

**Perfil toxigénico de cepas del grupo *Bacillus cereus* aisladas de alimentos comercializados en el Estado de Guerrero**

ARROYO-AYALA, Néstor\*†, RAMÍREZ-PERALTA, Arturo y LEYVA VÁZQUEZ, Marco Antonio

Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, UAGro. Av. Lázaro Cárdenas s/n Col. La haciendita, Chilpancingo, Guerrero, México

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

**Resumen**

El grupo *Bacillus cereus* está formado por microorganismos formadores de esporas, con capacidad de proliferación en una amplia variedad de ambientes, incluidos alimentos crudos, parcialmente cocinados y listos para su consumo. Cepas toxigénicas del grupo *B. cereus*, han sido descritas como causantes de intoxicación alimentaria, produciendo tanto síndrome emético como diarreico, ambos síndromes son ocasionados por toxinas sintetizadas por este microorganismo.

**Toxígeno, cepas, alimentos.****Abstract**

The *Bacillus cereus* group consists spore forming microorganisms, capable of proliferation in a variety of environments, including raw, partially cooked and ready to eat foods. Toxigenic strains of *B. cereus* group, have been reported to cause food poisoning, producing both emetic and diarrheal syndrome, both syndromes are caused by toxins synthesized by this organism.

**Toxigenic, strains foods.**

**Citación:** ARROYO-AYALA, Néstor, RAMÍREZ-PERALTA, Arturo y LEYVA VÁZQUEZ, Marco Antonio. Perfil toxigénico de cepas del grupo *Bacillus cereus* aisladas de alimentos comercializados en el Estado de Guerrero. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 Abril 2014, 1-1: 606-610

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: uacqbtito@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

**Introducción**

El síndrome diarreico puede ser causado por la acción de una o la combinación de la hemolisina BL (Hbl), la enterotoxina no hemolítica (Nhe), o por la Citotoxina K, las dos primeras constituidas por tres subunidades, estas toxinas son sensibles a altas temperaturas, a ácido y a proteasas, por lo tanto, para inducir este síndrome, es necesaria la producción de la toxina en el intestino del humano (1). El síndrome emético es ocasionado por la toxina cerulida, la cual es un péptido circular de cuatro amino ácidos producida por la enzima cerulida sintetasa. Esta toxina es termoestable, por tanto resistente a la cocción de los alimentos, por lo que no es necesaria la colonización de la bacteria para inducir el síndrome (2).

Debido a las implicaciones en la salud que tiene *B. cereus*, es necesario conocer la frecuencia y capacidad toxigénica, de las cepas presentes en alimentos comercializados en el Estado de Guerrero, lo cual permitirá conocer el grado de exposición a alimentos contaminados con cepas de *B. cereus* potencialmente causantes tanto de síndrome diarreico como emético.

**Objetivos**

- a) Determinar la frecuencia de contaminación de alimentos por cepas del grupo *Bacillus cereus*.
- b) Identificar el perfil toxigénico de las cepas del grupo *Bacillus cereus* aisladas.

**Metodología****Alimentos analizados**

Se analizaron 400 muestra de 6 diferentes grupos de alimentos que permitieran la presencia, replicación y transmisión de *B. cereus* y/o toxinas y que además no fuera necesario someterlos a procesos de cocción; alimentos ricos en almidón (n=66), frutas y vegetales crudos (n=66), especias (n=66).

Lácteos (n=66), cárnicos (n=69), alimentos listos para su consumo (n=67).

Las muestras se colectaron en el periodo de abril de 2013 a marzo de 2014 en diferentes puntos de venta de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, localizada al suroeste de México.

**Aislamiento de *B. cereus***

El aislamiento e identificación de las cepas de *B. cereus* presentes en las muestras de alimentos se realizó a partir de lo establecido en la ISO 7932: 2004 (E).

**Detección de genes de toxinas diarreogénicas y toxina emética**

Para la búsqueda de los genes codificantes de la toxina Nhe (nheA, nheB, nheC), Hbl (hblA, hblC, hblD), Citotoxina K (cytK) y cerulida (ces), se utilizó la PCR en punto final con los iniciadores y las condiciones de amplificación descritos por Lee et al., en el 2012 (4). Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 14579 de *B. cereus*, la cual presenta los genes analizados.

