

Universidad de Costa Rica  
Facultad de Microbiología

Aislamiento y caracterización parcial de  
*Bacillus cereus* toxigénicos en productos  
lácteos con especias o deshidratados

Walter Max Blanco Solís  
Carné: A20795

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura  
en Microbiología y Química Clínica

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
San Pedro de Montes de Oca, San José

Julio 2008

## Dedicatoria

A mi familia, por ser el motor de mi vida.

## Agradecimientos

Gracias infinitas a mis padres, por siempre estar ahí cuando los necesité y darme su apoyo incondicional de todas las formas posibles. Los amo.

A mis hermanos y sobrinos, por compartir conmigo su alegría y apoyarme en este proyecto.

Quiero darle un agradecimiento muy especial a la Dra. Carolina Chaves por toda su guía, apoyo y comprensión durante la elaboración de este proyecto. Gracias por entenderme entre todas las carreras y no solo ser mi mentora, sino además convertirse en mi amiga.

Un millón de gracias a la Dra. Maria Laura Arias por todos los conocimientos que ha compartido conmigo y por el respaldo a lo largo de tres años en el laboratorio de alimentos con mis múltiples proyectos. Por fin “Dog Chow” lo logró.

Muchas gracias al Dr. Cesar Rodriguez por todo su apoyo intelectual, técnico y logístico en la conclusión de este estudio y permitir generar un trabajo de mayor calidad.

A Laurita Villalobos, Andrés Chaves y toda la gente del laboratorio de alimentos. Saben que no lo hubiera logrado sin ustedes. Demasiadas gracias.

Al Dr. Christian Perez, muchas gracias por ayudarme cuando parecía que no lo iba a lograr con la parte molecular. De fijo voy a seguir la cadena de favores.

Muchas gracias a la Dra. Tatiana Moya por siempre estar dispuesta a ayudarme con mis dudas y hacer lo posible por resolverlas.

Al Dr. Marco Luis Herrera y todos los del Hospital Nacional de Niños que me apoyaron de diferentes formas. Muchas gracias.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros a lo largo de la carrera por compartir conmigo horas de cansancio, estrés y alegría. Gracias por pasar de ser extraños a convertirse en mis hermanos.

# Acta



## UNIVERSIDAD DE COSTA RICA VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

### FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

#### Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el lunes 07 de julio del año 2008 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **WALTER MAX BLANCO SOLIS**, carné A20795, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRACTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA y el título profesional de DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dra. María del Pilar Salas Chaves **PRESIDENTA**  
Dra. María del Mar Gamboa Coronado  
Dra. Carolina Chaves Ulate.  
Dra. María Laura Arias Echandi  
Dr. Carlos Quesada Gómez.

#### ARTICULO 1

La presidenta informa que el expediente de **WALTER MAX BLANCO SOLIS**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que el postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

#### ARTICULO 2

El postulante **WALTER MAX BLANCO SOLIS**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "Aislamiento y caracterización parcial de *Bacillus cereus* toxigénicos en productos lácteos con especias o deshidratados".

### ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

### ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: noventa y cinco coma seis (95.6)

### ARTICULO 5

La presidenta del Tribunal comunica al Postulante el resultado de la deliberación y lo declara acreedor al grado de **Licenciado en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctor en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las una horas.

M. del Pilar Salas Chaves

Dra. María del Pilar Salas Chaves  
Presidenta

Carolina Chaves Ulate

Dra. Carolina Chaves Ulate.

Carlos Quesada Gómez

Dr. Carlos Quesada Gómez.

