



**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA**

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SUSHI ADQUIRIDO EN LOCALES
GASTRONÓMICOS DE LA ZONA DE GÓMEZ CARREÑO, VIÑA DEL MAR,
CHILE**

Trabajo de Titulación para optar al Título de
Técnico Universitario en GESTIÓN DE
CALIDAD EN ALIMENTOS

Alumna:

María Victoria Fernández Santia Meana

Profesor guía:

Dr. Bernardo Prado Alderete

Profesora Correferente:

Ing. María Elisa Escobar Peña

2019

DEDICATORIA

Agradezco, en primera instancia, a mis directores de memoria por su apoyo y orientación en el desarrollo de esta Memoria de Título. Agradezco a todos los profesores y compañeros que me acompañaron en mi formación académica. Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional. Dedico este trabajo a mi marido y a mi hija y, muy especialmente, a Patricio y al Tata.

ÍNDICE

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	3
1.1. Generalidades del Sushi	4
1.1.1. La historia del Sushi	4
1.1.2. Características bioquímicas y microbiológicas de los principales ingredientes del Sushi	5
1.1.2.1. Productos de la pesca	5
1.1.2.2. Carne	5
1.1.2.3. Vegetales	6
1.1.2.4. Arroz	6
1.2. Enfermedades Transmitidas por Alimentos	6
1.2.1. Definición	6
1.2.2. Agentes contaminantes en alimentos	7
1.2.3. Fuentes de contaminación en alimentos	7
1.2.3.1. Manipuladores de alimentos	7
1.2.3.2. Materias primas	8
1.2.3.3. Agua	8
1.2.3.4. Fauna nociva	8
1.2.3.5. Tierra y aire	8
1.2.3.6. Superficies y utensilios	8
1.2.4. Contaminación Cruzada	9
1.2.4.1. Contaminación cruzada directa	9
1.2.4.2. Contaminación cruzada indirecta	9
1.2.5. Tipo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos de origen microbiano	9
1.2.5.1. Intoxicación	9
1.2.5.2. Infección	10
1.2.5.3. Toxicoinfección	10
1.3. Aspectos microbiológicos del <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.3.1. Estafilococos	10
1.3.2. Morfología e identificación	11
1.3.3. Crecimiento	11
1.3.4. Cultivo	11
1.3.5. Factores de virulencia	12
1.3.5.1. Factores de virulencia del <i>S. aureus</i> : componentes estructurales.	13
1.3.5.2. Factores de virulencia del <i>S. aureus</i> : toxinas.	14
1.3.5.3. Factores de virulencia del <i>S. aureus</i> : enzimas.	15
1.3.6. Epidemiología	16
1.3.7. Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i>	16

1.3.7.1. Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i> : intoxicación alimentaria.	17
CAPÍTULO 2: MARCO METODOLÓGICO	19
2.1. Muestreo y tamaño de la muestra	20
2.2. Toma de muestras	20
2.3. Codificación de las cepas aisladas	20
2.4. Equipos	21
2.5. Materiales	21
2.6. Medios y reactivos	22
2.6.1. Pre-enriquecimiento no selectivo: Caldo extracto cerebro-corazón (BHI)	22
2.6.1.1. Fundamento del medio	22
2.6.1.2. Composición del medio	22
2.6.1.3. Preparación del medio	22
2.6.2. Enriquecimiento selectivo: Caldo Manitol salado o Caldo con sal y manitol	22
2.6.2.1. Fundamento del medio	22
2.6.2.2. Composición del medio	23
2.6.2.3. Preparación del medio	23
2.6.3. Aislamiento: Agar Baird-Parker (BP)	23
2.6.3.1. Fundamento del medio	23
2.6.3.2. Composición del medio	24
2.6.3.3. Preparación del medio	25
2.6.4. Tinción de Gram	25
2.6.4.1. Fundamento del procedimiento	25
2.6.4.2. Reactivos necesarios	25
2.6.5. Pruebas bioquímicas confirmativas	26
2.6.5.1. Prueba Coagulasa	26
2.6.5.2. Prueba Catalasa	26
2.6.5.3. Prueba DNasa	27
2.6.5.4. Prueba de Fermentación de Carbohidratos	27
2.6.6. Otros: medio nutritivo	28
2.7. Procedimiento	29
2.7.1. Pre-enriquecimiento no selectivo	29
2.7.2. Enriquecimiento selectivo	29
2.7.3. Aislamiento	29
2.7.4. Sembrar colonia característica en medio nutritivo	29
2.7.5. Tinción de Gram	29
2.7.5.1. Preparación de Frotis y fijación de bacterias al porta-objetos	30
2.7.5.2. Tinción inicial: cristal violeta	30
2.7.5.3. Mordente: yoduro (lugol)	30
2.7.5.4. Decoloración: solución alcohol-acetona	30
2.7.5.5. Contratinción	30
2.7.5.6. Observación en microscopio	31
2.7.6. Pruebas bioquímicas confirmativas	31
2.7.6.1. Prueba de Coagulasa	31
2.7.6.2. Prueba de Catalasa	31

2.7.6.3. Prueba de DNasa	31
2.7.6.4. Prueba de Fermentación de Carbohidratos	32
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
3.1. Registro de resultados del análisis microbiológico de muestras de Sushi	35
3.1.1. Resultados: enriquecimiento selectivo	35
3.1.2. Resultados: Aislamiento y Tinción de Gram	36
3.1.3. Resultados: pruebas bioquímicas confirmativas	41
3.2. Presencia de <i>S. aureus</i> en muestras de suhi adquiridas en locales gastronómicos de la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile.	43
3.2.1. Criterio para considerar a la cepa aislada de la muestra de sushi como <i>S. aureus</i>	43
3.2.2. Presencia de <i>S. aureus</i> a nivel macro y micro	43
3.2.2.1. Presencia de <i>S. aureus</i> a nivel de la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile (nivel macro).	43
3.2.2.2. Presencia de <i>S. aureus</i> por local (nivel micro)	44
3.3. Discusión de los resultados	47
3.3.1. Análisis de posibles causas de contaminación del alimento por <i>S. aureus</i>	47
3.3.2. Análisis de posibles peligros y factores de riesgo relacionados con la contaminación del alimento por <i>S. aureus</i>	48
3.3.3. Análisis sobre la presencia de bacterias estafilococias distintas a <i>S. aureus</i>	49
3.3.4. Fuentes de error en el desarrollo de la investigación y análisis de resultados	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXO	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1.	Flujograma del procedimiento para el análisis microbiológico para determinar la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en una muestra alimenticia	33
Figura A-1.	Crecimiento en Agar Baird Parker (Aislamiento)	56
Figura A-2.	Observación al microscopio luego de Tinción de Gram (cocos grampositivos en racimos)	56
Figura A-3.	Prueba de Coagulasa. Resultados: negativo (tubo superior), positivo (tubo inferior)	57
Figura A-4.	Prueba de DNasa	57
Figura A-5.	Prueba de Carbohidratos. De izquierda a derecha: tubo sin inocular, tubo positivo para prueba de carbohidratos, tubo negativo para prueba de carbohidratos	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Parámetros fisicoquímicos que afectan en la producción de la enterotoxina por parte de <i>S. aureus</i>	18
Tabla 2-1.	Resultados del crecimiento para diferentes bacterias en medio agar BP	24
Tabla 3-1.	Crecimiento observado en caldo manitol salado	35
Tabla 3-2.	Tinción de Gram y aislamiento de cepas en agar BP	36
Tabla 3-3.	Resultados pruebas bioquímicas confirmativas	41
Tabla 3-4.	Resultados esperados para distintas pruebas bioquímicas confirmativas y producción de enterotoxina en diferentes especies del género <i>Staphylococcus</i>	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 3-1.	Porcentaje de locales gastronómicos evaluados en la zona de Gómez Carreño (Viña del Mar, Chile) cuyas muestras de sushi presentaron contaminación por <i>S. aureus</i>	44
Gráfico 3-2.	Porcentaje de muestras de sushi que presentaron contaminación por <i>S. aureus</i> en el local 1	45
Gráfico 3-3.	Porcentaje de muestras de sushi que presentaron contaminación por <i>S. aureus</i> en el local 2	45
Gráfico 3-4.	Porcentaje de muestras de sushi que presentaron contaminación por <i>S.aureus</i> en el local 3	46
Gráfico 3-5.	Porcentaje de muestras de sushi que presentaron contaminación por <i>S.aureus</i> en el local	46

SIGLA Y SÍMBOLOGÍA

A. SIGLA

Aw:	Actividad de Agua
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AGR:	Regulador del Gen Accesorio
ATCC:	American Type Culture Collection
BHI:	Infusión Cerebro-Corazón
BP:	Baird- Parker
BPM:	Buenas Prácticas de Manufactura
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
ETA:	Enfermedad Transmitida por Alimentos
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
MSCRAMM:	Componentes Microbianos de Superficie
N:	Normalidad
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH:	Potencial de Hidrógeno
QS:	Percepción de Cuórum
RSA:	Reglamento Sanitario de los Alimentos
SPEE:	Síndrome de la Piel Escaldada
SST:	Síndrome del Shock Tóxico
°C:	Grados Celcius
% p/v:	Porcentaje Peso-Volumen
% v/v:	Porcentaje Volumen-Volumen

B. SIMBOLOGÍA

g:	Gramo
h:	Hora
ng:	Nanogramo
L o l:	Litro
mL o ml:	Mililitro

RESUMEN

Keywords: SUSHI, ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS, STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Los actuales hábitos alimenticios incluyen el consumo de los alimentos denominados Listos para Consumo, aquellos preparados por el elaborador de alimentos y que no poseen un tratamiento térmico previo a ser consumidos por el cliente. Esto, si no se lleva a cabo una correcta manipulación de los alimentos, puede representar un riesgo para el consumidor final puesto que se expone a contraer una serie de enfermedades de origen alimenticio (Enfermedades Transmitidas por Alimentos, ETA).

El objetivo del presente Trabajo de Titulación es el de determinar la presencia de *Staphylococcus aureus*, microorganismos responsable de un tipo de intoxicación alimentaria, en muestras de sushi adquiridas en locales gastronómicos de la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile.

Este estudio es de tipo descriptivo transversal. Se analizaron un total de 12 muestras, 3 muestras aleatorias por cada uno de los 4 locales especializados en la venta de sushi en la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile. Primero se realizó un pre-enriquecimiento no selectivo, un enriquecimiento selectivo y un aislamiento de la bacteria de interés. Finalmente, se confirmó mediante una serie de pruebas bioquímicas la naturaleza de las cepas aisladas, determinando si se trataban efectivamente de *Staphylococcus aureus*.

A partir de los resultados arrojados, se determinó la incidencia de *S. aureus* en los locales evaluados. Todos los locales gastronómicos que expenden sushi en la zona de Gómez Carreño (Viña del Mar, Chile) presentaron muestras de alimentos contaminadas por *S. aureus*. Tres de los cuatros locales examinados presentaron una incidencia de *S. aureus* del 67%, mientras que sólo uno presentó una incidencia del 33%. Además de este microorganismo, las muestras alimenticias sometidas a análisis microbiológico estaban contaminadas con otras especies del género *Staphylococcus*, pero de menor importancia clínica en relación a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).

INTRODUCCIÓN

La industrialización de los alimentos ha aportado ventajas tales como el aumento del alimento disponible y el uso de nuevas tecnologías para el procesamiento y conservación de los alimentos. Sin embargo, este hecho unido a cambios en la forma de vida de las personas como el consumo de alimentos Listos para Consumo o el de alimentos crudos, plantea nuevas problemáticas también.

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) se deben a la ingestión de alimentos contaminados con sustancias químicas o microorganismos. Estas son un problema de salud pública, originados en principio por una mala manipulación del producto alimenticio.

El sushi es una comida de origen japonés que agrupa las preparaciones que son hechas con *shari* (arroz aderezado) y, primordialmente, pescado y/o mariscos crudos. Esta comida antiquísima se ha hecho muy popular en occidente en las últimas décadas, situación que no excluye a Chile. En los últimos años han aumentado los locales gastronómicos que expenden sushi a lo largo de todo el país debido a su gran aceptación por los consumidores.

Usualmente, el sushi se relaciona con enfermedades de origen parasitario, pero en el presente Trabajo de Título se buscarán bacterias relacionadas usualmente con la mala manipulación de los alimentos. El interés de este estudio se centra en conocer el riesgo que se corre al consumir este tipo de alimentos y en la importancia de implementar correctas medidas higiénicas en la elaboración de alimentos.

