables de brotes de ETA (CENA VECE EPIDEMIOLOGIA, 2008).

7.3 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* pertenece al Phylum 2 del Dominio Bacteria, Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales* y Familia *Staphylococcaceae*. Son bacterias Gram positivas, no esporuladas, con bajo contenido G+C (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). Tienen forma de cocos, de tamaño 0.8-1 μm de diámetro, y una presentación característica en agrupaciones irregulares semejantes a racimos de uvas debido a su capacidad de dividirse en tres planos (Figura 3). Son bacterias aerobias o anaerobias facultativas y son siempre inmóviles. El género incluye 19 especies, de las que algunas son patógenos oportunistas para el hombre y animales. De estas especies, *Staphylococcus aureus* es la causa principal de intoxicaciones alimentarias en el hombre así como de algunas infecciones extraintestinales (Torres, 2006).

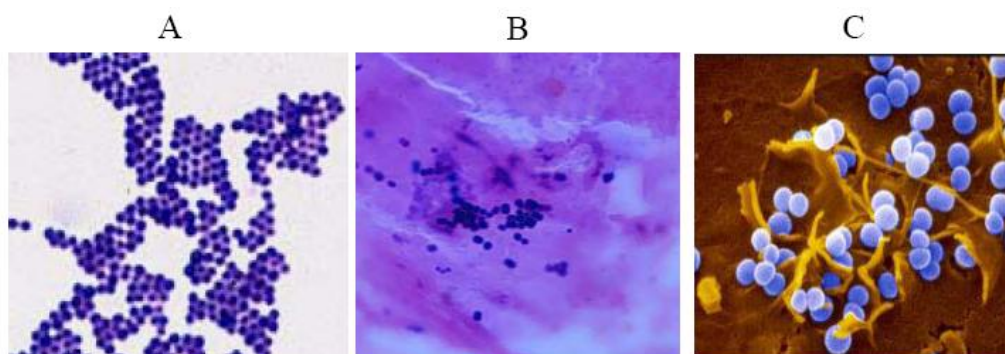


Figura 3. Morfología de *Staphylococcus aureus*. A: cultivo puro; B y C: exudados nasales. A y B, tinciones Gram que muestran las formas cocáceas agrupadas en racimos y de color violeta debido a la retención del colorante primario (cristal violeta). C, microfotografía electrónica de barrido (Fueyo, 2005).

Si las cepas de *Staphylococcus* infectivas son enterotoxigénicas y pasan a la leche, ésta y los alimentos lácteos derivados se pueden convertir en una posible fuente de intoxicación alimentaria. Una manera en la que los quesos pueden contaminarse es a través del contacto directo con equipos durante su procesamiento. La contaminación generada por los equipos como bombas, tuberías, y tanques generalmente es causada por deficiencias en el lavado e higienización del equipo. El estado de conservación y limpieza de los moldes, equipo y utensilios, el control de la fauna e higiene de los trabajadores, suelen ser determinantes en la inocuidad de los quesos (Suzanne y col., 2000; Torres, 2006). El hombre y los animales son las fuentes más importantes de *S. aureus* y el principal reservorio en el ganado bovino se localiza en los cuartos de la glándula mamaria de la vaca, y con frecuencia ocurre una

transmisión horizontal de la bacteria entre el ganado durante la ordeña (Torres, 2002; López y col., 2006).

7.4 Factores de virulencia de *S. aureus*

Staphylococcus aureus posee varios factores de virulencia asociados con la pared celular y extracelulares, los cuales contribuyen a favorecer la patogenicidad de cada cepa de esta especie, los cuales se ejemplifican en el cuadro 2. Los factores de virulencia asociados con la pared celular incluyen los receptores de superficie con propiedades enlazantes para inmunoglobulinas, fibrinógeno, fibronectina, colágeno y otras proteínas externas.

La proteínas extracelulares secretadas por *S. aureus* comprenden, entre otras, la variedad de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) de la A a la Q, las toxinas exfoliativas A (ETA) y B (ETB), la toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) anteriormente designada como SEF y una exotoxina similar nueva en el grupo; estas dos últimas no implicadas en intoxicaciones alimentarias (Sayed y col., 2006).

Cuadro 2. Determinantes de patogenicidad o factores de virulencia de *S. aureus* (Fueyo, 2005).

Determinante	Función
componente de la pared celular	
Peptidoglicano	activación del complemento, otras
Ácidos teicoicos	Antifagocitaria
Proteína A	Antifagocitaria
Adhesinas	adherencia a células-hospedador, colonización
Capsula mucoide y micocápsulas	adherencia y antifagocitario
enzimas	
Coagulasa	formación de abscesos
Estafiloquinasas	destrucción de coágulos
Hialuronidasa	invasión hística
Catalasa	supervivencia en fagocitos
Lipasas	Invasión-colonización
Termonucleasas	hidrólisis del AND
toxinas	
Hemolisinas	Rotura de membranas celulares
Leucocidinas	alteración de la permeabilidad celular
Toxinas exfoliativas	Epidermólisis
Toxina TSST-1	Shock tóxico
Enterotoxinas	Intoxicación alimentaria
Bacteriocinas	Matar a otras bacterias

7.4.1 Enterotoxinas

Uno de los principales factores de virulencia de *S. aureus* son las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), éstas se consideran como exotoxinas bacterianas, son proteínas de cadena simple de aminoácidos, tienen un peso molecular aproximado de 27 000 a 30 000 daltones, un punto isoelectrico de 7.0 a 8.6 y presentan un pico de máxima absorción a 277 nm. Son resistentes a algunas enzimas proteolíticas y son relativamente estables al calor (Torres, 2006).

Han sido reportados nueve tipos de SEs comprendiendo: cinco clásicas (SEA, SEB, SEC, SED y SEE) y cuatro recientemente descritas (SEG, SEH, SEI y SEJ) llamadas no clásicas. La enterotoxina C está dividida en tres subclases (C₁, C₂ y C₃) basadas en sus puntos isoelectricos. La SE del serotipo A es la que con más frecuencia aparece en los brotes de intoxicación alimentaria y le siguen en orden decreciente las de los serotipos C₁, B, D y E (Rosec, 2002).

La producción de enterotoxinas por cepas de *S. aureus* se ve afectada por la calidad de los nutrientes y el pH del sustrato, la temperatura, la atmósfera, el NaCl, entre otros factores (Pérez-Ordoyo, 2010).

7.4.2 Formación de biofilm

Las bacterias que forman biopelículas son más resistentes a las operaciones de desinfección y terapias antimicrobianas que bacterias planctónicas, haciendo que estos tratamientos sean menos efectivos o inefectivos (Wen-Chi y col., 2009). Se postula que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biopelículas, y tan sólo el 1% viven en estado planctónico (Nazar, 2007).

La biopelícula o biofilm es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y envueltos por una matriz, compuestos por moléculas sintetizadas por el propio microorganismo y otras procedentes del huésped, que conforman una estructura tridimensional con una organización espacial compleja. Podemos distinguir tres pasos en su formación: *a*) adherencia del microorganismo a la superficie; *b*) producción de la matriz extracelular, y *c*) desprendimiento de parte de la biocapa al medio. Las células bacterianas, que componen el 15 – 20 % del volumen, no se dividen al interior de las biopelículas, lo cual podría atribuirse al hecho de adoptar un fenotipo alterado, diferente al de las mismas bacterias

en estado planctónico (Nazar, 2007). Se han descrito varios genes relacionados con la producción de biopelículas en *S. aureus* entre los cuales se encuentran el operon *icaADBC* y *bap* (biofilm-associated proteína) (Ubeda y col., 2002).

Hoy día se conoce que la biopelícula está constituido por dos fracciones polisacáridas, y se denomina polisacárido de adhesión intercelular (PIA). Se ha de mostrado que el PIA puede desempeñar un papel importante en la adherencia de la bacteria al material inerte (Vila y col., 2008).

El biofilm protege a las bacterias de los mecanismos de defensa del hospedador, de la actividad antimicrobiana y de las condiciones adversas. La resistencia frente a los antimicrobianos está relacionada con la dificultad del antibiótico para difundir a través del biofilm, con la baja actividad metabólica de las bacterias en las capas inferiores y con los cambios fisiológicos en el modo de crecimiento, incluyendo la presencia de células "persistentes" en las que la muerte celular programada está inactiva (Oliveira et al., 2006).

Sin embargo, hay también muchos factores ambientales que influyen en la formación de biofilm, siendo desencadenantes exógenos conocidos la salinidad, un exceso de glucosa, la limitación de oxígeno, la depleción de hierro, los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} , el EDTA, el pH interno, las concentraciones de CO_2 , la osmolaridad y varios tipos de estrés como el calor y el etanol (Oliveira et al., 2006; Tu Quoc et al., 2007). Incluso se ha demostrado recientemente que el estrés del ciclo del ácido tricarbóxico induce la formación de PIA y promueve la formación de biofilm, lo que sugiere que pueden detectarse determinadas señales metabólicas endógenas y regular la formación de biofilm. Quedan aún por ser investigados los sistemas sensoriales que responden a señales que afectan a la formación y desarrollo del biofilm (Pérez-Ordoño, 2010).

La capacidad para formar biopelículas no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y en la actualidad se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, independientemente de la especie, puede existir dentro de una biopelícula adherida a una superficie en una interface sólido/líquido. Se ha encontrado que los microorganismos se adhieren más rápidamente a superficies hidrofóbicas, no polarizadas, como es el teflón y otros plásticos, en comparación con materiales hidrofílicos como vidrio o metales. Aparentemente se producirá algún tipo de interacción hidrofóbica entre la superficie celular y la del sustrato que permitiría al

microorganismo superar las fuerzas activas de rechazo a cierta distancia de la superficie del sustrato, y adherirse (Nazar, 2007). En las plantas procesadoras de alimentos y en los sistemas de distribución del agua, las biopelículas pueden ser la fuente de ingreso de patógenos, causando riesgos a la salud, y otros efectos adversos tales como la corrosión de materiales (Wen-Chi y col., 2009).