María del Mar Gamboa Coronado

Dra. María del Mar Gamboa Coronado

María Laura Arias Echandi

Dra. María Laura Arias Echandi

Walter Max Blanco Solís

Walter Max Blanco Solís  
Postulante

# Índice General

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Dedicatoria .....                                                               | 2  |
| Agradecimientos.....                                                            | 3  |
| Acta .....                                                                      | 4  |
| Índice General .....                                                            | 6  |
| Índice de Cuadros.....                                                          | 7  |
| Índice de Figuras .....                                                         | 8  |
| Resumen.....                                                                    | 9  |
| Objetivos .....                                                                 | 10 |
| Objetivo General.....                                                           | 10 |
| Objetivos específicos.....                                                      | 10 |
| Justificación.....                                                              | 11 |
| Antecedentes .....                                                              | 13 |
| Introducción.....                                                               | 13 |
| Biología .....                                                                  | 14 |
| Taxonomía.....                                                                  | 15 |
| Asociación de <i>B. cereus</i> con productos lácteos y comida deshidratada..... | 17 |
| Lácteos.....                                                                    | 18 |
| Especias .....                                                                  | 20 |
| Productos deshidratados.....                                                    | 20 |
| Aislamiento e Identificación.....                                               | 21 |
| <i>Bacillus cereus</i> como agente patógeno.....                                | 23 |
| Patogenicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                            | 24 |
| Cuadros clínicos extraintestinales.....                                         | 25 |
| Cuadros clínicos asociados a alimentos .....                                    | 26 |
| Síndrome diarreico .....                                                        | 28 |
| Síndrome emético .....                                                          | 28 |
| Toxinas .....                                                                   | 29 |
| Toxina emética.....                                                             | 29 |
| Enterotoxinas .....                                                             | 30 |
| Enterotoxina T (BcET).....                                                      | 31 |
| Hemolisina BL (HBL).....                                                        | 31 |
| Enterotoxina No Hemolítica (Nhe) .....                                          | 32 |
| Citotoxina K (Cyt K).....                                                       | 32 |
| Métodos de Detección.....                                                       | 33 |
| Ensayos biológicos.....                                                         | 33 |
| Ensayos inmunológicos.....                                                      | 33 |
| Técnicas moleculares .....                                                      | 33 |
| Materiales y métodos.....                                                       | 36 |
| 1. Muestreo .....                                                               | 36 |
| 2. Aislamiento.....                                                             | 36 |
| 3. Identificación .....                                                         | 37 |
| 4. Prueba de sensibilidad a antibióticos (PSA) .....                            | 37 |
| 5. Detección de los genes productores de enterotoxinas.....                     | 38 |
| a) Extracción de ADN.....                                                       | 38 |
| b) Primers.....                                                                 | 38 |
| c) Reacción en Cadena de la Polimerasa.....                                     | 39 |
| d) Electroforesis en gel de los productos de la PCR .....                       | 39 |
| Resultados .....                                                                | 41 |
| 1. Aislamiento e identificación .....                                           | 41 |
| 2. Prueba de Sensibilidad a Antibióticos .....                                  | 42 |
| 3. Detección de genes codificadores de toxinas.....                             | 43 |
| Discusión.....                                                                  | 46 |
| Conclusiones .....                                                              | 53 |
| Bibliografía.....                                                               | 55 |

## Índice de Cuadros

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro I. Características fenotípicas distintivas entre especies del Grupo <i>Bacillus cereus</i> y su resultado esperado.....                                                              | 22 |
| Cuadro II. Secuencia de nucleótidos y posición de los primers utilizados para la detección de genes codificantes para toxinas HBL y Nhe, así como el tamaño de los productos esperados..... | 39 |
| Cuadro III. Pruebas fenotípicas con resultado variable realizadas a colonias sospechosas por <i>Bacillus cereus</i> aisladas en productos lácteos.....                                      | 41 |
| Cuadro IV. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos de los aislamientos obtenidos de productos lácteos estudiados.....                                                        | 43 |
| Cuadro V. Presencia de genes toxigénicos en los aislamientos analizados.....                                                                                                                | 44 |

## Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representación esquemática de los cuadros clínicos<br>producidos por <i>Bacillus cereus</i> .....                                                                                                           | 24 |
| Figura 2. Gel demostrativo con bandas obtenidas a partir de<br>amplificación de los genes <i>hblA</i> , <i>hblD</i> , <i>nheA</i> , y <i>nheB</i> de<br><i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> HD 137..... | 44 |