Por lo expuesto anteriormente, se encontró la necesidad de realizar un trabajo investigativo que brindase información respecto a la manera que son tratados este tipo de alimentos, en particular, en la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile. El sector de la ciudad se eligió arbitrariamente, por no disponer datos al respecto. La metodología de estudio a emplear implicará un análisis microbiológico, de tipo descriptivo transversal, a muestras de sushi adquiridas en locales de la zona antes mencionada. Se determinará la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus*, microorganismo relacionado con la mala manipulación de alimentos y responsable de un tipo de intoxicación alimentaria. Para ello primero se realizará un aislamiento de cepas puras (potencialmente *S. aureus*) y, finalmente, estas se someterán a distintas pruebas confirmativas que conduzcan a concluir la naturaleza de las mismas. El análisis de los resultados experimentales ayudará a alcanzar los siguientes objetivos.

Objetivo General

Determinar de la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de sushi adquirido en locales gastronómicos de la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* como microorganismo indicador de malas prácticas higiénicas y de manipulación de alimentos en la elaboración de sushi.
- Determinar los posibles peligros en materia de salud que podría significar ingerir dichos alimentos en el actual estado de manipulación.
- Determinar las posibles causas de una potencial contaminación de las muestras analizadas, por *S. aureus*.

Hipótesis

El sushi que se expende en locales gastronómicos de la zona de Gómez Carreño presenta contaminación por *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

1.1. GENERALIDADES DEL SUSHI

1.1.1. La historia del Sushi

La historia de este alimento se remonta hace miles de años, empezando como una técnica para preservar el pescado crudo. Se cree que donde primero se llevó a cabo fue en las regiones montañosas del sudeste asiático, sobre todo en Tailandia, Laos, Myanmar y Malasia. De acuerdo a la evidencia encontrada, la primera vez que se mencionó el término *sushi* fue un diccionario chino, que data del siglo II d.C. [18]

Originalmente, el proceso involucraba envolver al pescado crudo y salado en arroz cocido, que producía ácido láctico. Luego de varios meses, el arroz era desechado, y el pescado fermentado podía consumirse.

En Japón, hoy considerado el país productor más importante de este alimento, incluso hasta el punto de confundirlo como el lugar de origen del mismo, esta técnica para la conservación de alimentos fue introducida en el siglo 7d.C [18], desarrollándose primeramente en la región del lago Biwa, cerca de Kioto, y denominándose al método como *nare-zushi*, que significa pescado avejentado [29].

En un principio, la técnica implicaba una fermentación de medio año o más de duración, y la acción de envolver se efectuaba bajo presión. Progresivamente, los tiempos de fermentación y la presión ejercida al envolverse el pescado se fue reduciendo. El sushi moderno está relacionado con el *nama-zushi* (XV y XVI d.C.), donde el tiempo de fermentación se acortó a un mes aproximadamente gracias a la adición de vinagre de arroz, pero este proceso seguía ejerciéndose bajo presión. A partir de este momento, el arroz ya no se descartaba sino que también era consumido. Luego, surgió el *haya-zushi* con una preparación que involucra un periodo de 24 horas; el *hako-zushi* (mediados del siglo XVI d.C.) cuya elaboración implicaba unas pocas horas, por lo cual ya no ocurría una fermentación *per se*; y finalmente, la base de la técnica del sushi consumido hoy día, que se cree fue ideada por Hanaya Yohei, el *nigiri-zushi* (XVII d.C.). Este último tipo de sushi consiste en una simple bola de arroz, moldeada a mano, con un pedazo de pescado sobre la misma. [29] El arroz utilizado está recién cocido para luego agregarle vinagre de arroz y sal. El pescado debe ser fresco. Entonces, lo que comenzó como una técnica de preservación del pescado, perdió esa finalidad (ya que el poco tiempo de preparación no da lugar a una fermentación) para derivar tan sólo en una nueva forma de preparar los alimentos y que debe consumirse rápidamente. Existen otras evoluciones posteriores del sushi que buscan innovar en la técnica, pero siempre basándose en la que da lugar al *nigiri-zushi*.

1.1.2. Características bioquímicas y microbiológicas de los principales ingredientes del Sushi

A continuación se detallan brevemente algunas características de los principales ingredientes que componen al Sushi, desde el punto de vista químico y microbiológico:

1.1.2.1. Productos de la pesca

Este término engloba pescados, mariscos y moluscos. La carne de pescados libre de enfermedades ha de ser estéril y, generalmente, la carga microbiana de la carne del animal, producto de la pesca, está directamente con la calidad del agua donde se ha desarrollado o capturado. La microbiota inicial se sitúa en el limo superficial, las agallas y los intestinos. [23] De acuerdo con datos de la FAO, las bacterias autóctonas, que son comunes y están ampliamente distribuidas en los medios acuáticos de diferentes lugares del mundo, y de carácter patógeno transmitidos por productos de la pesca son: *Clostridium botulinum*, *V. cholerae*, *V. Parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Listeria monocytogenes*. [31] Claro está que la temperatura del agua también afecta, siendo las aguas templadas o cálidas las que contienen una microbiota con abundancia de bacterias mesófilas Gram positivas; en aguas frías, predominan las bacterias Gram negativas.[23]

Desde el punto de vista de su composición bioquímica, el pescado es rico en proteínas (20-25%) y su contenido graso suele variar según la especie (4-8%). Luego de su captura, su pH ronda valores entre 6,6 y 6,7. [35] En el caso de los moluscos, este varía entre 4,8 y 6,3. [21]

1.1.2.2. Carne

Si bien no es un ingrediente usual en la preparación, si muchas veces se ofrece esta opción. Generalmente suelen ser de pollo y ternera, y deben ser cocinadas adecuadamente para evitar transmitir microorganismos propios de este tipo de carnes. Como pasa con el pescado, la microbiota presente en las carnes se relaciona directamente con los procesos de sacrificio y carnización y del entorno donde ha ocurrido. [23] Los microorganismos patógenos que usualmente se han asociado a brotes por la ingesta de carne son: *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, *Campylobacter*, entre otros. [19]

Se trata de un alimento de gran valor nutritivo, debido sobre todo a la riqueza proteica de su composición bioquímica. Dado a sus características nutricionales, pH

(carne de res: 5,1-5,6; pollo: 6,2-6,4) y aw elevado (cercano a 0,99) es un medio muy favorable para el desarrollo microbiano. [21]

1.1.2.3. Vegetales

Usualmente la contaminación microbiana de los productos vegetales es debida a su riego con aguas contaminadas. Los microorganismos patógenos más frecuentemente transmitidos por frutas y verduras son: *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*. [1]

Las verduras y hortalizas y otros productos vegetales constituyen un aporte considerable de vitaminas, fibra y minerales. Su composición de agua corresponde a valores entre 62 y 96% y su pH varía según el alimento. [35]

1.1.2.4. Arroz

El grano de cereal es pobre en agua (11-13%), por lo que significa un impedimento o complicación para el crecimiento microbiano. Sin embargo, en el grano de arroz se utiliza cocido, con lo que el mismo absorbe agua y entonces sí significa un alimento que puede ser afectado por contaminación microbiana, sobre todo por su alto contenido proteico (69-78%). La microbiota, generalmente microorganismos saprófitos, es abundante y se sitúa en su superficie. La misma suele tener origen del ambiente que lo rodea. [35] Una bacteria bien conocida que produce intoxicación alimentaria y que se asocia con el arroz, es el *Bacillus cereus*.

1.2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

1.2.1. Definición

Respecto al concepto de inocuidad en alimentos, se dice que un alimento es inocuo cuando se tiene la garantía de que el mismo no causará daño al consumidor al ser ingerido o preparado, de acuerdo con los requisitos higiénicos-sanitarios. [37]

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son aquellas generalmente responsables de trastornos en el tubo intestinal, acompañados de síntomas como el dolor abdominal, diarrea y vómitos. Las ETA se producen por la ingesta de alimentos que han sido contaminados, ya sea por agente físicos, químicos y/o biológicos. De acuerdo a la OMS, cada año 1 de cada 10 personas en el mundo es afectada por una ETA; y en el

continente americano, se estima que cada año 77 millones de personas enferman a causa de las mismas, y mueren como consecuencia unas 9000 personas. [32]

1.2.2. Agentes contaminantes en alimentos

De acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) de la República de Chile, se define contaminación como “la presencia de microorganismos, virus y/o parásitos, sustancias extrañas o deletéreas de origen mineral, orgánico o biológico, sustancias radioactivas y/o sustancias tóxicas en cantidades superiores a las permitidas por las normas vigentes, o que se presuman nocivas para la salud. La presencia de cualquier tipo de suciedad, restos o excrementos. Aditivos no autorizados por la reglamentación vigente o en cantidades superiores a las permitidas.” [9] Luego, se entiende que la contaminación de los alimentos puede tener tres orígenes: físico, químico y/o biológico.

Por citar algunos ejemplos:

- Agentes físicos: vidrio, plástico, metal, cabellos, entre otros.
- Agentes químicos: soluciones de limpieza, desinfectantes, plaguicidas, entre otros.
- Agentes biológicos: bacterias, virus, parásitos, toxinas, entre otros.

1.2.3. Fuentes de contaminación en alimentos

Las principales fuentes de contaminación en alimentos son las siguientes:

1.2.3.1. Manipuladores de alimentos

Aquellas personas que preparan, manipulan y sirven alimentos suelen ser una fuente importante de contaminación si los procesan o manipulan de forma inadecuada. Generalmente, son responsables de introducir microorganismos patógenos presentes en nariz, garganta, uñas, heridas, manos, así como también propios de heces fecales, orina y tracto respiratorio. [2] Manipulador de alimentos “es toda persona que está en contacto con los alimentos en forma directa o indirecta, a lo largo de toda la cadena de producción.” [37]

1.2.3.2. Materias primas

Ejemplos de esto pueden ser cultivos irrigados con aguas negras, uso inapropiado de insecticidas y pesticidas en vegetales, frutas y hortalizas, animales enfermos, entre otros. [25]

1.2.3.3. Agua

El agua que se utiliza para lavar, preparar o como ingrediente en alimentos puede ser una fuente importante de contaminación. [2]

1.2.3.4. Fauna nociva

Dentro de este grupo se encuentran las cucarachas, ratones, moscas, entre otros insectos y animales que tienen la capacidad de transmitir distintos microorganismos patógenos de los cuales son portadores habituales. [6]

1.2.3.5. Tierra y aire

La tierra representa una fuente de contaminación importante tanto desde el punto de vista biológico (bacterias, hongos y levaduras) como del químico (metales, pesticidas, entre otros). Si bien el aire no tiene una microbiota propia, sí sirve como medio para que distintos microorganismos lleguen de un punto a otro. El aire también funciona como un agente importante en la contaminación abiótica a partir de efluentes de contaminación industrial. [20]

1.2.3.6. Superficies y utensilios

Estas superficies son inertes por lo que, en teoría, los organismos no pueden asentarse en los mismos y si lo hacen viven allí poco tiempo. Sin embargo, en la realidad estas superficies ya sea metálicas, plásticas o de goma, presentan rugosidad que no permiten una adecuada limpieza o a veces por no soportar temperaturas de esterilización, no son sometidos en la práctica a este tipo de procesos. De este modo, la flora que se sitúa en los mismos puede generar un pequeño limo superficial que significa una fuente de contaminación. [20]

1.2.4. Contaminación Cruzada

La contaminación cruzada puede describirse como “la transferencia de agentes contaminantes de un alimento contaminado a otro que no lo está”. [33] Un ejemplo habitual es el trozar carne cruda en una tabla de cocina y después cortar vegetales para preparar una ensalada, sin limpiar la tabla antes.

Este tipo de contaminación puede ser transmitida de manera directa o indirecta al alimento. [13]

1.2.4.1. Contaminación cruzada directa

Ocurre cuando el alimento contaminado entra en contacto directo con otro que no lo está. (Ejemplo: cuando en el refrigerador entran en contacto alimentos listos para su consumo con carnes crudas).

1.2.4.2. Contaminación cruzada indirecta

Sucede cuando los microorganismos son transferidos de un alimento contaminado a otro que no lo está, a través de utensilios, tablas de cortar, entre otros. Ocurre cuando se utilizan útiles sucios o bien por una mala higiene personal. (Ejemplo: manipular pollo crudo con las manos y luego, sin lavarse las manos, manipular otro alimento, como una rebanada de pan).

1.2.5. Tipo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos de origen microbiano

Basándose en las características de las ETA de origen microbiano, estas se pueden clasificar en los siguientes tres grupos: intoxicación, infección y toxicoinfección.

