

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

BIOFILMS PRODUCIDOS POR *Staphylococcus aureus*

por

María Juliana CURBELO SILVEIRA

**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección-Control y
Tecnología de los Alimentos de origen animal**

MODALIDAD Revisión Monográfica



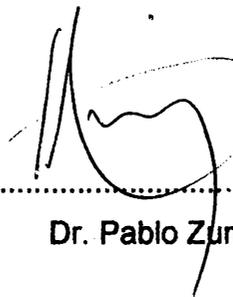
FV/28670



**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**

TESIS aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dr. Pablo Zunino

Segundo Miembro (Tutor):



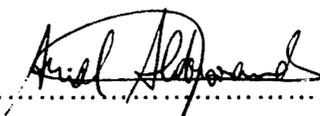
Dra. Rosario de los Santos

Tercer Miembro:



Dr. Juan Pablo Damián

Cuarto Miembro:

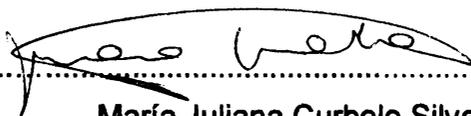


Dr. Ariel Airovandi

Fecha:

30/6/10.

Autor:



María Juliana Curbelo Silveira

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 10 (diez) 

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque todos mis logros son el resultado de sus esfuerzos.

A mi familia, en especial a mi sobrino Cami, por alegrarme en los momentos más difíciles.

A Rosario de los Santos y Ariel Aldrovandi por introducirme en esta interesante forma de vida microbiana la cual desconocía y por su gran tiempo dedicad y a sus hijos por su apoyo.

A Susana Mancebo por hacer del estudio mi prioridad.

A mi novio Cristian Tejera, por estar en las buenas y en las malas.

A Malena Carolina Pintos, porque además de ser una excelente amiga, me dio una mano cuando más la necesitaba.

A todas mis amigas.

A Pablo Zunino, por su colaboración.

A mis compañeros de trabajo, por su apoyo.

Tabla de contenido

Página de aprobación.....	II
Agradecimientos.....	III
Lista de Figuras.....	VI
Resumen.....	1
Summary.....	1
Objetivos.....	2
I. Antecedentes.....	3
II. Biofilm.....	4
A. Concepto de biofilm.....	4
B. Dinámica de formación del biofilm.....	4
C. Composición y estructura del biofilm.....	8
D. La comunicación célula-célula (<i>Quorum sensing</i>).....	8
E. Ecología.....	10
III. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
A. Genómica de <i>S. aureus</i>	12
1. Evolución del core del genoma.....	12
a. Estructura clonal.....	12
b. Recombinación.....	13
c. Diferencias genéticas entre linajes y entre especies.....	14
d. Grupos <i>agr</i>	15
2. Evolución del genoma accesorio.....	16
a. Cassette cromosómico estafilocócico (SCC).....	16
b. Islas genómicas.....	16
c. Islas de patogenicidad del <i>S. aureus</i> (SaPIs) y Profagos.....	16
3. Patogénesis.....	17
a. Dinámica fágica.....	17
b. Expresión y regulación de los factores de virulencia.....	17
IV. Regulación de la formación del biofilm en <i>Staphylococcus aureus</i>	17
A. <i>Quorum Sensing</i> – sistema <i>agr</i>	19
B. Regulación de la producción de limo y formación del biofilm.....	22
1. Biosíntesis de PIA.....	22
a. Genes <i>ica</i>	22
b. SarA.....	23
c. Represor de Toxinas (ROT):.....	24
d. Factor Sigma b (σ^b).....	26
2. Proteínas vinculadas a la formación de biofilm.....	27
3. Proteínas Asociadas al biofilm (Bap).....	27
C. Regulación en la etapa de dispersión.....	29
V. Mastitis.....	30
VI. <i>Staphylococcus aureus</i> , mastitis y biofilms.....	31
VII. Los biofilms en la industria.....	32
A. Biofilms en superficies hidrófilas.....	34
B. Biofilms en superficies hidrófobas.....	34
VIII. Efectividad de distintos métodos de limpieza en la Industria Alimentaria.....	34
IX. Estrategias antimicrobianas.....	35
X. Conclusiones.....	38
Referencias Bibliográficas.....	39

Lista de Figuras

Fig. 1: Etapas de formación de un biofilm.....	5
Fig. 2: Representación circular de cromosomas de cepas de <i>S. aureus</i>	13
Fig. 3: Ilustración de la hipotética evolución histórica del <i>S. aureus</i>	15
Fig. 4: Estructura del <i>S. aureus</i>	19
Fig. 5: Péptido autoinductor para <i>S. aureus</i>	20
Fig. 6: Esquema de funcionamiento del sistema <i>agr</i>	21
Fig. 7: Diferencias clonales en el receptor AgrC.....	21
Fig. 8: Esquema de funcionamiento del sistema <i>ica</i>	23
Fig. 9: Regulación de los determinantes de virulencia en el <i>S. aureus</i>	25
Fig. 10: Rol de SarA en la regulación de la formación de biofilm.	26
Fig. 11: Regulación de biofilm por un mecanismo independiente de <i>ica</i>	28



Resumen

En los últimos veinte años, diversos autores se han dedicado a dilucidar un nuevo tema, importante tanto en medicina veterinaria, como humana, abarcando desde la clínica hasta la industria alimentaria: los biofilms.

Los biofilms constituyen formas de vida multicelular, persistentes, difíciles de eliminar, tanto por el sistema inmune del huésped, como por antimicrobianos.

Los biofilms son comunidades de microorganismos envueltas en su propia matriz que se comunican mediante señales que ellos mismos producen, que van a depender de las condiciones del ambiente en el que estén.

En condiciones favorables estos microorganismos se adhieren a la superficie, se desarrollan y maduran en una modalidad sésil o adherida, la cual se denomina biofilm; y llegan a un punto del ciclo de desarrollo en el cual algunos de los miembros de este complejo se desprenden, pasando a un modo de vida libre o planctónico.

Tienen un complejo sistema de regulación genética, que le permiten a la bacteria detectar y responder a condiciones medioambientales.

En este trabajo, *Staphylococcus aureus* es el microorganismo elegido, debido a que según algunos autores es el más importante y prevalente patógeno asociado a infecciones y por su capacidad de formar biofilms.

Summary

In last twenty years, some scientists have dedicated to elucidate a new important subject, both for human and veterinary medicine, as for food industry and clinical practice: biofilms.

Biofilms consist in multicellular aggregates where bacteria have developed into organized communities, persistent and difficult to eliminate, even for the host immune system and antibiotics.

Biofilms are bacterial communities included on their own matrix, being able to communicate by signals generated by themselves and conditioned by the environment.

As environment allows them, microorganisms can successfully attach to any surface, grow and mature as a biofilm (sessile cells). When biofilm cycle of development leads some cells to detachment, they adopt a free form of life: planktonic cells.

Bacteria have complex genetic regulation systems which allow them to detect and respond to diverse ambient conditions.

In order to perform this revision, *S. aureus* was chosen because researchers describe it as one of the most important and prevalent pathogen associated to infections and its ability of biofilm production.

Objetivos

Revisar y actualizar la información referida a la modalidad de desarrollo de *S. aureus* en biofilms y evaluar su relación con la persistencia en tambos de vacas así como en la industria alimentaria y su asociación con las mastitis crónicas.

Principalmente abordara la información vinculada con *S. aureus*, pero se hicieron comparaciones con *S. epidermidis* por sus semejanzas.

I. Antecedentes

Los biofilms han sido descritos en numerosos sistemas, desde que Van Leeuwenhoek examinó los “animálculos” en la placa de su propio diente, en el siglo XVII. No obstante, el concepto de “biofilm” y su funcionamiento general no fue enunciado hasta 1978, cuando Costerton y col., a partir de trabajos de Gibbons y Van Houte del Forsyth Dental Center, quienes teorizaron al respecto (Costerton y Lewandowski, 1997). Esta teoría establecía que la mayor parte de las bacterias crecen en matrices o biofilms.

Desde la segunda mitad de la década de 1970, el concepto de biofilm ha ido evolucionando. Los hallazgos relativos a dicha evolución han agregado información, que actualmente nos permite una mejor comprensión de estos fenómenos.

- Marshall en 1976 identificó pequeñas fibras muy delgadas de un polímero extracelular que anclaba las bacterias a las superficies (Donlan y Costerton, 2002).
- Costerton y col. en 1978 observaron que comunidades bacterianas en sistemas acuáticos, se hallaban incluidas dentro de una matriz de “glicocalix”, cuya naturaleza se identificó como polisacárida y se estableció su capacidad de adherencia a las superficies (Donlan y Costerton, 2002).
- Costerton en 1987, estableció que el biofilm consistía en células y microcolonias embebidas en una matriz exopolimérica aniónica altamente hidratada (Donlan y Costerton, 2002).
- Characklis & Marshall en 1990 describieron otros aspectos definitorios de los biofilms, tales como su heterogenicidad y su capacidad de adherencia a superficies abióticas (Donlan y Costerton, 2002).
- En 1993, en la reunión anual de la American Society for Microbiology, se definió el concepto del crecimiento del biofilm. Esto marcó un hito de la microbiología moderna (Costerton y col., 1994).
- Costerton y col en 1995, destacaron que los biofilms podían adherirse a superficies y hacer de interfase entre ellos, incluyendo en la definición agregados microbianos, flóculos y poblaciones con capacidad para adherirse a medios porosos (Costerton y Lewandowski, 1997; Donlan y Costerton, 2002).
- Costerton y Lappin-Scott en 1995 establecieron que la adhesión disparaba la expresión de genes que controlaban la producción de componentes bacterianos necesarios para la propia adhesión y para la formación del biofilm, destacando que su proceso de formación estaba regulado por genes específicos transcritos durante la adhesión celular inicial (Donlan y Costerton, 2002).

Se demostró que más del 99.9 % de los microorganismos crecen en la modalidad de biofilm, en las más variadas superficies (Donlan y Costerton, 2002). Las bacterias se adhieren a las mismas en un medio provisto de nutrientes y allí se desarrollan. Estas bacterias inmovilizadas o “sésiles” difieren profundamente de sus contrapartes libres, las células bacterianas planctónicas (Donlan y Costerton, 2002).

Las bacterias poseen ciertas estrategias básicas de supervivencia, que emplean en el lugar donde se encuentran (sistemas industriales y naturales). Forman biofilms dentro de los cuales se hallan protegidos de químicos antibacterianos, bacteriófagos medioambientales y las amebas fagocíticas (Donlan y Costerton, 2002). No sorprende entonces, que las infecciones crónicas del biofilm soporten la antibioticoterapia y sean

particularmente resistentes frente a los mecanismos inmunes del huésped (anticuerpos y fagocitos). Por muchos siglos, los humanos han sufrido de infecciones bacterianas agudas. Las células planctónicas de patógenos especializados atacan nuestros organismos, las que en algunos casos se han controlado mediante vacunas y antibióticos. No obstante, organismos que han sido exitosos por varios millones de años en el medioambiente, han logrado vencer nuestras defensas, usando la estrategia del biofilm. Este los ha protegido muy bien en sus hábitats naturales. De esta forma, patógenos medioambientales que no hubiesen sobrevivido en otros tiempos, se han vuelto peligrosos en la actualidad, generando un problema difícil de combatir en hospitales, hogares y escuelas (Costerton y Lewandowski, 1997).

II. Biofilm

Las bacterias son capaces de tolerar y adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales adversas. El mecanismo primario que facilita esta adaptación es la capacidad de formar y mantener biofilms (Costerton y Lewandowski, 1997; Clutterbuck y col., 2007; Otto, 2008).

Para formar un biofilm es necesario que las bacterias se adhieren a una superficie, donde luego se van a agrupar en complejas comunidades, interactuando a través de señales químicas y logrando una rápida adaptación a los cambios de su entorno (Watnick y Kolter, 2000).

Los microorganismos se hacen entonces resistentes a la respuesta inmunitaria del huésped y agentes antimicrobianos, a los cuales los de vida libre "planctónica" son sensibles. Por ello los biofilms tienen importancia significativa en Ciencia y Clínica Veterinaria (Clutterbuck y col., 2007).

Las células del biofilm difieren de las células planctónicas, en los patrones de expresión genética y probablemente también en la expresión de proteínas (Annous y col., 2009).

Algunas bacterias están unidas formando una estable yuxtaposición de células de la misma especie (biofilm monoespecie) o de especies diferentes (biofilm multiespecie) en microcolonias dentro de una matriz de polisacáridos.

Aunque frecuentemente se denuncian infecciones bacterianas en los animales, su relación con la formación de biofilms es raramente discutida.

Por lo tanto es importante conocer su relevancia en Medicina Veterinaria (Clutterbuck y col., 2007).

A. Concepto de biofilm

El biofilm es una comunidad de células bacterianas sésiles, encerradas en una matriz propia de polisacáridos extracelulares, que permite que se adhieran unas a otras y a superficies vivas o inertes. Además exhiben un fenotipo diferente a las planctónicas (Jin y col., 2006; Clutterbuck y col., 2007; Donlan y Costerton, 2002).

Las bacterias planctónicas son importantes para la proliferación y diseminación, y las poblaciones de bacterias sésiles son necesarias para persistir como reservorio.

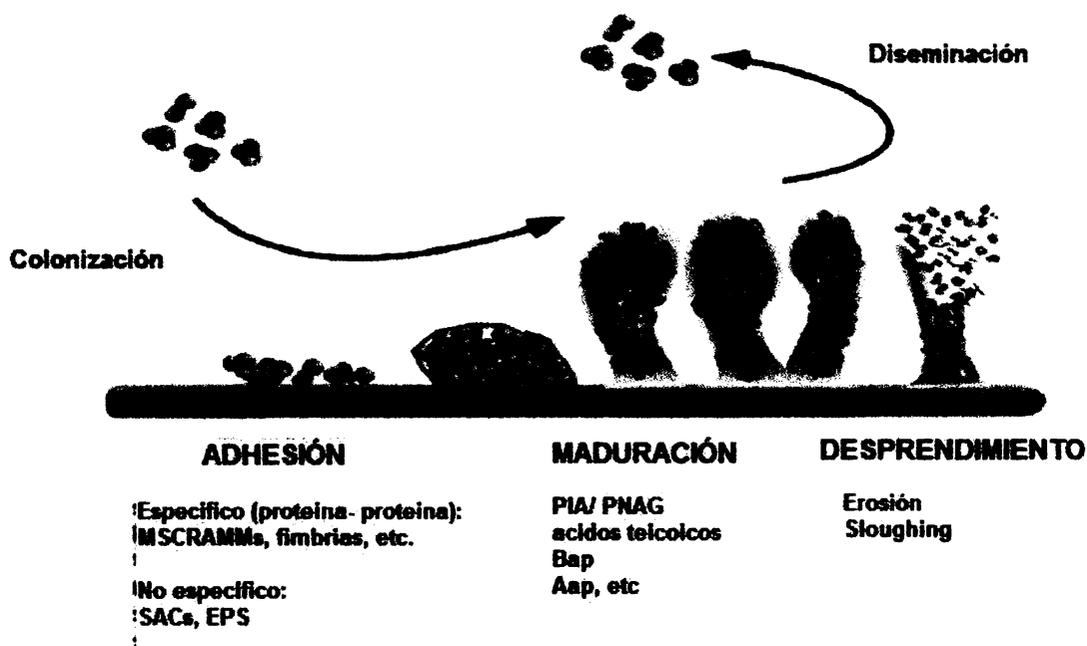
B. Dinámica de formación del biofilm

La formación del biofilm es un proceso altamente complejo y dinámico, que involucra el pasaje de una forma libre a un modo adherido de crecimiento (Clutterbuck y col., 2007).

La formación de biofilm en una superficie, puede describirse según distintos autores en tres, cuatro o cinco etapas, si bien la dinámica de los procesos biológicos no es tan estructurada (Zottola, 1994; Donlan y Costerton, 2002; Jin y col., 2006; Clutterbuck y col., 2007; Otto, 2008).

Etapas:

- de adhesión microbiana,
- de crecimiento/maduración (proliferación y estructuración u organización) y
- de desprendimiento y desagregación.



Tomado de Otto, 2008

Fig. 1: Etapas de formación de un biofilm.

Las condiciones medioambientales pueden estimular o no la formación del biofilm. Se necesitan ciertas condiciones de pH, temperatura y nutrientes para su formación.

El paso inicial es adherirse a la superficie, algunas bacterias planctónicas usan flagelos para su movilidad, con los cuales nadan a lo largo de las superficies y al hacer contacto forman una monocapa de células. Para adherirse las bacterias planctónicas usan fimbrias y componentes extracelulares (proteínas de superficie, sustancias poliméricas extracelulares), que le permiten hacer contacto y formar dicha monocapa (Costerton y Lewandowski, 1997).

La primera fase de la adhesión es reversible e involucra interacciones celulares mediadas por polaridad (Clusterbuck y col., 2007) y fuerzas de Van der Waals (Zottola, 1994).