## Resumen

*Bacillus cereus* es un bacilo gram positivo esporulado capaz de provocar cuadros clínicos de diarrea y vómito vinculados a alimentos, dichos cuadros se relacionan con la capacidad de la bacteria para producir toxinas. Este microorganismo ha sido asociado, entre otros alimentos, a productos deshidratados, lácteos y especias. En este trabajo se aislaron e identificaron cepas de *Bacillus cereus* a partir de 12 leches deshidratadas, 12 quesos con especias y 21 quesos crema con especias para ensayar su capacidad productora de toxinas mediante la detección de los genes *hblA* y *hblD*, que codifican para la Hemolisina BL (HBL), y los genes *nheA* y *nheB*, que codifican para la Enterotoxina no hemolítica (Nhe), y además ensayar su perfil de sensibilidad a antibióticos. Se lograron aislar 16 cepas de la bacteria a partir de estos productos, encontrándose con mayor frecuencia en quesos crema con especias, luego en leche deshidratada y por último en quesos con especias. Las cepas aisladas presentaron resistencia a los  $\beta$ -lactámicos y sensibilidad a azitromicina, eritromicina, vancomicina, tetraciclina, gentamicina y ciprofloxacina. Se logró detectar al menos uno de los genes que codifica para la HBL o Nhe en las 16 cepas analizadas, presentándose en 9 de estas el total de genes ensayados. Esto implica que las cepas encontradas en productos lácteos pueden ser patógenos potenciales importantes y evidencia la necesidad de contar con buenas prácticas de producción, almacenamiento y manejo de los productos lácteos.

# Objetivos

## Objetivo General

Determinar la presencia de genes toxigénicos en cepas de *Bacillus cereus* aisladas a partir de alimentos de origen lácteo, deshidratados y con especias, identificadas mediante pruebas fenotípicas y ensayar la susceptibilidad a antibióticos de estas cepas.

## Objetivos específicos

- 1 Evaluar la presencia de *Bacillus cereus* en los quesos crema con especias y quesos con especias disponibles en el comercio costarricense y en leches deshidratadas de amplia distribución nacional.
- 2 Identificar y confirmar como *Bacillus cereus* los aislamientos obtenidos mediante las pruebas fenotípicas de morfología colonial, tinción de Gram, catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa, indol, movilidad, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina, utilización de nitratos, tinción de inclusiones parasporales cristalinas y la batería de pruebas API CH50B.
- 3 Ensayar la susceptibilidad a antibióticos de las cepas aisladas mediante la técnica de difusión en disco.
- 4 Detectar los genes *hblA* y *hblD*, codificantes para la toxina Hemolisina BL, y los genes *nheA* y *nheB*, codificantes para la Enterotoxina No Hemolítica, en las cepas aisladas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

# Justificación

*Bacillus cereus* ha sido encontrado causando una gran variedad de cuadros clínicos, tanto asociado a brotes alimenticios como a infecciones oportunistas (Mahon y Manuselis, 2000), los cuales al aumentar en frecuencia han provocado un aumento en el interés sobre esta bacteria (Granum y Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Granum, 2005). Dentro de los cuadros intestinales que produce se tiene el cuadro diarreico, más frecuente en el hemisferio oeste, y el emético, de mayor frecuencia en Japón (Granum, 2005).

Este agente se ha encontrado en una gran variedad de alimentos como arroz hervido, arroz frito, vegetales, productos lácteos, especias, comidas desecadas, pastas, carne, pollo, postres, sopas, ensaladas y vegetales (Kramer y Gilbert, 1989; Downes e Ito, 2000; Granum, 2005). Ya que el aislamiento de esta bacteria en productos lácteos, incluyendo leches deshidratadas, es frecuente (Wong *et al.*, 1988; Kramer & Gilbert, 1989; Van Netten *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1994; Crielly, 1994; Andersson *et al.*, 1995; Larsen y Jørgensen, 1997; Lin *et al.*, 1998, Granum, 2005), así como lo es en especias (Seenappa y Kempton, 1981; Kamat *et al.*, 1989; Little *et al.*, 2003; Banerjee y Sarkar, 2004) se analizaron en este estudio alimentos lácteos con especias o deshidratados que eventualmente podrían presentar las condiciones necesarias de humedad, nutrientes y temperatura para que se dé un crecimiento potencialmente peligroso, igual o mayor a  $10^3$  UFC/g, de este microorganismo (Granum y Lund, 1997; Granum, 2005).