1.2.5.1. Intoxicación

Este tipo de enfermedades ocurren debido a la ingesta de toxinas bacteriana preformadas o de mohos (micotoxinas) que se forman en los alimentos. La toxina debe estar en forma activa en el alimento contaminado. Una vez producidas las toxinas durante el crecimiento de los microorganismos, no es preciso que el alimento presente células viables al ser consumido para que se manifieste la enfermedad. (Ejemplo: envenenamiento estafilocócico por un alimento) [5]

1.2.5.2. Infección

Las enfermedades causadas por infección son consecuencia del consumo de alimentos contaminados con bacterias o virus enteropatógenos. Las células viables tienen la capacidad de establecerse y multiplicarse en el tracto digestivo del huésped y causar la enfermedad. (Ejemplo: salmonelosis) [5]

1.2.5.3. Toxicoinfección

Esta situación se produce por ingerir un gran número de células viables de microorganismos patógenos a través de un alimento contaminado. Una vez en el huésped las bacterias pueden liberar toxinas que producen los síntomas. (Ejemplo: gastroenteritis por *Clostridium perfringens*) [5]

1.3. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS

1.3.1. Estafilococos

Dentro la familia Micrococcaceae, se encuentran los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. *Staphylococcus* posee al menos 40 especies, siendo las tres de importancia clínica *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

Los estafilococos son células esféricas grampositivas, por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a uvas. Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían en color e intensidad. [7]

Algunos son miembros de la microbiota normal de la piel y las mucosas del ser humano; otros producen supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Los de tipo patógeno producen generalmente hemólisis, coagulación del plasma y diversas enzimas y toxinas extracelulares. [7]

En el ámbito alimenticio, es bien conocido el caso del *Staphylococcus aureus*, objeto de estudio de este Trabajo de Título, quien produce enterotoxinas que son muy termoestables, resistentes tanto a la cocción como a la pasteurización. La contaminación de los alimentos suele producirse a través de los manipuladores. Una vez contaminado el alimento, deben presentarse las condiciones para producirse la toxina. Los síntomas

aparecen a las 1-8 horas después y no suelen durar más de 24 horas. Estos abarcan náuseas, vómitos violentos, dolores abdominales y a veces diarrea. [40]

1.3.2. Morfología e identificación

Los estafilococos son bacterias de forma esférica, siendo de 1 μm de diámetro aproximadamente, y dispuestas en racimos irregulares. Este tipo de bacterias no son móviles ni forman esporas. [7]

La identificación de *S. aureus* suele hacerse a través de la tinción de Gram y pruebas bioquímicas. El resultado de su tinción de Gram, indica que son Gram positivos (+), por dar una coloración violeta oscuro tras el procedimiento. Dentro de las pruebas bioquímicas recurrentes se encuentran: prueba de la catalasa, permitiendo diferenciar estafilococos (positivos) de los estreptococos (negativos); prueba de fermentación de azúcares, como la glucosa o el manitol, positivas en ambos casos; prueba de la coagulasa, basándose en la capacidad del *S. aureus* de generar una enzima extracelular que coagula el plasma; prueba de la DNasa termoestable, que permite fácilmente la identificación en un medio que contiene DNA y verde malaquita. [8]

S. aureus puede identificarse también por técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizándose genes específicos de la especie. Sin embargo, por ser técnicas más complejas y caras, reservándose generalmente para fines epidemiológicos donde se requiere identificar cepas o grupos de cepas. [8]

1.3.3. Crecimiento

S. aureus posee una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre los 30° y 37°C, siendo sus temperaturas mínima y máxima 6° y 46°C, respectivamente. Es una bacteria aerobia y anaerobia facultativa. La tasa de cloruro de sodio relacionada con su crecimiento, abarca del 0% a 20%. Si pH óptimo de crecimiento se sitúa entre los valores 6 y 7, con extremos de 4,0 a 9,8. Posee límites de actividad de agua (aw) entre 0,83 y 0,99 (óptima aw de 0,94), lo que la convierte en una bacteria resistente a la desecación. Así mismo, es una muy resistente a la congelación, sobreviviendo a temperaturas -20°C, al igual que sus enterotoxinas. [35]

1.3.4. Cultivo

S. aureus crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar chocolate, agar sangre o agar infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés), y medios

líquidos para hemocultivo donde se recupera con facilidad. En la mayoría de los medios de cultivo tradicionales, medios no selectivos, *S. aureus* desarrolla colonias de 0,5-1,5 mm de diámetro tras incubarse durante 18-24 hs. Las mismas se presentan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, y observándose de una consistencia cremosa y color que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides. Gran parte de las cepas producen β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. [8]

Para el análisis de muestras, es preciso utilizar medios selectivos o diferenciales. Se recomiendan medios como el agar sal manitol o medio Chapman, que permiten inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas, dado el alto contenido de sal del medio. Este medio posibilita, en una primera instancia, la detección presuntiva de *S. aureus* en caso que el mismo se torne de color amarillo. Esto se debe a que el microorganismo en estudio, tiene la capacidad de fermentar el manitol, produciendo un ácido que hace el que medio vire de rojo pálido a amarillo por efecto de cambios de pH. Otros medios selectivos aconsejados son el agar Baird Parker enriquecido con telurito, medio 110 para estafilococos, agar base con sangre y azida, entre otros. [11]

Actualmente, se han desarrollado otros medios de cultivo en cuya composición se incluye agar base cromogénico específico para la detección de *S. aureus* resistentes a la meticilina en muestras clínicas. La particularidad de este medio es que, en presencia de enzimas específicas, los sustratos se modifican y los cromógenos tiñen las colonias específicamente, dando lugar a la identificación directa de la bacteria. [8]

1.3.5. Factores de virulencia

La Patogenicidad se define como “la capacidad de un microorganismo de producir daño” [39]. Por otro lado, al grado de patogenicidad, es decir a cuánto daño hacen, se lo define como virulencia. Los factores de virulencia bacteriana, propiedades del microorganismo esenciales para el desarrollo de infecciones y enfermedades, pueden ser codificados en plásmidos, cromosomas, transposones o bacteriófagos.

Estas características se regulan por señales ambientales, tales como las condiciones físico-químicas, la disponibilidad de nutrientes o la presencia de receptores específicos. [39] En estafilococos la expresión de estos factores se halla bajo el control de sistemas reguladores, siendo el principal el AGR (de sus siglas en inglés accessory gene regulator, regulador del gen accesorio). “Este sistema de control por *quorum sensing* permite la expresión de proteínas de adhesión y promueve la colonización tisular cuando la densidad de las bacterias es baja y de enzimas hidrolíticas y toxinas cuando la densidad es alta”. [30] El *quorum sensing* (QS) es “el mecanismo bacteriano de

comunicación intercelular que controla la expresión genética en función de la densidad celular”. [26]

A continuación se desarrollan los factores de virulencia propios del *S. aureus*, convenientemente clasificados como componentes estructurales de la bacteria, toxinas y enzimas.

1.3.5.1. Factores de virulencia del *S. aureus*: componentes estructurales.

S. aureus presenta una cápsula de naturaleza polisacárida denominada *slime* o cápsula mucoide, que así como posee una capacidad antifagocitaria, también ayuda a la bacteria a adherirse a diversas células. Algunas cepas de *S. aureus* producen una capa polisacárida extracelular, denominada biofilm o biopelícula. La finalidad de la misma, es la de facilitar a la comunidad bacteriana la adhesión a distintas superficies. Esta biopelícula podría afectar positivamente en la prolongación de la infección y colonización por parte del microorganismo en el huésped. [8] La capa de limo propia de esta bacteria, también interfiere con la fagocitosis bacteriana.

S. aureus posee un gran número de proteínas de superficie que sirven para ligarse a los tejidos del huésped, ayudar a su internalización y a evadir al sistema inmune. Estas proteínas se denominan como componentes microbianos de superficie (MSCRAMM, por sus siglas en inglés) favorecen la colonización por mediar la adherencia a una variedad de proteínas del huésped. [8] Particularmente, la proteína A, tiene la capacidad de unirse a las inmunoglobulinas y evitar de esta forma la eliminación de la bacteria por parte del sistema inmunitario del individuo afectado. La proteína A extracelular también se liga a los anticuerpos, conformando inmunocomplejos y, en consecuencia, agotando o consumiendo el complemento. [30]

El peptidoglucano, componente básico de la pared celular, le otorga al *S. aureus* resistencia y tolerancia osmótica. Por otro lado, el mismo dota a la bacteria de propiedades biológicas como actividad endotóxica, estimula la quimiotaxis y la agregación de leucocitos e inhibe la fagocitosis. [8].

Finalmente, los ácidos teicoicos, también propios de la pared celular, tienen como función mediar la unión de los estafilococos con superficies de las mucosas, a través de uniones específicas a la fibronectina, además de inducir la producción de anticuerpos. Por su parte, los ácidos lipoteicoicos que se unen a la membrana plasmática, están relacionados con la inflamación y con la liberación de citosinas por los macrófagos y otras moléculas del sistema inmune. [8]

1.3.5.2. Factores de virulencia del *S. aureus*: toxinas.

Tóxico puede definirse como “Toda sustancia química que, incorporada al organismo vivo a determinada concentración, produce en virtud de su estructura química y a través de mecanismos fisicoquímicos y bioquímicos, alteraciones de la fisicoquímica celular, que pueden ser transitorias o permanentes, siempre incompatibles con la salud y en algunos casos la vida.” [4]. Se utiliza el término *toxina* cuando dicha sustancia tóxica es producida por seres vivos, ya sean animales, vegetales o bacterias.

S. aureus genera una gran cantidad de toxinas: cinco toxinas citolíticas (alfa, beta, delta, gamma y leucocidina de Panton-Valentine [P-V]), dos toxinas exfoliativas (A y B), dieciocho enterotoxinas (A a R) y la tóxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1). [30]

Las toxinas citolíticas o hemolisinas, tienen una función hemolítica y citolítica, actuando sobre determinadas células del huésped, tal como plaquetas, fibroblastos, macrófagos y leucocitos. [8]

Dentro de las toxinas exfoliativas, se encuentran dos formas: ETA y ETB. La ETA es termoestable y su gen se relaciona con un fago; mientras que la ETB es termolábil y se ubica en un plásmido. Ambas son proteasas de serina que rompen la desmogleína 1, cuya funcionalidad es la de formar puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis. Estas toxinas provocan el síndrome de la piel escaldada por estafilococos (SPEE), la cual se manifiesta generalmente en niños pequeños y no tanto en niños mayores o adultos. [30]

La TSST-1 es un superantígeno que provoca la liberación de citosinas y la extravasación de células endoteliales, y, en circunstancias de altas concentraciones, posee un efecto citotóxico en las células. La facultad de esta toxina para atravesar barreras mucosas, tiene como consecuencia el efecto sistémico del Síndrome del Shock Tóxico (SST). La enfermedad se caracteriza por presentarse fiebre alta, hipotensión, vómitos, diarrea y erupciones en la piel seguidas por la descamación, y, eventualmente, un fallo multisistémico. [17] La mayoría de las cepas relacionadas con el SST, que son originadas por la TSST-1, se asocian a la menstruación y el uso de tampones. La enterotoxina B, y muy rara vez la enterotoxina C, producen la mitad de los casos de esta enfermedad que no se relacionan con la menstruación. [30]

Las enterotoxinas estafilocócicas, de particular interés para este trabajo, son dieciocho, nombradas de la A a la R. La enterotoxina A es la que se asocia con mayor frecuencia a intoxicaciones alimenticias. La enterotoxina B genera colitis pseudomembranosa estafilocócica. Las enterotoxinas C y D suelen presentarse en productos lácteos contaminados por la bacteria. El resto de las toxinas no tienen mayor importancia clínica. Se caracterizan por ser termoestables, tolerando hasta 100 °C

durante 30 minutos, y también por resistir a la hidrólisis por parte de las enzimas gástricas y yeyunales. Se sabe que son superantígenos capaces de estimular la activación de los linfocitos T y la liberación de citosinas. [30]

Los genes de las enterotoxinas, las toxinas exfoliativas y la TSST-1 se ubican en un elemento cromosómico llamado isla de patogenicidad. El mismo interactúa con elementos genéticos complementarios (bacteriófagos) para generar las toxinas. [7]

1.3.5.3. Factores de virulencia del *S. aureus*: enzimas.

S. aureus genera una serie de exoenzimas o enzimas extracelulares, que la bacteria secreta en el proceso virulento. De acuerdo a la bibliografía, “Las enzimas son proteínas cuya acción biológica consiste en la catálisis de las reacciones del metabolismo, las cuales transcurrirían muy lentamente sin su intervención. El concepto de catálisis implica la influencia del catalizador en la reacción acelerándola, sin consumirse en dicho proceso”. [27]

Los estafilococos producen catalasa, que tiene la propiedad de convertir al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esto le permite al microorganismo protegerse contra la fagocitosis. [8]. La prueba de la catalasa permite distinguir entre los estafilococos, catalasa positivos, de los estreptococos, que son negativos. [7]

S. aureus produce una enzima termoestable llamada coagulasa, que puede convertir fibrinógeno del plasma en fibrina, y es particularmente importante ya que permite diferenciar las distintas especies dentro del género *Staphylococcus*. [38] Esta característica le da la posibilidad a los estafilococos coagulasa positivos de depositar fibrina en la superficie de los mismos, protegiéndolos de la fagocitosis. Esto último se da ya sea por alterar su ingestión por parte de las células fagocíticas, o por su destrucción dentro de dichas células. [7] La coagulasa se presenta en dos formas: coagulasa ligada y coagulasa libre. La primera, puede convertir directamente el fibrinógeno en fibrina, sin intervención de factores plasmáticos, lo que da lugar a la coagulación del plasma, estimulando el desarrollo de sepsis y abscesos. [8] Por su parte, la coagulasa libre logra el mismo efecto, mas mediante la reacción con un factor plasmático de tipo globulina (factor de reacción con la coagulasa), resultando en una estafilotrombina, que cataliza finalmente la conversión de fibrinógeno en fibrina insoluble. [30]

Los estafilococos desarrollan otro tipo de enzimas que hidrolizan los componentes tisulares del huésped y ayudan a la diseminación de los microorganismos en cuestión. La fibrinolisisina, disuelve coágulos de la fibrina. La hialuronidasa, hidroliza los ácidos hialurónicos, propios de la matriz acelular del tejido conjuntivo. *S. aureus* genera distintas lipasas, capaces de hidrolizar lípidos, facilitando la supervivencia de la

bacteria en regiones sebáceas del organismo. *S. aureus* produce una nucleasa termoestable con capacidad de hidrolizar el ADN viscoso.