La segunda fase es irreversible, la cual está vinculada a la producción de sustancias importantes para la cohesión y la adherencia a las superficies.

Neu (1996) encontró una serie de sustancias en varias bacterias a las cuales denominó SACs: Componentes Activos de Superficie. Estos compuestos son de naturaleza lipídica y atípicos ya que poseen regiones hidrófobas e hidrófilas. Debido a dichas propiedades, las bacterias pueden modificar su capacidad de adhesión a las

superficies. Se reconocen distintos tipos de SACs: biosurfactantes, polímeros anfífilicos (de alto peso molecular) y polímeros polifílicos que se han evidenciado en distintas especies bacterianas *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (Neu, 1996; Yao y col., 2005).

Se identificó un grupo de sustancias llamadas sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que están compuestas por diversos tipos de moléculas, entre ellas: proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos. Son recursos que permiten a las bacterias adherirse a superficies abióticas. Gehrke y col. (1998), investigaron que la fracción lipopolisacárida de las EPS está particularmente involucrada en la adherencia a los sustratos sólidos. Los cuales tienen propiedades de adhesión que se mantienen desde las primeras fases del desarrollo del biofilm hasta la fase siguiente (Gibson y col., 2006; Ahimou y col., 2007).

Las proteínas y los polisacáridos, están vinculados con el perfil de la energía cohesiva entre el biofilm y la superficie a la que se unirá, permitiendo también una alta oxigenación de la matriz. Los polisacáridos también juegan un rol clave en la inclusión de diferentes microorganismos (Zottola, 1994; Ahimou y col., 2007).

Salmonella enterica serovar *enteritidis*, produce sustancias y estructuras de adhesión: delgadas fimbrias agregativas, celulosa, y otros EPS no caracterizados (Gibson y col., 2006)

En las superficies vivas y los alimentos la adherencia a una matriz proteica representa el primer paso en la formación del biofilm.

Distintos organismos tienen distintas formas de adherirse a distintas superficies:

En *Proteus mirabilis*, principal responsable de las infecciones urinarias asociadas al uso de catéteres, las fimbrias tendrían un papel en la adhesión (Jansen y col., 2004) En *Pseudomonas spp.* son los flagelos y las fimbrias tipo IV los que tienen una gran importancia; *Pseudomonas aeruginosa* se adhiere mediante fimbria tipo IV a las células de la córnea (Zolfaghar y col., 2003; Head y Yu, 2004).

S. epidermidis y *S. aureus* no sólo se unen a las superficies plásticas, sino que también poseen factores de adherencia que los unen a los componentes de la matriz extracelular para iniciar la colonización. Esta adherencia es mediada por adhesinas proteicas que son componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMM) y en algunos casos se unen covalentemente a peptidoglicanos. Ejemplos de esto, son: las proteínas A y B, que son proteínas de unión a las fibronectinas; proteína de unión a colágeno (Götz, 2002).

MSCRAMMs tienen una estructura que muestra tres dominios: uno de unión, expuesto, otro que se une a la pared celular dentro del cual a veces, la estructura se repite, y el tercero es responsable de la adherencia (covalente o no covalente) a la proteína. La adherencia covalente es catalizada por una familia de enzimas, llamadas sortasas, que conectan los MSCRAMMs al peptidoglicano. La sortasa A es la más importante y reconoce una secuencia aminoacídica LPXTG, que está en el dominio de unión, y es el que se une a las proteínas (Otto, 2008).

El ejemplo más importante de la adherencia no covalente son las autolisinas. Las autolisinas son las proteínas de superficie más abundantes de *S. aureus*. Se sugiere que están unidas al ácido teicoico de forma no covalente, y facilitan la adherencia a plásticos y superficies vivas.

Una vez que la adhesión se hace irreversible, se desarrolla la matriz y el biofilm comienza a crecer y madurar. Ello incluye el desarrollo de la matriz de exopolímeros, la unión célula-célula y la formación de la arquitectura del biofilm. Se caracteriza por la formación de un agregado intercelular, compuesto por una variedad de moléculas como proteínas adhesivas, polisacáridos y exopolímeros. Éstas le otorgan la apariencia típica tridimensional de un biofilm maduro: de hongo o de torre (Clutterbuck y col., 2007).

En *S. aureus*, la principal molécula responsable de la adhesión intercelular es el Polisacárido de Adhesión Intercelular (PIA) también llamada poli N-acetil glucosamina (PNAG). Junto con los ácidos teicoicos, ésta forma la mayor parte del llamado *slime* (limo), la matriz extracelular del biofilm de *Staphylococcus spp* (Otto, 2008).

En algunas bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, el polisacárido de adhesión intercelular es el alginato, polímero compuesto de ácido malurónico y ácido glucurónico, el cual cumple el mismo rol que el anteriormente mencionado (Hoyle y col., 1990).

Sauer y col., dividen la maduración del biofilm por *Pseudomonas aeruginosa* en dos fases: maduración 1 y maduración 2.

Maduración 1: involucra una regulación genética y existe marcada diferencia fenotípica entre células sésiles y planctónicas (Sauer y col., 2002).

Maduración 2: El máximo espesor del biofilm se alcanza durante esta etapa donde se establece la mayor diferencia entre células sésiles y planctónicas (Sauer y col., 2002).

Las bacterias del biofilm son fenotípicamente diferentes a las planctónicas de la misma especie. Las células planctónicas sólo se relacionan transitoriamente con otras células, mientras que las bacterias de un biofilm viven en comunidades microbianas. Los nutrientes y los productos finales de las células planctónicas pueden ser transportados por difusión o convección, pero en los biofilms bacterianos, las bacterias viven en microambientes cubiertos por una matriz extracelular, cuyas propiedades dependen, de la difusión limitada y la actividad metabólica de las células adyacentes (Costerton y col., 1994).

En la llamada etapa de dispersión se produce la liberación de las células planctónicas desde el biofilm. Durante la dispersión se observa que las células nadan desde el interior de las células agrupadas dejando un hueco en el centro de la estructura y una barrera de bacterias no móviles. El desprendimiento celular está dividido en dos procesos conocidos: erosión y sloughing o muda. La erosión se refiere al continuo desprendimiento de pequeñas porciones del biofilm mientras que la muda implica una rápida y masiva pérdida de células desde el biofilm, la cual ocurre de forma menos frecuente. Las células se desprenden como resultado del crecimiento volviéndose planctónicas. Son diferentes las células de muda que retienen las características que presentaba el biofilm como la resistencia a los antimicrobianos. El desprendimiento está relacionado con una disminución de nutrientes, en respuesta a señales químicas entre las células bacterianas (Clutterbuck y col., 2007).

El desprendimiento de las células bacterianas es crucial para la diseminación de las bacterias y colonización de nuevos sitios (Otto, 2008). Como ejemplo podemos observar la colonización de las válvulas cardíacas, a partir de bacterias provenientes de biofilms de la placa dental (Costerton y Lewandowski, 1997).

De este modo las bacterias se vuelven planctónicas sensibles a la defensas del huésped y a los antibióticos, pero a su vez son productoras de toxinas y/o capaces de expresar virulencia (Stoodley y col, 2001).

C. Composición y estructura del biofilm

121

Recientemente con técnicas avanzadas como la microscopía de escaneo laser confocal (CLSM) y técnicas nuevas de microscopia electrónica, se pudo examinar la estructura del biofilm. La microscopia confocal permitió observar los biofilms con su matriz intacta; requiere que los microorganismos se tiñan con colorantes fluorescentes y se usa para identificar células con características diferentes (Donlan y Costerton, 2002).

El ámbito en el que se desarrolla el biofilm es una matriz de exopolisacáridos, altamente hidratada cuya composición depende de la especie bacteriana. Esta matriz es heterogénea. Posee una serie de micronichos, que albergan células microbianas, organizadas en microcolonias donde conviven una o más especies (Costerton y col., 1994). Posee también canales que permiten el flujo de agua y sustancias disueltas. Los canales que se encuentran en la estructura del biofilm permiten el flujo de material genético entre los microorganismos vecinos (transferencia horizontal) así como el intercambio de nutrientes para acceder a una biomasa que permite el crecimiento del biofilm, estos canales llenos de fluidos tienen vital función en la entrega de nutrientes a las células que se encuentran en las capas más profundas del biofilm (Clutterbuck y col., 2007; Otto, 2008).

La densidad de la matriz es mayor alrededor de las microcolonias productoras de los polímeros, y más baja entre ellas (Costerton y Lewandowski, 1997).

El desarrollo relativo de una célula bacteriana dentro del biofilm, depende del acceso que tenga a los nutrientes y al oxígeno así como de la posibilidad de eliminación de sus desechos (Costerton y col., 1994).

La estructura de hongo permitiría una máxima accesibilidad a los nutrientes y una mínima exposición a detritos metabólicos (Costerton y Lewandowski, 1997).

La alta hidratación de la matriz previene de la desecación letal a los microorganismos y al perder un poco de agua se forma una capa superficial dura que evita la evaporación y las protege (Clutterbuck y col., 2007).

Dentro del biofilm las bacterias son capaces de desarrollar un pool de enzimas necesario para degradar el sustrato y solo cuando poseen dicho pool completo, son capaces de degradarlo y producir huecos (Costerton y Lewandowski, 1997).

Dentro de las microcolonias existen canales por los cuales circula agua, nutrientes y metabolitos, conformando una especie de "aparato circulatorio" que sugiere un grado de organización que recuerda a organismos eucariotas multicelulares primitivos.

En los centros de las microcolonias celulares existe menos oxígeno disuelto, y en los canales de agua el oxígeno disuelto es superior (Costerton et al, 1994).

Los componentes principales de un biofilm son: agua, polisacáridos, material genético, proteínas y células bacterianas (Donlan y Costerton, 2002; Clutterbuck y col., 2007).

D. La comunicación célula-célula (*Quorum sensing*)

La comunicación célula-célula juega un importante rol en el desarrollo de la estructura del biofilm desde que comienza la adherencia.

Las bacterias en condiciones naturales se encuentran formando comunidades, dentro de las cuales se comunican por señales químicas pertenecientes a mecanismos intercelulares llamados *Quorum Sensing* (QS). Las bacterias liberan, detectan y responden a la acumulación de estas moléculas, llamadas autoinductores. Este proceso llamado *quorum sensing* permite a las bacterias coordinar el control de la

expresión de genes de toda la comunidad.

La detección de autoinductores permiten que estas bacterias distingan densidades de población altas y bajas y en respuesta a ello controlen la expresión de sus genes (Schauder y Bassler, 2008). Ejemplos de los procesos celulares modulados por el QS son la simbiosis, la transferencia de plásmidos conjugados, la esporulación, la síntesis de péptidos antimicrobianos, la regulación de virulencia y la formación de biofilms (Annou y col., 2009).

Además el QS tiene como función controlar la población que se encuentra dentro del biofilm, usando diferentes mecanismos promueve la dispersión o disolución de la sub población de células. A veces puede inducir autólisis, o alterar el desarrollo del biofilm, a través de la producción de factores secretados como exopolisacáridos u otras adhesinas (Irie y Parsek, 2008; Clutterbuck y col., 2007).

El QS juega un rol importante en la patogenia de ciertos organismos regulando la expresión de determinantes de virulencia, afectando negativamente las defensas del huésped. También está involucrado en el espesor del biofilm (Clutterbuck y col., 2007)

QS existe tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, con diferencias obvias entre ambas. Por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* la comunicación célula-célula es requerida para formar un biofilm con un gran espesor bajo ciertas condiciones de crecimiento. Pero ocurre lo opuesto en *S. aureus*, debido a que cuando se activa el *quorum sensing* impide la adherencia y el desarrollo del biofilm (Clutterbuck y col., 2007).

Las señales químicas del *quorum sensing* difieren entre grupos bacterianos, las bacterias Gram negativas utilizan lactonas mientras que las Gram positivas utilizan péptidos.

Las bacterias Gram negativas poseen dos componentes primarios del sistema QS: el autoinductor o señal molecular (AI) que corresponde a moléculas pequeñas, difusibles y autogeneradas y el activador transcripcional, o Proteína R (Murray, 1997).

Si las concentraciones celulares son bajas la cantidad de autoinductor presente no es detectada, cuando su concentración supera determinado umbral se activa la proteína R, la cual induce la transcripción de genes blanco (Kievit e Iglewski, 2003).

En la mayoría de los microorganismos Gram negativos, las señales moleculares son homoserin-lactonas aciladas (acil-HSL). Dichas señales están formadas por una cadena acil C4 a C14 unida por un enlace amido a una homoserina-lactona (HSL) (Irie y Parsek, 2008; Schauder y Bassler, 2001).

Las bacterias Gram negativas como el *V. fischeri* poseen un operon luciferasa que es regulado por dos proteínas, LuxI que es responsable de la producción del autoinductor HSL, las pequeñas cadenas laterales HSL difunden libremente cruzando membranas celulares, las cadenas laterales largas se escinden para atravesar la membrana y requieren flujos activos para exportar la señal, dichas señales son percibidas por un receptor citoplasmático dependiente de ADN (familia LuxR). Y LuxR es activado por el autoinductor para aumentar la transcripción del operon luciferasa. LuxR regula la transcripción de genes relacionados con una variedad de fenotipos. Esto incluye la producción de antibióticos, la motilidad, patogénesis y la formación de biofilm (Reading y Sperandio, 2006; Irie y Parsek, 2008).

La señal en las bacterias Gram positivas se produce a través de péptidos auto inductores. Un ejemplo son los péptidos de señal de competencia (CSP), usados por

los estreptococos, la acumulación de ellos produce autólisis, liberando al ADN cromosómico en el ambiente. También usan el ADN de las células vecinas para promover la transferencia horizontal de genes (Steinmoen y col, 2002).

En general el sistema de señales basado en péptidos autoinductores funciona de la siguiente manera: las señales consisten en péptidos de entre 5 y 87 amino ácidos, algunos de los cuales están modificados, generalmente formando lactonas o tioalactonas. De esta manera las señales están bastante diferenciadas y les dan estabilidad en el ambiente extracelular. Dichas señales pueden ser traducidas tanto a nivel de la membrana celular como en el citoplasma. La traducción activa un mecanismo de dos reguladores que hacen blanco en promotores de la expresión genética del quorum sensing. Todas estas etapas tienen asociadas fosforilaciones lo que implica gasto de energía (Kleerebezem y col, 1997; Irie y Parsek, 2007; Schauder y Bassler, 2001).

E. Ecología

El crecimiento dentro del biofilm proporciona una sinergia de especies bacterianas, facilitando la cooperación metabólica y la transferencia de sustratos (Costerton y Lewandowski, 1997).

Los biofilms naturales existen como un consorcio multiespecies, donde la interacción beneficia una o más de ellas, mediante diferentes formas como protección cuando son expuestas a componentes antimicrobianos. Esta última es causada por varios factores que incluyen: complementación enzimática, y una organización espacial de células en el biofilm. Es probable que éstos y otros mecanismos, le otorguen efectos sinérgicos que resulten en la formación cooperativa de biofilm por cepas incapaces de formarlos por sí mismos (Cowan y col., 2000; Burmolle y col., 2006).

Los biofilms multiespecies en comparación con los de especies simples, tienen ventajas. Una ventaja es definida como la habilidad del organismo o del biofilm de persistir y crecer en un determinado ambiente o bajo ciertas condiciones particulares de estrés.

También pueden haber interacciones negativas en los biofilms multiespecies en las que un miembro del consorcio encuentra una ventaja y expresa mecanismos inhibitorios como ser la producción de toxinas y/o reducción del pH (Burmolle y col, 2006)

Un ejemplo de ventajas de los biofilm multiespecies son las relaciones de sinergia, de acuerdo al trabajo realizado por Burmolle y col., (2006). Estos autores sometieron a biofilms monoespecie y multiespecies a distintas situaciones de estrés (peróxido de hidrógeno, tetraciclina, invasión por *Pseudoalteromonas tunicata*), resultando con ventajas este último, el cual resistió mejor a las tres situaciones, respecto al monoespecie. Esto fue posible por la interacción de los polímeros de matriz diferentes que resultaron en una matriz más viscosa. El incremento de la viscosidad, sugiere una posible explicación para la gran resistencia a desinfectantes de algunos biofilms multiespecies. Además, la distribución espacial, organizada específicamente de las células en el biofilm está sujeta a especies bacterianas capaces de coexistir. Es posible la protección de bacterias a agentes antimicrobianos por otras especies miembros del biofilm. Leriche y col., 2003, encontraron en los biofilms que coexisten en estructuras mixtas, que aquellas especies susceptibles cuando son expuestas a condiciones de estrés, son protegidos por las especies más resistentes del biofilm, mediante una reorganización espacial (Leriche y col, 2003).

III. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una especie bacteriana Gram positiva con forma de coco de 0,5-1,5 μm de diámetro, que se dividen en más de un plano y se agrupa irregularmente en racimos. Posee cápsula y carecen de esporos. Son inmóviles y aerobios facultativos.