7.4.3 Regulación de la adherencia y relación con la virulencia

En *S. aureus*, el locus *agr* (accessory gene regulator) es el responsable del control de la expresión de numerosos determinantes de virulencia vía *quórum sensing* (Fueyo, 2005). El locus *agr* es un sistema multigénico complejo que regula los factores de virulencia, detectando la densidad celular; cuando ésta es alta se activa *agr*, de manera que induce la producción de proteínas extracelulares como las exotoxinas y, simultáneamente, reprime la expresión de antígenos de superficie como la proteína A y otras adhesinas (Pérez-Ordoyo, 2010). La producción de enterotoxinas (SEs) por el locus *agr* en alimentos depende de la habilidad de *S. aureus* para incrementar la densidad de celular (10^5 - 10^6 UFC/mL o g) en el alimento (Fueyo, 2005).

La molécula efectora del locus *agr* es un ARN regulador denominado RNAIII; además de sus efectos en la expresión de genes de factores de virulencia, el transcrito primario de RNAIII también codifica la hemolisina δ , cuyas propiedades como surfactante se piensa que modulan la formación del biofilm. Un estudio reciente con *S. aureus* reveló que la disrupción de sistema señal bicomponente *arLS* promovió intensamente la formación de biofilm, aumentando la fijación a superficies y la producción de PIA. De forma similar, la inactivación de un sistema *sensor-quorum* mediado por la Leucotoxina *LuxS* mostró un aumento de la formación de biofilm in vitro y provocó una mayor virulencia in vivo en ratas con infección mediada por biofilms (Tu Quoc et al., 2007). Concretamente, en el caso de las cepas de mastitis bovina, se ha informado de que la regulación de la formación de biofilm se consigue por la actividad combinada de los locus *ica* (intercelular adhesion), *bap* (biofilm-associated protein), *agr* (accessory gene regulator) y *sar* (staphylococcal accessory regulator) (Oliveira et al., 2006).

La síntesis de PIA esta catalizada por enzimas codificadas en el operon *ica* que se encuentra en el cromosoma bacteriano, que incluye un elemento regulador de 4 genes (A, B, C

y D). El gen codifica una enzima *N-acetilglucosamina transferasa* responsable para la síntesis de PIA. Esta enzima no es muy activa in vitro, pero la co-expresión del gen *D* aumenta la actividad. El *ica B* es el responsable de la desacetilación del PAI y la proteína transmembranal *ica C* parece estar implicado en la externalización y alargamiento del polisacárido de crecimiento. El *icaA* e *icaD* juegan un papel importante en la formación de biopelículas de *S.aureus* y *S.epidermidis*. Dhanawade y col., 2010 analizaron 102 cepas de *S. aureus* provenientes de leche e industria láctea determinando que el 48.03 % producían biopelículas y el gen *icaAD* en un 61.22%. Se sabe que el operón *ica* es reprimido por IcaR y también por TcaR, un regulador del locus asociado a la teicoplanina. Otros reguladores globales influyen también, como el *sar* (el regulador accesorio de estafilococo) y quizás el factor alternativo de estrés sigma (σ^B), que es importante para la regulación del biofilm en *S. epidermidis* aunque menos en *S. aureus*. De hecho, se ha demostrado que la producción de biofilm en *S. aureus* se ve más afectada por las mutaciones en el gen *sar* que en el locus *ica* (Beenken et al., 2004).

7.5 Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

El medio Baird Parker es excelente para el recuento de *S. aureus* incluso si se trata de células que sufrieron algún tipo de daño no letal (Figura 4). En ese medio las colonias presentan un aspecto característico, circulares, lisas, convexas, húmedas, de color negro; miden de 2 a 3 mm de diámetro, están rodeadas de una zona opaca y frecuentemente rodeada de un halo claro de un diámetro mayor que revela la actividad lipolítica sobre la yema de huevo; las colonias son de consistencia gomosa o butirosa (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). Las colonias típicas se seleccionan para su posterior confirmación.

La confirmación bioquímica puede incluir la fermentación de varios carbohidratos, la producción de coagulasa, termonucleasa, lipasas o determinación de la resistencia a antibióticos o algunas sustancias químicas. Ninguna de estas pruebas o combinaciones de ellas son indicadoras absolutamente confiables de la producción de enterotoxinas por este microorganismo.

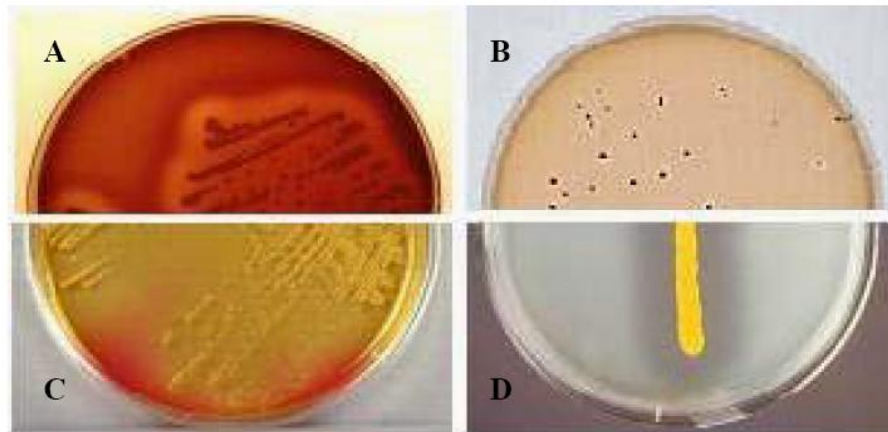


Figura 4. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en diferentes medios de cultivo. El A corresponde a agar sangre, B agar Baird Parker, C salado mintol y D agar DNAasa. Fuente: Fueyo, 2005.

7.6 Detección de cepas productoras de biofilm

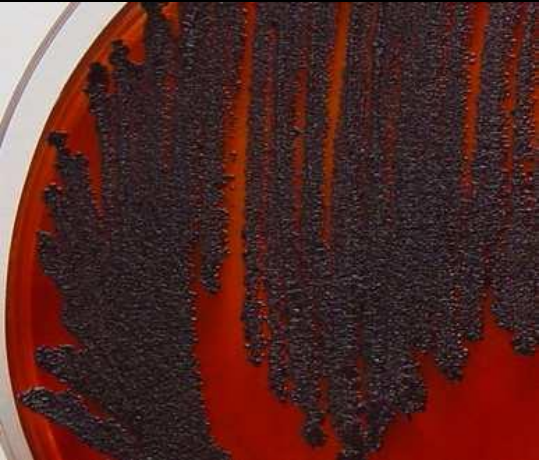


Junto a la investigación de la estructura molecular del biofilm, también se desarrollaron varias técnicas para identificar a las bacterias productoras de biofilm, una de estas técnicas, muy difundida por su sencillez y bajo costo es la siembra de la colonia sospechosa en agar de rojo Congo, en donde las colonias productoras toman un color negro opaco y las negativas un color rojo-rosa brillante; incluso se pueden percibir una modificación en su morfología encontrando las colonias positivas firmemente adheridas al agar y las negativas tienen una consistencia laxa. Otra manera de determinar la presencia o no de biopelículas es el método de fotodensitometría en cultivos de caldo teñidos con safranina descrito en la década de 1980, el cual tiene la ventaja de ser más exacto al proporcionar un valor cuantitativo sobre la producción de biofilm; sin embargo, es más costoso y laborioso en su realización.

7.6.1 Determinación fenotípica para la formación de biofilm.

Un método frecuentemente empleado para detectar las cepas de *Staphylococcus* productoras de biofilm es el del cultivo sobre agar Rojo Congo, descrito inicialmente por Freeman y col., (1989), que se basa en el uso de un medio de agar sangre enriquecido con sacarosa (36 g/L), para detectar la producción de glucanos, y con Rojo Congo (0.8 g/L) para mostrar la presencia de exopolisacáridos. El Rojo Congo interactúa con varias proteínas y estructuras proteicas fibrilares. La pérdida de la proteína Bap dio lugar a la transformación de la morfología de las colonias rugosas en colonias lisas. No se conoce con exactitud el mecanismo de la reacción que se presenta en dicho medio, pero se observó que el cambio de color sólo ocurre después de un período largo de incubación (48 h), lo cual sugiere que un producto secundario del metabolismo microbiano podría estar involucrado. Sobre este agar, los autores describen que las cepas adherentes, productoras de biofilm, desarrollan colonias negras de aspecto “cristalino”, mientras que las colonias de cepas no productoras aparecen de color rojo.

Se realiza sembrando sobre placas de CRA por estría cruzada, y posteriormente incubándose 24 h, a 37°C. Finalmente, se vuelven a incubar durante un nuevo periodo de 24 h a temperatura ambiente y se interpretan de acuerdo al cuadro 3 (Pérez-Ordoyo, 2010).

Cuadro 3. Características morfológicas de *S. aureus* en Agar Rojo Congo (CRA).

Productora de Biofilm	Morfología colonial	ilustración en Agar Rojo Congo
Positiva	colonias negras y de consistencia áspera, seca y cristalina	
Negativa	presentaban colonias rosadas o rojas, lisas y sin consistencia seca ni cristalina	
Intermedia	colonias rosadas de centro y contorno negro	

7.6.2 Método del tubo para detectar la adherencia de *S. aureus* (Christensen).

En el método de Christensen se detecta la adherencia de la cepa al tubo, mediante la observación en la intensidad de color de los depósitos bacterianos desarrollados en la superficie interna de los tubos. Las cepas previamente inoculadas en un medio líquido se incuban durante 24 horas en estático. Tras la incubación se procede a teñir los cúmulos bacterianos que se hayan producido en las paredes de los tubos de ensayo, de manera que se asocia una mayor intensidad o extensión del cúmulo (Figura 5) con una mayor capacidad de adherencia de la cepa a superficies inertes.