1.3.6. Epidemiología

Los estafilococos son ubicuos. Las bacterias de este género se encuentran muy distribuidas en el ambiente (agua, aire, polvo, superficies, entre otros) y, especialmente, en hombres y animales, en piel y mucosas. [35] Los estafilococos se localizan en la bucofaringe, el aparato digestivo y el sistema genitourinario. Particularmente, *S. aureus* se localiza más frecuentemente en la nasofaringe que en la bucofaringe, cuando se trata de niños mayores y adultos; en neonatos, suele colonizar la zona del ombligo, la piel y la región perianal. Alrededor del 15% de los adultos sanos, son portadores permanentes de *S. aureus* en la nasofaringe. La adherencia de estas bacterias al epitelio mucoso se debe gracias a adhesinas estafilocócicas de superficie celular. [30]

Los estafilococos son responsables de muchas infecciones adquiridas en el hospital y esto no solamente por la colonización por parte de estos microorganismos a personal sanitario u otros pacientes hospitalizados, sino también por la colonización de superficies. Si bien los estafilococos son sensibles a altas temperaturas, como también a desinfectantes y soluciones antisépticas; estos microorganismos pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo en superficies secas. [30] Luego, las bacterias se pueden transferir a una persona vulnerable por contacto directo o por medio de fómites (cualquier objeto o material inerte y sin vida que es capaz de transportar organismos patógenos. Por ejemplo: ropa, sábanas, equipamiento hospitalario no esterilizado). [38]

1.3.7. Enfermedades causadas por *S. aureus*

S. aureus puede provocar enfermedad en el huésped ya sea por la producción de toxinas, o bien por medio de la invasión directa y la destrucción del tejido. [30] Dada su amplia versatilidad, este microorganismo es capaz de provocar enfermedades de alto espectro que abarca desde infecciones leves en la piel a otras infecciones más serias como la bacteriemia, infecciones del sistema respiratorio, síndrome de choque tóxico, entre otros; además de infecciones gastrointestinales. [8] Dado que este trabajo investiga o estudia la presencia del *S. aureus* en muestras alimenticias, a continuación se desarrollan las enfermedades de origen alimentario causadas por esta bacteria.

1.3.7.1. Enfermedades causadas por *S. aureus*: intoxicación alimentaria.

La intoxicación alimentaria causada por *S. aureus* es una de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) más comunes. La misma es consecuencia de la acción de una enterotoxina, producida por la bacteria. No se sabe con certeza su mecanismo de acción, si actúa directamente en la pared del estómago o bien en el sistema nervioso central luego de su absorción en la parte superior del tracto gastrointestinal. [41] En este caso, si bien puede presentarse una infección, la acción de la toxina bacteriana que está en el alimento tiene mayor incidencia en el huésped, que el efecto directo de los microorganismos. [30]

Los alimentos que se contaminan con mayor frecuencia son el jamón, salchichas, alimentos cocinados a base de carne de pollo, pavo y res, productos de pastelería, productos lácteos (sobre todo quesos frescos), huevo y distintas ensaladas. [14]

La mayoría de las intoxicaciones por *S. aureus* encuentran su origen durante la elaboración del alimento o en su inadecuado almacenamiento. Los microorganismos suelen contaminar el alimento a través de la persona que lo prepara, el manipulador de alimentos, ya que generalmente es el hombre la mayor fuente de cepas productoras de enterotoxinas, que suelen habitar en la mucosa de la nariz o pliegues de la piel. [22] La transferencia de la bacteria también puede darse desde las superficies de trabajo. [10]

La toxina estafilocócica es termoresistente, pudiendo permanecer estable a 100 °C durante 30 minutos. [30] La enterotoxina es sintetizada durante la parte exponencial del crecimiento bacteriano. La producción de la toxina no se produce por debajo de un aw 86. La enterotoxina más frecuente es la del tipo A, hallada en el 75% aproximadamente de los brotes. [16]

Con una incubación de cuatro horas tras la ingesta del alimento contaminado (y a la toxina preformada) se presentan los siguientes síntomas, que no suelen durar más de 24 horas: vómitos, diarrea, dolor abdominal y náuseas. Si bien se puede producir sudoración y cefalea, no así fiebre. La diarrea se da de forma acuosa y no sanguinolenta, pudiéndose ocasionar una deshidratación en el huésped a causa de la pérdida de líquidos. El tratamiento se basa en el alivio del dolor abdominal y de la diarrea, así como la reposición de líquidos; dado que la enfermedad es causada por una toxina, un tratamiento con antibióticos no tendría sentido alguno. [30] De acuerdo a la literatura consultada, una ingesta de menos de 200 ng de la toxina es suficiente para provocar el cuadro clínico. [10]

La prevención constituye el modo esencial para controlar la intoxicación estafilocócica: una refrigeración apropiada (por debajo de los 5°C, para evitar la proliferación bacteriana que potencialmente producirían la enterotoxina), una cocción

adecuada si es el caso y, sobre todo, el optar por implementar unas correctas prácticas higiénicas por parte del manipulador de alimentos.

Tabla 1-1. Parámetros fisicoquímicos que afectan en la producción de la enterotoxina por parte de *S. aureus*.

Parámetros	Valores
Temperatura mínima	10 °C
Temperatura máxima	50 °C
pH mínimo	4,76
pH máximo	9,02
Aw mínima	0,86
% máximo de NaCl	12

Fuente: OPS, Educación en inocuidad de alimentos: glosario de términos. [33]

CAPÍTULO 2: MARCO METODOLÓGICO

2.1. MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se define por conveniencia. El muestreo es de tipo aleatorio estratificado uniforme.

Se analizan 3 muestras por cada uno de los 4 locales gastronómicos especializados en venta de sushi en la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile.

2.2. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de los diferentes productos terminados se recolectan en sus envases originales, siendo los únicos individuos en manipular las muestras los trabajadores del local gastronómico. Estos se trasladan en una nevera portátil hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Federico Santa María sede Viña del Mar. Rápidamente, se recoge la porción analítica a analizar en bolsas estériles debidamente etiquetadas. Las muestras se conservan a temperatura de refrigeración.

2.3. CODIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Para poder identificar correctamente las cepas aisladas durante la primera parte del procedimiento, se estableció un código alfanumérico que indica:

Número de local (1, 2, 3 ó 4) – Identificación de muestra del local (A, B, C)-
Número de cepa aislada (1...5)- Identificación de cepa purificada después de Tinción Gram (a, b,...)

Ejemplo 1:

Código de identificación: 2B3

Significado: Cepa N° 3, aislada de la muestra aleatoria B, tomada del local 2.

Ejemplo 2:

Código: 3A2b

Significado: Cepa 'b' purificada después de Tinción Gram de la cepa N°2, aislada de la muestra A, tomada del local 3.

2.4. EQUIPOS

- Estufa de cultivo. Marca: Binder.
- Horno Pasteur. Marca: Memmert.
- Balanza Semi-analítica. Marca: Sartorius.
- Microscopio. Marca: Boeco.
- Refrigerador. Marca: Fensa.
- Equipo Baño María. Marca: Memmert.
- Lámpara Luz UV. Marca: Spectroline.
- Pipeta mecánica. Marca: Sartorius.
- Autoclave. Marca: Oppici.

2.5. MATERIALES

- Pipetas graduadas de 1 y 10 mL
- Recipientes de vidrio de 300 mL aprox. estériles
- Placas de Petri estériles de 90 mm.
- Tubos de ensayo
- Tubos de hemólisis
- Campanas Durham
- Matraces Erlenmeyer de distintos volúmenes
- Probetas graduadas de distintos volúmenes
- Asas de siembra (asa loop)
- Gradillas
- Espátula
- Pinza
- Porta-objetos
- Micropipetas para pipeta mecánica
- Mechero de Bunsen
- Mortero
- Bolsas tipo Ziploc
- Guantes de látex

2.6. MEDIOS Y REACTIVOS

2.6.1. Pre-enriquecimiento no selectivo: Caldo extracto cerebro-corazón (BHI)

2.6.1.1. Fundamento del medio

Medio de alto contenido nutricional que se utiliza para cultivar diversos microorganismos, ya sea en forma de caldo o agar. Sus ingredientes principales son: la infusión a partir de distintas fuentes de tejido animal, peptona (proteína), amortiguador de fosfato y una pequeña cantidad de dextrosa. [38]

2.6.1.2. Composición del medio

- Triptosa 10 g.
- Extracto cerebro ternera 12,5 g.
- Extracto corazón de buey 5 g.
- Cloruro sódico 5 g.
- Fosfato disódico 2,5 g.
- Agua destilada 1 L

2.6.1.3. Preparación del medio

Disolver por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el pH a 7,4. Repartir en recipientes de vidrio estériles de 300 ml aprox., a razón de 225 mL por recipiente. Esterilizar a 121° C durante 15 minutos. Se conserva varios meses en refrigeración.

En esta experiencia se trabajó con un medio de cultivo preparado de la marca BD, el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones de su envase. (Ref.: 237500; Lot: 2355492; Proveedor: BD)

2.6.2. Enriquecimiento selectivo: Caldo Manitol salado o Caldo con sal y manitol

2.6.2.1. Fundamento del medio

El medio tiene como carbohidrato fermentable solamente al manitol, rojo fenol como indicador para una fácil detección y una concentración inusualmente alta de sal con el fin de inhibir microorganismos no deseados. La fermentación del manitol hace que el pH de la solución disminuya y, por ende, vire el color del medio. Este medio

suele utilizarse para la detección y aislamiento de microorganismos estafilocócicos patógenos en muestras de alimentos. [11]

2.6.2.2. Composición del medio

- Triptona 17 g.
- Peptona 3 g.
- Cloruro sódico 100 g.
- Manitol 2,5 g.
- Fosfato dipotásico 2,5 g
- Rojo fenol 0,025 g
- Agua destilada 1L

2.6.2.3. Preparación del medio

Disolver. Ajustar el pH a 7,3 +/- 0,2. Distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo. Esterilizar a 121° C durante 15 minutos. Conservar a temperatura de refrigeración hasta su uso.

2.6.3. Aislamiento: Agar Baird-Parker (BP)

2.6.3.1. Fundamento del medio

Medio parcialmente selectivo que aprovecha la capacidad de los estafilococos de reducir el telurito a telurio y detectar la lecitinasa a partir de la lecitina del huevo. A su vez, el medio está constituido por las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos. La yema de huevo actúa como sustrato para determinar la producción de lecitinasa y también la actividad de lipasa.

Los microorganismos estafilocócicos desarrollan colonias de color de gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito; aquellos capaces de producir lecitinasa degradan la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes. A veces puede formarse una zona de precipitación debido a la actividad. [3]

Tabla 2-1. Resultados del crecimiento para diferentes bacterias en medio agar BP

Cepas	Resultados del crecimiento
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento bueno a excelente; colonias brillantes, de tamaño mediano y color de gris oscuro a negro; halos transparentes alrededor de las colonias.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Crecimiento bueno a excelente; colonias brillantes, de tamaño mediano y color de gris oscuro a negro; halos transparentes alrededor de las colonias.
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	Ausencia de crecimiento a crecimiento promedio; colonias pequeñas, de incoloras a color gris amarronado; sin zonas transparentes.
<i>Escherichiacoli</i> ATCC 25922	Inhibición completa.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Ausencia de crecimiento a crecimiento bueno; colonias de color marrón oscuro; proliferación reducida.
Sin inocular	De amarillento a marrón claro, opaco

Fuente: BD Laboratories, BD Baird-Parker Agar. [3]

2.6.3.2. Composición del medio

- Agar Base Baird-Parker (B.P)
 - Triptona 10 g.
 - Extracto de carne 5 g.
 - Extracto de levadura 1 g.
 - Piruvato sódico 10 g.
 - Glicina 12 g.
 - Cloruro de litio 5 g.
 - Agar 20 g.
 - Sol. sulfametazina 0,2 por 100 25 ml.
 - Agua destilada 1.000 ml.