**Determinación de la capacidad hemolítica**

La capacidad de hemólisis se determinó incubando durante 10 minutos 1 mL de solución eritrocitaria de carnero al 5% con 1 mL de sobrenadante de cultivos bacterianos en fase logarítmica de las cepas de *B. cereus*, posteriormente se midió la hemoglobina liberada en los sobrenadantes en un espectrómetro a una longitud de onda de 545 nm. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 14579 de *B. cereus*, la cual presenta los genes de la toxina Hbl.

**Resultados**

Frecuencia de contaminación por cepas del grupo *B. cereus*.

Se analizaron 400 muestras de diferentes grupos de alimentos, en el 21% (84/400) de las muestras se detectó presencia de organismos del grupo *B. cereus*, algunas de las muestras presentaron contaminación por 2 especies diferentes del grupo *B. cereus*, aislándose en total 92 cepas. Tras la diferenciación de las 92 cepas del grupo *B. cereus*, se identificaron 74 (80%) cepas de la especie *B. cereus sensu stricto*, 6 (7%) cepas de *B. thuringiensis* y 12 (13%) cepas de *B. mycoides*.

La frecuencia de cepas del grupo *B. cereus* por tipo de alimento así como el rango de UFC presentes por gramo de alimento se presenta en el cuadro N.1

Tipo de alimento	Numero de muestras analizadas	Numero y porcentaje de muestras positivas	Porcentaje de muestras contaminadas con cepas del grupo <i>B. cereus</i>			p
	n	n (%)	<1000 ufc g <sup>-1</sup>	1000- 10,000 ufc g <sup>-1</sup>	> 10,000 ufc g <sup>-1</sup>	
Ricos en almidón	66	10 (15)	20%	60%	20%	0.025
Frutas y vegetales crudos	65	19 (29)	42%	47%	11%	
Espicias	66	27 (41)	44%	52%	4%	
Lácteos	68	15 (23)	27%	33%	40%	
Cárnicos	69	2 (3)	0	100%	0	
Listos para su consumo	66	11 (17)	18%	46%	36%	

**Tabla 1** Frecuencia de contaminación de alimentos con cepas del grupo *B. cereus*.

La mayor frecuencia de contaminación se observó en las especias 41%, seguido por las frutas y vegetales crudos y productos lácteos con un 29, y 23% respectivamente. En los alimentos listos para su consumo y alimentos ricos en almidón la frecuencia fue menor al 20%.

En las 84 muestras positivas, se demostró la presencia de esporas así como de células vegetativas, en un rango entre <1000 a >10,000 UFC/g.

Perfil toxigénico de cepas del grupo *B. cereus*.

En las 92 cepas aisladas se determinó la presencia de genes codificantes del complejo Hbl, Nhe, Citotoxina K y Cerulida. El 17% (16/92) de las cepas no presentó ninguno de los genes analizados, en tanto que el 10% (9/92) de las cepas presentaron todos los genes codificantes de las toxinas diarreogénicas.

El 17% de las cepas analizadas presentaban los 3 genes codificantes de las subunidades de la toxina Hbl en tanto que el 40% de estas cepas fue negativo para estos genes, el 60% de las cepas presentaron uno o dos genes.

La prevalencia de los genes codificantes de las subunidades de la toxina Nhe fue mayor, el 29% de las cepas presentaban los 3 genes del complejo Nhe, en tanto que el 80% de las cepas presentaban uno o dos genes de dicho complejo (cuadro N.2). Únicamente una cepa fue portadora del gen codificante de la toxina emética.

El 24% (22 de 92) de las cepas fueron portadoras del gen *cytK*.