*Bacillus cereus* posee una amplia distribución en alimentos y en el ambiente (Vilain *et al.*, 2006; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008), y puede presentar resistencia a varios antibióticos (Weber *et al.*, 1988, Schlegelova *et al.*, 2003, Turnbull *et al.*, 2004) por lo que existe la posibilidad de que pueda actuar como reservorio de genes de resistencia. En este estudio se brinda una noción del perfil de susceptibilidad a antibióticos de las cepas encontradas en los productos analizados.

La capacidad de causar patologías por parte del microorganismo en estudio se encuentra estrechamente relacionada con su capacidad para producir toxinas, la cual depende de la presencia del material genético codificante para estas (Ghelardi *et al.*, 2002). La detección en este estudio del patrón toxigénico de las cepas aisladas funciona como método de tamizaje para reflejar la posibilidad de que se encuentren cepas de *B. cereus* capaces de producir toxinas biológicamente activas en productos lácteos con especies y deshidratados vendidos en el mercado nacional.

Debido a la escasez de estudios a nivel regional sobre esta bacteria en productos lácteos y la capacidad toxigénica de las cepas distribuidas en esta región, este estudio pretende ilustrar levemente la situación de esta bacteria en productos lácteos vendidos en Costa Rica y señalar la importancia de que se realicen estudios más profundos sobre el tema.

# Antecedentes

## Introducción

Los miembros del género *Bacillus* son bacilos gram positivos formadores de esporas con distribución ubicuota en el ambiente, pueden crecer en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis y la mayoría son mesófilos, con la presencia de miembros termófilos o psicrófilos capaces de crecer a temperaturas tan altas como 75°C o tan bajas como 4°C respectivamente (Drobniewski, 1993).

Los miembros de este grupo pueden crecer saprofiticamente bajo condiciones de riqueza de nutrientes casuales en el ambiente, encontrándose normalmente en suelo y presentando diversas relaciones ecológicas con animales y plantas, entre ellas puede encontrarse como flora intestinal de diferentes animales (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Debido a la eventual ubicación intestinal de especies de *Bacillus* se especula que podrían presentar relaciones simbióticas con hospederos invertebrados apropiados y ocasionalmente entrar a un ciclo de vida patogénico en un hospedero que lo permita (Jensen *et al.*, 2003).

Dentro de este género es posible encontrar varias especies capaces de producir enfermedad en el ser humano como lo son *Bacillus anthracis*, agente del ántrax, asociado a cuadros cutáneos, pulmonares y gastrointestinales; *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, asociados esporádicamente a cuadros gastrointestinales y *Bacillus cereus*, el cual puede producir tanto cuadros intestinales como infecciones oportunistas (Jackson *et al.*, 1995; Mahon y Manuselis, 2000). Este último es capaz de causar cuadros diarreicos y eméticos principalmente, que están adquiriendo importancia en el mundo industrializado, debiéndose su patogenicidad a su capacidad de elaborar toxinas, incluyendo enterotoxinas y la toxina emética (Granum, 2005).

*B. cereus* es aislado frecuentemente en una gran variedad de alimentos procesados o crudos, la importancia de su presencia radica en que puede llegar a desarrollarse y provocar cuadros y brotes gastrointestinales si se dan las condiciones adecuadas (Kotiranta *et al.*,

2000; Downes e Ito, 2001). Esto ha adquirido más importancia en la industria alimentaria con el hallazgo de cepas psicrotróficas y toxigénicas de *B. cereus* capaces de crecer en alimentos almacenados en refrigeración (Downes e Ito, 2001).

Entre otros alimentos, este agente ha sido asociado a productos lácteos (Wong *et al.*, 1988; Crielly, 1994; Larsen y Jørgensen, 1997; Granum, 2005), productos deshidratados (Blakey y Priest, 1980; Jaquette y Beuchat, 2006) y especias (Banerjee y Sarkar, 2004), por lo que su prevalencia en estos alimentos es de suma importancia para estimar el riesgo de que se den cuadros clínicos causados por este agente.