Para 475 mL del medio anterior,

- Telurito de Potasio al 1% p/v = 5 mL
- Emulsión de Yema de huevo al 50% v/v = 25 mL

2.6.3.3. Preparación del medio

Disolver por calentamiento y agitación. Ajustar el pH a 6.8 - 7.0. Esterilizar durante 20 minutos a 121° C. En esta investigación se utilizó un medio de cultivo preparado de la marca Biomark Laboratories (Ref.: B013; Lote: 1213/0575).

A 475 mL del medio fundido y enfriado a 50°C agregar:

- Telurito de Potasio al 1% p/v = 5 mL
- Emulsión de Yema de huevo al 50% v/v = 25 mL

En esta investigación se utilizó un preparado comercial y esterilizado de la marca Merck.

Mezclar bien y verter 15 a 20 mL del medio, en placas de Petri. Dejar solidificar. El medio completo no debe usarse después de 48 h. de preparado. El medio base puede ser almacenado de 1 a 2 meses en refrigeración.

En períodos prolongados de almacenamiento del medio deshidratado se reduce la selectividad. Este efecto puede ser revertido por adición de 0,5 mL de piruvato de sodio al 20% p/v, sobre la superficie del medio de cultivo plaqueado y dejar secar a 50°C por 30 minutos o hasta que la superficie esté seca.

2.6.4. Tinción de Gram

2.6.4.1. Fundamento del procedimiento

Este tipo de tinción diferencial permite distinguir entre bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, basándose la estructura y grosor de la pared bacteriana. Las Gram positivas que poseen una capa gruesa de peptidoglucano y carecen de membrana externa, se verán de color violeta al microscopio. Por su parte, las Gram negativas que tienen una capa delgada de peptidoglucano y sí tienen una membrana externa, se verán de color rosado cuando se observen en el microscopio. [38]

2.6.4.2. Reactivos necesarios

- Solución de cristal violeta

- Solución de yoduro (Iugol)
- Solución de alcohol-acetona
- Solución de safranina 2%

2.6.5. Pruebas bioquímicas confirmativas

2.6.5.1. Prueba Coagulasa

Fundamento de la prueba bioquímica

La coagulasa es una enzima termoestable capaz de convertir al fibrógeno del plasma en fibrina, y esta característica es útil para diferenciar distintas especies dentro del género *Staphylococcus*.

La prueba que se realiza en esta investigación es en tubo, donde se detecta la coagulasa libre o estafilocoagulasa. Esta enzima actúa sobre la protrombina, formando así un complejo llamado estafilotrombina, el cual finalmente transforma el fibrógeno en fibrina. [38]

Medios y/o Reactivos necesarios

- Plasma de conejo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

En esta experiencia se utilizó un plasma de conejo con EDTA, liofilizado, de la marca Merck. (Ref.: 1.10493.; Proveedor: Merck)

2.6.5.2. Prueba Catalasa

Fundamento de la prueba bioquímica

La catalasa es una enzima que cataliza la reacción de degradación del peróxido de hidrógeno (también conocido como agua destilada) en agua y oxígeno. [7] Si la prueba es positiva, se observa la aparición de burbujas de aire sobre la muestra a la que se trató con peróxido de hidrógeno, que corresponden al oxígeno liberado en la reacción. *S. aureus* es una bacteria catalasa positiva.

Medios y/o Reactivos necesarios

- Peróxido de hidrógeno al 3%

2.6.5.3. Prueba DNasa

Fundamento de la prueba bioquímica

Esta prueba estudia la capacidad que tienen ciertas bacterias de producir la enzima DNasa con actividad desoxirribonucleasa que hidroliza el ADN, generando una mezcla de mono y polinucleótidos. Esta prueba suele usarse para la identificación de *Staphylococcus* que producen grandes cantidades de DNasa extracelular. [36]

Medios y/o Reactivos necesarios

- Agar DNasa
 - Triptona 20 g.
 - Acido desoxirribonucleico 2 g.
 - Cloruro sódico 5 g.
 - Agar 12 g.
 - Agua destilada 1.000 ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7.3. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Preparar placas de Petri.

- Solución de azul de toluidina
 - Azul de toluidina 1 g.
 - Agua destilada 100 ml.
- Solución de ácido clorhídrico 1N

En este trabajo de investigación se utilizó un medio preparado, que ya contiene azul de toluidina en su composición.

2.6.5.4. Prueba de Fermentación de Carbohidratos

Fundamento de la prueba bioquímica

Esta prueba estudia la capacidad que tienen las bacterias para fermentar distintos azúcares. Cuando la prueba resulta positiva, el medio se acidificará y el color virará gracias a la acción del indicador que reacciona ante el cambio de pH. Puede o no producirse gas.

Mediosy/o Reactivos necesarios

En este trabajo de investigación, se estudia la capacidad de las cepas de fermentar al manitol y a la glucosa.

- Caldo nutritivo
- Solución de carbohidrato (glucosa o manitol) al 1%
- Indicador púrpura de bromocresol al 0,05%

Preparar caldo nutritivo y se añade glucosa al 1% más el indicador de pH, el púrpura de bromocresol, es preparado en una solución acuosa aparte al 0,05%. En este trabajo se utilizó un medio nutritivo preparado de la marca Merck (Ref.: 1054430500). Distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo que contengan campanas de Durham.

2.6.6. Otros: medio nutritivo

En distintas etapas del trabajo de investigación fue necesario utilizar medios nutritivos: una vez aisladas las cepas, se las hace crecer en un tubo que contiene un medio nutritivo sólido inclinado, ya sea para mantenerlas después bajo refrigeración o para prepararlas para realizar una prueba confirmativa; caldo nutritivo necesario en algunas pruebas bioquímicas confirmativas (fermentación de carbohidratos).

Los medios nutritivos no selectivos son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de bacterias que no necesiten requerimientos especiales. La pluripectona y el extracto de carne funcionan como fuente de carbono, nitrógeno y dan al medio los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El cloruro de sodio ayuda al equilibrio osmótico. [24]

En esta investigación se utilizaron los siguientes medios preparados: caldo nutritivo para microbiología (Ref.: 1054430500; Proveedor: Merck) y agar nutritivo (Ref.: GM001-500G; Proveedor: Himedia; Lote: 0000225604).

2.7. PROCEDIMIENTO

2.7.1. Pre-enriquecimiento no selectivo

Disolver 25 g de la muestra en 225 mL de caldo BHI. Incubar 18-24 h a 35°C.

2.7.2. Enriquecimiento selectivo

Tomar inóculo de la dilución anterior (4 asas) e inocular caldo manitol salado. Incubar 18-48 h, a 35 °C. En caso de ser positivo (turbidez y cambio de color del medio, tonalidad amarilla) continuar con el procedimiento como se detalla; sino, considerar ausencia de *S. aureus* en la muestra analizada.

2.7.3. Aislamiento

Tomar inóculo del medio anterior y sembrar por agotamiento por estría una placa de Petri con medio BP para aislar colonias de *S. aureus*. Incubar 35°C por 48 h.

Las colonias típicas se presentan de colores negros o gris oscuro, brillantes, convexas, de consistencia cremosa. Presentan una zona clara o halo alrededor de la colonia con una zona con o sin precipitado debajo de ella.

2.7.4. Sembrar colonia característica en medio nutritivo

Tomar colonias características del medio BP (5 mín.) para *S.aureus* y sembrar en tubos que contienen medio Agar Nutritivo inclinado. Incubar 35°C, 18-24 h. Tubos inoculados se reservarán refrigerados hasta la Tinción de Gram. Recuperar la cepa 18-24 h antes (Temperatura de incubación: 37 °C) pues se necesitan cepas jóvenes para dicho procedimiento.

2.7.5. Tinción de Gram

Debe ser la primera de las pruebas confirmativas para saber si se trabaja con cepas puras. Si al microscopio se observan colonias mixtas, repetir la siembra de la cepa en agar BP y tomar nuevamente colonias características y, finalmente, realizar otra vez la Tinción de Gram. Resultado esperado: Gram positivo, forma de cocos agrupados en racimos.

2.7.5.1. Preparación de Frotis y fijación de bacterias al porta-objetos

En el centro de un porta-objetos limpio, depositar una muy pequeña gota de agua destilada (es necesario muy poca cantidad, por lo que puede ser útil hacerlo con la ayuda de un asa de siembra). Flamear el asa de siembra y tomar, en condiciones asépticas, el inóculo para transferirlo a la gota de agua. Utilizando el asa de siembra (asa loop), extender sobre el porta-objetos hasta formar una suspensión homogénea.

Evaporar el agua acercando el porta-objetos con mucho cuidado a la llama del mechero. No calentar demasiado el porta-objetos porque podría partirse. En este paso, las bacterias se fijan por calor (cinco pasadas aproximadamente por llama por pocos segundos; dejar enfriar entre cada pase).

2.7.5.2. Tinción inicial: cristal violeta

Teñir las células con cristal violeta, esperar aproximadamente 1 minuto. Enjuagar con agua destilada y dejar secar. En este paso, el yoduro (lugol) forma un complejo con el cristal violeta. Las células siguen de color morado.

2.7.5.3. Mordente: yoduro (lugol)

Agregar yoduro (lugol), esperar aproximadamente 1 minuto. Enjuagar con agua destilada y dejar secar. En este paso, las células se tiñen de morado.

2.7.5.4. Decoloración: solución alcohol-acetona

Adicionar solución alcohol-acetona, esperar aproximadamente 30 segundos. Enjuagar con agua destilada y dejar secar. Este solvente no polar lava el complejo cristal-violeta de las células Gram negativas. Así, las Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas incoloras.

2.7.5.5. Contratinción

Teñir con safranina, esperar aproximadamente 1 minuto. Enjuagar con agua destilada y dejar secar. Las células Gram negativas, incoloras en el paso anterior, se teñirán de color rosado, mientras que las Gram positivas no se verán afectadas por la contratinción y seguirán moradas.

2.7.5.6. Observación en microscopio

Resultado esperado: células Gram positivas, forma de cocos agrupados en racimos. Sólo continuar con las siguientes pruebas confirmativas en caso de obtener una cepa pura de acuerdo al resultado esperado; sino, considerar el resultado como negativo y dicha cepa no corresponde a un *S. aureus*.

2.7.6. Pruebas bioquímicas confirmativas

Antes de efectuar las pruebas confirmativas, recuperar las cepas a analizar en agar nutritivo o caldo nutritivo, según corresponda, para que estas no tengan más de 18-24 hs. (Temperatura de incubación: 37 °C).

2.7.6.1. Prueba de Coagulasa

Antes de someter las cepas a la prueba, recuperarlas previamente en caldo BHI para que estas no tengan más de 18-24 hs. (Temperatura de incubación: 37 °C).

Disolver el plasma de conejo tratado con EDTA liofilizado con 3 mL de agua destilada o desmineralizada. Con ayuda de una pipeta automática, repartir el contenido en tubos de hemólisis previamente esterilizados, en volúmenes de 0,3 mL. Finalmente inocular estos últimos, con 0,1 mL del cultivo de BHI que contiene la cepa a analizar. Incubar en el baño de agua a 37 °C.

Los tubos deben verificarse cada 1 hora, inclinado cuidadosamente para comprobar si ha coagulado. La prueba de coagulasa se considera positiva si más de las tres cuartas partes del contenido del tubo se presenta como un grumo constante. En caso de resultado negativo tras 4 horas (o hasta 6), dejar que se cumplan las 24 h de incubación para hacer una evaluación concluyente.

2.7.6.2. Prueba de Catalasa

Sobre un porta-objetos limpio, depositar una pequeña cantidad de inóculo con ayuda de un asa loop y añadir una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). La aparición de burbujas indicará que la cepa es catalasa positiva.