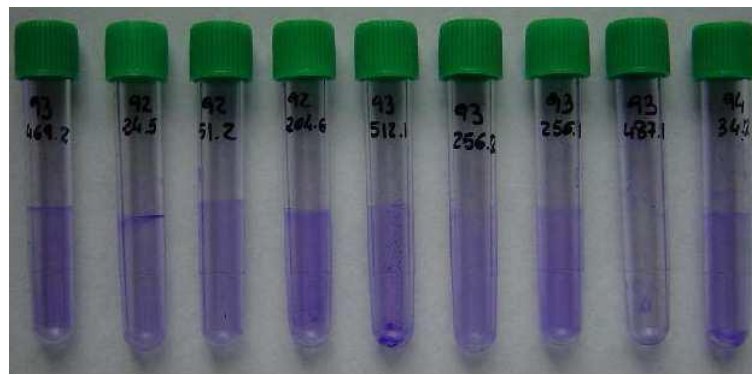


Fig. 5. Prueba de Christensen sobre varias cepas.

La técnica consiste en sembrar cada una de las cepas seleccionadas para las pruebas iniciales de factores de superficie en tubos de vidrio conteniendo 5 ml de caldo soya tripticasa con 0.25 % de glucosa. Una vez sembradas y homogeneizadas, se incuban durante 24 horas, en estático, a 37°C. Transcurrida la incubación, el caldo se elimina por decantación y se lavan 3 veces con agua estéril PBS (buffer fosfato salino) y se seca. Después del secado, los tubos se tiñen con 0.1 % de safranina, rotándolos manualmente durante 30 segundos para permitir la tinción de todo el material presente, adherido a las paredes o al fondo. El exceso de colorante se elimina por decantación y los tubos se lavan con agua destilada estéril. Se secan abiertos e invertidos en estufa de 37°C, toda la noche. Se evalúa visualmente la formación de biopelículas.

7.6.3 Cuantificación de la biopelícula en ensayos de poliestireno

El ensayo en placas de microtitulación resulta muy útil para determinar la capacidad de adhesión bacteriana a sustratos abióticos, ya que permite realizar estimaciones cuantitativas.

Esta técnica consiste en inocular las cepas de *S. aureus* en caldo soya tripticaseína (CST) a 37°C / 24h, realizando una dilución 1:100 en CST con glucosa y NaCl al 2%. Se le colocan 200 µL de esta suspensión bacteriana en una microplaca de poliestireno y se incuban a 37°C / 24 h. Se determina la absorbancia a 600 nm para obtener el crecimiento total. El crecimiento bacteriano no adherido es eliminado al lavar las placas en tres tiempos con 200 µL de agua peptonada e invirtiéndolas. Posteriormente se le adiciona 100 µL de solución acuosa de safranina al 0.1 % por 3 min. La safranina es retirada y la placa de poliestireno será secada por 2 h antes, determinando la absorbancia a 492 nm. La cepa productora de biofilm es definida con una densidad óptica de 492 nm \geq 0.17. Cada prueba se realiza por triplicado y se repite 5 veces.

7.6.4 Detección molecular de factores de virulencia

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica altamente sensible por medio de la cual secuencias de ADN que se encuentran en cantidades muy pequeñas se pueden amplificar enzimáticamente (Anexos), de tal modo que es posible disponer de una cantidad de material suficiente para analizarse (Persing, 1991). La base fundamental de esta tecnología es que cada agente infeccioso causante de una enfermedad posee una secuencia característica propia en su genoma por medio del cual se puede identificar (Koneman y col., 1999).

La PCR multiplex ha demostrado ser más específica y rápida que los procedimientos de identificación por métodos de cultivo, reduciendo el tiempo de confirmación de los aislados por arriba de los tres o cuatro días (Porllad y col., 1990).

8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

8.1 Recolección de muestras provenientes de superficies inertes

8.1.1 Criterios de Inclusión:

Las industrias lácteas se seleccionaron con o sin pre-requisitos sanitarios. Así también, las superficies inertes regulares e irregulares que estuvieran en contacto con los alimentos destinados al consumo directo (utensilios, vajillas, superficie de corte, equipos, indumentaria).

El procedimiento de selección de las muestras, estuvo en función de los riesgos sanitarios relacionados a las diferentes etapas de la cadena alimentaria, determinándose mediante una inspección tradicional. Ubicando estos sitios principalmente en mesas de trenzado, utensilios y tuberías.

Una práctica de campo determinó cuáles serían los sitios de muestreo tomando en consideración las zonas geográficas, su producción e importancia en la distribución del producto en la región de Ciénega e inspección sanitaria en cada una de las microempresas según la NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Practica de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.

8.1.2 Ubicación y características:

Las industrias lácteas seleccionadas fueron ubicadas en la Región Ciénega de Jalisco, en los municipios de Ocotlán, La Barca y Jamay, un total de 6 microempresas, todas de carácter artesanal. En cada microempresa se hizo una supervisión visual en la que se tomaron datos sobre las características de las instalaciones y sus procedimientos de limpieza, las observaciones se indican en el cuadro 4, en donde para guardar la confiabilidad de las empresas se denominan con números.

Cuadro 4. Observaciones basadas en una inspección tradicional.

Número de empresa	Características de las instalaciones	Protocolo de limpieza
1	Ventanas sin protección a polvo, puertas abiertas sin cortinas hawaiana, piso poroso y áreas húmedas. Mesetas con ranuras, operadores solo con botas de hule y sin guantes, utensilio de limpieza cerca de las cantaros y tambos de leche. Moldes en piso y uno que otro sobre mesas de trabajo	El área de trabajo se lava con agua y jabón comercial.
2	Techos de lamina, ventanas exteriores abiertas, piso de concreto húmedo, mesetas de trabajo de madera, utensilios de limpieza cerca de cantaros de leche, lienzos solo en agua y en tinas de plástico.	Solo se lava con agua y jabón y algunas ocasiones se utiliza cloro, esto es para piso y mesetas de trabajo
3	Puertas de fierro oxidadas, áreas no separadas, registros de agua cerca de mesas de trabajo, recepción de leche en tambos de 200 litros en contacto con estiércol al exterior, personal solo con mandil, botas y sin cofia ni cubre bocas.	A las tinas se lavan con agua y jabón y se les pone cloro, en la parte de recepción se lava con manguera a chorro con jabón
4	Cortina única que separa el área de proceso al de producción. Ventanas con polvo, piso poroso, las mismas mangueras que utilizan para la succión de leche solo utilizan agua como purga, el suero solo lo tiran al abrir la llave de desagüe.	Agua con jabón para moldes y lienzos, par las mesas de trabajo, jabón con cloro y en pocas ocasiones agua caliente sin considerar tiempo de acción del cloro ni nada.

5	Puertas abiertas todo el tiempo, ventanas solo con tela mosquetera, algunas paredes lavadas y otras no, utensilios de limpieza no están separados ni definidos por área, los moldes están en tarimas de madera.	Enjuague con agua caliente, lavado con jabón, agua caliente y solución de iodo para desinfectar tanto charolas como mandiles de los operadores.
6	Cortinas hawaianas sucias, piso de concreto y las tuberías se ven con sucias con costra o con queso ya muy viejo, las charcas sin solución sanitizante mesetas de trabajo con azulejos, cortina única de separación de abierta, moldes en el piso y amontonados.	Agua caliente, jabón Roma y agua con cloro para los lienzos, para mesas de trabajo agua, jabón y cloro.

8.2 Calculo de tamaño de la muestra

Para determinar el tamaño de una muestra empleando el muestreo aleatorio simple es necesario partir de dos supuestos: en primer lugar el nivel de confianza al que queremos trabajar; en segundo lugar, cual es el error máximo que estamos dispuestos a admitir en nuestra estimación. El tamaño de la muestra global se determino estadísticamente considerando la prevalencia esperada del patógeno 61.22 %, un nivel de error del 5% y un nivel de significancia de 0.05, de acuerdo a lo siguiente (Segura y Honhold, 2000):

$$N = pqz^2 / e^2 = 356 \text{ muestras}$$

donde:

p = es la proporción promedio esperada de muestra; $z / 2 =$ Se obtiene de las tablas de distribución normal y define la confianza estadística, que en este caso se trabajó al 94% por lo que z es de 1.96; e = Error máximo de fijación deseado para p.

En este reporte solo se incluyen 144 muestras de 356 muestras calculadas, el tamaño de muestra global no se llegó a completar dado a los límites de tiempo y acceso a las industrias lácteas, por lo que se fueron a 6 empresas de carácter artesanal con 24 muestras respectivamente.

8.3 Procedimiento de muestreo según la resolución ministerial N° 461-2007/MINSA “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas”.

La selección del método de muestreo estuvo en función de las características de la superficie a muestrear. El método del hisopo se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares, tales como tabla de picar, bandejas, mesas de trabajo, utensilios, cuchillas de equipos, cortadora de embutidos, cortadora de pan de molde, fajas transportadoras, tolvas, mezcladoras, pisos, paredes y otros. Debido a esto, se utilizó el método del hisopo sobre el método por esponja que se utiliza preferentemente para muestrear superficies regulares de mayor área, además de que está demostrado que no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

Para llevar a cabo el muestreo se utilizó el método del hisopo, el cual se colocó la plantilla (10 cm x 10 cm) sobre la superficie a muestrear. Se humedeció el hisopo en la solución diluyente (caldo soya tripticasa con 10 % de NaCl) y se presiono ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución. Se frotó 4 veces la superficie delimitada por la plantilla con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, cada una en dirección opuesta a la interior. Y se colocó el hisopo en el tubo con la solución diluyente quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos del operador.

Para superficies irregulares, en el caso de utensilios, se repetirá la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con el mismo hisopo, considerando el área que está en contacto con el alimento. En el caso de utilizar la plantilla de 5 cm x 5 cm, se repitió esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm².