Aislamientos	Frecuencia de genes <i>hbl</i> (%)							Negativos
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA+ hblC</i>	<i>hblA+ hblD</i>	<i>hblC+ hblD</i>	<i>hblA+ hblC+ hblD</i>	
<i>B. cereus</i>	36	26	26	22	24	16	12	40
<i>B. thuringiensis</i>	5	4	4	4	4	3	1	1
<i>B. mycoides</i>	10	7	9	7	4	4	4	1

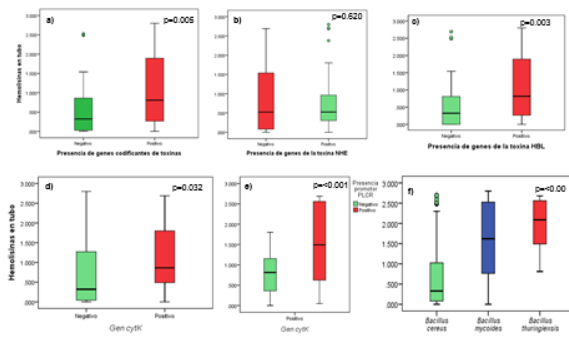
  

Aislamientos	Frecuencia de genes <i>nhe</i> (%)							Negativos
	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>nheA+ nheB</i>	<i>nheA+ nheC</i>	<i>nheB+ nheC</i>	<i>nheA+ nheB+ nheC</i>	
<i>B. cereus</i>	51	36	38	29	28	24	22	20
<i>B. thuringiensis</i>	5	5	5	4	3	4	3	0
<i>B. mycoides</i>	7	5	8	4	5	5	4	4

**Tabla 2** Frecuencia de genes de las enterotoxinas *hbl* y *nhe* en *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. thuringiensis*.

### Capacidad hemolítica

Se determinó la actividad hemolítica en las 92 cepas del grupo *B. cereus* aisladas previamente. El 100% (92/92) de las cepas lisan eritrocitos humanos y el 75% (69/92) presentó actividad hemolítica detectable contra eritrocitos de carnero. El análisis de la producción de hemólisis por presencia de genes de toxinas, así como por especie bacteriana se muestra en la figura 1.



**Figura 1** Producción de hemólisis por cepas portadoras de genes codificantes de Toxinas diarreogénicas a), producción de hemólisis en cepas portadoras de genes codificantes de toxina Nhe b), Hbl c), Citotoxina K d), PLCR e), producción de hemólisis por especie bacteriana f).

## Discusión y conclusión

Tanto la Administración de Alimentos y Medicamentos Koreana (KFDA) como la Administración de Alimentos y Medicamentos Belga (BFDA) limitan la presencia de organismos del grupo *B. cereus* a menos de 103 UFC/g, si estos límites se aplicaran a la normatividad mexicana (al no existir una propia), se demostraría que el 14% de los productos analizados no cumple con los límites propuestos por estos organismos reguladores, sin embargo, al tratarse de organismos esporulados y potencialmente productores de toxinas, no se puede descartar inóculos menores a 103 UFC/g. En este aspecto, se ha descrito que la dosis infectiva para causar enfermedad se encuentra entre 104 UFC y 106 UFC. En este estudio, fueron pocas las muestras que alcanzaban la dosis infectiva descrita, sin embargo, se debe considerar también la cantidad de alimento que se ingiere, ya que podría llegar a ser un inóculo de tamaño considerable.

*B. cereus sensu stricto* es reconocido como causante de intoxicación alimentaria, causando tanto síndrome diarreico como emético, dependiendo de la combinación de toxinas que sintetice.

Recientemente, otras especies del grupo *B. cereus* como *B. thuringiensis* y *B. mycoides*, se ha demostrado la presencia de genes codificantes de toxinas y la producción de estas.

En este estudio se realizó el aislamiento de 92 cepas del grupo *B. cereus*, 74 de estas cepas fueron identificadas como *B. cereus sensu stricto*, 12 como *B. mycoides* y 6 como *B. thuringiensis*.