Produce enzimas coagulasa, catalasa, termonucleasa, β -lactamasa, lipasa, hialuronidasa, enzimas fibrinolíticas, que actúan como factores de virulencia.

Forma colonias grandes y lisas en 24 horas, su pigmentación es amarillenta causada por carotenoides. Es capaz de soportar altas concentraciones de cloruro de sodio y fermentar el manitol. De ahí el uso del medio manitol sal-agar para su aislamiento. En agar sangre, crece bien dando hemólisis completa. Produce varias toxinas y son oportunistas y ubicuos.

Es una especie sensible a la acción del calor (no así su enterotoxina que es termorresistente) y a los desinfectantes en particular cuando se encuentra en forma de vida planctónica (Pascual, 1992; Murray y col., 1997).

S. aureus es una bacteria comensal de la piel y mucosa del hombre y otros mamíferos, por lo tanto es uno de los microorganismos que más frecuentemente infecta los dispositivos médicos. Las cepas de *S. aureus* que forman biofilms son diferentes de aquellas involucradas en infecciones más severas y se hallan en un estatus fisiológico diferente. Las últimas pueden desarrollar un comportamiento agresivo al diseminarse dentro del organismo del huésped (Otto, 2008). Es un patógeno versátil, capaz de causar diversas infecciones en diferentes sitios del organismo. Esta versatilidad es atribuida al impresionante arsenal de factores de virulencia que posee (Saïd-Salim y col., 2003).

Son frecuentemente vinculados a infecciones asociadas a biofilms y causantes de infecciones comunitarias y hospitalarias en hombres y animales (Arciola, 2005; Otto, 2008).

Los factores de virulencia de los que están provistos pueden dividirse en proteínas de superficie celular y proteínas de secreción.

Las proteínas de superficie celular incluyen componentes de la superficie microbiana que les permiten reconocer moléculas de la matriz adhesivas y hacen posible que colonicen los tejidos del huésped, al permitirle al microorganismo evadir el sistema inmune.

Las proteínas secretadas incluyen diversas enzimas que degradan los compuestos con actividad antimicrobiana, así como diferentes hemolisinas que lesionan los tejidos del huésped (Saïd-Salim y col., 2003).

En lo referente a la capacidad de degradar compuestos antimicrobianos, la resistencia a los antibióticos es un claro ejemplo. En 1940 la Penicilina G era el tratamiento de elección para las infecciones causadas por este microorganismo, aunque desde 1960 aparecen cepas resistentes a las penicilinas, resistentes a la meticilina y antibióticos de la misma familia y se hacen frecuentes en todo el mundo.

Estas cepas han sido llamadas históricamente *S. aureus* meticilinoresistente (MRSA) y son también resistentes a todos los β -lactámicos. Recientemente, se han transformado en multirresistentes presentando resistencia a macrolidos y lincosamida y frecuentemente a tetraciclina y gentamicina, la resistencia al trimetoprim y a

sulfonamida también se ha hecho prevalente en algunos países (Feng y col., 2008).

S. aureus posee en su estructura:

- **Cápsula de polisacáridos:** facilita la adherencia a catéteres, prótesis y otros materiales sintéticos, y es una forma de protección contra las defensas del huésped.
- **Capa de peptidoglicanos:** es el componente principal de la pared celular. Las cadenas de glicano están constituidas por 10 a 12 subunidades alternantes de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Esta capa tiene actividad similar a una endotoxina.
- **Proteína A:** tapiza la superficie del *S. aureus* coagulasa positivo. Se une de forma covalente a la capa de peptidoglicanos y tiene afinidad por receptores de inmunoglobulinas, por lo que evita la eliminación inmunógena del microorganismo, mediada por anticuerpos.
- **Acido Teicoico:** se trata de polisacáridos complejos, que contienen fosfatos unidos a la capa de peptidoglicano y a la membrana citoplasmática. Son específicos de especie. El ácido teicoico ribitol con residuos de N-acetil glucosamina (polisacárido A), se encuentra en *S. aureus*. La adherencia de los estafilococos a las superficies mucosas está mediada por los ácidos teicoicos de la pared celular a través de su unión específica con la fibronectina.
- **Factor de agrupamiento o coagulasa de unión:** esta proteína se une al fibrinógeno y puede hacer que los estafilococos formen grumos o se adhieran.
- **Membrana citoplasmática:** es un complejo de proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de hidratos de carbono, que forman una barrera osmótica para las células y proporcionan un sitio de anclaje para las enzimas biosintéticas y respiratorias celulares (Murray y Brace, 1997).

A. Genómica de *S. aureus*.

1. Evolución del core del genoma

a. Estructura clonal

La población de *S. aureus* presenta una estructura altamente clonal que interfiere en los intercambios genéticos entre linajes. Su clonalidad es el resultado de un mecanismo crítico que sólo permite una evolución clonal a largo plazo. Debido a ello no le está permitida una movilidad arbitraria de los elementos génicos móviles. Se hace notoria la dificultad en el laboratorio de manipular genéticamente a este microorganismo debido al rechazo que sufren los plásmidos exógenos.

En *S. aureus* existe un sistema de Restricción a la Modificación (RM) que controla estrictamente la adquisición de todo tipo de ADN foráneo ya sea por transducción, conjugación o transformación. Por otra parte, protege a la célula bacteriana de la lisis por fagos.

En *S. aureus*, los sistemas RM son de 2 tipos, $vSa\alpha$ y $vSa\beta$ y se hallan en las islas genómicas. Estas islas están en todas las cepas de *S. aureus* y los genes *hsdS* en los sistemas RM varían entre linajes y son responsables de la especificidad de la

secuencia.

Se especula con que el sistema RM juega un importante rol en el mantenimiento de la estructura clonal de *S. aureus*.

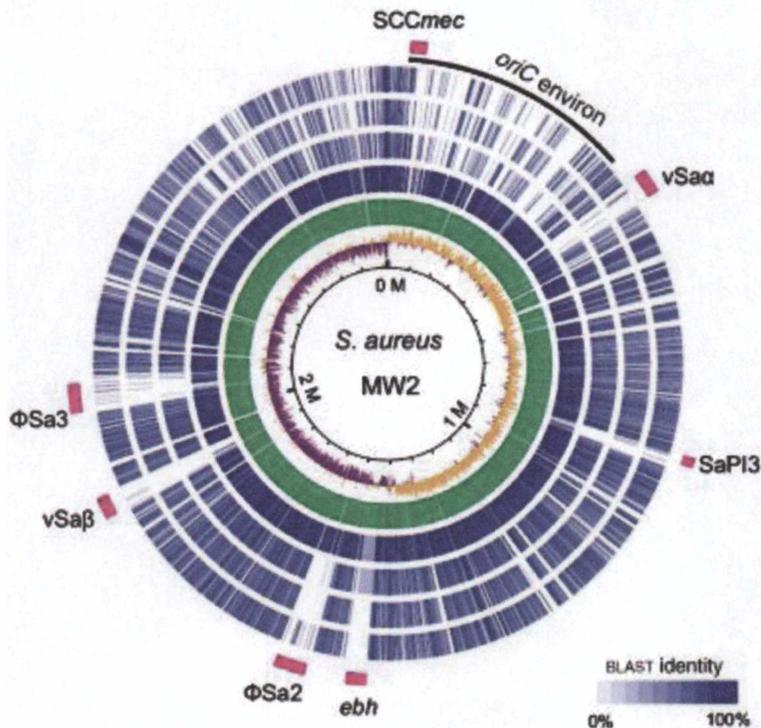


Fig. 2: Representación circular de cromosomas de cepas de *S. aureus*.

La región magenta de afuera representa los elementos genéticos, móviles y un gen que codifica proteínas ancladas a la superficie (*ebh*); la línea curva negra representa (*oriC- environ*) que activa la *SCCmec* y ocupa 0,4 Mbp en el cromosoma. los cuatro círculos azules de afuera representan ortólogos de *MW2*'2, que codifican secuencias de *Staphylococcus epidermidis* RP62a y *S aureus* MRSA252. El círculo verde codifica secuencias *MW2*'s. El de más adentro representa la parte GC (anaranjado positivo y lo púrpura negativo).

Esta figura ha sido extraída de Feng y col, 2008.

b. Recombinación

Si bien la recombinación en *S. aureus* posee una baja frecuencia, es importante la significación que posee en la patogénesis del mismo. La mayoría de los genes involucrados en la recombinación están relacionados a la patogénesis ya que codifican la estafilocoagulasa, exotoxinas, enterotoxinas y proteínas que se unen al fibrinógeno.

La estafilocoagulasa es una proteína extracelular característica que permite la clasificación de las infecciones por *S. aureus*. Las relaciones filogenéticas entre gen que codifica la estafilocoagulasa (*coa*) no parece ser la misma que entre las regiones que la flanquean a los genes housekeeping habitualmente usados para la secuencia tipo MLST (multilocus sequence typing), indicando que puede haberse transferido horizontalmente entre linajes (Feng y col, 2008).

La recombinación puede llegar, en ocasiones, a cambiar la estructura clonal. La

relación entre la Secuencia Tipo (ST) no es siempre consistente, aún entre los siete loci housekeeping usados en los métodos de tipificación, que definen el perfil alélico y el complejo clonal al que pertenecen los aislamientos realizados. Más de la mitad de estas incongruencias se localizan en el locus *arcC*, debido a su proximidad con tres genes de virulencia putativos. Estos últimos codifican proteínas expuestas a la respuesta inmune del huésped y son un “hot spot” en lo referente a la introducción de diversidad genética en la adaptación a la presión de selección. Aunque se han observado amplios cambios en el cromosoma del *S. aureus*, éstos raramente ocurren naturalmente (Feng y col, 2008).

c. Diferencias genéticas entre linajes y entre especies

Aproximadamente el 78% de los genes se conservan entre cepas y forman el llamado core del genoma. El 22% restante corresponde al genoma accesorio y en él se encuentran las islas genómicas, los islotes de patogenicidad, profagos, plásmidos integrados y transposones.

El core del genoma no es siempre estable. Algunas regiones son excepcionalmente variables entre linajes. Se puede distinguir un core variable y un core estable por análisis de microensayos.

Muchos genes del core variable codifican factores de virulencia involucrados en la patogénesis (toxinas, superantígenos, exoenzimas y elementos regulatorios).

Los genes del core variable tienen un mayor índice en sustitución de nucleótidos además de un número variable de repeticiones en tandem, de las cuales las más estudiadas son aquellas que codifican los componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas adhesivas de la matriz (MSMRAMM). Estas últimas median la adherencia a los componentes de la matriz extracelular del huésped. Un cierto número de MSMRAMM son característicos de las repeticiones de péptidos y son propensos a permitir ciertos errores en la replicación o inducir recombinación en los loci.

Esta hipervariación en los genes que codifican la virulencia es debida a la competencia que se plantea con el sistema inmune del huésped y a que no forman parte crítica del metabolismo bacteriano.

Cuando se comparan el *S. aureus* con otros *Staphylococcus* coagulasa negativos se observa que una gran proporción de genes se conservan tanto en orden como en secuencia.

Sin embargo, existe una pequeña región de 0,4 Mbp cercano al cassette cromosómico del *S. aureus* que presenta muy poca homología entre especies, en la cual se localizan muy importantes genes específicos del *S. aureus*. Takeuchi y col. (2005), la designaron como “*oriC* environ” y se especula con que se relaciona con eventos de inversión del cromosoma dentro del género *Staphylococcus* y ha hecho una gran contribución a la evolución y diferenciación de las especies de *Staphylococcus*.

Ninguno de los profagos, islas genómicas e islas de patogenicidad que regulan genes de toxinas están presentes en las cepas coagulasa negativas lo que parece ser la razón por la cual *S. aureus* los supera en virulencia.

También las adhesinas y exoenzimas son diferentes entre especies. En contraste, el *agr* y el *sarA* que son los responsables globales de la regulación de los factores de virulencia del *S. aureus* se conservan en todas las especies de estafilococos.

En teoría, la mayoría de las toxinas y otros factores de virulencia específicos de *S.*

aureus emergieron luego de la especiación determinando la coevolución de *agr* y *sarA* con ciertos factores de virulencia. Otros al ser extemporáneos a esta co-evolución (enterotoxinas A y K) no pueden ser regulados por ellos (Feng y col, 2008).

d. Grupos *agr*

Para adentrarse en el estudio de las relaciones entre las especies de *S. aureus*, aún aquellas no secuenciadas, se usa una secuencia concatenada de alelos MLST para reconstruir el árbol filogenético. Basados en el MLST, la secuencia de genes *SAS* y el *agr* se hipotetizó con la existencia de 2 subespecies ambas conteniendo grupos *agr* I, II y III.

La parte esencial de esta hipótesis radica en el locus *agr*. Este permite un fenómeno de interferencia bacteriana por el cual cepas de diferentes especies o linajes se excluyen mutuamente en los sitios de colonización o de infección. El *agr* codifica un sistema de dos señales que activa el ligando de un péptido autoinductor (AIP).

Existe polimorfismo en la secuencia del AIP y el receptor correspondiente permite la clasificación en 4 grandes grupos. Dentro de un mismo grupo, cada cepa produce un péptido que puede activar la respuesta del *agr* en miembros de otras cepas. Los AIP pertenecientes a otros grupos son mutuamente inhibitorios. Sin embargo las especies no están subdivididas en 3 o 5 grupos monofilácticos de *agr*. Cepas del mismo grupo no están relacionadas unas con otras. Se ha propuesto que la evolución del *S. aureus* incluye tres fases. La fase inicial es el evento de especiación que da origen al *S. aureus*. La segunda fase es la divergencia del *S. aureus* en 2 grupos de subespecies, cada una con *agr* I, II y III. La tercera fase consiste en la divergencia del *agr* I y IV dentro de las subespecies del grupo I y por último la fase final es un evento de recombinación entre *agr* I y IV resultando el *agr* I-IV.

No está claro dónde la divergencia de los 2 grupos de subespecies precede a la divergencia de los grupos *agr*. Se puede especular que pudieron existir otros eventos importantes en la evolución del *S. aureus*. El complejo clonal (CC) debió haber aparecido luego de la divergencia de los 3 grupos ya que parece imposible que el *agr* primitivo fuera capaz de contener en las mismas variantes *agr*, diferentes linajes a la vez.

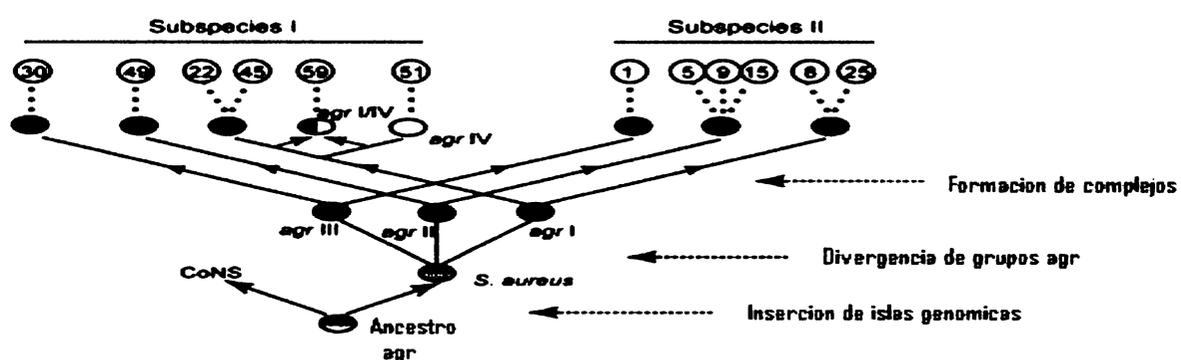


Fig. 3: Ilustración de la hipotética evolución histórica del *S. aureus*.

Los círculos con colores diferentes, representan los diferentes grupos *agr*, y los círculos con números dentro representan el complejo clonal correspondiente. Las flechas de la derecha indican las fases importantes durante la evolución del *S. aureus*. **Esta figura fue modificada de Feng y col, 2008**

2. Evolución del genoma accesorio

a. Cassette cromosómico estafilocócico (SCC)

La resistencia a la meticilina es el resultado de la presencia de una proteína de unión a la penicilina modificada que posee reducida afinidad hacia la meticilina y otros antibióticos β -lactámicos pero que sin embargo conserva las funciones críticas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis celular.

b. Islas genómicas

Las dos islas *vSa α* y *vSa β* , se encuentran en casi todos los aislamientos de *S. aureus*, así sean divergentes desde el punto de vista clonal, geográfico y causa de diferentes enfermedades. La *vSa α* codifica un cluster de superantígeno proteico designado como *ssl* cluster y un cluster de lipoproteínas llamado *lpl* y la isla *vSa β* codifica un cluster de serin-proteasa, *spl* y un cluster de enterotoxina, todos estos cluster son factores de virulencia especialmente el gen cluster de enterotoxina que es causante de una enfermedad transmitida por alimentos contaminados.