8.4 Aislamiento y cuantificación de Staphylococcus aureus según Sandel y Mckillip (2004) y la NOM-115-SSA1-1994.

Se introdujo el hisopo estéril en una solución de caldo soya tripticasa con 10 % de NaCl y se incubó a 35 - 37°C/24 h. Una vez incubado se procedió a realizar diluciones (10²-10³), utilizando diferentes pipetas de 1mL para cada dilución, se depositó 0.1 mL sobre la superficie de la placas de agar Baird Parker y distribuyó el inóculo sobre las superficies del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto. Las placas se invirtieron e incubaron a

35°C/48 h. Finalmente, se seleccionaron las placas de agar Baird Parker que contengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus* con las siguientes características morfológicas: negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro 1-2 mm y con una zona opaca y un halo claro (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). El número de colonias sospechosas fueron tomadas según la NOM-115-SSA1-1994 (Cuadro 5) dependiendo del número de UFC por caja contada. Una vez desarrolladas se seleccionaron las colonias características de *S. aureus* y se realizó un perfil bioquímico que se indica en el Cuadro 6, las cepas probables se mantuvieron en caldo Infusión Cerebro Corazón incubadas a 35°C/24 h. El perfil bioquímico se comparo con la cepa control de *S.aureus* ATCC 6538.

Cuadro 5. Criterios de selección de colonias de *Staphylococcus aureus*

Colonias en placa de ABP	Colonias sospechosas por probar
50	Menos de 3
51 a 100	5
101 a 150 o más	Mas de 7

NOM-115-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos

Cuadro 6. Perfil bioquímico para la identificación de especies del género de *Staphylococcus*

Especie	Catalasa	Coagulasa	DNasa/	TNasa	D-Manitol	F.Maltosa	Lactosa	NaCl 6.5 %
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Macfadin J.F. 2003, Bacteriological Analytical (BMA), 2001

De las cepas confirmadas se obtuvieron cultivos axenicos de *S.aureus* en caldo soya tripticaseína suplementado con 0.25 % de glucosa a 37°C/24 h como lo indica Cucarella, (2001).

8.5 Caracterización fenotípica de la producción de biopelículas

8.5.1 Método de cultivo en Agar Rojo Congo (CRA)

Este método se basa en el uso de un medio de agar sangre enriquecido con 36 % de sacarosa, para detectar la presencia de glucanos, y 0.8 % de Rojo Congo para mostrar la presencia de exopolisacáridos.

Se realizó mediante la técnica de Freeman y col., 1989, en el cual se seleccionaron las cepas con la presencia de enterotoxinas clásicas o no clásicas por la técnica de PCR múltiple, y cada cepa de *S. aureus* enterotoxigénicas (25/116) fue inoculado en agar Rojo Congo (CRA) e incubado durante 24 – 48 h / 37°C. Las colonias con las siguientes características morfológicas: colonias negras, cristalinas y de consistencia seca, serán consideradas productoras de biofilm. Las colonias negras con centro rosa serán vueltas a incubar hasta completar las 48 h.

8.6 Detección de factores de virulencia de *S.aureus* provenientes de superficies inertes.

S. aureus es la especie de estafilococos más virulenta para el hombre y se caracteriza por poseer componentes estructurales y producir numerosos enzimas considerados factores de virulencia, que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas puede ser la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina (Torres et al., 2001).

A continuación se indica el procedimiento para identificar genes enterotoxigénicos de cepas de *S. aureus* previamente enriquecidas en caldo soya tripticaseína suplementado con glucosa (0.25 %). Así como también la amplificación del gen *ica ADBC* a partir de cepas enterotoxigénicas fenotípicamente productoras de biofilm.

8.6.1 Extracción del material genético para la identificación de enterotoxinas.

Se hicieron extracciones de ADN por cada cepa confirmada bioquímicamente como *S. aureus* (116/410), de acuerdo a los protocolos propuestos por Shuaihua y col. (2010) y Manfredi y col. (2010) con algunas modificaciones, el cual consistió en obtener cultivos axénicos de *S. aureus* (caldo soya tripticaseína suplementado con 0.25 % de glucosa a 37°C/24 h), los cuales se vaciaron en microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min. Descartando el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido en 100 µL de buffer de Lisis (10mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA), se homogenizo en vortéx y posteriormente se le aplico un tratamiento térmico a 95°C/8 min en un Termoblock, seguido de un enfriamiento a 5°C/8 min para después centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min. Finalmente se pasó el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml con el ADN bacteriano, el cual se almaceno a -30°C antes de utilizarse.

8.6.2 Extracción del material genético para la identificación del gen ica ADBC.

El principal componente del biofilm es un Polisacárido Intracelular Adhesina (PIA). PIA esta compuesto de un polímero de β -1,6-N-acetil glucosamina sintetizado por una enzima codificada por el operon *ica* que se encuentra en el cromosoma bacteriano, que incluye un elemento regulador de cuatro genes (A, B, C y D).

La extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo de acuerdo a los protocolos propuestos por Shuaihua y col. (2010) y Manfredi y col. (2010) , el cual consistió en obtener una colonia a partir de agar Rojo Congo previamente seleccionadas según sus características morfológicas como productora de biofilm (21/25) y se resuspendió a un microtubo de 1.5 ml con 100 µL de buffer de Lisis (10mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA), se homogenizo en vortéx y posteriormente se le aplico un tratamiento térmico a 95°C/8 min en un Termoblock, seguido de un enfriamiento a 5°C/8 min para después centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min. Finalmente se pasó el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml con el ADN bacteriano, el cual se almaceno a -30°C antes de utilizarse.

8.6.3 Cuantificación

El ADN bacteriano se cuantificó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Biophotometer plus) a una longitud de onda de 260 nm.

8.6.4 Condiciones de la PCR para la identificación de genes enterotoxigénicos

En los últimos años se desarrollaron numerosas técnicas de PCR múltiple para la detección de los genes que codifican las enterotoxinas de *S. aureus*. Algunas de estas nuevas técnicas permiten detectar un mayor número de genes que codifican enterotoxinas y en ellas se utilizan varios primers. Para la detección de genes que codifican SEs (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* y *sej*) se enlistan los primers en el siguiente cuadro 7. Se emplearon cepas de American Type Culture Collection (ATCC) de *S. aureus* ATCC 51811, 27664, 14458, 27543 respectivamente y el protocolo propuesto Shuaihua y col., 2010. Para la identificación de enterotoxinas clásicas (A-G) y no clásicas (H-J) se utilizó dos juegos (A-B) de PCR-multiplex, cada PCR tuvo un volumen final de 25 μ L conformado por: 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTP's, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.625 U de Taq polimerasa, 0.3 μ M de cada iniciador (primer) y 5 μ L de DNA. El extracto de ADN fue colocado previamente en un microtubo para después agregar 20 μ L de la mezcla de reacción de PCR para obtener un volumen total de 25 μ L. Al final se adicionaron 10 μ L de aceite mineral. Los tubos de PCR se pasaron a un termociclador bajo las siguientes condiciones de PCR: precalentamiento inicial a 95°C/5 min, 30 ciclos que consistieron en una desnaturalización a 94°C/1 min, alineación a 57°C/1 min, extensión a 72°C/1min y por último una extensión final a 72°C/7 min (Cuadro 8).

Cuadro 7. Primers usados para caracterizar genes enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* según Shuaihua y col., (2010).

Primer		Secuencia (5'-3')	Producto amplificado (pb)	Juego de PCR-Multiplex
<i>Sea</i>	f	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	521	A
	r	GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG		
<i>seb</i>	f	ATGTAATTTTGATATTCGCAGTG	665	A
	r	TGCAGGCATCATATCATACCA		
<i>sec</i>	f	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA	284	A
	r	TGCAGGCATCATATCATACCA		
<i>sed</i>	f	GTGGTGAAATAGATAGGACTGC	385	A
	r	ATATGAAGGTGCTCTGTGG		
<i>see</i>	f	TACCAATTA ACTTGTGGATAGAC	171	A
	r	CTCTTTGCACCTTACCGC		
<i>seg</i>	f	CGTCTCCACCTGTTGAAGG	328	A
	r	CCAAGTGATTGTCTATTGTCG		
<i>seh</i>	f	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	359	B
	r	GTCGAATGAGTAATCTCTAGG		
<i>sei</i>	f	CAACTCGAATTTTCAACAGGTAC	466	B
	r	CAGGCAGTCCATCTCCTG		
<i>sej</i>	f	CATCAGA ACTGTTGTTCCGCTAG	142	B
	r	CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC		

Cuadro 8. Condiciones optimas de la PCR

TEMPERATURAS			COMPONENTES DE LA MEZCLA
Pre calentamiento	95 °C	5 min.	Buffer 2.5 µL buffer 1X
Desnaturalización	94 °C	1 min.	Cloruro de Magnesio 2.5 mM
Alineación	57 °C	1 min.	dNTPs 0.2 mM
Extensión	72 °C	1 min.	Iniciadores 0.3 µM
Extensión final	72 °C	7 min.	Taq Polimerasa 0.625 U
Ciclos	35		AND 5 µL

8.6.5 Detección del operón *icaADBC*

Para el desarrollo de la PCR se empleara *S.aureus* ATCC 6538 y el protocolo propuesto por Arciola y col., 2001. La mezcla de reacción final fue de 25 µL conformada por: 1 µM de cada iniciador, 100 µM de ADN, 100 µM DNTP's, 1 U de Taq polimerasa, buffer (10 mM [Tris-HCL], 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2.5mM MgCl₂ y 10 µL de aceite mineral. En la tabla 7 se detallan las secuencias y las condiciones utilizadas, realizando una desnaturalización inicial 94 °C por 5 min y una extensión final 72°C / 1 min.