2.7.6.3. Prueba de DNasa

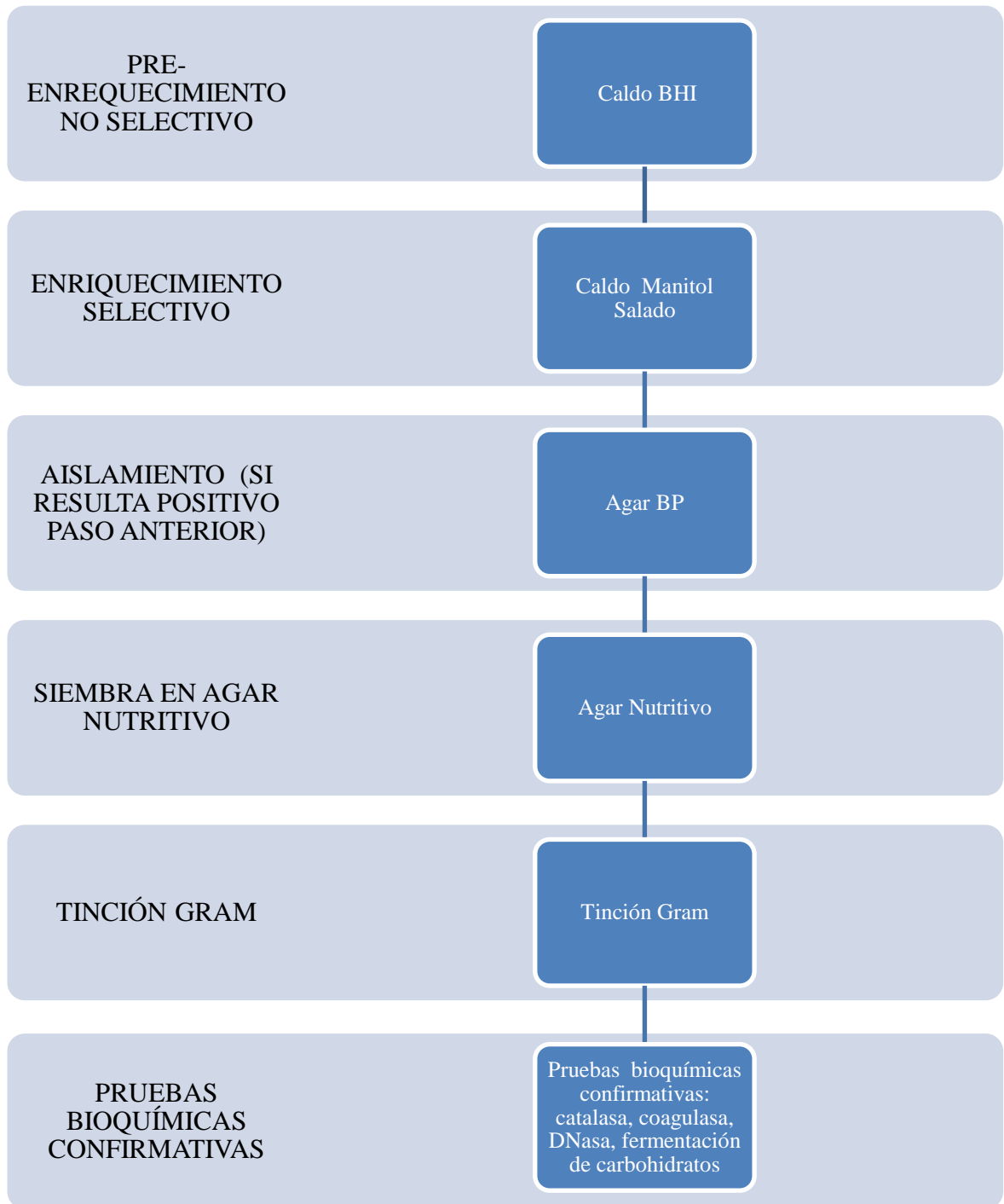
Con ayuda de un asa loop previamente esterilizada, tomar el inóculo y sembrar, en estrías radiales o en una sola estría, sobre la superficie de agar DNasa. Incubar a 37°C

durante 18-24 horas. La aparición de un halo brillante alrededor de la estría será considerada como un resultado positivo.

En caso de que el medio utilizado no contuviese azul de toluidina, verter ácido clorhídrico 1N sobre el crecimiento y esperar unos minutos para observar la reacción. De ser positiva, aparecerá un halo transparente alrededor.

2.7.6.4. Prueba de Fermentación de Carbohidratos

Con ayuda de un asa loop esterilizada, inocular la solución del carbohidrato en cuestión, preparada según las indicaciones mencionadas 2.6.4.5.2. Incubar por 18-24 h, a 37 °C. Un resultado positivo será aquel donde el medio haya virado su color a amarillo. Observar la presencia o ausencia de gas en las campanas Durham.



Fuente: esquema elaborado por el autor en base al procedimiento propuesto

Figura 2-1. Flujo de trabajo del procedimiento para el análisis microbiológico para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en una muestra alimenticia.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. REGISTRO DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE SUSHI

A continuación se detallan los resultados del análisis microbiológico de las muestras, una vez finalizado cada paso del procedimiento antes descrito en el capítulo 2. Claro está que no hay información respecto al pre-enriquecimiento, dado que este no es de carácter selectivo.

3.1.1. Resultados: enriquecimiento selectivo

Todas las muestras presentaron un crecimiento sospechoso en el caldo manitol salado. Si bien hubo crecimiento (turbidez), el medio viró a un color amarillo anaranjado y no a un amarillo bien definido. No manifestaron presencia de gas. Se decidió entonces sembrar todas en medio Baird Parker.

Tabla 3-1. Crecimiento observado en caldo manitol salado

Identificación Muestra (Local/Muestra)	Crecimiento en caldo Manitol salado
1A	Sospechoso
1B	Sospechoso
1C	Sospechoso
2A	Sospechoso
2B	Sospechoso
2C	Sospechoso
3A	Sospechoso
3B	Sospechoso
3C	Sospechoso
4A	Sospechoso
4B	Sospechoso
4C	Sospechoso

Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales obtenidos.

3.1.2. Resultados: Aislamiento y Tinción de Gram

De las placas sembradas en agar Baird Parker, se tomaron al menos 5 colonias características de cada placa que presentó crecimiento (a menos que no fuese posible por escaso crecimiento). Las colonias características fueron sometidas a Tinción de Gram, para permitir identificar por medio del microscopio si estas correspondían a células Gram positivas o no, y si la morfología de las mismas correspondía al género *Staphylococcus* (cocos agrupados en racimo). Aquellas cepas que resultaron mixtas fueron nuevamente sembradas en agar Baird Parker, y la Tinción de Gram se repitió (“Segunda Tinción de Gram” en la tabla 3-2). La Tinción de Gram también fue repetida en otros casos, como un frotis mal hecho.

Además de las cepas aisladas provenientes de las muestras de alimentos, se estudió el comportamiento de una cepa de referencia (*S. aureus* 25923) para facilitar un estudio comparativo.

Finalmente, se aislaron 55 cepas puras que fueron sometidas luego a distintas pruebas bioquímicas, cuyos resultados se describen en el apartado siguiente.

Tabla 3-2. Tinción de Gram y aislamiento de cepas en agar BP

Código de Cepa (Local/Muestra/Cepa)	Características de colonia en medio Baird- Parker (Primera Siembra)	Primera Tinción de Gram	Características de colonia en medio Baird- Parker (Segunda Siembra)	Segunda Tinción de Gram
Cepa de Referencia (<i>S. aureus</i> 25923)		Coco en racimo, Gram +		
1A1	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1A2	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1A3	Color negro sin halo	Coco en racimo,		

		Gram +		
1A4	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1A5	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1B1	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1B2	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1B3	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1B4	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1B5	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
1C-	Sin Crecimiento	-	-	-
2A1	Color negro sin halo	<i>Mixto</i>	Gris con halo pequeño (2A1a) Gris claro con halo (2A1b)	Bacilar, Gram + (2A1a) Coco en racimo, Gram + (2A1b)
2A2	Color negro sin halo	<i>Mixto</i>	Gris con halo (2A2a) Gris con halo (2A2b)	Coco en racimo, Gram + (2A2a) Coco en racimo,

				Gram + (2A2b)
2A3	Grisácea con halo	Coco en racimo, Gram +		
2A4	Grisácea con halo	Coco en racimo, Gram +		
2A5	Grisácea con halo	Coco en racimo, Gram +		
2B1	Color negro sin halo	<i>Repetir frotis (poco inóculo)</i>	-	Coco racimo, Gram +
2B2	Colonia grisácea con halo	Coco en racimo, Gram +		
2B3	Colonia grisácea con halo	Coco en racimo, Gram +		
2B4	Grisácea con halo	Coco en racimo, Gram +		
2B5	Color gris	Coco en racimo, Gram +		
2B6	Grisácea con halo	<i>Mixta</i>	Negro sin halo	Coco en racimo, Gram +
2C1	Color negro sin halo	<i>Repetir frotis</i>	-	Coco en racimo, Gram +
2C2	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3A1	Color negro sin	Coco en		

	halo	racimo, Gram +		
3A2	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3A3	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3A4	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3A5	Color gris	Coco en racimo, Gram +		
3B1	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3B2	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3B3	Color grisáceo con halo	Coco en racimo, Gram +		
3B4	Color grisáceo con halo	Coco en racimo, Gram +		
3B5	Color gris	Coco en racimo, Gram +		
3C1	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3C2	Color grisáceo sin halo	Coco en racimo, Gram +		
3C3	Color grisáceo sin hao	Coco en racimo,		

		Gram +		
3C4	Color negro	Coco en racimo, Gram +		
3C5	Color negro	Coco en racimo, Gram +		
4A1	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4A2	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4A3	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4A4	Color gris sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4A5	Color gris sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4B1	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4B2	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4B3	Negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4B4	Negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4B5	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		

4C1	Color negro sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4C2	Color grisáceo	<i>Repetir frotis (poco inóculo)</i>	-	Coco en racimo, Gram +
4C3	Color grisáceo	Coco en racimo, Gram +		
4C4	Grisácea sin halo	Coco en racimo, Gram +		
4C5	Grisácea sin halo	Coco en racimo, Gram +		

Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales obtenidos.

3.1.3. Resultados: pruebas bioquímicas confirmativas

Una vez aisladas las cepas puras, se procedió a efectuar pruebas bioquímicas confirmativas, cuyos resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3-3. Resultados pruebas bioquímicas confirmativas

N° Cepa	Código Cepa (Local/Muestra/Cepa)	Glucosa	Manitol	Catalasa	DNasa	Coagulasa
Cepa Referencia	Cepa de Referencia (<i>S. aureus</i> 25923)	+	+	+	+	+
1	1A1	+	+	+	-	-
2	1A2	+	+	+	+	+
3	1A3	+	+	+	+	+
4	1A4	+	+	+	+	+
5	1A5	+	+	+	+	+
6	1B1	+	-	+	+	-

7	1B2	+	-	+	-	-
8	1B3		+	+	-	-
9	1B4	+	+	+	+	-
10	1B5	+	+	+	+	+
11	2A1a	+	+	+	-	-
12	2A1b	+	+	+	-	-
13	2A2a	+	+	-	-	-
14	2A2b	+	+	+	-	+
15	2A3	+	+	+	+	+
16	2A4	+	-	-	-	-
17	2A5	+	-	+	+	-
18	2B1	+	+	-	-	-
19	2B2	+	+	+	-	-
20	2B3	+	-	+	-	-
21	2B4	+	+	+	+	+
22	2B5	+	+	+	+	+
23	2B6	+	-	+	-	-
24	2C1	+	-	+	-	-
25	2C2	+	+	+	+	+
26	3A1	-	+	+	+	+
27	3A2	+	-	+	+	-
28	3A3	+	+	+	+	-
29	3A4	+	+	+	+	-
30	3A5	+	+	+	+	-
31	3B1	+	+	+	+	-
32	3B2	+	-	+	+	-
33	3B3	+	+	+	+	-
34	3B4	+	+	+	+	-
35	3B5	+	-	+	+	-
36	3C1	+	-	+	+	-
37	3C2	+	-	+	-	-
38	3C3	+	+	+	-	-
39	3C4	+	-	+	-	-
40	3C5	+	-	+	-	-
41	4A1	+	+	+	+	-
42	4A2	+	-	+	+	-

43	4A3	+	+	+	-	-
44	4A4	-	+	+	+	-
45	4A5	+	+	+	+	+
46	4B1	+	-	+	-	-
47	4B2	+	+	+	-	-
48	4B3	+	+	+	+	-
49	4B4	+	-	+	-	-
50	4B5	+	-	+	-	-
51	4C1	+	-	+	-	-
52	4C2	+	+	+	+	+
53	4C3	+	-	+	-	-
54	4C4	+	+	+	+	-
55	4C5	+	+	+	+	+

Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales.

3.2. PRESENCIA DE *S. AUREUS* EN MUESTRAS DE SUHI ADQUIRIDAS EN LOCALES GASTRONÓMICOS DE LA ZONA DE GÓMEZ CARREÑO, VIÑA DEL MAR, CHILE.

3.2.1. Criterio para considerar a la cepa aislada de la muestra de sushi como *S. aureus*

De acuerdo a la literatura consultada, para el análisis de los resultados experimentales, se considera a la cepa aislada de la muestra del alimento estudiado como *S. aureus* si es coagulasa positiva y cumple con al menos el 75% de resultados positivos de las pruebas bioquímicas confirmativas efectuadas.