Las toxinas Nhe y Hbl están constituidas por 3 subunidades, *nheA*, *nheB*, *nheC* y *B*, *L1*, *L2* respectivamente. Esta descrito que para la total funcionalidad biológica de estas toxinas son necesarias las 3 subunidades que las conforma. Sin embargo, recientemente se ha descrito actividad citotóxica contra células vero en cepas que únicamente eran portadoras de los genes codificantes de las subunidades A y B de la toxina Nhe, por lo cual en el presente estudio, no se puede descartar el potencial de causar enfermedad de aquellas cepas portadoras de la combinación de 2 genes codificantes de alguna de las subunidades de las toxinas o incluso de un solo gen de las subunidades de las toxinas Hbl o Nhe.

Con la finalidad de comprobar indirectamente la producción y funcionalidad de toxinas, se analizó la actividad hemolítica en las 92 cepas del grupo *B. cereus* aisladas previamente. Las cepas portadoras de genes codificantes de toxinas diarreogénicas el Rango intercuartilico (IQR) de hemólisis se encontraba entre 0.4 y 2 en tanto que en las cepas negativas fue de 0 a 0.8 (Figura 1).

Al analizar la producción de hemólisis por tipo de genes de enterotoxinas presentes, se observó que las cepas portadoras de genes de la toxina HBL o Citotoxina K causaban mayor grado de hemólisis (IQR 0.4-1.8 y 0.5-1.8 respectivamente) que las portadoras de genes de la toxina NHE (IQR 0.4-0.8). En este aspecto, se conoce que de las enterotoxinas de *B. cereus* asociadas al síndrome diarreico, únicamente la toxina HBL y la Citotoxina K producen hemólisis en sangre de carnero, lo cual explica los resultados obtenidos en este estudio, sin embargo, se debe considerar que además de las enterotoxinas HBL y Citotoxina K, *B. cereus* es productor de una serie de enzimas; fosfolipasas, colagenasas y hemolisinas como H1yl, H1yll, H1ylll y H1ylV, las cuales podrían ser causantes de la hemólisis en aquellas cepas que no presentan genes codificantes de toxinas diarreogénicas, sin embargo al no estar demostrada su participación en el síndrome diarreico no fueron determinadas en este estudio.

La Citotoxina K es uno de los factores de virulencia de mayor importancia entre las cepas del grupo *B. cereus*, debido a que está asociada directamente al síndrome diarreico. La síntesis de esta toxina está bajo el control del regulador transcripcional PlcR, este regulador se une a una secuencia de ADN específica denominada caja-PlcR la cual se localiza río arriba entre la posición -35 y el inicio de la transcripción del gen. Conociendo el mecanismo de regulación de expresión de este gen, se buscó la presencia de la denominada caja-PlcR en el gen de la Citotoxina K en las 22 cepas. Únicamente 14 de estas cepas presentaron esta región en el promotor del gen de la Citotoxina K. Esto indica que las 14 cepas portadoras del gen *cytK* y que contiene el sitio de unión para el factor de transcripción PlcR.

Son aptas para expresar dicho gen, esto se pudo observar de manera evidente al determinar la producción de hemólisis en las cepas portadoras del gen *cytK* y que presentaban el sitio de unión para el factor de transcripción PlcR (Figura 1e: cepas positivas a PlcR: IQR de 0.7-2.6, cepas negativas a PlcR: IQR 0.4-1.2).

En este estudio, se logró demostrar la presencia de cepas productoras de toxinas diarreogénicas (y potencialmente causantes de enfermedad) del grupo *B. cereus* en diferentes muestras de alimentos comercializadas en el Estado de Guerrero.

### Referencias

- Bottone E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 382-398.
- Granum, P., Lund, Terte. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157:223-228.
- Samapundo S., Heyndrickx M, Xhaferi R, Devlieghere F. 2011. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int. J Food Microbiol.* 150:34-41.
- Lee N., Sun J. M, Kwon K. Y., Kim H. J., Koo M., Chun H. S. 2012. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from Sunsik. *J Food Prot.* 75:225-230.
- Lindback, T., Hardy S., Dietrich, A., Moravek, M., Fagerlund, A., Bock, S., Nielsen, C., Casteel, M., Granum, P., Martlbauer, E. 2010. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect. Immun.* 78:3813-3821