Tabla 7. Iniciadores para la determinación del operon *icaADBC*

Iniciador	Secuencia (5´-3´)	Producto amplificado (pb)	Condiciones de PCR
<i>icaA</i>	TCT CTT GCA GGA GCA ATC AA	188	30 s 94 °C
<i>icaA</i>	AGG CAC TAA CAT CCA GCA		30 s 55 °C
			30 s 72 °C
<i>icaB</i>	ATG GCT TAA AGC ACA CGA CGC	526	60 s 95 °C
<i>icaB</i>	TAT CGG CAT CTG GTG TGA CAG		60 s 59 °C
			90 s 72 °C
<i>icaC</i>	ATA AAC TTG AAT TAG TGT ATT	989	30 s 95 °C
<i>icaC</i>	ATA TAT AAA ACT CTC TTA ACA		60 s 42 °C
			90 s 72 °C
<i>icaD</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198	30 s 94 °C
<i>icaD</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA		30 s 55 °C
			30 s 72 °C

Fuente: Arciola y col. 2001

8.6.6 Electroforesis

La secuencia de los genes amplificados en la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio a una intensidad de 160 Volts durante 2 horas según el tamaño del gel. Las bandas se observaron en un transluminador de luz UV de corta longitud de onda y se comparó con un marcador de peso molecular de 50-100 pb Promega Corp[®] que sirvió para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

8.6.7 Análisis de los resultados

Los datos obtenidos fueron reportados como el porcentaje de cepas que fueron positivas a la presencia de gen *icaADBC* y su expresión fenotípica. Las muestras que fueron positivas a cualquiera de los genes analizados se recopilaron y se corrieron nuevamente en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio. El criterio para determinar si *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tiene la capacidad de formar biopelículas en superficies inertes, es que posea un gen (*icaADBC*) que codifique los componentes principales del biofilm. Posteriormente se analizaron los resultados de acuerdo a los porcentajes en relación con el número de muestras.

9. RESULTADOS

Un total de 144 muestras fueron colectadas de 6 microindustrias lácteas productoras de queso de la región Ciénega del estado de Jalisco, éstas no seguían un protocolo de limpieza ni contaban con instalaciones adecuadas. En el muestreo se seleccionaron superficies inertes que estuvieran en contacto con el producto, tales como: mesas de trenzado, tuberías, extrusores utensilios y recipientes.

Se identificaron colonias típicas de *Staphylococcus aureus* en 82 placas de Agar Baird Parker, de las cuales se obtuvieron 410 colonias sospechosas, se les hizo un perfil bioquímico y se confirmaron 116 cepas de *S. aureus*. Por cada cepa confirmada se realizó una extracción de ADN por el método de ebullición con las consideraciones de Shuaihua y col., (2010). Se les cuantificó ADN para saber la viabilidad de cada cepa con la ayuda de un espectrofotómetro, obteniendo un rango de concentración de 0.7 µg/mL hasta 40.6 µg/mL.

Se estudiaron 116 cepas de *S. aureus* sospechosas de poseer genes enterotoxigénicos, 25 cepas resultaron positivas a la presencia de alguna de las enterotoxinas clásicas y no clásicas. Las muestras de superficies inertes que presentaban estos genes fueron tomadas de mesas de trenzado, extrusores y tuberías (cuadro 9). En la figura 6 se observa el gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio que ilustra la cepas positivas 130 y 131 aisladas de mesas de trenzado, el producto amplificado fue de 284 pb que corresponde a la enterotoxina C por la comparación con el marcador de peso molecular (MPM) de 50-100 pb.

Cuadro 9. Presencia de enterotoxinas en superficies inertes de queserías por el método de PCR multiplex

Número cepas positivas	Enterotoxina	Superficies inertes
13	<i>seh</i>	Mesas de trenzado y Extrusores
6	<i>sec</i>	Mesas de trenzado
2	<i>sea</i>	Extrusores
1	<i>see</i>	tuberías
0	<i>seb, sed, sei, sej</i>	-----

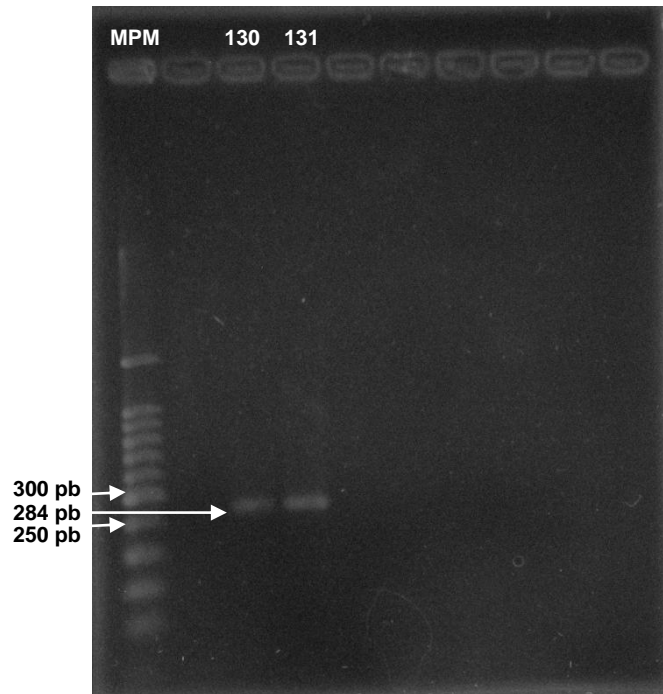


Figura 6. Gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio que ilustra la cepa positiva que posee el gen *sec* (284 pb). MRM= marcador de peso molecular, 130 y 131= muestras tomadas de mesas de trenzado en queserías.

Las 25 cepas enterotoxigénicas se caracterizaron fenotípicamente en Agar Rojo Congo donde se pudo ver de manera cualitativa la producción de biofilm. Puesto que algunas cepas mostraban un crecimiento lento o débil en agar Rojo Congo, se valoró los resultados obtenidos tras prolongar la incubación hasta las 48 h, como aconsejan algunos autores (Arciola *et al*, 2010). Considerando como productoras de biofilm a las cepas de color negro, de consistencia áspera, seca y cristalina en el agar Rojo Congo, los datos obtenidos se recogen en el Cuadro 3. Los resultados indican que el 56% (14/25) de las cepas enterotoxigénicas son formadoras de biofilm según la morfología descrita anteriormente, el 28% (7/25) como productoras de biopelículas intermedias y el 16% (4/25) como no productoras.

Cuadro 3. Características fenotípicas de las 25 cepas enterotoxigénicas en agar Rojo Congo.

Característica	Cepas formadoras de biofilm	% sobre el total
<u>Color</u>		
Rojas	4	16
Negras	14	56
Variantes	7	28
<u>Superficie</u>		
Cristalina	7	28
Seca	14	56
Opaca	4	16
<u>Aspecto</u>		
Rugoso	21	84
Liso	4	16
<u>Precipitado</u>		
Presencia	7	28
Ausencia	18	72

Tomando como referencia la cepa control, en las 25 cepas enterotoxigénicas estudiadas no se logró amplificar el gen *icaADBC*, esta ausencia del operón *ica* en las cepas enterotoxigénicas resultó de la incapacidad de producir exopolisacáridos. Estudios indican que aun sin la expresión del operón *ica* se ha observado la formación de biofilm y se ha sugerido la existencia de rutas metabólicas dependientes e independientes del mismo (Pérez-Ordoyo, 2010). Además se ha visto que algunas cepas de *Staphylococcus* son fenotípicamente negativas a la producción de biopelículas y que posterior a varios pasos de cultivos, expresan de nuevo la producción de PIA, según Diamond y col., 2003, de la misma forma observo que las bacterias que eran positivas en un principio, tras varios pasos en agar dejaban de producir biofilm.

La técnica de extracción utilizada en este trabajo no es de uso frecuente, sin embargo, se obtuvieron resultados válidos de un modo más rápido, sencillo y económico que con los métodos artesanales y comerciales, esto de acuerdo a la optimización de la técnica propuesta por Manfredi y col. (2010). Para la identificación de enterotoxinas, la técnica de PCR-multiplex fue la adecuada por el alto grado de homogeneidad que existe entre los genes de las diferentes enterotoxinas.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar el proyecto se llegó a la conclusión, de que existen cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de enterotoxinas, en superficies inertes de queserías de la región Ciénega del estado de Jalisco, de las cuales se identificaron enterotoxigénicas clásicas (SEA, SEC y SEE) y no clásicas (SEH) mediante PCR- Múltiplex, siendo éstas una fuente importante de contaminación. Las cepas de *S. aureus* presentaron características fenotípicas propias de la producción de biofilm, sin embargo, no se detectó el gen *ica ADBC*, responsable de la adherencia a superficies inertes. No se establece una relación directa entre las características morfológicas en Agar Rojo Congo y la expresión del gen *ica ADBC* con la formación de biofilm, por lo tanto se concluye que la determinación fenotípica no corresponde a la expresión del gen que se encarga de codificar los componentes del biofilm.