3.2.2. Presencia de *S. aureus* a nivel macro y micro

3.2.2.1. Presencia de *S. aureus* a nivel de la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile (nivel macro).

Del total de locales examinados, todos presentaron muestras contaminadas con *S. aureus*.

Locales cuyas muestras presentaron contaminación por *S. aureus* en la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile



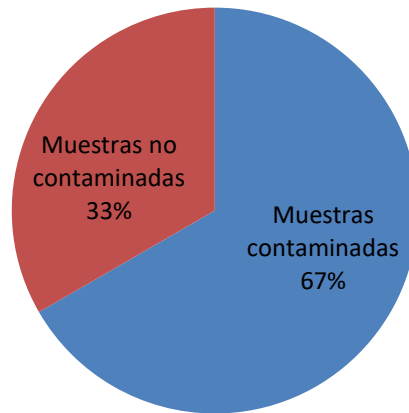
Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales obtenidos.

Gráfico 3-1. Porcentaje de locales gastronómicos evaluados en la zona de Gómez Carreño (Viña del Mar, Chile) cuyas muestras de sushi presentaron contaminación por *S. aureus*.

3.2.2.2. Presencia de *S. aureus* por local (nivel micro)

A continuación se analiza el porcentaje de muestras contaminadas con *S. aureus* por cada local gastronómico de la zona de Gómez Carreño, Viña del Mar, Chile. Los resultados se muestran en los siguientes gráficos. Con el fin de mantener la confidencialidad de los locales evaluados, a cada local se le asignará un número (1...4).

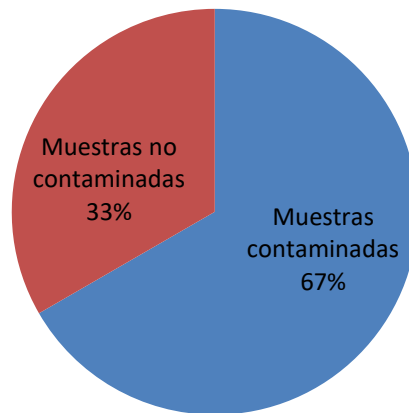
Porcentaje de muestras contaminadas por *S. aureus* en el Local 1



Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales obtenidos.

Gráfico de muestras de sushi que presentaron contaminación por *S. aureus* en el local 1.

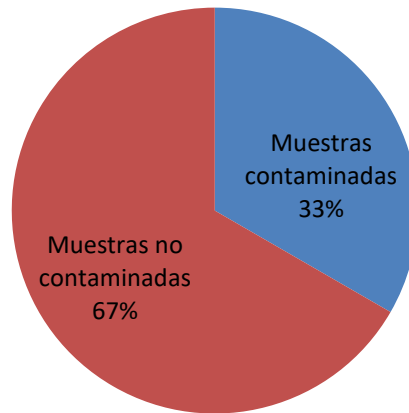
Porcentaje de muestras contaminadas por *S. aureus* en el Local 2



Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales obtenidos.

Gráfico 3-3. Porcentaje de muestras de sushi que presentaron contaminación por *S. aureus* en el local 2.

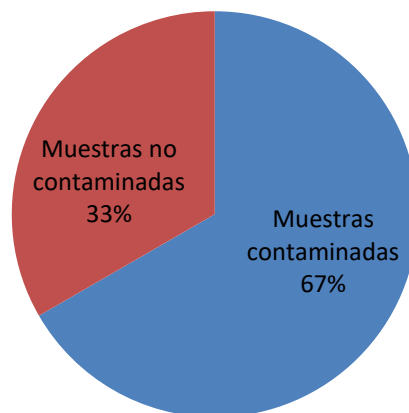
Porcentaje de muestras contaminadas por *S. aureus* en el Local 3



Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales obtenidos.

Gráfico 3-4. Porcentaje de muestras de sushi que presentaron contaminación por *S. aureus* en el local 3.

Porcentaje de muestras contaminadas por *S. aureus* en el Local 4



Fuente: elaboración del autor en base a los resultados experimentales obtenidos.

Gráfico 3-5. Porcentaje de muestras de sushi que presentaron contaminación por *S. aureus* en el local 4.

Como se puede observar fácilmente en los gráficos presentados, en tres de los cuatro locales dos tercios (67% de las muestras analizadas por local) de las muestras de sushi, correspondientes a los locales evaluados, presentaron contaminación por *S. aureus*; mientras que sólo en un local la presencia de la bacteria fue menor, representando un tercio de las muestras (33% de las muestras analizadas por local).

3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.3.1. Análisis de posibles causas de contaminación del alimento por *S. aureus*

Si bien el *S. aureus* es una bacteria ubicua, se demostró en el capítulo 1 que la presencia de *S. aureus* no es inherente a la naturaleza de los ingredientes que componen al sushi. En cambio, este microorganismo es un indicador habitual de una manipulación inadecuada de los alimentos, dado que la fuente principal suele ser la superficie corporal del hombre. [33]

Los estafilococos se localizan en la bucofaringe, el aparato digestivo y el sistema genitourinario. Particularmente, *S. aureus* se localiza más frecuentemente en la nasofaringe que en la bucofaringe, cuando se trata de niños mayores y adultos [30]. Entonces, lo más factible es que los manipuladores de alimentos hayan contaminado las muestras a través de las siguientes formas:

- Un inadecuado o inexistente lavado de manos previo a la preparación del alimento, lo que permitía una transferencia directa del *S. aureus* desde las manos del manipulador hacia el alimento.
- Habiéndose lavado las manos correctamente, el manipulador puede haber tocado o rascado su nariz durante la preparación, lo que representa un acto involuntario habitual en las personas, y de esta forma contaminar el alimento a través de sus manos.
- El manipulador de alimentos pudo haber presentado infecciones cutáneas, tales como heridas o abscesos, y haber contaminado al alimento con *S. aureus* a través de estas áreas colonizadas por la bacteria.
- El manipulador de alimentos pudo haber transferido el microorganismo, que es objeto de estudio de este trabajo de investigación, al alimento al toser o estornudar sobre el mismo. La bacteria presente en su región bucofaringe pudo haberse posado sobre el alimento a través de pequeñas gotas de saliva provenientes de la boca de la persona.

- La contaminación del alimento pudo haber sido causada por contaminación cruzada, al utilizar durante el procedimiento algún elemento contaminado anteriormente, que luego no fue debidamente higienizado y desinfectado. Esto incluye tanto utensilios de cocina (ejemplo: cuchillos) y vestimenta, como superficies (ejemplo: tablas de cortar). En cuanto a esto es importante recordar del capítulo 1, la capacidad de ciertas cepas de *S. aureus* de generar biofilms y la capacidad general de la bacteria para sobrevivir en superficies secas, ya que puede crecer a nivel de aw bajos (aw mínimo 0,83, de acuerdo a la bibliografía consultada [35]).

3.3.2. Análisis de posibles peligros y factores de riesgo relacionados con la contaminación del alimento por *S. aureus*

De acuerdo a la literatura, un peligro es una “situación que denuncia un mal para alguien o alguna cosa” y un riesgo es la “probabilidad de ocurrencia del peligro”. [42]

Entonces, el peligro en este caso es el que se contamine el alimento con *S. aureus* y el mal sería enfermar por intoxicación alimenticia a causa de una toxina producida por la bacteria. Si bien otra posible consecuencia sería la de enfermar por una toxicoinfección, dado que el sushi es un alimento que una vez preparado no es sometido a cocción antes de su consumo, esto suele ocurrir sobre todo en personas inmunodeprimidas o una acidez gástrica reducida. [35]

Por otro lado, basándose en la definición de riesgo, se pueden describir los siguientes factores de riesgo que afectarían positivamente a la probabilidad de ocurrencia de las enfermedades transmitidas por el alimento a causa de la presencia del *S. aureus* en el mismo:

- El sushi es un alimento que se agrupa dentro de “alimentos listos para el consumo”. Esto significa que el alimento no es sometido a cocción antes de su ingesta, por lo que la carga microbiana resultante de su elaboración no es eliminada antes del consumo.
- *S. aureus* tiene la capacidad de generar enterotoxinas termoestables, es decir, que son altamente resistentes al calor (entre otras cosas). Luego, por más que el alimento se cocinase previamente a su consumo, la toxina sobreviviría pudiendo causar una intoxicación en el consumidor final.
- Malas prácticas de higiene y de manipulación de alimentos como no lavar y desinfectar adecuadamente utensilios y superficies en contacto con el alimento; o no mantener una adecuada temperatura de refrigeración del alimento lo que

estimularía la reproducción bacteriana y la factibilidad de que se genere la enterotoxina; o no lavarse las manos; entre otras.

- Un consumidor final con una inmunidad debilitada (personas inmunodeprimidas, embarazadas y niños), una acidez reducida o malnutridos, es más probable que desarrolle una ETA.

3.3.3. Análisis sobre la presencia de bacterias estafilocócicas distintas a *S. aureus*

La discusión de los resultados se centra en analizar la incidencia del *S. aureus* en muestras de alimento, en este caso particular sushi, dado que es la especie del género *Staphylococcus* que suele estar detrás de enfermedades transmitidas por alimentos. Sin embargo, durante este trabajo de investigación se encontraron otros microorganismos del mismo género.

Si bien la generación de enterotoxinas está asociada a *S. aureus*, como ya se mencionó, se conocen otras especies de *Staphylococcus*, que no siempre producen coagulasa o DNasa, que son capaces de producir enterotoxinas. En la siguiente tabla se detalla el comportamiento de algunas especies y subespecies de *Staphylococcus* respecto a tres de las pruebas efectuadas en este trabajo investigativo, y si producen enterotoxina o no.

Tabla 3-4. Resultados esperados para distintas pruebas bioquímicas confirmativas y producción de enterotoxina en diferentes especies del género *Staphylococcus*

Organismos	Coagulasa	Nucleasa	Manitol	Enterotoxina
<i>S. aureus</i> subsp				
<i>anaerobius</i>	+	TS	-	-
<i>aureus</i>	+	TS	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	TS	(+)	+
<i>S. hyicus</i>	(+)	TS	-	+
<i>S. delphini</i>	+	-	+	
<i>S. schleiferi</i> subsp.				
<i>coagulans</i>	+	TS	(+)	
<i>schleiferi</i>	-	TS	-	
<i>S. caprae</i>	-	TL	-	+
<i>S. epidermis</i>	-	-	-	+

<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+
-------------------------	---	---	---	---

Fuente: Jay, Loessner y Golden, Microbiología moderna de los Alimentos. [23]

Nota: + = positivo; - = negativo; (+) = reacción débil; TS = termoestable; TL = termolábil.

Sin embargo, estas no son consideradas generalmente en el estudio de ETA debido a que sus toxinas son termolábiles, su incidencia es mayor en animales que en humanos (*S. intermedius*), tienen importancia clínica por generar otro tipo de enfermedades (*S. epidermis*) o simplemente porque su frecuencia de ocurrencia es muy baja en alimentos. [23] A pesar de esto último, es preciso no dejar de mencionarlas porque de todos representan una contaminación en el alimento, dado que no son parte de la microbiota propia de los ingredientes del sushi.

3.3.4. Fuentes de error en el desarrollo de la investigación y análisis de resultados

Las posibles fuentes de error que pudiesen haber interferido en el desarrollo del presente trabajo investigativo pueden ser: contaminación de las cepas, contaminación de las muestras, errores de interpretación de resultados, entre otros.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del estudio y discusión de los resultados, se concluye que todos los locales gastronómicos que expenden sushi en la zona de Gómez Carreño (Viña del Mar, Chile) presentaron muestras de alimentos contaminadas por *S. aureus*, algunos en mayor medida que otros. Tres de los cuatros locales evaluados presentaron una incidencia de *S. aureus* del 67%, mientras que sólo uno presentó una incidencia del 33%. Además de esta bacteria, las muestras alimenticias examinadas estaban contaminadas con otras especies del género *Staphylococcus*, pero de menor importancia asociada a generación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).

S. aureus es un microorganismo que si bien es ubicuo, es habitual considerarlo como un indicador de malas prácticas higiénicas y de manipulación de alimentos, ya que es el ser humano quien generalmente es la principal fuente de contaminación en alimentos por esta bacteria. Las ETA que podrían manifestarse en el consumidor final son la intoxicación (*S. aureus* produce enterotoxinas termoestables y resistentes) y/o la toxicoinfección alimentaria (por ser el sushi un alimento listo para su consumo, lo que implica que no es sometido a cocción antes de ingerirlo), aunque en menor medida.