Es posible encontrar estudios sobre esta bacteria en lácteos provenientes de Estados Unidos, Europa y Asia; sin embargo, a nivel latinoamericano es difícil encontrar este tipo de trabajos y se desconocen datos de presencia de esta bacteria o la capacidad toxigénica de las cepas distribuidas en esta región. Este estudio pretende dar una impresión de la situación de este agente en productos lácteos vendidos en Costa Rica y señalar la importancia de estudios más extensos sobre el tema.

En este trabajo se realizó el aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus cereus* en quesos con especias y quesos crema con especias disponibles en el mercado costarricense, además de leches deshidratadas de amplia distribución a nivel nacional, con el objetivo de evaluar la capacidad de las cepas encontradas para producir las enterotoxinas HLB y Nhe por medio de la detección de genes que codifican para éstas. Adicionalmente se determinó la susceptibilidad a antibióticos de estas cepas.

## **Biología**

*B. cereus* es frecuentemente aislado en suelo gracias a que tiene la capacidad de germinar, crecer y esporular tomando como fuente de nutrientes la materia orgánica que se encuentra en este nicho (Vilain *et al.*, 2006), pudiéndose distribuir por contaminación cruzada, tanto de esporas como de células vegetativas, a alimentos y eventualmente causar

patologías (Johnson, 1984; Gilbert y Kramer, 1986; Granum, 2005). Esta frecuencia en el ambiente y alimentos es considerablemente más alta que la observada en heces humanas de adulto sano (Ghosh, 1978).

Se caracteriza por ser un bacilo gram positivo facultativo de 0,9  $\mu\text{m}$  a 1,2  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2,0  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$  de largo, móvil con esporas elipsoidales, centrales o pericentrales, raramente distendiendo el esporangio; crece a temperaturas entre 5°C y 45°C, presenta reacción positiva para catalasa, producción de ácido en medio Voges – Proskauer, utilización de yema de huevo, resistencia a la lisozima, crecimiento en 7 % de NaCl, crecimiento a pH 5,7, producción de ácido a partir de glucosa, hidrólisis y uso de almidón como única fuente de carbono, reducción de nitratos a nitritos, descomposición de caseína y tirosina; a su vez presenta reacción negativa a la producción de ácido a partir de arabinosa, xilosa y manitol (Gordon *et al.*, 1973).

La temperatura mínima para el crecimiento de *B. cereus* puede variar desde 5 a 11°C, variando también con esta el valor  $D_{90^\circ\text{C}}$  de las esporas, el cual tiende a aumentar entre mayor sea la temperatura mínima de crecimiento, presentando cepas psicrotróficas esporas con una resistencia menor al tratamiento térmico que cepas mesófilas (Dufrenne *et al.*, 1994), sin embargo, se han encontrado cepas psicrotróficas con esporas con un valor  $D_{90^\circ\text{C}}$  mayor a 100 minutos (Dufrenne *et al.*, 1995), lo que abre la posibilidad de que un tratamiento térmico no sea suficiente para bajar la población bacteriana a niveles seguros dependiendo de la cantidad original de esporas.

## **Taxonomía**

Debido a la inevitable similitud que se presenta entre las diferentes especies pertenecientes al género *Bacillus* se han realizado varias clasificaciones. La clasificación más tradicional se realizó de acuerdo a características morfológicas, la cual fue originalmente propuesta por Smith *et al.* en 1952 y posteriormente ampliada por Gordon y

Smith en 1949 y Gordon *et al.* en 1973. Esta establece como parámetros la forma de las esporas, distensión del esporangio a causa de la espora, diámetro del bacilo y apariencia del protoplasma. Dentro de esta clasificación *B. cereus* y las especies más relacionadas a él se ubican dentro del Grupo 1.

Actualmente *B. cereus* y estas especie estrechamente relacionadas se han clasificado de acuerdo a sus características fenotípicas y genómicas dentro del Grupo *Bacillus cereus*, siendo este integrado por *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus anthracis* (Tourasse *et al.*, 2006). A sus vez, este grupo se ha subdividido de acuerdo a mayores grados de similitud entre las especies, ubicándose a *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* dentro del subgrupo *Bacillus cereus sensu lato* debido al alto grado de semejanza entre sí (Rasko *et al.*, 2005).