Aunque ambas islas genómicas aún siguen en evolución activa su frecuente recombinación y eventos de delección llevan a una variación en el número de copias de los genes de toxina entre distintas cepas aisladas. Por ejemplo se encontró que dentro de un cluster de gen de enterotoxina la mayoría de los aislamientos llevaban dos pseudoenterotoxinas, mientras que en algunos pocos la recombinación entre dos pseudogenes dio como resultado la aparición de nuevas toxinas. Sin embargo la acumulación de genes de virulencia no necesariamente le confiere al microorganismo una ventaja frente a la presión de selección.

c. Islas de patogenicidad del *S. aureus* (SaPIs) y Profagos

Son ambas, importantes factores de virulencia que incluyen la estafiloquinasa, enterotoxina, toxina del síndrome de shock tóxico y Leucocidina Pantón-Valentine (PVL). La transferencia horizontal de las islas es responsabilidad de fagos específicos. La *SaPI I* puede ser escindida y circularizada por el fago 13 y el 80 alfa, ser encapsulada en las pequeñas cabezas fágicas y replicarse traduciéndose con muy alta frecuencia. Las *SaPI II* y la *SaPI III* también pueden escindirse de los cromosomas y formar ADN circular extracromosómico. Muchos de los genes contenidos en la *SaPI* son homólogos a los que se describen en los genes fágicos, sugiriendo que provienen de un bacteriófago. La isla de patogenicidad del *S. aureus* es dependiente de un fago facilitador de tipo salvaje para su escisión, envoltura y movilización. Las islas de patogenicidad, los profagos y los fagos poseen estructura en mosaico. Los genes de los fagos se clasifican en 6 categorías: de replicación del ADN, de integración, de envoltura, cabeza, cola y lisis. Se distribuyen en módulos funcionales y se postula que cada módulo puede tener una historia evolutiva relativamente independiente debido a que un módulo encontrado en un fago puede ser remplazado por el de otro fago siempre y cuando cumpla una función semejante o relacionada (Feng y col, 2008).



3. Patogénesis

a. Dinámica fágica

Muchos de los genes que codifican las toxinas del *S. aureus* se localizan en las islas de patogenicidad y en los profagos, por lo tanto existe una importancia aparente en la dinámica fágica. Las cepas comensales tienen una frecuencia de transformación muy lenta, pero en contraste las cepas patógenas tienen una actividad fágica alta y una plasticidad genómica elevada. Aislamientos isogénicos con presencia o no de fagos, difieren en la capacidad para causar enfermedad. Los genes que codifican las toxinas no pueden acumularse ilimitadamente dentro del cromosoma, ya que los elementos móviles son mutuamente excluyentes. Aunque la transferencia de elementos móviles no se permite entre linajes cruzados (sistemas de restricción a la modificación tipo 1 y 2) sí se permite entre secuencias del mismo tipo. Todavía se desconoce exactamente el sistema de restricción tipo 1 del *S. aureus*, pero como el tipo 2 restringe el flujo de genes todavía no está claro (Feng y col., 2008).

b. Expresión y regulación de los factores de virulencia

Se ha identificado un determinado número de genes de virulencia en el genoma del *S. aureus*, con la habilidad de causar diferentes enfermedades. Lo que no se sabe es cuáles son necesarios para cada infección.

Del punto de vista clonal las cepas aisladas de enfermos o portadores asintomáticos no son diferentes. Se supone que no se trata de dos tipos de organismos distintos, sino del mismo organismo en diferente estado. Cuando el *S. aureus* cambia de comensal a patógeno, tiene que enfrentar un medio ambiente totalmente diferente y soportar un sistema defensivo del huésped mucho más severo.

Se vio que en condiciones de cultivo *in vitro* la mayor parte de los genes involucrados en la transcripción y biosíntesis proteica y maduración dominan la expresión génica de la bacteria, sin embargo, cuando el microorganismo es fagocitado por neutrófilos este perfil cambia a los genes relacionados con la patogenicidad, es decir aquellos genes involucrados en la virulencia, metabolismo, síntesis de cápsula y regulación de los genes.

La dinámica fágica también puede intervenir en la transformación de comensal a patógeno, aunque los factores de virulencia de los fagos no expresan su patogenicidad en forma independiente.

Teóricamente las cepas de un mismo linaje poseen un mismo grupo de genes variables dentro del core y comparten el mismo pool de islas de patogenicidad y fagos para el intercambio. Entonces podríamos pensar que serían capaces de infectar a la misma población causando la misma enfermedad, sin embargo, no todas las cepas son igualmente virulentas. Aunque cada linaje posea igual set de genes en la porción variable del core, existen otros requisitos como la posibilidad de crecimiento y la habilidad para sobrevivir que determinarán qué clon se convertirá en un patógeno exitoso (Feng y col., 2008).

IV. Regulación de la formación del biofilm en *Staphylococcus aureus*

S. aureus posee proteínas de superficie celular y extracelulares involucradas en la

virulencia. La producción de estos factores de virulencia es controlada por numerosos loci reguladores globales que incluyen *agr*, *sar*, *sigB*, *sae*, *arl* y seis homólogos de *SarA*. Estos reguladores forman parte de una importante red que modula la expresión de los genes de virulencia del *S. aureus*.

Un determinado gen de virulencia puede estar bajo la influencia de varios reguladores, para asegurar que ese gen específico, sólo se exprese cuando las condiciones son favorables. El rol específico y la importancia de un factor de virulencia o un gen regulador de virulencia en la patogénesis de *S. aureus*, puede variar de un tipo de infección a otra. La fibronectina (proteína de unión) media la invasión de las células de mamíferos, aunque esta misma proteína decrece la virulencia del *S. aureus* cuando induce una neumonía. Así mismo Yarwood y col. demostraron que la expresión del gen regulador accesorio (*agr*) no es necesaria para el desarrollo del síndrome del Shock tóxico, pero sí es importante en la patogénesis de artritis y abscesos en modelos de infección animal (Saïd-Salim y col., 2003).

Entre los reguladores globales, los sistemas reguladores de dos componentes *SarA* y *agr* son los más conocidos y que están mejor caracterizados (Novick, 2003; Cheung col., 2004)

El *SarA* es un regulador transcripcional que se une al promotor de sus genes blanco y el *agr* es un sistema que se activa mediante una determinada densidad celular (Saïd-Salim y col., 2003).

El locus *agr* es más importante durante la fase dependiente del crecimiento y mediante el promotor P3 se transcribe el RNAIII de forma que el *agr* regula la codificación de los genes de proteínas segregadas (α -, β -, TSST1, leucotoxinas y proteasas), de forma positiva y negativamente, los genes que codifican las proteínas de superficie (proteína A, coagulasa y la proteína de unión a la fibronectina).

El *Sar* es el otro sistema regulatorio y activa el *agr* por medio de un promotor durante la fase de crecimiento estacionaria. Por lo tanto, altera la síntesis de factores de virulencia.

En suma, los reguladores de genes de virulencia pueden actuar por dos mecanismos: directo, afectando al gen blanco uniéndose a su promotor, e indirecto a través de otros reguladores por ejemplo el *sar* (Saïd-Salim y col., 2003).

El sistema de *Quorum Sensing* en *S. aureus* es codificado por el *agr* y la señal molecular es el Péptido autoinductor (AIP) (Yarwood y col., 2004; Schauder y Bassler, 2001; Reading y col., 2006)

El QS regula la densidad de la población en un biofilm, usando diferentes mecanismos (Clutterbuck y col., 2007). Cuando la densidad celular es baja, la bacteria expresa las proteínas requeridas para la adherencia y la colonización, y cuando la densidad celular es alta, se expresan proteínas para la secreción de toxinas y proteasas (Reading y Sperandio, 2006).

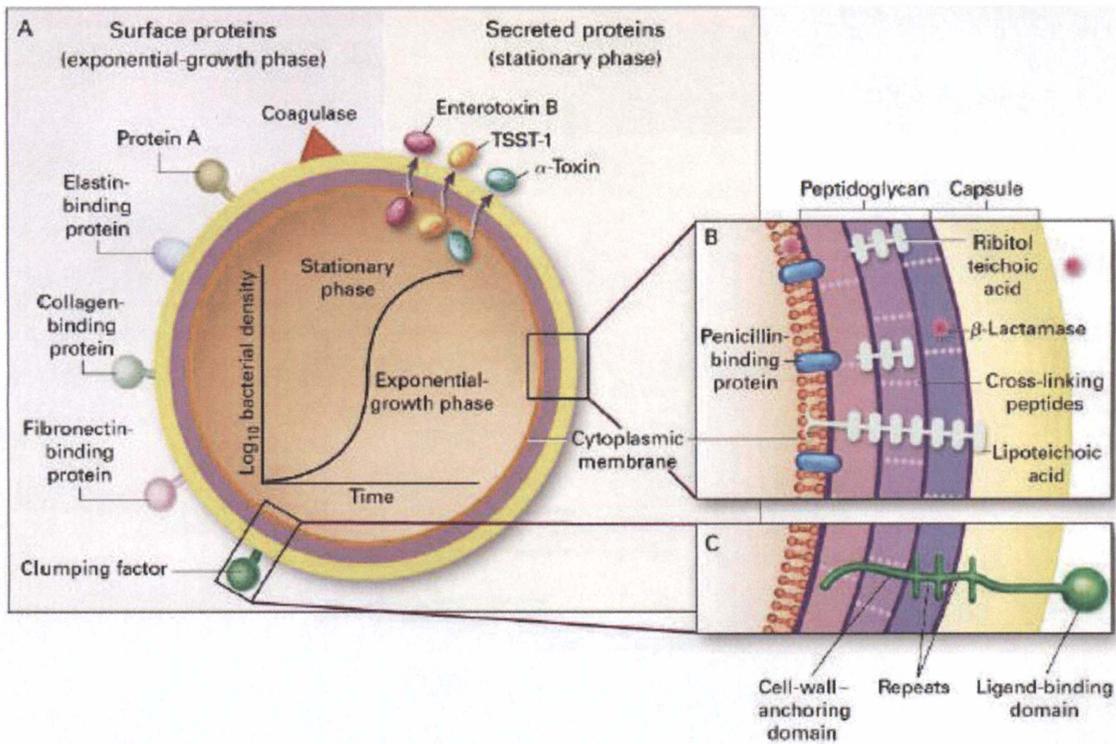


Fig. 4: Estructura del *S. aureus*.

Extraída de: Rafael Vignoli, Curso: Interacciones huésped- patógenos, IIBCE, 2009.

En el laboratorio *S. aureus* en particular y las bacterias en general, crecen en condiciones planctónicas, pero en una infección *in vivo* crecen en un biofilm debido a que le da mayores posibilidades frente a la respuesta defensiva del huésped (Feng y col., 2008).

En *S. aureus*, AIP está formado por ocho residuos de aminoácidos y en el quinto residuo posee un anillo cíclico de tiolactona (Boles y col., 2008). A veces los AIP alcanzan una concentración crítica y se ligan a una superficie receptora de histidinquinasa, iniciando una cascada reguladora que controla la expresión de factores de virulencia (Queck y col., 2008; Schauder y Bassler, 2001).

A. Quorum Sensing – sistema agr

El sistema *agr* de *Quorum Sensing* modula la expresión de los factores de virulencia del *S. aureus* en respuesta a los péptidos autoinductores.

Recientes estudios han sugerido el rol del sistema *agr* en el desarrollo del biofilm, ya que los mutantes *agr* exhiben una gran propensión a la formación de biofilms y las células que se desprenden de los biofilms poseen un sistema *agr* muy activo.

La represión del sistema *agr* es necesaria para formar un biofilm y la reactivación de éste en un biofilm establecido, a través de la adhesión de péptidos autoinductores o la depleción de glucosa desencadena el desprendimiento. Las moléculas de péptidos autoinductores inhibitoras no inducen el desprendimiento en un biofilm y los mutantes *agr* no responden indicando que existe una dependencia de un sistema *agr* activo y funcional para que se produzca la dispersión.

El desprendimiento del biofilm ocurre en múltiples cepas del *S. aureus* de sistemas *agr* divergentes, sugiriendo que es un fenómeno general del *S. aureus*, la proteinasa inhibe la formación del biofilm y estimula la dispersión de biofilms establecidos, indicando que el desprendimiento mediado por el *agr* se produce en forma independiente del gen de adhesión intercelular (*ica*). La inducción del sistema *agr* en biofilms de *S. aureus* estimula el desprendimiento de las células y este mecanismo de dispersión requiere de la actividad de proteasas extracelulares (Boles y Horswill, 2008, y col. 2007, Yarwood y col., 2004).

En el huésped, los sitios colonizados de bajo pH como la piel y el tracto vaginal, impiden la acción del *agr* y promueven la formación del biofilm (Otto, 2008; Tormo y col., 2005).

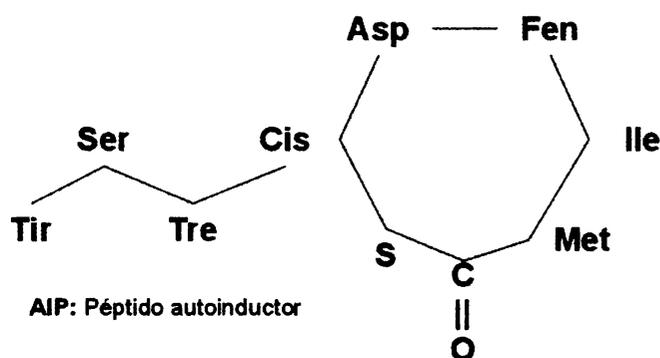


Fig. 5: Péptido autoinductor para *S. aureus*.

El regulador *agr* se expresa a través de dos operones con mensajes divergentes (promotores P2 y P3). Ambos operones tienen una secuencia similar (ACDB). El operon *agrP2* codifica la transcripción del ARNII, mientras que el operon *agrP3* codifica la transcripción de ARNIII. El ARNII, codifica cuatro proteínas, AgrA, AgrB, AgrC y AgrD. En ambos operones, AgrC y AgrA funcionan como sensores y proteínas reguladoras, respectivamente.

La señal química que activa el proceso es un péptido autoinductor (AIP). AIP es un octapéptido cíclico, que se transcribe como un prepéptido (AgrD) a partir del gen *agrD*, el cual es modificado por la enzima AgrB y se une al anillo de tio lactona de este péptido y transporta el AIP fuera de la célula.

El AIP estimula al receptor, sensor quinasa AgrC afín con el regulador de respuesta AgrA. Por encima de la unión entre AIP y AgrC, éste transfiere una fosfatasa a AgrA, la cual activa la transcripción del operon *agr* para la autorregulación y en suma activa la transcripción del ARN III.

La señalización vía este sistema, con otros elementos reguladores, como SarA, aumenta la transcripción de ambos promotores P2 y P3, resultando en una elevada concentración intracelular de ARNIII. En un cultivo discontinuo, ARNIII actúa aumentando la expresión de varios factores de virulencia, toxinas y enzimas (α -toxina, β -toxina, lipasas, proteasas, etc.), factores de virulencia relacionados con la adquisición de nutrientes, la supervivencia y la diseminación bacteriana y decrece la expresión de varias adhesinas de superficie, incluyendo proteína A y la proteína de unión a la fibronectina (McNamara y col, 2000; Schauder y Bassler, 2001; Novick, 2003; Said-

Salim y col., 2003; Yarwood y col. 2004; y Sperandio, 2006; Boisset et al., 2007).

La inhibición de la transcripción del ARNIII ocurre vía una unión de competencia de un AIP no emparentado, el cual se une al sensor del receptor dominante del AgrC.

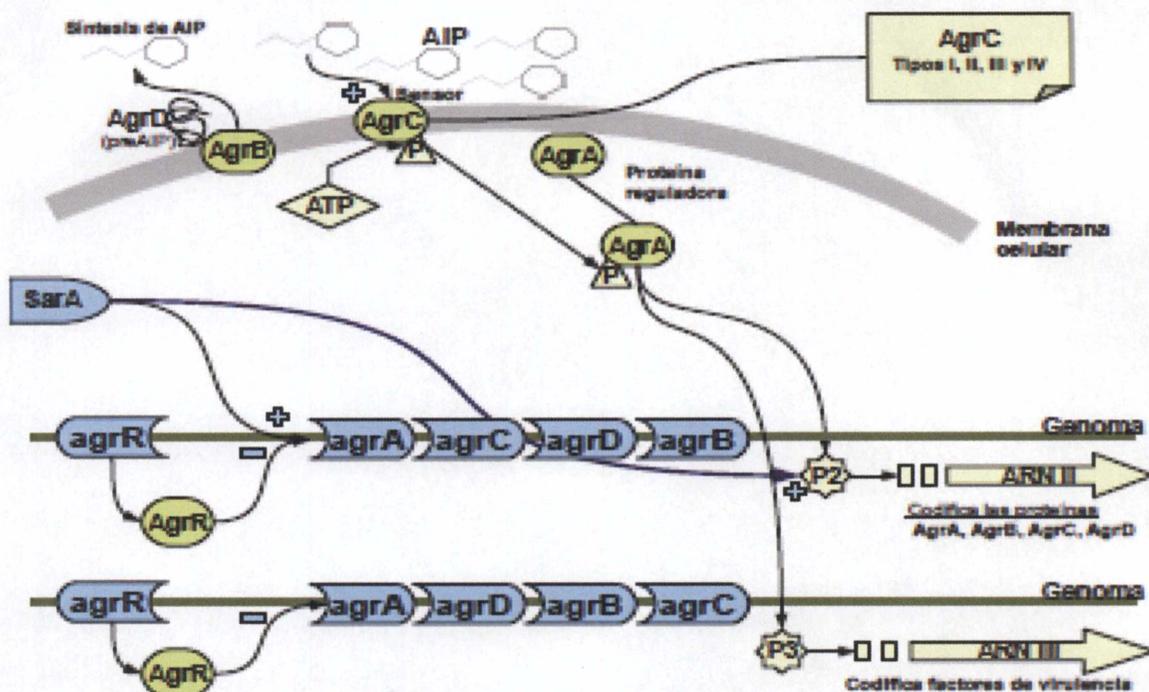


Fig. 6: Esquema de funcionamiento del sistema *agr*.