Se recomienda el seguimiento de la investigación comparando resultados de diferentes métodos para identificar la adherencia a superficies inertes, una combinación de varios métodos (fenotípicos y genotípicos) serían útiles para la identificación de biofilm de *S. aureus* en superficies inertes.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

1. Arciola, C.R., Baldassari, L., and Montarano, L. 2001. In catheter by *Staphylococcus epidermidis* the intracelular adhesión (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. Journal of biomedical materials research. 59:557-562
2. Castro V. G. Díaz R. A. M. Torres T. B. 2007. Análisis de la calidad sanitaria de las queserías y los quesos en el estado de tabasco en el periodo del 2002-2005. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe España y Portugal. Vol. 13 número 001, 560-567.
3. CENA VECE EPIDEMIOLOGIA, boletín epidemiología, 2008. Disponible en: <http://www.dpegi.salud.gob.mx/unidos/epidemiológicas/boletín>. Accesado el 10/06/2010.
4. Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena I.L and Penades J.R. 2001. *Bap*, a *Staphylococcus aureus* Surfaces Protein Involved in Biofilm Formation. Journal of Bacteriology.183:2888-2896.
5. Dhanawade N.B., Kalorey D.R., Srinivasan R., Barbudhe B., Kurkure N.V. 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Vet Res Commun. 34:81-89.
6. Diamond J., Miranda G., Solórzano F., Leños B., 2003. Detección de los genes del operón *ica* y producción de polisacárido de adherencia intercelular (PIA) en cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas de pacientes con infecciones asociadas a catéteres. Tesis de Infectología Pediatría. HP CMN SXXI IMSS.
7. Food and Drug Administration (FDA), U. S. Department of Agriculture, U. S. Environmental Protection Agency, and Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Food safety from farm to table: a national food safety initiative report to the president. Available at <http://www.cfsan.fda.gov/dms/fsreport.html>. Visitada el 8 de Marzo del 2011.
8. Fernández E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
9. Freeman, D.J., Falkiner, R.F. Keane, C.T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathon. 42:872-874.

10. Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R. Muñiz, J., Álvarez, M.A and Martín, M.C. 2005. Cytotoxin and Pyrogenic Toxic Superantigen Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. pp 1279-1284.
11. Katsuhiko O., Machito I., Yu S., Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin Productivities of *S.aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:857-862.
12. Koneman W.; Elmer Allen; Stephen D.; Janda William M.; Schreckenberger C. Paul y Winn C. Washington. 2001. Diagnóstico microbiológico “Bacteriología básica”. Quinta Edición. Editorial médica Panamericana. p. 47.
13. López Meza J.E., Higuera Ramos J.E., Ochoa Zarzosa A., Chassin Noria O., Valdez Alarcón J.J., Bravo Patiño A., Baizabal Aguirre V.M. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus spp.* Asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Tec Pecu México*.44:91-106.
14. 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: 212-215.
15. Martín M.C, González-Hevia M.A, Mendoza M.C. 2002. Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiology*. 20:605-610.
16. Moretro T., Hermansen L., Holck A.L., Sidhu M.S., Rudi K. and Langsrud S. 2003. Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion *Locus ica* among *Staphylococci* from Food and Food Processing Environments. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*.69:5648-5655.
17. Nazar J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*. 67:61-72
18. NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados, para seleccionar las superficies inertes que intervienen durante el proceso.

19. Normanno G; Firinu A; Virgilio S; Mula G; Dambrosio A; Poggiu A; Descastelli L. 2004. Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *J. Food Microbiology*. 98: 73-79
20. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. Perfiles básicos de salud en los países de América Latina, México. http://www.paho.org/Spanish/DD/AIS/cp_484.htm Visitada el 5 de Mayo del 2011.
21. PANALIMENTOS. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. 2002. ¿Qué son las enfermedades transmitidas por los alimentos?. Oficina de comunicación social y educación. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/ME%20%20ETA%20INPP AZ.pdf Visitada el 9 de Abril del 2011.
22. Pérez-Odoyo, L. 2010. Exopolisacáridos y otros factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche ovina. Universidad de León. pp 161, 226.
23. Persing, D. H. 1991. Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *Journal Clinic microbiology*. 29:1281-1285.
24. Pollard, D. R.; Jhonson, W.M.; Lior H.; Tyler, S. D., And Rozee K. R. 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28:540-545.
25. Resolución ministerial No 461-2007/MINSA “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas” de Lima, Perú.
26. Rosec, J.P., and Gigaud O. 2002. *Staphylococcal* enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *J. Food Microbiology*. 77:61-70
27. Sandel M.K., Mckillip J.L. 2002. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*. 15:5-10.
28. Sayed A., Alber Joachim, Lammler C., Jager S., Wolter W., Castañeda Vázquez H. 2006. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 32:165-179.
29. Secretaria de Salud y Asistencia (SSA). 2005. Información epidemiológica de morbilidad, versión ejecutiva.

- <http://www.dgepi.salud.gob.mx/download/descargar/morbilidad05.pdf> Visitada el 5 de Mayo del 2011.
30. Segura J, Honhold N. 2000. Método de muestreo para la producción y la salud animal. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. pag 30
 31. Suzanne B., Luppens I., Martine W.R., Rob W.L. Rombouts F.M and Tjakko A. 2002. Developmente of a Standard Test to Asses the Resistance of *Staphylococcus aureus* Biofilm Cells to Disinfectants. Journal of Applied and Environmental Microbiology.68: 4194-4200.
 32. Torres Vitela M.R., Castillo Ayala Al., 2006, Microbiología de los Alimentos. 1ª. Edición. Editorial Universidad de Guadalajara. 59-82.
 33. Shuaihua, P., Wang, F., and Ge, B. 2010. Characterization of Toxin Genes and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Louisiana Retail Meats. Foodborne Pathogens and Disease. 8:299-306.
 34. Ubeda, T.M., Cucarella, C., Trotonda, P. Amorena, B., Lasa, I., y Penades, J.R. 2002. BAP, una proteína implicada en la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus*, forma parte de elementos genéticos móviles en diferentes especies patógenas de *Staphylococcus coagulasa* negativos. S.E.O.C.
 35. World Health Organization (WHO). 2007. Food safety and foodborne illness. Fact sheet N°237, reviewed March 2007. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/> visitada el 5 de Mayo del 2011.
 36. Wen-Chi C., Casper S., Lisbeth R.H., Per M. and Tolker-Nielsen T. 2009. Silver-Palladium Sufaces Inhibit Biofilm Formation. Journal of Applied and Environmental Microbiology.75: 1674-1678.

12. ANEXOS

12.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés como PCR (Polimerase Chain Reaction), es una técnica de replicación *in vitro*. Esta reacción bioquímica se realiza a partir de pequeñas cantidades de DNA y es catalizada por la enzima DNA polimerasa. La PCR sirve para generar millones de copias de un segmento de DNA de interés, lo que se conoce como “amplificar” una secuencia, que puede ser un gen, un pedazo de un gen.

En la primera fase de un ciclo de PCR la doble hebra del DNA se separa por calor, entonces dos secuencias cortas de nucleótidos (oligonucleótidos), conocidos como primers o iniciadores, hibridan por complementariedad de bases (A=T; G=C) en hebras opuestas flanqueando la región de interés. Finalmente la DNA polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer, que va “creciendo” formando las hebras nuevas. La adición de nucleótidos se da por complementariedad de bases con la hebra molde. En síntesis, la separación de hebras (desnaturalización), la unión de iniciadores, (alineamiento) y la acción de la polimerasa (extensión), constituyen un ciclo de PCR (Figura 7).

Una PCR consiste en alrededor de 30 ciclos, y las nuevas copias generadas en un ciclo sirven de molde para la amplificación del siguiente, por lo que el número de copias del fragmento crece exponencialmente. Las etapas de la PCR se desarrollan a diferentes temperaturas, que son:

- **DESNATURALIZACIÓN**, de 94 a 96°C para separar las cadenas de DNA
- **ALINEAMIENTO**, de 42 a 60°C los iniciadores o primers se aparean con una secuencia homóloga específica del DNA molde, delimitando una región deseada.
- **EXTENSIÓN**: de 60 a 72°C se lleva a cabo la polimerización del DNA, por la adición de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) al extremo 3' de los primers alineados, generando las nuevas cadenas de DNA.

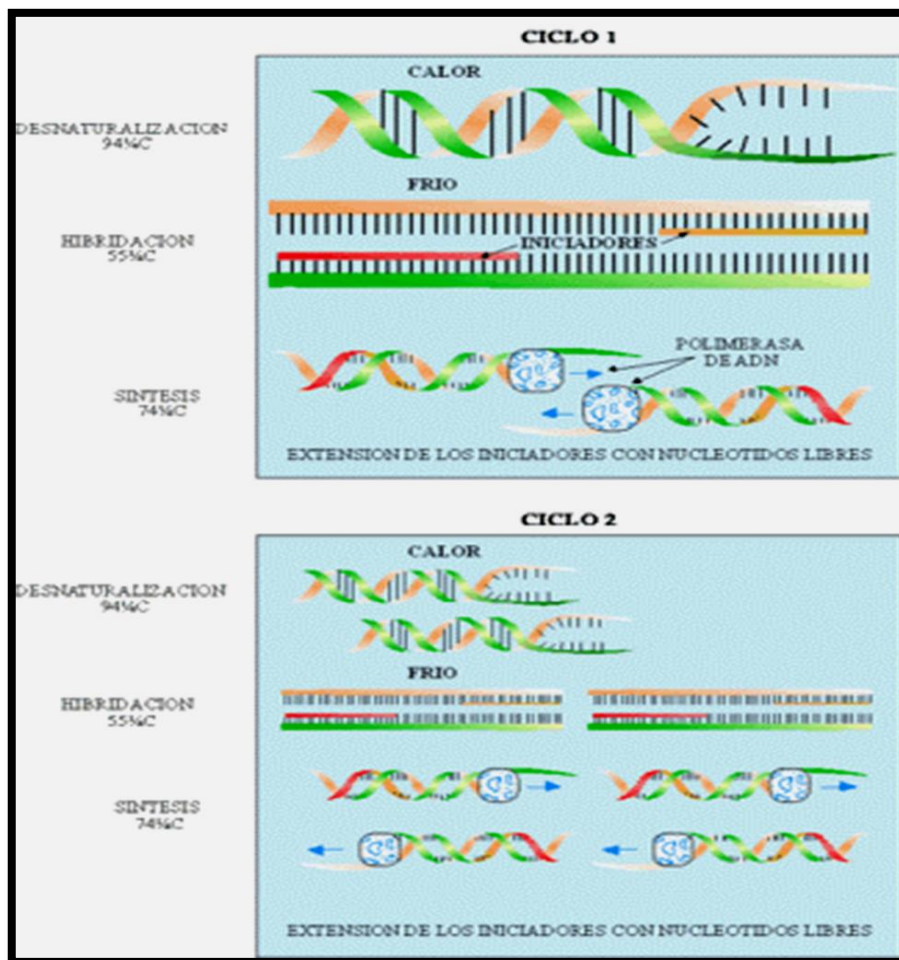


Figura 7:
Pasos de un ciclo de PCR: 1) desnaturalización,
2) alineamiento o hibridación y 3) extensión o síntesis.