Estudios moleculares recientes, como electroforesis enzimática multilocus (MEE), tipificación de secuencias multilocus, polimorfismo de fragmentos grandes amplificados y estudios comparativos de subunidad ribosomal 23S, han permitido establecer las relaciones filogenéticas entre las especies de *Bacillus cereus sensu lato* al caracterizarse genotípicamente a *Bacillus cereus* (Cardazzo *et al.*, 2008; Tourasse *et al.*, 2006, Ghelardi *et al.*, 2002), detectar los genes que codifican para sus toxinas (Ghelardi *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 1999) y comparar su genotipo con las otras especies.

De acuerdo a estos estudios se ha podido establecer definitivamente que *B. cereus* y *B. anthracis* son especies diferentes (Henderson *et al.*, 1994), pero se encuentran estrechamente relacionadas (Ash y Collins, 1992; Tourasse *et al.*, 2006). Esta relación estrecha se evidencia al analizar los plásmidos de virulencia de estas bacterias, ya que *B. cereus* posee plásmidos similares al plásmido pXO1 de *B. anthracis* que incluso poseen genes toxigénicos codificados en el pXO1 (Rasko *et al.*, 2007; Hoffmaster *et al.*, 2006)

Las técnicas moleculares ya mencionadas, acompañadas por electroforesis en gel de campo pulsado y estudios de distribución de genes de virulencia, han evidenciado que *B. cereus* y *B. thuringiensis* son especies filogenéticamente intermezcladas y no pueden ser

separadas genéticamente, por lo que constituyen, en esencia, la misma especie (Carlson *et al.*, 1994; Helgason *et al.*, 1998; Tourasse *et al.*, 2006; Zahner *et al.*, 2005); esto explica que *B. thuringiensis* presente genes toxigénicos iguales o semejantes a los que posee *B. cereus* (Asano *et al.*, 1997; Hansen y Hendriksen, 2001; Zahner *et al.*, 2005) e incluso se haya visto involucrado en brotes alimenticios (Jackson *et al.*, 1995).

*B. cereus* y *B. thuringiensis* tradicionalmente se han separado por la capacidad de este último de producir cristales proteicos intracelulares, de los cuales existen muchos tipos (Gordon *et al.*, 1973; Debro *et al.*, 1986), y se encuentran codificados en genes llamados *cry* dentro de plásmidos transmisibles (Höfte y Whiteley, 1989; Rasko *et al.*, 2005). Sin embargo, también se han encontrado cepas de *B. cereus* con estos genes (Carlson *et al.*, 1994), por lo que la división entre estas especies se encuentra en discusión y a la espera de nuevos estudios. La detección de los plásmidos con los genes *cry* implica un procedimiento de mayor complejidad y costo que la observación de los cristales a través de microscopía de luz (Debro *et al.*, 1986; Rasko *et al.*, 2005), por lo que no es normalmente usado en la diferenciación de estas bacterias.

Dentro de la especie *B. cereus*, estudios filogenéticos de tipo de secuencia multilocus (MLST) han clasificado las cepas de esta bacteria en tres líneas (I, II y III), y han dado evidencia de que es posible la transferencia horizontal de genes entre estas bacterias y que esto ha tenido un papel muy importante en la evolución de los genes codificadores de toxinas (Cardazzo *et al.*, 2008).

## **Asociación de *B. cereus* con productos lácteos y comida deshidratada**

*Bacillus cereus* puede ser aislado de una gran variedad de alimentos como arroz hervido, arroz frito, vegetales, productos lácteos, especias, comidas desecadas, pastas,

carne, pollo, postres, sopas, ensaladas y vegetales (Kramer y Gilbert, 1989; Downes e Ito, 2000; Granum, 2005).

La distribución de esporas y formas vegetativas de esta bacteria puede darse por contaminación cruzada ya que al estar asociado a polvo entran en las zonas de procesamiento de los alimentos por medio de la materia prima y dispositivos de la planta, estableciéndose sobre el equipo de procesamiento del alimento y contaminando así al producto final (Johnson, 1984; Gilbert y Kramer, 1986). Las esporas tienen la capacidad de adherirse a superficies y resistir procedimientos de lavado y desinfección normales, excepto el hipoclorito y radiación ultravioleta (Granum, 2005), lo que aumenta la probabilidad de que se contamine el alimento en la planta de producción.