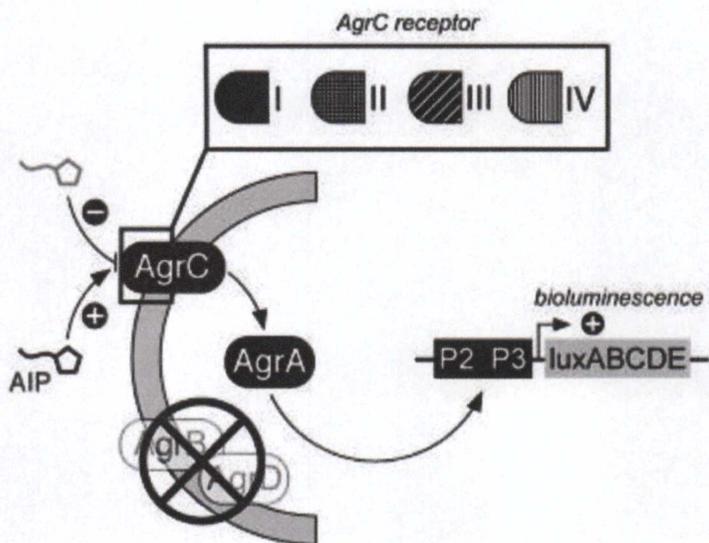


Fig.7: Diferencias clonales en el receptor AgrC.

Tomado de Wright y col., 2005

Se encontraron cepas específicas para cada uno de los cuatro AIPs producidos por *S. aureus* de cada grupo (I, II, III, IV).

Son inactivadas por *agrBD* y no producen autoinductor. AIP exógenos provocan la señal en cascada por un grupo específico AgrCA de dos componentes de señales que modulan la activación de *luxABCD* reportada por el promotor P3. Entre grupos, se

intercambian el receptor dominante AgrC, que demostró especificidad determinante para AIP y el remplazo de esta región con otra clase de AgrC homólogo, puede generar una serie de reportes con diferentes inductores específicos (Wright y col., 2005).

B. Regulación de la producción de limo y formación del biofilm

En las etapas iniciales de la formación del biofilm por *Staphylococcus spp*, se incluye la adherencia de las células a las superficies, la multiplicación celular y la formación de una estructura madura. Asociado a este proceso se producen factores extracelulares, que incluyen la síntesis de polisacáridos de adhesión intercelular (PIA). Dicha producción fue verificada genéticamente (Gotz, 2002).

1. Biosíntesis de PIA

La regulación de la síntesis de PIA/PNAG, es compleja. Para su estudio se distinguen tres diferentes tipos de regulación, dos que regulan la transcripción del regulador negativo IcaR y el tercero, una proteinasa dependiente de glucosa, es el factor de síntesis de PIA/PNAG.

Se le suman dos etapas reguladoras accesorias, una que depende del regulador global SarA y otra dependiente de la δ -toxina (Tormo y col. 2005).

a. Genes *ica*

PIA es un polisacárido integrado por N acetil-glucosamina con residuos deacetilados (20%), que embebe las células y las protege de las defensas del hospedero y los tratamientos antimicrobianos. La expresión de genes *ica* media la formación de PIA y la generación de colonias con mucus (slime) consistente. El operon está compuesto por el gen *icaR* (regulador) y los genes *ica* AD (biosíntesis). La producción de PIA es baja, ante la presencia del *icaR*. *icaA* promueve directamente la expresión del gen, mientras *ica R* la reprime (Gotz, 2002).

Los productos Ica A, C y D están localizados en la membrana celular e Ica B está en el exterior de la célula (Gotz, 2002).

El producto del gen *icaA* es una proteína transmembrana con actividad N acetil glucosaminil-transferasa, y requieren el gen *icaD* para optimizar la actividad. Oligómeros de N acetil glucosamina producidos por IcaAD tienen una longitud máxima de 20 residuos (Gerke, 1998). IcaD controla la correcta unión e inserción a la membrana de IcaA y media la unión entre IcaA e IcaC. Solo cuando *icaAD* es co expresado con *icaC*, codifican una proteína de membrana, putativa, que sintetiza los oligómeros largos de unión (130 residuos) (Gerke, 1998). IcaC es una proteína de membrana que está involucrada en la translocación del polisacárido a la superficie celular (Gotz, 2002). La proteína de adherencia a la superficie, IcaB es la responsable de la deacetilación de la molécula de poli-N-acetil glucosamina. La no deacetilación de Poli N-acetil glucosamina en un mutante isogénico *icaB* no permite la adherencia de la bacteria a la superficie celular y el desarrollo del biofilm (Vuong, 2004). La mutación de los genes de biosíntesis bloquea la formación del biofilm, la hemoaglutinación, baja la virulencia así como la adhesión a superficies. El gen *icaR* codifica el represor transcripcional con un rol central en la regulación del ambiente de la expresión del operon *ica* en los *Staphylococcus*. La proteína IcaR del *S.aureus* se liga a la región promotora del operon *ica* cercano al codón de comienzo del *icaA*. IcaR es un represor

débil de la transcripción del operon *ica*. TcaR es un miembro de la familia MarR. IcaR y TcaR juegan un rol negativo en el control del biofilm por *Staphylococcus* (Gara, 2007) (Ver Figura 11).

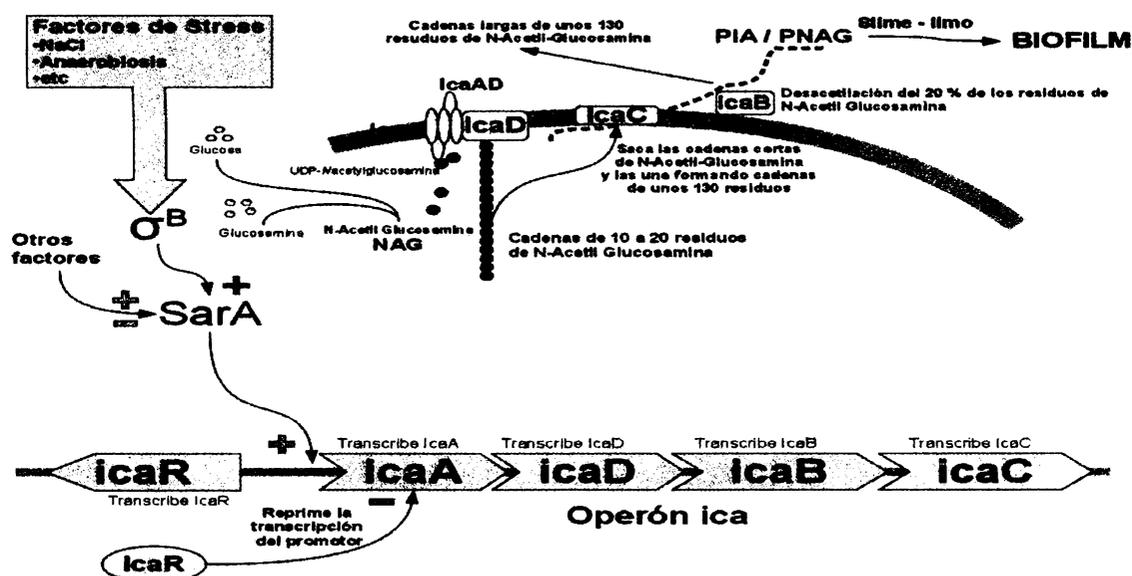


Fig. 8: Esquema de funcionamiento del sistema *ica*.

b. SarA

SarA estimula la transcripción del operón *ica*, para la producción de PIA y para la formación del biofilm (Valle y col., 2003)

Fenotípicamente el locus SarA promueve la síntesis de proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina, las toxinas α -, β - y δ - y la formación de biofilm, mientras que reprime la de las proteínas de unión a colágeno, proteína A y proteasas uniéndose directamente a los promotores de los genes blanco, o indirectamente por su efecto sobre otros reguladores (Cheung col, 2004).

La expresión temporal de algunos determinantes de virulencia en *S. aureus* están bajo el control de varios loci genéticos, incluyendo *agr* y *sarA*. El locus *sarA* codifica para SarA, una proteína de unión de 14,5 kDa que activa los promotores *agr* y puede trabajar conjuntamente con el sistema *agr* para controlar los genes blancos de transcripción. La proteína SarA puede activar algunos genes de virulencia independientes de *agr*.

Previamente, SarA mostro ser un regulador positivo de la formación de biofilm por *S. aureus*, incrementando la transcripción del operon *ica* el cual codifica una proteína responsable de la producción de PIA (Cheung y col, 2004, Tormo y col, 2005). Media su efecto por unión a los genes blanco promotores (ej. *agr*, *hla* y *spa*) e indirectamente vía otros reguladores. La expresión de SarA es máxima durante la última fase exponencial y coincide con la activación de otro regulador global, el *agr* durante la fase estacionaria, presumiblemente vía una interacción entre SarA y *agr* (Cheung y col, 2004).

La mutación no polar de *sarA* en *S. aureus* decrece la producción de PNAG y daña el desarrollo del biofilm, vía un mecanismo independiente de *agr*. La mutación del gen *sarA* resulta en una baja regulación de la transcripción del operon *ica* y consecuentemente reduce la producción de PIA (Tormo y col. 2005). PIA, es crítico

para la formación del biofilm en *S. aureus*, pero *ica* no es absolutamente requerido en algunas cepas de *S. aureus*. Por ello, cepas positivas a las proteínas asociadas al biofilm (bap) son capaces de formar biofilm en ausencia del operon *ica* (Toronda y col. 2005).

SarA es esencial para el desarrollo del biofilm por *S. aureus*, ya que controla este proceso relacionado a la persistencia y resistencia antibiótica en las infecciones por *S. aureus* (Tsang y col., 2005).

Los mutantes *sarA* poseen una reducida capacidad de formar biofilm tanto por *S. aureus* como por *S. epidermidis*.

La producción de proteasas extracelulares es incrementada en mutantes *sarA*. Las proteasas extracelulares en los biofilm por *S. aureus* tienen especial importancia en la formación de biofilms deficientes en los mutantes de *sarA*. (Tsang y col, 2008)

c. Represor de Toxinas (ROT):

El locus *rot* de *S. aureus*, homólogo de *SarA* actúa como regulador global inhibiendo la transcripción de varios genes de virulencia. Algunos de estos genes codifican proteínas secretadas como lipasa, hemolisinas y proteasas, que tienen un rol importante en la invasión tisular (Saïd-Salim y col., 2003).

La mutación de *rot* aumenta la expresión de proteasa y la toxina α (McNamara y col, 2000), *rot* regula positivamente la expresión de un número de genes que codifican las adhesinas de superficie celular y además modula la expresión de genes no implicados en la patogénesis (McNamara y col., 2000 ; Saïd-Salim y col., 2003).

Los genes *rot* y *agr* codifican componentes por caminos diferentes, pero parcialmente redundantes. La actividad asociada a *rot* está alterada por los productos de *agr* o factores que regula el *agr* (McNamara y col. 2000).

Todos los homólogos de *SarA* actúan como reguladores globales de genes de virulencia.

SarA estimula la producción de proteínas extracelulares e inhibe las proteínas de adhesión celular, en la etapa de crecimiento estacionaria. Al contrario de lo que ocurre con *rot*, el *sarA* estimula la producción de toxinas regulado por el *agr* (*sarA* actúa indirectamente estimulando al *agr* a nivel de AIP y *agr* inhibe *rot* que es el represor de la síntesis de toxinas, por lo tanto *sarA* estimula la producción de toxinas).

En *S. aureus* la expresión de algunos factores de virulencia son regulados coordinadamente. La genética de esta regulación está basada en la función de *agr* y *sar*.

Juntos, los componentes de estos loci forman parte de un camino complejo que en primer lugar disminuyen la transcripción de genes de virulencia e incrementan la transcripción de toxinas extracelulares regulatorias y de enzimas.

El control de la traducción de la toxina α por el sistema *agr-sar* ha sido demostrado. En cepas mutantes de *agr-sar*, se regula las proteínas de superficie celular (ej. coagulasa, fibronectina, proteína de unión, y proteína A) que son producidas en la fase exponencial y estacionaria de crecimiento.

En contraste, las cepas salvajes sólo producen estas proteínas durante el crecimiento exponencial. Además, en cepas mutantes *agr* y *sar*, algunas toxinas extracelulares y enzimas que están normalmente presentes en la fase estacionaria (ej. toxina α ,

metaloproteasa, y proteasa serina) decrecen un 5% de los niveles normales.

Los genes *agr* y *rot* tienen efectos opuestos en la expresión de ciertos determinantes de virulencia, el *rot* es un regulador de virulencia más global. Los mecanismos de regulación no se conocen aún.

A pesar del progreso en el estudio de los sistemas *agr-sar*, se evidenció que factores adicionales de regulación son requeridos para la producción de factores de virulencia.

Un ejemplo de esta diferencia se vio con la toxina α . La hemolisina es transcrita, trasladada y secretada dos horas después aparecer el RNAIII. A veces RNAIII no se eleva cuando la producción de toxina α cae dentro de una hora de la producción pico. Adicionalmente, las moléculas regulatorias no son identificadas, lo que explica la disminución en el mensaje de la toxina α cuando *S. aureus* es tratado con inhibidores de síntesis de proteínas y por lo tanto no se sintetiza RNAIII (Saïd-Salim y col., 2003)

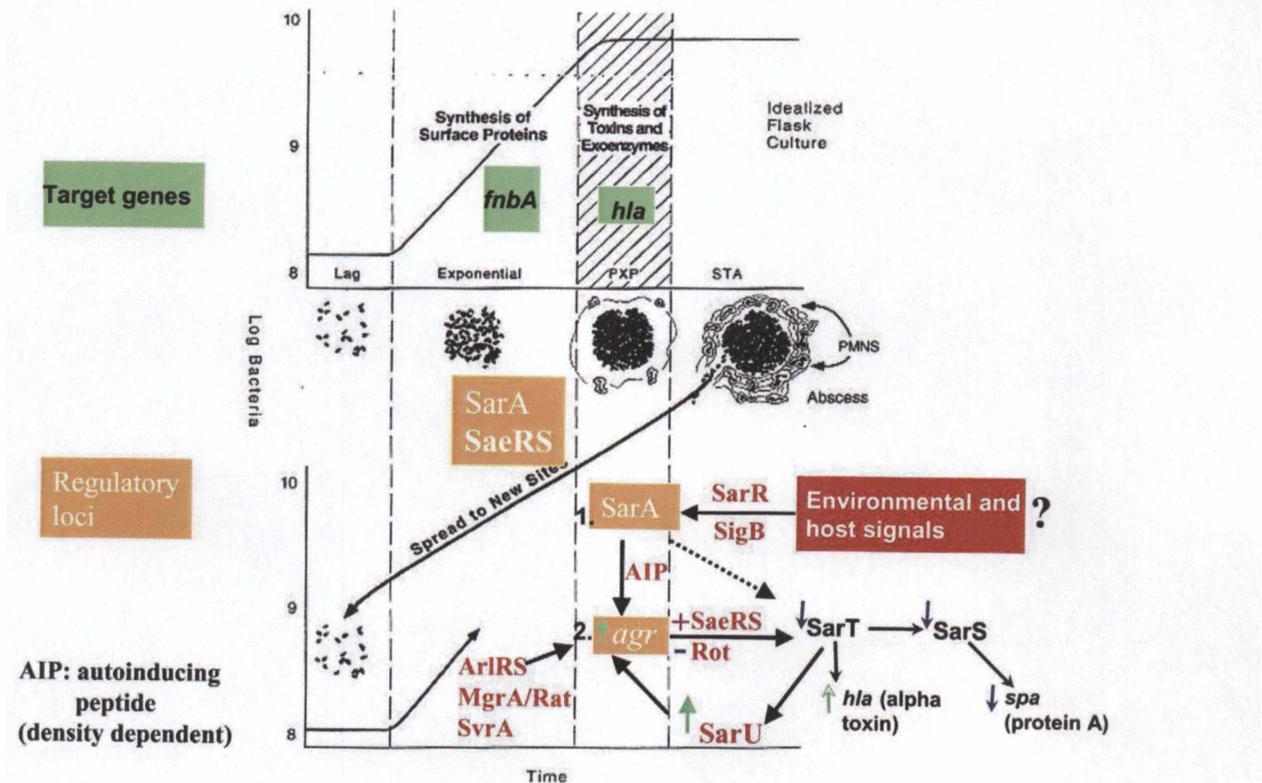


Fig. 9: Regulación de los determinantes de virulencia en el *S. aureus*.