Las recomendaciones generales son implementar un sistema de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que haga especial hincapié en la capacitación de los manipuladores de alimentos, principales fuentes de *S. aureus*, y en el desarrollo de un programa de auditoría que permita brindar información en pos de mejorar el desempeño en cada local para asegurar la inocuidad del producto alimenticio. En el caso de detectar a un manipulador de alimentos con lesiones y/o abscesos en su piel, asignarle alguna otra tarea que no involucre el contacto con el alimento. Finalmente, cuando el consumidor final pertenezca a un grupo de riesgo, tal como personas inmunodeprimidas, embarazadas y niños, se recomienda directamente evitar consumir este tipo de alimento, aun cuando se presente cocido pues el riesgo de contaminación cruzada en este tipo de locales es muy alto.

BIBLIOGRAFÍA

1. ASTURIAS. GOBIERNO del Principado de Asturias. Frutas, verduras y derivados [diapositiva]. España: Gobierno de Asturias. s.a. 12 diapositivas.
2. BARREIRO MÉNDEZ, José A., MENDOZA GALINDO, Silvia y SANDOVAL BRICEÑO, Aleida J. Higiene y Saneamiento en la Preparación y Servicio de Alimentos. Venezuela: Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar, 1994. Colección cuadernos USB. Serie Biología, N°2. ISBN 980-237-078-9.
3. BECTON DICKSON Laboratories. BD Baird-Parker Agar [en línea]. Francia: BD Laboratories, 2003. <<https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255084.pdf>>. [Consulta: 16 de mayo de 2019].
4. BELLO GUTIÉRREZ, José y LÓPEZ DE CERAIN SALSAMENDI, Adela. Fundamentos de ciencia toxicológica. España: Díaz de Santos, 2001. 368 p. ISBN 9788479784720.
5. BIBEK, Ray y BHUNIA, Arun. Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. 4ª ed. México: Mc Graw Hill, 2010. 352P. ISBN 9786071503398.
6. BRAVO MARTÍNEZ, Francisco. El manejo higiénico de los alimentos. Guía para la obtención del distintivo H. México: Limusa, 2004. 116P. ISBN 968-18-6308-9.
7. BROOKS, George F., et al. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25ª ed. México: Mc Graw-Hill, 2011. 832p. ISBN: 978-607-15-0503-3.
8. CERVANTES GARCÍA, Estrella, GARCÍA GONZÁLEZ, Rafael y SALAZAR SCHETTINO, Paz M. Características generales del *Staphylococcus aureus* [en línea]. Revista Latinoamericana de Patología Clínica, 2014, 61 (1): 28-40. <<https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>>. [Consulta: 15 de septiembre de 2018]
9. CHILE. MINISTERIO de Salud. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Chile: Ministerio de Salud, 2019. 200p.
10. CHILE. MINISTERIO de Salud. Vigilancia de enterotoxinas en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de alimentos, Chile 2011 – 2012 [en línea]. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile, 2013, 3 (1). <<http://www.ispch.cl/content/18362>>. [Consulta: 18 de noviembre de 2018].
11. DIFCO LABORATORIES. Manual DIFCO. Medios de Cultivo Deshidratados y Reactivos para Microbiología. 10ª ed. Estados Unidos: Difco Laboratories, 1984.

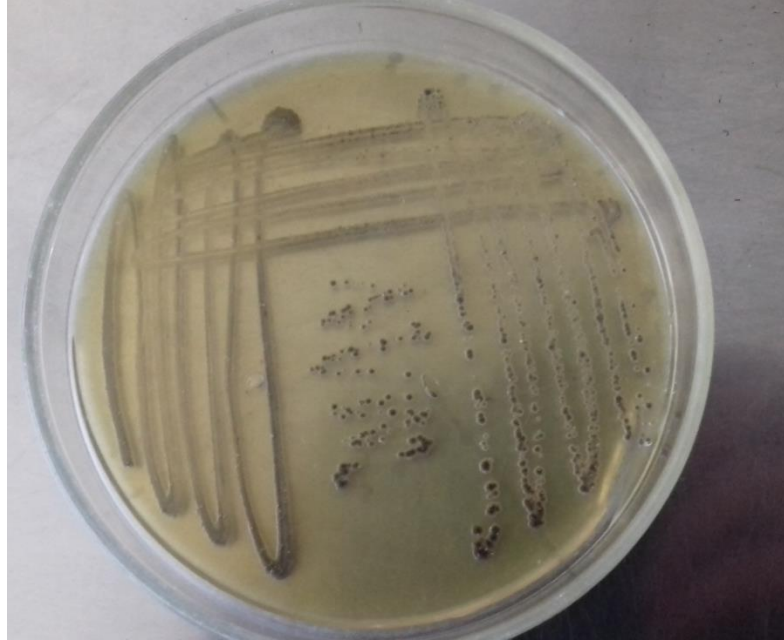
12. ENCICLOPEDIASALUD.COM. Definición de Fómite [en línea]. <<https://www.encyclopediasalud.com/definiciones/fomite>>. [Consulta: 3 de octubre de 2018].
13. EQUIPO VÉRTICE. Dietética y Manipulación de Alimentos. España: Vértice, 2011. 260 p. ISBN 978-84-92578-29-0.
14. ESTEBAN MÉNDEZ, Maricela, QUINTOS ESCALANTE, Manuel y HERRERA BENAVIDES, Alicia. Importancia de la determinación de *Staphylococcus aureus* en los alimentos [en línea]. Revista Vidsupra, 2012, 4 (1): 14-16. < <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8821>>. [Consulta: 2 de noviembre de 2018].
15. FORBES, Betty A., SAHM, Daniel F. y WEISSFELD, Alice S. Diagnóstico microbiológico. 12ª ed. Argentina: Médica Panamericana, 2009. 1160 p. ISBN 978-950-06-8243-5.
16. GIL, Angel. Tratado de Nutrición. 2ª ed. España: Panamericana, 2010. 2v. ISBN 978-84-9835-347-1.
17. GUSTAV, Claude A., LINA, Gerard y TRISTAN, Anne. Síndrome del shock tóxico estafilocócico [en línea]. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=99919>. [Consulta: 3 de octubre de 2018].
18. HEITER, Celeste. The sushi book. Estados Unidos: Things AsianPress/Global Directions, 2007. 269 p. ISBN 978-1934159002.
19. HEREDIA, Norma, et al. Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control [en línea]. Revista electrónica Nacameh, 2014, 8 (1): 20-42. < <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6032880>>. [Consulta: 22 de abril de 2019]. ISSN 2007-0373.
20. HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Manuel y SASTRE GALLEGO, Ana. Tratado de Nutrición. España: Díaz de Santos, 1999. 1496 p. ISBN 84-7978-387-7.
21. HERNÁNDEZ UZÚA, Miguel A. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud. México: Médica Panamericana, 2016. 240 p. ISBN 9786079356842.
22. INGRAHAM, John L. e INGRAHAM, Catherine A. Introducción a la Microbiología. España: Reverté, 1998. 2v. ISBN 84-291-1871-3.
23. JAY, James M., LOESSNER, Martin J. y GOLDEN, David A. Microbiología moderna de los alimentos. 5ª ed. España: Acribia, 2009. 788 p. ISBN 978-84-200-1125-7.
24. LABORATORIOS BRITANIA. Nutritivo Agar [en línea]. Argentina: Laboratorios Britania, s.a. <https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28446b169d8.pdf>. [Consulta: 16 de mayo de 2019].

25. MAHECHA PARRA, Nancy. Manejo adecuado de los alimentos en casa. Colombia: San Pablo, 2004. ISBN 958-692-511-0.
26. MARQUINA DÍAZ, Domingo y SANTOS DE LA SEN, Antonio. Sistemas de quorum sensing en bacterias [en línea]. Revista REDUCA (Biología), 2010, 3 (5): 39-55. <<http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/820/835>>. [Consulta: 22 de septiembre de 2018]. ISSN: 1989-3620.
27. MONTERO, Claudio. Manual de Técnicas de Histoquímica Básica. México: Universitaria Potosina, 1997. 136 p. ISBN 968-7674-27-X.
28. MOSSEL, David A.A. y MORENO GARCÍA, Benito. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. España: Acribia, 1985. ISBN 84-200-0561-4.
29. MOURITSEN, Ole G. Sushi. Food for the eye, the body & the soul. Estados Unidos: Springer, 2009. 330 p. ISBN 978-1-4419-0617-5.
30. MURRAY, Patrick, ROSENTHAL, Ken y PFALLER, Michael. Microbiología Médica. 8ª ed. Estados Unidos: Elsevier, 2017. 848p. ISBN 9788491130765.
31. ORGANIZACIÓN DE LA NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros [en línea]. <<http://www.fao.org/3/t1768s/T1768S03.htm>>. [Consulta: 16 de abril de 2019].
32. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Datos y cifras sobre las enfermedades de transmisión alimentaria [en línea]. <https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/es/>. [Consulta: 5 de diciembre de 2018].
33. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Educación en inocuidad de alimentos: glosario de términos [en línea]. <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=es>. [Consulta: 10 de abril de 2019].
34. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Peligros biológicos [en línea]. <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es>. [Consulta: 22 de abril de 2019].
35. PASCUAL ANDERSON, María del Rosario. Enfermedades de origen alimentario: su prevención. España: Díaz de Santos, 2005. 208 p. ISBN 9788479786823.

36. PORRES OSANTE, Nerea y RUIZ RUIZ, ELENA. Microbiología clínica. España: Parainfo, 2018. 285 p. ISBN 978-84-283-4926-7.
37. RABINO, Daniel y ARÉVALO, Laura. Alimentos Inocuos [diapositiva]. Argentina: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2017. 42 diapositivas.
38. RODRÍGUEZ CAVALLINI, Evelyn, et al. Bacteriología General. Principios y prácticas de laboratorio. 2ª ed. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2016. 458 p. ISBN 9789968465779.
39. ROMERO CABELLO, Raúl. Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Médica Panamericana, 2007. 1000 p. ISBN 9789687988481.
40. ROTGER ANGLADA, Rafael. Microbiología Sanitaria y Clínica. España: Síntesis, 1997. 752 p. ISBN 978-8477385417.
41. STAINER, Roger Y., et al. Microbiología. 2ª ed. España: Reverté, 2005. 768 p. ISBN 84-291-1868-3.
42. ZAZOPULOS GARAY, Miguel. El Sistema HACCP. Parte III [diapositiva]. Chile: Cátedra de HACCP de la Universidad Técnica Federico Santa María, sede Viña del Mar, s.a. 320 diapositivas.

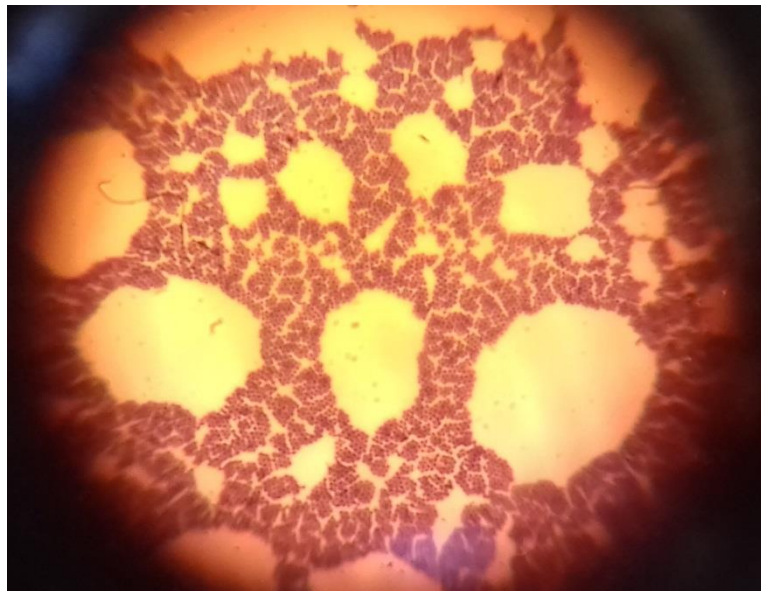
ANEXO

ANEXO A: FOTOGRAFÍAS DE PRUEBAS CONFIRMATIVAS



Fuente: Fotografía tomada por el autor durante el desarrollo experimental del T.T.

Figura A-1. Crecimiento en Agar Baird Parker (Aislamiento).



Fuente: Fotografía tomado por el autor durante el desarrollo experimental del T.T.

Figura A-2. Observación al microscopio luego de Tinción de Gram (cocos grampositivos en racimos)



Fuente: Fotografía tomada por el autor durante el desarrollo experimental del T.T.

Figura A-3. Prueba de Coagulasa. Resultados: negativo (tubo superior), positivo (tubo inferior)



Fuente: Fotografía tomada por el autor durante el desarrollo experimental del T.T.

Figura A-4. Prueba de DNasa.



Fuente: Fotografía tomada por el autor durante el desarrollo experimental del T.T.

Figura A-5. Prueba de Carbohidratos. De izquierda a derecha: tubo sin inocular, tubo positivo para prueba de carbohidratos, tubo negativo para prueba de carbohidratos.