12.1.1 Enzima DNA polimerasa

Todas las DNA polimerasas catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 3'-OH al final del oligonucleótido y el grupo fosfato 5' del desoxirribonucleótido trifosfatado que va llegando (dNTP). Los protocolos originales de PCR se desarrollaron usando la enzima Klenow DNA polimerasa I, derivada de *Escherichia coli*. Su temperatura óptima para polimerizar es 37° C, por lo que se inactivaba durante la desnaturalización en cada ciclo de PCR, y tenía que añadirse nuevamente después de cada desnaturalización. Lo anterior, combinado con las bajas temperaturas requeridas para la extensión, resultaba en una baja eficiencia y pobre especificidad de la reacción.

Un gran avance se produjo con el uso de DNA polimerasas termoestables. La primera fue la Taq DNA polimerasa I (Taq pol I), purificada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, que puede permanecer activa aun después de ser calentada a 95°C y puede extender los cebadores a temperaturas de 72°C. La Taq pol I simplificó enormemente el protocolo de PCR y permitió el desarrollo de instrumentos de ciclos térmicos para automatizar la reacción incrementando drásticamente la especificidad y producción.

12.1.2 Cloruro de Magnesio (MgCl₂)

El cloruro de magnesio es esencial para la actividad de la *Taq polimerasa*, activa los dNTPs e influye en la temperatura de desnaturalización del DNA molde. Un exceso de MgCl₂ causa una acumulación de productos no específicos, mientras la insuficiencia de MgCl₂ reduce la producción de amplificado. La concentración óptima de MgCl₂ suele ser establecido empíricamente, es decir, por ensayos a prueba y error. Cuando se estandariza una PCR se prueban las condiciones reportadas en la literatura, si no funciona, se recomienda bajar la temperatura de alineamiento -5°C e implementar una curva con diferentes concentraciones de MgCl₂ para definir la óptima.

12.1.3 Buffer de PCR 10X

Un componente esencial para hacer una PCR es el buffer 10X, cuya función es dar las condiciones fisicoquímicas adecuadas al medio para que se lleve a cabo la replicación in vitro. Se le denomina 10X porque esta 10 veces más concentrado de lo que se requiere en un medio de PCR, de manera que si el volumen total de PCR son 50 μL , se tendrán que añadir 5 μL buffer 10X para proporcionar las condiciones adecuadas para la reacción. El buffer suele contener albúmina de suero bovino (BSA), Tris-HCl, detergentes como twin 20 e inclusive el cloruro de magnesio al 15Mm, entre otros.

12.2 Elaboración de la mezcla para PCR

Los componentes de PCR no se añaden individualmente en cada tubo para cada muestra, debido a que las cantidades a agregar serían muy pequeñas, lo que aumentaría considerablemente la probabilidad de error. Por ejemplo añadir 0.07 μL de Taq pol por muestra sería muy difícil. Por lo que se prepara en un tubo de 0.5 o 1.5 mL una mezcla para PCR llamado “cóctel”, que contiene todos los componentes de la PCR para todas las muestras, claro, a excepción de los ADN’s a los que se les va a hacer la prueba; los ADNs se añaden individualmente en cada tubo. Los cálculos de la PCR suelen hacerse en un formato previamente diseñado por el laboratorio, donde se consideran todos los componentes de la reacción, las muestras de DNA a tipificar, la elaboración del cóctel, las condiciones de temperatura, el termociclador y programa utilizado, quedando como un registro de la prueba. En cada PCR es conveniente incluir una muestra como control negativo donde se coloca agua en vez de ADN molde, con el fin de detectar si está contaminado alguno de nuestros reactivos.

Cabe señalar que los componentes de la reacción tienen una concentración que les permite ser agregados a la mezcla en cantidades adecuadas, es decir, ni muy pequeñas que sean difíciles de medir ($>1\mu\text{L}$), ni tan grandes que su volumen abarque la mayoría del volumen total del cóctel.

12.3 Electroforesis

La electroforesis describe la migración de una partícula bajo la influencia de un campo eléctrico. Todos los aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos poseen grupos ionizables que por su carga eléctrica pueden ser cationes (+) o aniones (-). Cerca del pH neutro, las moléculas de ADN tienen una gran carga negativa y por ende se mueven hacia el electrodo positivo. Las moléculas con cargas eléctricas similares, poseen distintas relaciones carga/masa, estas diferencias constituyen una base suficiente para una migración diferencial cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico. La separación de moléculas por electroforesis, en este caso un fragmento de DNA, se basa en la velocidad diferencial a la que migran en el medio, mientras las grandes se retrasan las pequeños migran más rápidamente, y su tamaño se determina al someter a electroforesis simultáneamente a una muestra con fragmentos de tamaño conocido, al que se denomina marcador de peso molecular. Para llevar a cabo una electroforesis es necesario contar con:

Fuente de poder: esta suministra el campo eléctrico, convirtiendo la corriente alterna en corriente continua y la filtra para eliminar el 98% de las alternancias. La intensidad debe mantenerse constante durante la electroforesis, pueden utilizarse voltajes bajos (100-500V) a voltajes altos (500-10,000V), La resistencia OHM (Ω) depende del tipo y tamaño del medio de soporte, así como de la fuerza iónica del buffer. La resistencia aumenta con la longitud del medio de soporte así como disminuye a mayor anchura del mismo, al aumentar de concentración iónica del buffer y cuando la temperatura aumenta. La aplicación de voltajes es determinada por la concentración del gel, el tamaño del fragmento y la resolución que se desee obtener de los fragmentos esperados. La movilidad electroforética relativa de los fragmentos de DNA de diferentes tamaños no cambian entre los 4°C y 30°C.

La movilidad electroforética del DNA está afectada por la composición y fuerza iónica del buffer. En ausencia de iones, la fuerza iónica la conductancia eléctrica es muy eficiente pero puede llegar a producir grandes cantidades de calor y lograr desnaturalizar el DNA. Las moléculas cargadas presentes en una solución acuosa sometida a un campo eléctrico son atraídas hacia el polo opuesto a su carga neta, un proceso conocido como electroforesis. Dos fuerzas de acción opuesta determinan la velocidad de la partícula en cuestión.

Cámara electroforética: recibe la corriente continua proveniente de una fuente de poder por el electrodo negativo suministrando electrones libre a la solución buffer y los recibe por el electrodo positivo.

Buffer transportador: es una sustancia con carga neutra que conduce los electrones a través del medio viscoso. En ausencia de iones la conductancia eléctrica es mínima y el DNA migra muy lentamente, cuando se aumenta la intensidad de corriente y se producen grandes cantidades de calor y desnaturaliza el DNA o forma geles sonrientes. Existen diversos tipos de buffer para electroforesis, pero el utilizado por nosotros es el buffer TBE (Tris-Boratos-EDTA) que tiene alta capacidad para mantener el pH y se puede reutilizar.

Medio de soporte: es el medio donde se aplican las muestras a separar, y a través de él migran las moléculas en cuestión. Como lo son la agarosa y la poliacrilamida.

12.3.1 Gel de agarosa

La agarosa es un polímero extraído de la pared de las algas marinas, forma un gel coloidal de consistencia variable. Se caracteriza por baja electroendosmosis, poros amplios y fuerza en la matriz. En el comercio se encuentra en tres presentaciones: alto, mediano y bajo punto de fusión, que indica la temperatura a la que se funde el gel. Se emplea para verificar productos de PCR, digestiones con enzimas restricción, así como la calidad, cantidad y pureza del DNA genómico. Siempre se corren paralelamente marcadores de peso molecular con la muestra de prueba con el objeto de poder determinar el tamaño preciso de los fragmentos.

Los geles de agarosa son usualmente corridos en una configuración horizontal en un campo eléctrico de potencia y dirección constante. La electroforesis en geles de agarosa seguida por tinción con bromuro de etidio es una metodología fácil, rápida y los productos son fácilmente recobrados para análisis subsecuentes. En biología molecular es la tinción fluorescente más comúnmente empleada para detectar ácidos nucleicos.

12.4 Registro de las cepas positivas a enterotoxinas

Cuadro 11. Registro de cepas de *S. aureus* aisladas de superficies inertes positivas a enterotoxinas mediante la técnica de PCR-Multiplex.