Normalmente, la síntesis de adhesinas superficiales como proteína A, fibronectina de unión durante la fase exponencial coincide con la expresión de SarA y Sae, sugiriendo que la regulación de fibronectina y proteína A esta dada por estos dos loci y en la transición de la fase exponencial a la fase postexponencial, la síntesis de células y proteínas es inhibida y comienza la producción de toxinas extracelulares como la δ toxina. Esta transición corresponde a la expresión máxima del SarA y a la consiguiente activación del *agr*. La expresión de SarA se controla por SarR y una proteína homóloga de SarA y SigB (factor de transcripción inducido por el estrés). Por otro lado, *agr* es controlado por SarA, un quórum sensing AIP, un TCRS (sistema regulador de dos componentes) llamado ArIRS, MgrA/Rat/NorR y una proteína de membrana llamada SvrA. La activación de *agr* regula positivamente otros sistemas TCRS llamados Sae y un regulador negativo de un homólogo de la proteína SarA llamado Rot. Eventualmente reprime dos productos genéticos llamados SarT y SarS. SarT es un represor de la toxina α y es un activador de la proteína síntesis de la proteína A, lo que explica la elevada producción de la α toxina, la represión de la proteína A, sobre la activación de *agr*. La activación de *agr* resulta en la amplificación de la señal originada por activación de SarU que es un regulador positivo de *agr*. Tomado de Cheung y col., 2004.

d. Factor Sigma b (σ^b)

En numerosas bacterias, varios factores sigma alternativos modulan la expresión de genes en respuesta a las señales metabólicas medioambientales. Según la información contenida en el genoma del *S. aureus*, éste posee solo un factor alternativo, el σ^b .

Este factor juega un rol crucial en la regulación global. La expresión de factores de virulencia del *S. aureus* mostró que depende de σ^b y de los dos sistemas reguladores globales: *agr* y *sar*.

Sar es responsable de la activación *agr* y σ^b influye en la expresión de *SarA*, por lo que σ^b es el regulador global superior en *S. aureus* actúa regulando la expresión de exoproteínas (Kies y col., 2001).

La represión de σ^b no afecta la producción de PIA/PNAG ni la formación de biofilm, pero decrece la transcripción del operon *ica*. Además los mutantes dobles de *SarA* y σ^b , mostraron una disminución significativa de la expresión de *ica*, pero un incremento en la producción y la formación de biofilms comparado con los mutantes unicos de *sarA*. *SarA* activa el desarrollo de biofilm porque mejora la transcripción del operon *ica* y suprime la transcripción de una proteína involucrada en el recambio de PIA/PNAG.

Los genes de *sarA* e *ica* representan genes indispensables requeridos por el *S. aureus* para la formación del biofilm en diferentes condiciones ambientales.

La mutación de *sarA* decrece la transcripción de *ica*, la producción de PIA/PNAG y la formación de biofilm (Valle y col., 2003)

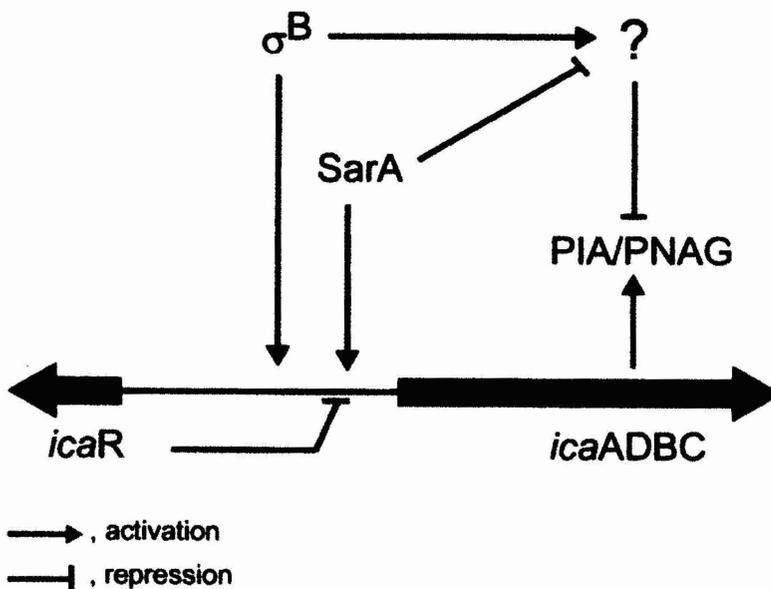


Fig. 10: Rol de *SarA* en la regulación de la formación de biofilm.

SarA y σ^b activan la transcripción de *Ica* directa o indirectamente. *SarA* mayormente afecta la producción PIA/PNAG mediante la supresión de un elemento que degrada PIA/PNAG o reprime su síntesis. *IcaR* reprime la transcripción de *ica* posiblemente junto a un factor adicional probablemente localizado en la secuencia genética después del locus *SarA*.

Tomada de Valle y col, 2003

Un análisis transcripcional reveló que la transcripción de *ica* ADBC fue fuertemente reprimida en mutantes deficientes de σ^b , sugiriendo que σ^b controla la transcripción de *ica* ADBC por un mecanismo dependiente de *icaR* en *S. epidermidis*. El factor σ^b juega un rol contradictorio en la formación del biofilm por *S. aureus*, donde se demostró que la producción de biofilm y de PIA/PNAG no fue afectada en cepas mutantes de σ^b en comparación con las cepas salvajes (Tormo y col., 2005).

2. Proteínas vinculadas a la formación de biofilm

Como mencionamos anteriormente la adherencia en el *S. aureus* es mediada por adhesinas proteicas que son componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs) y en algunos casos se unen covalentemente a muros de peptidoglicanos. Ejemplos son la proteína de unión a la fibronectina, SasG, la proteína A y B, la de unión al colágeno, y la proteína de unión al fibrinógeno, las cuales se adhieren a las células mamarias.

Las proteínas que fueron identificadas en la formación del biofilm son: La proteína asociada de acumulación (AAP), el factor de agrupación, factor A (ClfA), las proteínas de superficie del *Staphylococcus* (SSP1) y las proteínas asociadas al biofilm (Bap) (Tormo y col., 2005).

3. Proteínas Asociadas al biofilm (Bap)

El gen *bap* codifica proteínas asociadas a la superficie que promueven la formación de biofilm y se ha aislado de las mastitis bovinas (Tsang y col. 2008).

Todos los *S. aureus* que poseen Bap tienen una alta adherencia y producen fuertes biofilms, indicando una importante correlación entre la presencia de la proteína y la habilidad de formar biofilms en las superficies abióticas (Valle y col., 2003; Otto, 2008).

Se han identificado en la formación de biofilm por *S. aureus*, proteínas DtlA y Bap. El operón *dtl ABCD* es responsable por la incorporación de alanina en el ácido teicoico. La falta de alanina causa una carga neta negativa en la superficie de la bacteria que afecta la adherencia primaria a superficies de polietileno o vidrio (Valle y col., 2003; Otto, 2008).

El gen *bap* codifica una larga proteína de 2276 aminoácidos y promueve la adhesión primaria a las superficies inertes y la adhesión intercelular. En contraste, PIA/PNAG están envueltas mayormente en la adhesión intercelular.

Bap está estructuralmente relacionada con la proteína alfa C del grupo *Streptococcus B* y tiene una región centro (core), que consiste en 13 repeticiones idénticas de 258 nucleótidos de unidades en tándem, que codifican secuencias reiteradas de 86 AA (repetición C). Las repeticiones en la región C representan el 52% de la proteína Bap, y esta unidad repetida muestra una secuencia de identidad alta con otras unidades repetidas de esta proteína.

El gen *bap* está contenido en una isla de patogenicidad móvil y sólo se ha encontrado en aislamientos de mastitis bovina. Cepas de *S. aureus* una capacidad elevada para infectar y persistir en la glándula mamaria. Se encontró en el curso de la infección, que Bap sufre cambios en el número de repeticiones que hay en la región C.

La estructura del biofilm depende mayormente de la naturaleza de las moléculas involucradas.

C. Regulación en la etapa de dispersión

Las enzimas proteolíticas son secretadas por un amplio número de organismos procariontes. En la mayoría de los casos, están involucradas en la adquisición de nutrientes, pero las evidencias indican que las peptidasas producidas por bacterias patógenas son un importante factor de virulencia.

En *S. aureus* la expresión de proteinasas está regulada por el nivel de transcripción de los reguladores globales *agr*, *SarA* y σ^B . En adición la actividad proteolítica está controlada hasta el nivel postraslacional por una cascada de activación de proenzimas secretadas. Ambos sistemas trabajan regulando la función de estas enzimas que facilitan la diseminación del *S. aureus* la colonización de sitios. Este proceso ocurre a través de una elaborada modificación de las proteínas de la superficie bacteriana, cambiando el fenotipo de la bacteria de adhesivo a invasivo (Tormo y col., 2005)

En forma similar al *S. aureus*, el mutante *sarA* presenta una sobreproducción de proteasas.

Los factores de virulencia de *S. aureus* están controlados por el gen regulador *agr* y el regulador accesorio *sar*. Estos factores son afectados por las condiciones ambientales en la cual crecen.

Los loci *agr* y *sar* tienen efectos pleiotropicos en la expresión de moléculas de superficie responsables de la unión a distintos sustratos (Gotz, 2002).

Las células se desprenden mayormente de forma individual desde el biofilm como resultado de su división dentro de éste, o en forma de agregados celulares o cluster. Este proceso es universal para todos los biofilms. También puede ser que este desprendimiento de células o agregado esté relacionado con los cambios en la concentración de sustrato. El desprendimiento de células, posiblemente puede ser causa de la generalización de una infección (Donlan y Costerton, 2002).

El mutante de *agr* es altamente propenso a la formación del biofilm. Las células se dispersan del biofilm cuando actúa el sistema *agr*. Es imprescindible su activación para que se produzca el desprendimiento celular en *Staphylococcus spp.* Durante este desprendimiento las cepas se hacen sensibles a los antibióticos.

Cuando aumentan los niveles de AIP, o cuando se generan cambios ambientales como en los niveles de oxígeno, depresión de nutrientes, AIP se une a un receptor de histidinquinasa, se activan la señal de desprendimiento del biofilm y el *agr*, resultando ello en un incremento de las proteasas extracelulares necesarias para la diseminación celular. El sistema *agr* media en ese desprendimiento, aumentando la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos. Ello sugeriría que este mecanismo puede ser el blanco para tratar las infecciones por biofilm. También regula una cascada reacciones que controlan la expresión de factores de virulencia, hemolisinas y toxinas (Boles y Horswill, 2008; Stoodley y col., 2001).

La proteinasa K inhibe la formación del biofilm, elimina la adherencia rompiendo la estructura de superficie y promueve su dispersión. Las proteínas de superficie que permiten la adherencia son destruidas por las proteasas secretadas por *S. aureus* que también activa a precursores de lipasas y secreta enzimas como la nucleasa.

Considerando que el sistema *agr* regula todas estas enzimas cuando se activa, se expresan dichos factores que contribuyen al desprendimiento del biofilm (Tormo y col., 2005).

QS induce comportamientos en la dinámica de las células del biofilm alterando su

estructura y fenotipo, a través de la regulación y la producción de los factores secretados (exopolisacáridos u otras adhesinas) (Irie y Parsek, 2008).

V. Mastitis

La mastitis es una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria. Se caracteriza por diversos cambios físicos y químicos en la leche y por alteraciones patológicas en el tejido glandular. Es causada por muchos y diversos agentes infecciosos, pero más frecuentemente de origen bacteriano (Hillerton y Berry, 2005).

La enfermedad es usualmente local, pero puede hacerse sistémica en animales inmunocomprometidos. La incidencia de la enfermedad en vacas lecheras varía según la edad del animal y la etapa de lactación, aunque más del 50% de los casos ocurren en los primeros 60 días luego del parto. La mastitis es menos común en los animales jóvenes, lo que compromete más el aspecto económico de la producción lechera, debido a que la producción va en aumento con la edad del animal y son las mejores productoras las que deben ser descartadas.

Es probablemente, la más costosa de las enfermedades endémicas infecciosas que afectan a las vacas y otras especies lecheras. Su impacto alcanza la producción animal, el bienestar animal y la calidad de la leche producida (Cucarella y col., 2004; Hillerton y Berry, 2005; Olson, 2007).

En los últimos años, con el desarrollo de la industria láctea, el control de la mastitis clínica, ha sido exitoso y las mayorías de las mastitis ocurren en un estado de mastitis subclínica y se detectan por un aumento de las células somáticas, un aumento en el recuento bacteriano y la disminución de la producción láctea. Todo ello contribuye a un menor ingreso del productor ya que el valor y la calidad y cantidad de leche, disminuyen. La prevalencia de estas infecciones es un riesgo significativo para los animales sanos, ya que se ven expuestos a distintas fuentes de infección: pasturas, momento de ordeño y la máquina de ordeño y el sucesivo contacto con las manos del ordeñador cuando está preparando los animales para el ordeño (Hillerton y Berry, 2005).

S. aureus es el más importante y prevalente patógeno, contagioso, intramamario (Kerro Dego y col., 2002). Es una bacteria patógena oportunista responsable de un amplio espectro de enfermedades en humanos y animales, que resiste durante mucho tiempo en el ambiente, aún en condiciones adversas (Fitzgerald et al, 2001). Se encuentra ampliamente distribuido en todos los rodeos lecheros del mundo (Ruiz y col., 2001; Revelli y Rodríguez, 2001).

En un estudio realizado en la región litoral oeste de nuestro país en el año 2002, *S. aureus* fue el patógeno más frecuentemente aislado en 37, 5 % de un total de 40 muestras de leche de casos clínicos. No hubo crecimiento bacteriano en el 32, 5% del total de muestras. La frecuencia del *S. aureus* aislado de casos subclínicos fue de 62,8% (Giannechini y col., 2002).

S. aureus es un agente causal de infecciones mamarias en los rodeos lecheros (Barkema y col., 2006) y el patógeno más frecuentemente encontrado en leche cruda (Ruiz y col., 2001; Revelli y Rodríguez, 2001; Zadoks y col., 2002) y existe evidencia que puede formar biofilms en la ubre de vacas con mastitis (Melchior y col, 2008).

La mastitis estafilocócica en vacas puede manifestarse a través de infecciones clínicas, asociadas a formas planctónicas (cuando se activa el sistema *agr*) y subclínicas o crónicas que pueden persistir durante todo el período de lactación y en lactaciones subsecuentes (Boles y Horswill, 2008). Éstas, generalmente no son tratadas

satisfactoriamente mediante una antibioticoterapia adecuada que logre curarlas y prevenir la instalación de una infección crónica, debido a que el *S. aureus* posee la característica de adquirir resistencia a los antibióticos (Kerro Deogo y col, 2002; Feng y col, 2008), probablemente debido a la capacidad de este microorganismos de formar biofilms (Costerton, 1999; Cucarella y col., 2004).

El *S. aureus* es capaz de producir infección intramamaria, debido a la capacidad de expresar ciertos factores que incluyen:

- proteínas de superficie que promueven la adhesión y la colonización de los tejidos del huésped y otros componentes extracelulares (Götz, 2002; y col., 2004; Sibbald y col., 2006; Otto, 2008).
- invasinas que son exportadas a una localización extracitoplasmática y promueven la difusión en los tejidos (leucocidinas, hialuronidasas) (Cucarella y col., 2004; Sibbald y col., 2006).
- factores de superficie que inhiben la fagocitosis (cápsula y proteínas), que le permiten la supervivencia en las células que colonizan.
- propiedades bioquímicas que mejoran la supervivencia de *Staphylococcus* en la fagocitosis (producción de carotenoides y catalasa).
- enmascaradores inmunológicos (proteína A y factor de coagulación).
- toxinas de daño de membranas: que lesionan la membrana de células eucariotas (hemolisinas y leucotoxinas) y
- determinantes para la resistencia inherente o adquirida a agentes antibióticos (Sibbald y col., 2006).

Muchas infecciones crónicas están asociadas con estirpes productoras de *biofilms*, debido a que son muy difíciles de eliminar por fagocitosis y no responden bien a amplio rango de agentes antimicrobianos (Costerton y col., 1999; Cucarella y col., 2004). Esto último podría ser explicado debido a la protección que la estructura del exopolisacáridos le ofrece a la bacteria dentro del biofilm (Mittelman, 1998).

La caracterización del patógeno, *S. aureus* aislado de mastitis bovina puede ser útil en el desarrollo de prácticas de control más efectivas. Dentro de la misma, se tienen en cuenta los caracteres de virulencia que presenta el agente, particularmente la formación de biofilm, ya sea en estudios de su expresión fenotípica, (Turkyilmaz y Kaya, 2006) como genotípica (Boerlin y col., 2003; Rabello y col., 2005).

VI. Staphylococcus aureus, mastitis y biofilms

S. aureus es un agente común de infecciones intramamarias, que frecuentemente son crónicas y se hallan asociadas a la habilidad de producir biofilm.

La mastitis bovina se clasificó en tres grupos, en base a la presencia de elementos genéticos particulares requeridos para la formación del biofilm: grupo 1 (*ica* +, *bap*+), grupo 2 (*ica*+, *bap*-), y grupo 3 (*ica*-, *bap*-). Todos los animales infectados naturalmente con el grupo 1 y 2 tuvieron menor conteo de células somáticas, que los infectados con el grupo 3. Los aislamientos *bap* positivos son capaces de colonizar y persistir más en la glándula mamaria *in vivo* y poseen baja susceptibilidad a los tratamientos, cuando forman biofilms *in vitro* (Cucarella y col., 2004).

En la glándula mamaria, la presencia de *Bap* facilita la formación del biofilm, y esa estrechamente relacionado a la persistencia del *S. aureus* en el tejido glandular

(Cucarella y col., 2004).

El *S. aureus* ingresa a la glándula mamaria, proveniente de la epidermis infectada o por el ingreso de leche contaminada a la glándula debido a una deficiencia en las prácticas de manejo del equipo de ordeño, como un mal ajuste de las bombas de la ordeñadora. Coloniza primero el canal del pezón, se adapta y multiplica en la leche, accediendo luego a la parte superior de la glándula. La bacteria se adhiere al epitelio ductal y alveolar, y comienza a producir toxinas. La adherencia bacteriana activa la llegada de macrófagos y neutrófilos que migran desde la sangre a la leche (generando el incremento de las células somáticas en la leche) generando la inflamación de la glándula mamaria, afectando el sistema inmunitario del huésped y dañando las células epiteliales. Como resultado, la bacteria alcanza la capa basal subepitelial, uniéndose al fibrinógeno y otras proteínas receptoras del hospedero, y finalmente establece una infección que a menudo se vuelve crónica (Foster y Höök, 1998; Cucarella y col, 2004).

Algunas infecciones crónicas están asociadas con el crecimiento bacteriano en forma de colonias adheridas rodeadas por una matriz de exopolisacáridos, constituyendo el biofilm. Este agregado multicelular, no es susceptible a los fagocitos ni a los macrófagos y células del biofilm son resistentes a las dosis usuales de antibióticos (Costerton, 1999; Melchior y col, 2006).

La implicancia del biofilm en infecciones crónicas ha estimulado el estudio de la caracterización de genes involucradas en su formación.

El cluster *icaADBC* está asociado a la producción de PIA/PNAG y Bap, implicada en la formación de biofilm por *S. aureus*. El gen *bap* sólo se ha encontrado en aislamientos de mastitis bovinas. Las cepas de *S. aureus* *bap* positivo mostraron una alta capacidad para infectar y persistir en la glándula mamaria. El bajo conteo de células somáticas (SCC) asociado con la alta colonización de la glándula mamaria por cepas *bap* e *ica* positivas, sugiere que hay una reducida producción de toxinas durante la infección.

El gen *bap* se localiza en una isla patogenicidad de *S. aureus* *bap* y algunos genes de toxina están localizados en la misma región del cromosoma, sugiriendo que ambos genes están envueltos en dos estrategias opuestas de interacciones bacteria-huésped (Ubeda y col., 2003).

Las bacterias formadoras de biofilms ocasionan daños pequeños y no evidentes en el tejido glandular del huésped. Las no formadores de biofilms, producen toxinas, son más patogénicas en poco tiempo y causan daño tisular evidente en el animal. El resultado de este daño consiste en una exposición de las adhesinas de la matriz celular del huésped, que permiten la adherencia bacteriana a los receptores proteicos del huésped y son posteriormente difundidas hacia otros sitios del animal (Cucarella y col, 2004).

A la ordeñadora llegan cepas que provienen de la piel y de la leche, por lo tanto ambas se pueden transmitir a través de ella, pero los estudios han demostrado que la fuente de infección intramamaria más relevante en el rodeo lechero, es la leche proveniente de animales infectados (Zadoks y col, 2002).

VII. Los biofilms en la industria

La resistencia del biofilm depende, entre otros, del tiempo de establecido. Numerosos autores en la década de los 90, se planteaban interrogantes sobre cuál sería el alcance de este tipo de adherencia bacteriana y formación de biofilms de los cuales aún la información era incipiente. Hoy sabemos que la microbiología no estudia a las bacterias en forma aislada, sino como microorganismos que se comunican y viven en

comunidades bacterianas en biofilms. En cuanto a la composición de la matriz extracelular del mismo, sabemos que existe un mecanismo mediante el cual, se regula la formación de exopolisacáridos y como es la estructura de un biofilm y su relación activa y dinámica con el medio que lo rodea. Sabemos también que se puede construir un biofilm en muy poco tiempo si se dan las condiciones adecuadas, los residuos de alimentos sirven de sustrato para los microorganismos que forman el biofilm, pero no constituyen su matriz, son los propios microorganismos los que lo forman, en un nicho adecuado. También ha sido demostrado que la forma de limpieza y sanitización no son suficientes para disminuir el número de células viables adheridas al biofilm. El medio ambiente también condiciona el desprendimiento de las células del biofilm y la colonización de nuevas estructuras (Zottola, 1994).

En la industria alimentaria la adherencia bacteriana y la formación del biofilm, pueden tener efectos benéficos o indeseables.

En los birreactores la formación de biofilms microbianos es muy útil en la producción de elementos fermentados, así mismo en el tratamiento de efluentes sirven como un filtro capaz de retener compuestos orgánicos e inorgánicos y facilitar la reutilización del agua ya reciclada (Zottola, 1994).

Como un efecto indeseable observamos la formación de biofilm y la adherencia de microorganismos que favorecen la presencia de potenciales problemas a causa de agentes patógenos o deteriorantes que entran en contacto con los alimentos o las superficies contactadas, en la industria alimentaria, en particular, la industria láctea (Mittelman, 1998).

Si bien, en el área industrial los biofilms por *S. aureus* son un gran problema (Zottola, 1994), la mayoría de los estudios respecto a la características de persistencia y resistencia han sido realizados en medicina humana, asociados a dispositivos médicos o a los tejidos del huésped (Donlan y Costerton, 2002; Yarwood y col, 2004; Jiang y Pale, 2006; Shlegelova y col, 2008). Dada la similitud de los materiales estudiados, con algunos utilizados en la industria alimentaria, sería posible extrapolar algunos resultados en aquel ámbito trasladándolos al área alimentaria.

La formación de biofilms por *Staphylococcus* a alimentos, es relevante para la industria alimentaria, ya que incrementa la supervivencia de este microorganismo (Moretro y col., 2003).

Entre los problemas que se pueden encontrar a este nivel, se destacan los siguientes:

- causan serios problemas por ejemplo en los sistemas de agua al adherirse a las paredes de los caños para lo cual se deben desarrollar estrategias eficaces a fin de destruir las bacterias sésiles. Esto también es válido para los sistemas de conducción de alimentos líquidos. El flujo turbulento mejora la adhesión de las bacterias y la formación del biofilm, porque las células planctónicas tienen más probabilidad de chocar con la superficie (Donlan y Costerton, 2002).
- Se reportó un brote asociado con la industria láctea en el año 2000, en Japón y afectó a más de 13000 personas, debido a una toxina termorresistente de *S. aureus*, residente en un sistema de conducción, en una planta procesadora de lácteos (Asao y col., 2003).
- en plantas procesadoras de aves, donde *S. aureus* es endémico, tiene un fenotipo agregativo que es más resistente a la desinfección por hipoclorito que otros fenotipos (Moretro y col., 2003).

- Chmielewski y Frank (2003), descubrieron que los microorganismos se pueden agregar más fácilmente en ambientes húmedos y formar biofilms, se encuentran más frecuentemente en las plantas procesadoras de leche.
- Shlegelová y col (2008), en casi 2800 muestras analizadas entre el 1999 y 2006, encontraron un nivel mayor de contaminación en las superficies cerradas de la industria lechera, respecto a las superficies de la industria cárnica que no lo son.
- son resistentes a condiciones de estrés, entre ellos al efecto de algunas sustancias como: alcohol, cloruro de sodio, SDS (Dodecil sulfato de sodio) y amonios cuaternarios (Wong, 1995; Moretro y col., 2003). Esto último, tiene una regulación genética, asociado a la presencia del locus *qac*, genes que codifican bombas de eflujo, que los hace resistentes a varios agentes sanitizantes. Tanto las cepas de *Staphylococcus spp* como las de *L. monocytogenes* que son fuertes formadoras de biofilms y resistentes a QAC, están especialmente dotadas para sobrevivir en ambientes de procesamiento de alimentos (Montero y col., 2003).

A. Biofilms en superficies hidrófilas

Moretro (2003) encontró que en el acero inoxidable, material usado en la industria alimentaria, permitía el desarrollo del biofilm por *Staphylococcus* y postuló su posible relevancia como fuente de contaminación de los alimentos.

En un estudio realizado por Marques y col, en el 2007 se estudio la capacidad de adherencia del *S. aureus* en superficie de acero inoxidable y de vidrio, encontrándose que en este ultimo la capacidad de adhesión era casi 10 veces mayor. A su vez se estudio la sensibilidad de las células del biofilm, a diferentes sanitizantes, encontrándose en todos los casos, mayor sensibilidad de los biofilms adheridos a vidrios. De los sanitizantes ensayados el que tuvo mayor performance fue el ácido peracético. A pesar que fue el mejor no llego a los niveles recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Moretro y col., 2003; Marques y col., 2007).

B. Biofilms en superficies hidrófobas

Muchos de los trabajos de laboratorios que se hacen, acerca de biofilms, emplean dispositivos de poliestireno por lo cual se ha demostrado ampliamente, la capacidad de muchos microorganismos entre ellos *S. aureus*, para utilizar estos materiales como soporte para desarrollar biofilms (Vuong y col., 2000; Moretro, 2003; Cucarella y col., 2004). Existen algunos trabajos de similar tenor realizados con dispositivos de otros materiales (PVC, silicona) (Luppens y col., 2002; Shah y col., 2002).

VIII. Efectividad de distintos métodos de limpieza en la Industria Alimentaria

A partir de distintos trabajos realizados a escala de laboratorio, a fin de corroborar la efectividad de una limpieza CIP tipo, similar a la que se puede dar en una planta lechera, en la limpieza del equipo de ordeño en el tambo y en una superficie de acero inoxidable, se obtuvieron los siguientes resultados: a tiempos, temperatura y productos habituales, los biofilms no eran removidos, pero a través del agregado de una mezcla de ácidos, una mezcla de cáusticos, un aditivo cáustico y un sanitizante se lograba disminuir el número de células viables del biofilm, en el orden de 3,8 logaritmos. Los pasos de incorporación de sanitizante no fueron tan efectivos en la remoción del biofilm, como la mezcla de ácidos y cáusticos combinados con el uso del aditivo cáustico. Estos hallazgos tienen distintas implicancias dentro de las cuales se incluyen:

mejorar los sistemas de limpieza, a fin de incrementar la calidad de los productos obtenidos, lograr una mayor performance en la planta y optimizar las ganancias (Bremer y col., 2006).

En ensayos realizados a fin de evaluar el desempeño de antimicrobianos naturales (Nisina, 500ppm; Lauricidina, 100ppm; Lactoperoxidasa, 200ppm) en un sistema CIP, se demostró con ellos una mayor eficiencia en la reducción de células viables adheridas al biofilm a las dos horas, no lográndose reducciones significativas más allá de este lapso. El tratamiento convencional con hipoclorito durante dos horas fue sin embargo, el de mejor performance. En suma, estas combinaciones logran descontaminar las superficies a pequeña escala o mejorar la limpieza en equipos de tamaño reducido (Dufour y col, 2004).

En la industria, los biofilms se podrían remover satisfactoriamente, mediante el uso de ácidos fuertes, surfactantes o mediante acciones físicas energéticas (ultrasonido, cepillado). No obstante, en el manejo de la remoción de biofilms de los tejidos corporales, resulta obvio que es imposible el uso de las mismas estrategias, debido a la toxicidad, dolor y daño tisular que se causarían (Hurlow y Bowler, 2009).

IX. Estrategias antimicrobianas

P. aeruginosa necesita señales moleculares de Acil-HSL (autoinductor *quorum sensing*) para la formación de biofilms. Existen inhibidores de *quorum sensing* (QSI) que afectan su formación y su funcionalidad. Las Furanonas halogenadas fueron caracterizadas por el grupo de Michael Givskov como inhibidores de *quorum sensing* y aislados de *Delisea pulchra*. Al adicionarlos a cultivos de *P. aeruginosa* inhiben la activación de los reguladores genéticos de QS. Este tratamiento hace a la *pseudomona*, más susceptible a una variedad de compuestos antimicrobianos. Thomas Rassmussen del grupo de Givskov trató de identificar QSI de origen natural y pudo aislar un potente inhibidor proveniente del ajo. Algunos de estos también inhibieron QS en los pulmones de ratones (Givskov y col, 1996).

Los ácidos asiáticos y corosólico, son dos productos naturales que han sido identificados como QSI del biofilm de *P. aeruginosa*. Se evaluó que en combinación Tobramicina y Ciprofloxacina, en concentraciones a las cuales los biofilms eran tolerantes, se logró aumentar la susceptibilidad a estos compuestos y potenciar la actividad de los mismos (Garo y col., 2007).

Debido al aspecto multifactorial de la patogénesis del *S. aureus* y debido a las múltiples cepas existentes lograr tratamientos exitosos es cada vez más difícil debido a la múltiple resistencia a los antibióticos desarrollada por los microorganismos (Feng y col., 2008).

La comunicación célula-célula vía QS afecta la expresión de factores de virulencia en algunas bacterias.

El bloqueo del QS es una manera alternativa de tratar la infección bacteriana, ya que suprime la virulencia, pero no mata la bacteria y el desarrollo de las cepas resistentes por selección natural se minimiza.

El único sistema de QS conocido en *Staphylococcus* es el operon *agr*. El sistema *agr* es activado durante la transición de la fase exponencial de crecimiento a la fase de crecimiento estacionaria a través de un mecanismo autorregulatorio que censa la densidad celular. Por ello, se ha propuesto el bloqueo del sistema QS como tratamiento

de la infección por *Staphylococcus sp.*

S. aureus desarrolló varios mecanismos para sobrevivir en un ambiente hostil.

En las enfermedades infecciosas agudas, las toxinas presentes en cepas *agr+*, atacan los tejidos del huésped, en las enfermedades crónicas el *agr* – contribuye a aumentar la persistencia. La habilidad de las cepas *agr* del *S. aureus* para adherirse a los polímeros es considerada una ventaja en las infecciones asociadas a los catéteres. Los mutantes *agr* tienen la propiedad de adaptarse a nichos ecológicos, dentro de los cuales las propiedades adhesivas son importantes.

Se pueden atenuar las infecciones agudas causadas por *S. aureus agr+*, por inhibición del sistema *agr*. El bloqueo del *agr* es un potencial terapéutico anti-*Staphylococcus*, atenuando las infecciones agudas. Sin embargo, el tratamiento en pacientes con enfermedades persistentes especialmente en aquellos que tienen dispositivos médicos, es contraproducente (Vuong y col., 2000).

El primer mecanismo del cual se valen los microorganismos, para lograr resistir a los factores antimicrobianos, consiste en bajar drásticamente su nivel metabólico y la tasa de división celular. A su vez la matriz polimérica de la que están formadas la mayoría de los biofilms retarda la difusión de los antimicrobianos al interior del mismo. La reacción oxidativa desencadenada por la respuesta inmune del huésped o los agentes clorados puede ser desactivada en las capas más externas del biofilm más rápido de lo que pueden difundir hacia el interior del mismo, quedando las capas más profundas protegidas.

Algunos estudios han mostrado que la expresión genética dentro de los biofilms se halla alterada debido a la acción física de la adherencia. Aunque estos cambios se deben a una respuesta biológicamente programada a la adhesión y la privación de nutrientes, la relación entre la resistencia a los antimicrobianos y esta alteración aún se desconoce. En las células de los mamíferos el farnesol constituye un paso intermedio en la síntesis *de novo* del colesterol. Es metabólicamente un derivado del farnesil pirofosfato, y la inhibición de su biosíntesis tiene como resultado el bloqueo de la síntesis de ADN y por lo tanto la detención del crecimiento celular. Se especula que el farnesol actúa a nivel de las membranas celulares de ciertas especies bacterianas, incluyendo el *S. aureus*. Se sabe que el daño de las membranas celulares es uno de los más poderosos mecanismos de acción de los antibacterianos. Los agentes que destruyen la pared microbiana usualmente afectan la síntesis del glicano reduciendo la biomasa y acumulo de matriz de los biofilms. El efecto del farnesol en la formación de polisacáridos del biofilm de *S. aureus* aún no ha sido investigado. Ya que el principal sitio de acción del farnesol sería la membrana citoplasmática, podría alterar la permeabilidad de la membrana a algunos compuestos químicos exógenos, inclusive los antimicrobianos.