REGISTRO	REGISTRO PROPIO	FUENTE	ENTEROTOXINA SEA, B, C, D, E, G, H, I, J
H23	2	Mesa de trenzado	A, H
H1	8	Mesa de trenzado	A
GQ3	14	Tubería	H
M2 9/02	35	Tubería	E
16	41	Canaleta	C
5	42	Canaleta	C
6[C]	51	Canaleta	C
8	57	Canaleta	H
7[C]	58	Canaleta	H
5	65	Extrusor	H
12	66	Extrusor	H
44	73	Extrusor	H
57	74	Extrusor	H
112	80	Extrusor	H
252	88	Extrusor	H
288	93	Mesa de trenzado	H
323	95	Mesa de trenzado	H
502	98	Mesa de trenzado	H
321	130	Mesa de trenzado	C
339	131	Mesa de trenzado	C
Lupita	144	Mesa de trenzado	C

12.5 Diagramas de flujo

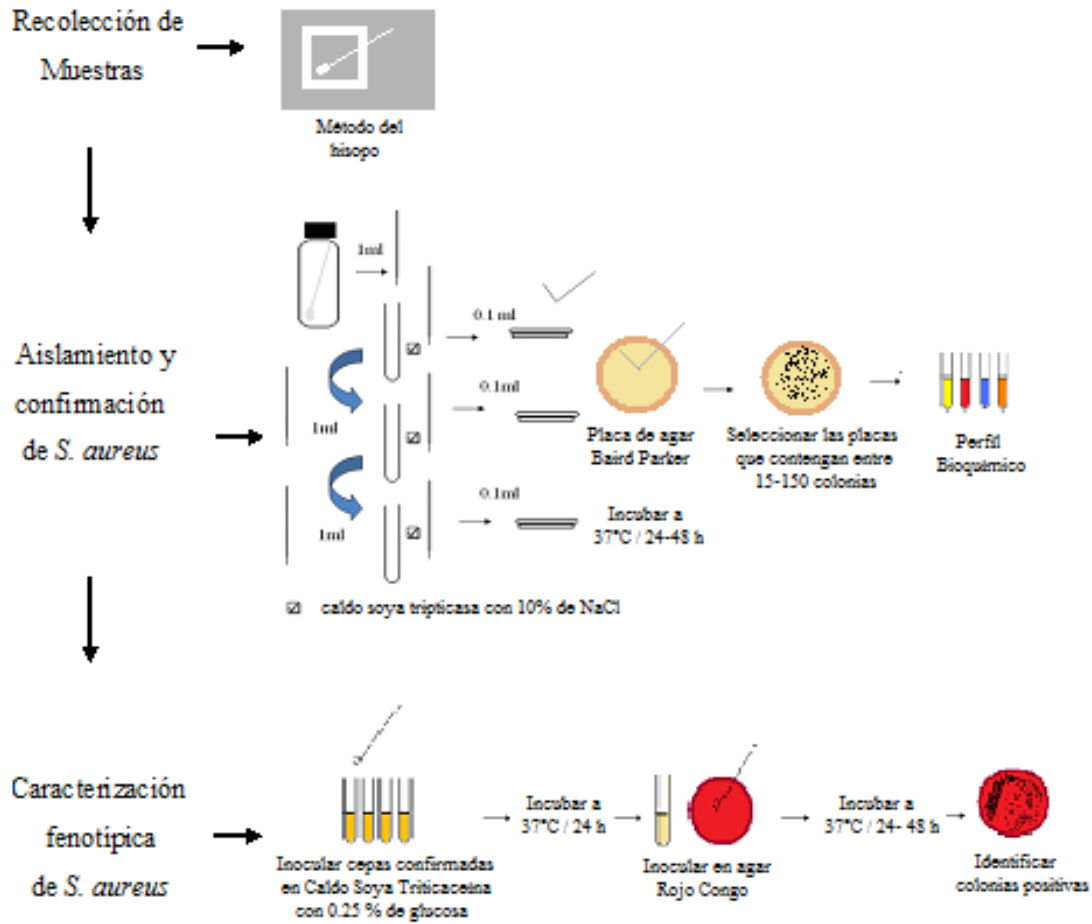


Fig. 8. Caracterización fenotípica de *S. aureus* a partir de muestras aisladas de superficies inertes.

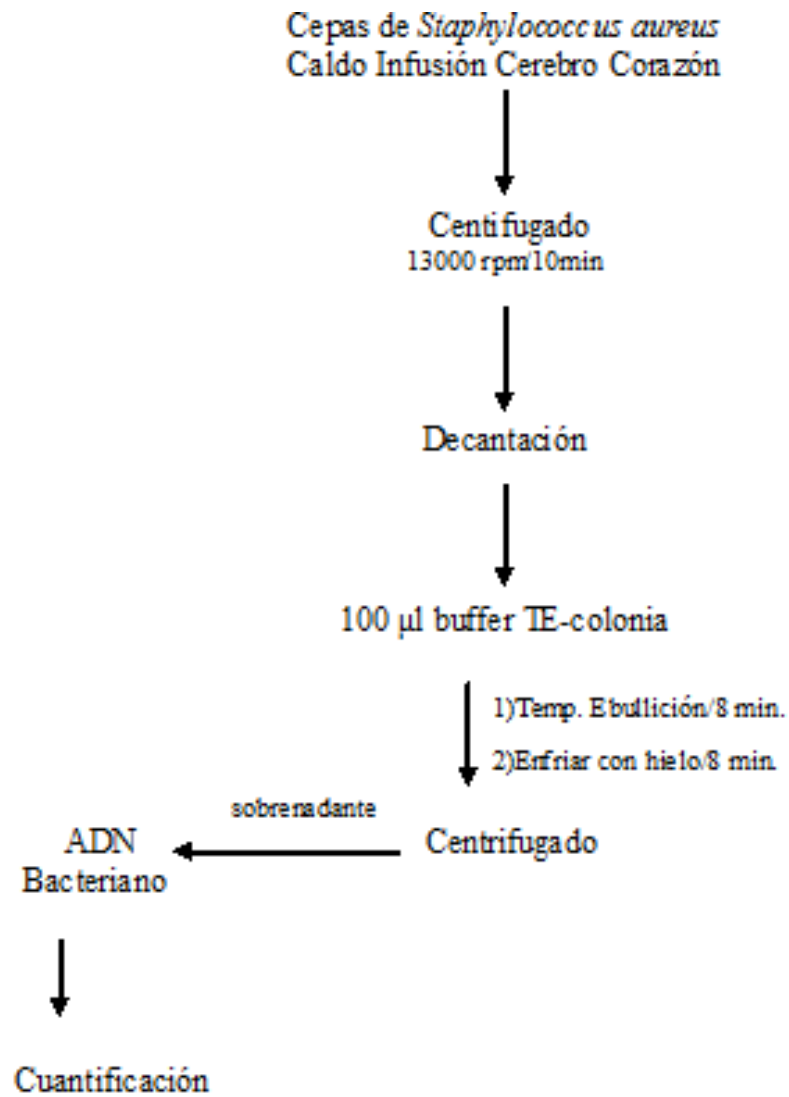


Fig. 9. Extracción de ADN para identificar enterotoxinas

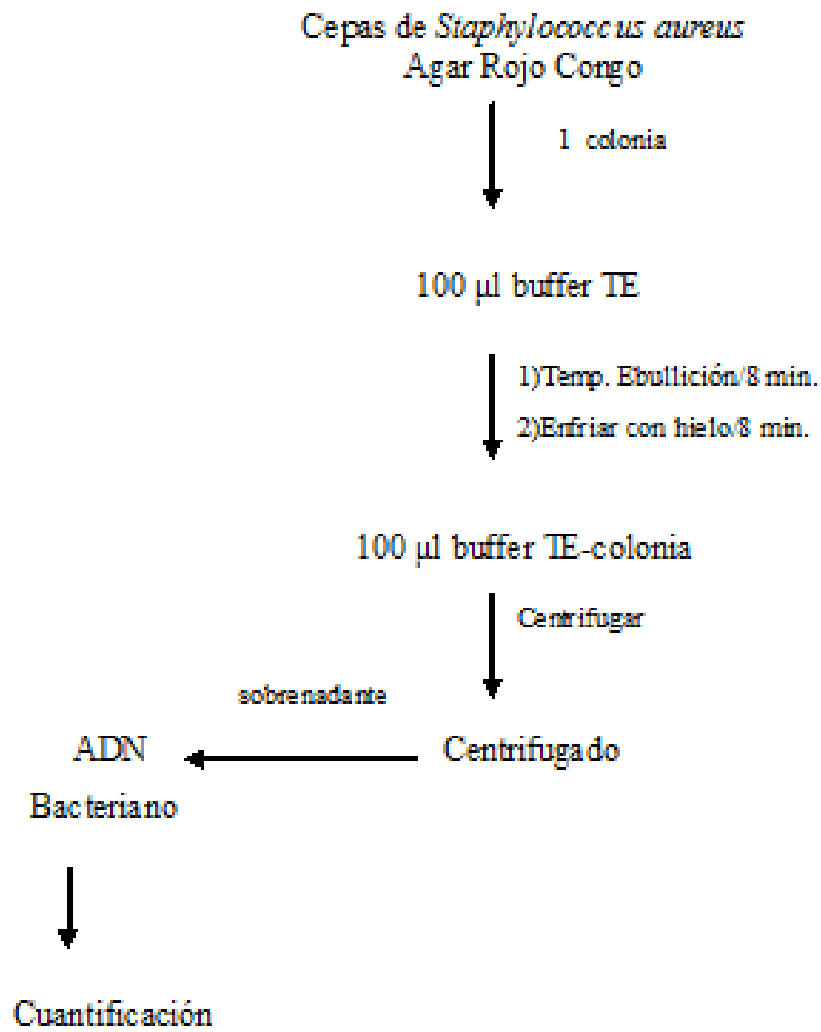


Fig. 10. Extracción de ADN para identificar el gen *icaADBC*

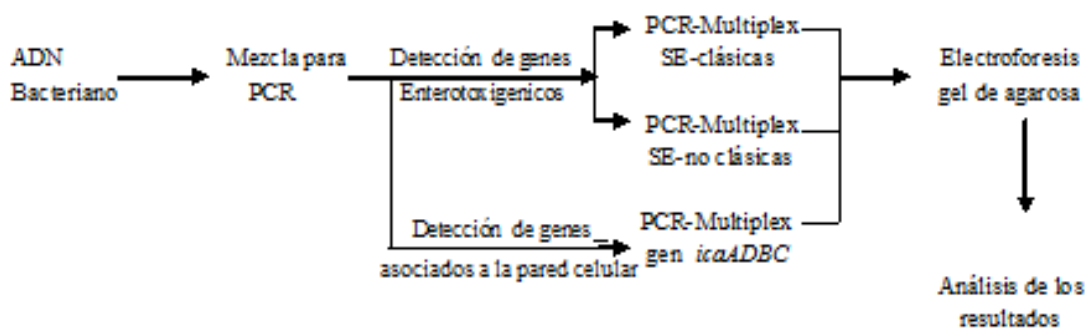


Fig. 11. PCR multiplex