La naturaleza hidrofóbica del farnesol favorece su acumulación en la membrana bacteriana, causando posiblemente su rotura. Esta rotura resulta en la pérdida de iones K^+ desde la célula. La posible acción del farnesol consistiría en ser un coadyuvante terapéutico para el tratamiento o prevención de las infecciones a biofilms y revertir la resistencia a los antimicrobianos (Jabra-Rizk y col., 2006)

El efecto antimicrobiano del farnesol no se relacionaría con la comunicación célula a célula a través de moléculas del quórum sensing ya que actuaría en especies bacterianas cuyos sistemas de comunicación son muy diferentes. Se piensa que el farnesol actuaría en forma sinérgica con ciertos grupos de antibióticos, en particular los

aminoglicósidos. Estos últimos no son capaces de penetrar en las células bacterianas intactas y afectar la función de los ribosomas que requieren de ATP para entrar activamente algunas moléculas al interior de la célula. En suma se concluye que estos antibióticos no serían muy efectivos frente a microorganismos anaeróbicos o en algunas zonas del biofilm de *S. aureus* donde los nutrientes son escasos, las células están intactas y el ATP está en bajas concentraciones (Jabra-Rizk y col., 2006)

X. Conclusiones

S. aureus bajo esta modalidad de biofilm, es un grave problema a lo largo de la cadena agro-industrial, que incluye desde el rodeo lechero, el tambo, la industria láctea y puede llegar al hombre. Sus estrategias de supervivencia han logrado superar las defensas del huésped, los tratamientos antimicrobianos clásicos y los agentes habituales de limpieza.

Resulta imprescindible conocer más acerca de este microorganismo y de los biofilms utilizando las nuevas técnicas disponibles, con la finalidad de obtener nueva información que permita su control.

Referencias Bibliográficas

1. Ahimou, F; Semmens, M; Haugstad, G; Novak, P (2007) Effect of protein, polysaccharide and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Appl Environ Microbiol*; 73:2905–2910.
2. Annous, B; Fratamico, P; Smith, J (2009) Quorum Sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do? *J Food Sci*; 74:24-37.
3. Arciola, C; An, Y; Campoccia, D; Donati, M; Montanaro L (2005) Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int J Art Org*; 28:1091-100.
4. Asao, T; Kumeda, Y; Kawai, T; Shibata, T; Oda, H; Haruki, K; Nakasawa, H; Kozaki, S (2003) An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin a in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidem Infect*; 130:33-40.
5. Boerlin, P; Kuhnert, P; Hussy, D; Schaellibaum, M (2003) Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *J Clin Microbiol*; 41:767-771.
6. Boles, B; Horswill, A (2008). Agr- mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens*; 4: 1-13.
7. Bremer, P; Fillery, J; McQuillan, J (2006) Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int J Food Microbiol*; 106: 256-62.
8. Burmolle, M; Webb, J; Rao, D; Hansen, L; Sorensen, L; Kjelleberg, S (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Env Microbiol*; 72: 3916-3923
9. Clutterbuck, A; Woods, E; Knottenbelt, D; Clegg P; Cochrane C; Precivale, S (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol*; 121: 1-17.
10. Costerton, W; Lewandowski, Z; Debeer, D; Caldwell, D; Korber, D; James, G (1994) Biofilms, the Customized Microniche. *J Bacteriol*; 176: 2137-2142.
11. Costerton, W; Lewandowski, Z (1997) The biofilm lifestyle. *Adv Dent Res*; 11: 192-195.
12. Costerton, J; Stewart, P; Greenberg, E (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284:1318-1322.
13. Cowan, S; Gilbert, E; Liepmann, D; Keasling, J (2000) Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. *Appl Environ Microbiol*; 66: 4481-4485.
14. Cucarella, C; Tormo, M; Úbeda, C; Trotonda, M; Monzón, M; Peris, C; Amorena, B; Lasa, I; Penadés, J (2004) Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Imm*; 72: 2177-2185.
15. Cheung, A; Bayer, A; Zhang, G; Gresham, H; Xiong, Y (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 40: 1-9.
16. Chmielewski, R; Frank, J (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comp Rev Food Sci Food Saf*; 2: 22-32.

17. Donlan, R; Costerton, J (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*; 15: 167-193.
18. Dufour, M; Simmonds, R; Bremer P (2004) Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of "natural" antimicrobials against dairy biofilms. *J Food Prot*; 67: 1438-1443.
19. Feng, Y; Chen, Ch; Su, L; Hu, S; Yu, J; Chiu, Ch (2008) Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev*; 32: 23-37.
20. Fitzgerald, J; Monday, J; Foster, T; Bohach, G; Hartigan, P; Meaney, W; Smyth, C (2001) Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol*; 183:63-70.
21. Foster, T; Höök, M (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*; 6:484-488.
22. Gara, J (2007) ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*; 270: 179-188.
23. Gara, E; Eldridge, G; Goering, M; DeLancey Pulcini, E; Hamilton, M; Costerton, J; James, G (2007) Asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. *Antimicrob Agents Chemot*; 51: 1813-1817.
24. Gerke, C; Kraft, A; Süssmuth, R; Schweitzer, O; Götz, F (1998) Characterization of the N-Acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin; *J Biol Chem* 273: 18586-18593.
25. Gerke, T; Telegdi, J; Thierry, D; Sand, W (1998) Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl Env Microbiol*; 64: 2743-2747.
26. Giannechini, R; Concha, C; Rivero, R; Delucci, I; Moreno López, J (2002) Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Vet Scand*; 43, 221-230.
27. Gibson, D; White, A; Snyder, S; Martin, S; Heiss, C; Azadi, P; Surette, M; Kay, W (2006) *Salmonella* produces an O-Antigen capsule regulated by AcfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol*; 188: 7722-7730.
28. Givskov, M; Nys, R; Manfield, M; GRAM, L; Maximilien, R; Eberl, L; Molin, S; Steinberg, P; Kjelleberg, S (1996) Eukaryotic Interference with Homoserine Lactone-Mediated Prokaryotic Signalling *J Bacteriol*; 178 (22): 6618–6622.
29. Gotz, F (2002) *Staphylococcus* and Biofilm. *Mol Microbiol*; 43: 1367-1378.
30. Haveri, M; Hovinen, M; Roslöf, A; Pyörälä, S (2008) Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Microbiol*; 46: 3728-3735.
31. Head, N; Yu, H (2004) Cross- selectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect Imm*; 72: 133-134 .
32. Herron-Olson, L; Fitzgerald, R; Musser, J; Vivek Kapur, V (2007) Molecular

- correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE; 2(10): 1-13.
33. Hillerton, J; Berry, E (2005) Treating mastitis in the cow- a tradition or an archaism. Soc Appl Microbiol; 98: 1250-1255.
 34. Hoyle, B; Jass, J; Costerton, W (1990) The biofilm glycocalyx as a resistance factor. J Antimicrob Chemot ; 26: 1-6.
 35. Hurlow, J; Bowler, P (2009) Clinical experience with wound biofilm and management: A Case Serie. Ostomy Wound Management; 55(4): 38-49.
 36. Irie, Y; Parsek, M (2008) Quorum Sensing and microbial biofilms. En: Romeo, T. Bacterial Biofilm, Current Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, Springer, pp.67-84.
 37. Jabra-Rizk, M; Meiller, T; James, C; Shirtliff, M (2006) Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. Ant Agents Chemot; 50: 1463–1469.
 38. Jensen, A; Lockett, V; Johnson, D; Mobley; H (2004) Mannose-resistant proteus-like fimbriae are produced by most proteus mirabilis Strains Infecting the urinary tract, dictate the In Vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. Infect Imm; 72: 7294-7305.
 39. Jiang, X; Pale, J (2006) Microbial biofilms En: Pace, J; Rupp, M; Finch, R; Biofilms, infection and antimicrobial therapy. Boca Raton, Ed: CRC, pp 3-20.
 40. Jin, H; Zhou, R; Kang, M; Luo, R; Cai, X; Chen, H (2006) Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*. Vet Microbiol; 118: 117-123.
 41. Kerro Dego, O; van Dijk , J; Nederbragt, H (2002) Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. Vet Quart; 24(4): 181-198.
 42. Kleerebezem, M; Quadri, L; Kuipers, O; Vos, W (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol; 1997; 24: 895-904.
 43. Kies, S; Otto, M; Vuong, C; Götz, F (2001) Identification of the sigB Operon in *Staphylococcus epidermidis*: Construction and Characterization of a sigB Deletion Mutant. Infec Imm; 69: 7933-7936.
 44. Kievit, T; Iglewski, B (2003) Quorum sensing and microbial biofilm. En: Wilson, M Medical Implication of biofilm. New York, Cambridge University, pp 18-35
 45. Leriche, V; Briandet, R; Carpentier, B (2003) Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. Environ Microbiol; 5: 64-71.
 46. Luppens, S; Reij, M; van der Heijden, R; Rombouts, F; Abee, T (2002) Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* Biofilm cells to disinfectants. Appl Environ Microbiol; 68: 4194-4200.
 47. McNamara, P; Milligan-Monroe, K; Khalili, S; Proctor, R (2000) Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol; 182: 3197-3203.
 48. Melchior, M; Vaarkamp, H; Fink-Gremmels, J (2006) Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?. Vet J; 171: 398–407.

49. Mittelman, M (1998) Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J Dairy Sci*; 81: 2760–2764.
50. Moretro, T; Hermansen, L; Holck, A; Sidhu, M; Rudi, K; Langsrud, S (2003) Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol*; 69: 5648-5655.
51. Murray, P; Kobayashi, G; Pfaller, M; Rosenthal, K (1997) *Staphylococcus*, en *Microbiología Médica*. 2a ed, Madrid, Harcourt Brace 19:166-179.
52. Neu, T (1996) Significance of Bacterial Surface-Active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev*; 60: 151-166.
53. Novick, R (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*; 48: 1429-1449.
54. Otto, M (2008) *Staphylococcal* Biofilms. En: Romeo, T. *Bacterial Biofilm Current Topics in Microbiology and Immunology*, Berlin, Springer, pp. 207-228.
55. Parsek, M y Fuqua, C (2004) Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J Bacteriol*; 186: 4427–4440.
56. Pascual Anderson, M.R; Calderon y Pascual, V (1992) Investigación y recuento de *Staphylococcus aureus*. En: Pascual Anderson, M.R; Calderon y Pascual, V. *Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid; ed. Díaz de Santos, pp: 63-70.
57. Rabello, R; Souza, C; Duarte, R; Lopes, R; Teixeira, L; Castro, A (2005) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro Brazil. *J Dairy Sci*; 88: 3211-3219.
58. Reading, C; Speradio, V (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Let*; 254: 1-11.
59. Revelli G; Rodríguez C (2001) Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina. *Téc Láct Latinoamer*; 23: 48-53.
60. Ruiz, J; Ramírez, N; Arroyave, O (2001) Determinación de concentraciones inhibitorias de las bacterias aisladas de la glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Col Cienc Pec*; 14(2): 143-154.
61. Saïd-Salim, B; Dunman, P; McAleese, A; Macapagal, D; Murphy, E; McNamara, P; Arvidson, S; Foster, T; Projan, S ; Kreiswirth, N (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol*; 185: 610-619.
62. Sauer, K; Camper, A; Ehrlich, G; Costerton, W; Davies, D (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a Biofilm. *J Bacteriol*; 184: 1140-1154.
63. Schauder, S; Bassler, B (2001) The languages of bacteria. *Genes y Dev*; 15: 1468-1480.
64. Schlegelová, J; Barbak, V; Holasová, M; Dendis, M (2008) The Biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. *Folia Microbiol*; 53(6): 500–504.
65. Shah, C; Mittelman, M; Costerton, W; Parenteau, S; Pelak, M; Arsenault, R; Mermel, L (2002) Antimicrobial activity of a novel catheter lock solution. *Ant Agent Chemoth*; 46(6): 1674-1679.

66. Sibbald, M; Ziebandt, A; Engelmann, S; Hecker, M; De Jong; Harmsen, A; Raangs, G; Stokroos, I; Arends, J; Dubois, J; van Dijl, J (2006) Mapping the pathways to Staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev*; 70: 755-788.
67. Somerville, G; Cockayne, A; Dürr, M; Peschel, A; Otto, M; Musser, J. (2003) Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* ...Toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. *J Bacteriol*; 185: 6686-6694.
68. Steinmoen, H; Knutsen, E; Håvarstein, L (2002) Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Nat Acad Sci*; 99: 7681-7686.
69. Stoodley, P; Wilson, S; Stoodley, L; Boyle, J; Lapping-Scott, H; Costerton, W (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Env Microbiol*; 67: 5608-5613.
70. Tormo, M; Marti, M; Valle, J; Manna, A; Cheung, A; Lasa, I; Penadés, R (2005) SarA Is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol*; 187: 2348-235.
71. Trottonda, M; Manna, A; Cheung, A; Lasa, I; Penadés, J (2005) SarA Positively controls bap-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*; 187: 5790–5798.
72. Tsang, L; Cassat, J; Shaw, L; Beenken, K; Smeltzer (2008) Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus* SarA mutants. *PLoS ONE*; 3: 1-14.
73. Úbeda, C; Tormo, A; Cucarella, C; Trottonda, P; Foster, T; Lasa, I; Penadés, J (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol*; 49(1), 193–210.
74. Valle, J; Toledo-Arana, A; Berasain, C; Ghigo, J; Amorena, B; Penadés, J; Lasa, I (2003) SarA and sigma b not is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*; 48: 1075-1087.
75. Vuong, C; Kocianova, S; Voyich, J; Yao, Y; Fischer, E; De Leo, F; Otto, M (2004) Biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*; 279: 54881-54886
76. Vuong, C; Saenz, H; Gotz, F; Otto, M (2000) Impact of the Quorum Sensing system on adherence to polysysterne in *Staphylococcus aureus*. *J Inf Dis*; 183: 1688-1693.
77. Watnick, P; Kolter, R (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*; 182: 2675-267
78. Wright, J; Traber, K; Corrigan, R; Benson, S; Musser, J; Novick (2005) The agr radiation: an early event in the evolution of *Staphylococci*. *J Bacteriol*; 187: 5585-5594.
79. Wong, L (1998) Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci*; 81: 2765-2770.
80. Yao, Y; Sturdevant, D; Otto, M (2005) Genomewide Analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the rol of phenol-soluble modulins in formation of biofilm. *J Inf Dis*; 191: 289-298.
81. Yarwood, J; Bartels, D; Volper, E; Greenberg, E (2004) Quorum Sensing in

Staphylococcus aureus biofilm. J Bacteriol; 186: 1838-1850.

82. Zadoks, R; van Leeuwen, W; Kreft, D; Fox, L; Barkema, H; Schukken, Y; van Belkum, A (2002) Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. J Clin Microbiol; 40: 3894-3902.
83. Zolfaghar, I; Evans, D; Fleiszig, S (2003) Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Inf Imm; 71: 5389-5393.
84. Zottola, E (1994) Microbial and biofilm formation: a new problem for the food industry? Food tech; 48:107-115.

Abreviaturas

- Acil-HSL: Homoserin Lactona acilada
- ADN: Acido Desoxirribonucleico
- agr: Regulador de Gen Accesorio (accessory gene regulator)
- AIP: Péptido Autoinductor (auto-inducing peptide)
- ARN: Acido Ribonucleico
- CC: Complejo Clonal
- CLSM: Microscopia de escaneo Laser Confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy)
- CSP: Péptidos de Señal de Competencia (Competence Signal Peptides)
- EPS: Exopolisacáridos
- HSL: Homoserin Lactona
- ica: Adhesión Intercelular (Intercellular Adhesin)
- mo: microorganismo
- MRSA: *S. aureus* Meticilinorresistente (Methicillin-Resistant *S. aureus*)
- MSCRAMM: Componentes que Reconocen Moléculas Ahesivas de la Matriz (Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules)
- PIA/PNAG: Polisacárido de Adhesión Intercelular (Polysaccharide Intercellular Adhesin)/ de Acetil- glucosamina (Polymeric N-Acetyl-glucosamine)
- PVL: Leucocidina Panton-Valentine
- QSI: Inhibidores del Quorum Sensing (Quorum Sensing Inhibitor)
- Rot: Represor de toxinas (Repressor of Toxins)
- SDS: Dodecil Sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate)
- TCRSs: Sistema Regulador de dos Componentes (Two-Component Regulatory Systems)
- TSST: Toxina del Síndrome del choque Toxico (Toxic Shock Syndrome Toxin)