## **Lácteos**

*B. cereus* es un contaminante común en productos lácteos y se ha encontrado una relación estacional con su prevalencia (Wong *et al.*, 1988; Kramer & Gilbert, 1989; Van Netten *et al.*, 1990; Crielly, 1994; Andersson *et al.*, 1995; Larsen y Jørgensen, 1997; Lin *et al.*, 1998, Granum, 2005). La contaminación de lácteos se puede deber principalmente a la contaminación previa al procesamiento de la leche debido al empolvamiento de las ubres de las vacas (Granum, 2005), al fenómeno de contaminación cruzada descrito anteriormente y la alta cantidad de esporas en los corrales, alimentos y heces del ganado (Magnusson *et al.*, 2007).

La importancia de la contaminación previa al procesamiento ha sido corroborada por Lin *et al.*, en 1998, ya que en sus estudios encontraron que el 10% de las leches crudas analizadas presentaban formas vegetativas de la bacteria y el 80% presentaba esporas de la misma; estas leches de forma posterior a la pasteurización presentaron un porcentaje de positividad del 80% para células vegetativas, estas al estudiarse sus perfiles de ácidos grasos presentaron un alto grado de similitud con las esporas de la leche cruda, concluyéndose que las esporas en la leche cruda constituyen la mayor fuente de *B. cereus*

en la leche pasteurizada y que la contaminación post-pasteurización es una fuente menor de contaminación (Lin *et al.*, 1998).

Lo anterior manifiesta la importancia de las esporas en la leche cruda ya que al ser más resistentes a tratamientos térmicos que otras bacterias tienen poca competencia bacteriana luego de ellos (Andersson *et al.*, 1995), causando en algunos casos la pérdida de estos productos mediante su acción lecitinasasa o de coagulación, o pudiendo alcanzar dosis infecciosas (Granum, 2005).

Se ha encontrado que esta bacteria es comúnmente aislada en todas las etapas del procesamiento de lácteos y que su número en el alimento aumenta al pre-incubar a temperatura ambiente la leche cruda, pasteurizada y en polvo reconstituida, pudiendo alcanzar niveles asociados con la producción de enterotoxinas (Crielly, 1994).

Se han descrito varios estudios de frecuencia de *B. cereus* en lácteos, entre ellos Larsen y Jørgensen han descrito una prevalencia de un 56% en leche pasteurizada, además encontraron cepas psicotróficas de *B. cereus* en el 25% de las muestras de leche cruda analizadas (Larsen y Jørgensen, 1997). Te Giffel y colaboradores encontraron una prevalencia del 77% en leche pasteurizada (Te Giffel *et al.*, 1997). Estudios de Wong y colaboradores revelan una prevalencia de esta bacteria en el 52% de helados y 29% de leches deshidratadas analizadas (Wong *et al.*, 1988). Van Netten y colaboradores encontraron que 25% de los lácteos que analizaron tenían cepas psicotróficas de *B. cereus* (Van Netten *et al.*, 1990).

Se ha visto que las cepas psicotróficas son capaces de crecer a menos de 8°C pero se ven limitadas a 4°C, encontrándose además que la producción de toxinas se ve restringida a temperaturas menores de 8°C, aunque se podría dar si se agita constantemente el producto para aumentar la oxigenación del medio (Christiansson *et al.*, 1989; Van Netten *et al.*, 1990), por lo que en condiciones de almacenamiento normales, en donde no hay agitación, si el producto se mantiene a menos de 8°C no se da una producción significativa de toxinas.

La refrigeración es muy importante para mantener los números bajos de *Bacillus cereus*, inclusive un incremento de 2°C, de 6 a 8°C, puede aumentar importantemente la cantidad de bacterias, y aunque la refrigeración a 4°C garantiza la buena calidad de la leche, debido el costo energético temperaturas sobre 8°C son comunes (Granum, 2005). Esto es de especial importancia en productos lácteos debido al alto porcentaje de cepas psicrotóxicas aisladas en ellos (Wijnands *et al.*, 2006).

## **Espicias**

Las especias son sustancias aromáticas que sirven de condimento (RAE, 2001). Estas son un vector importante de *B. cereus*, causando la contaminación de los alimentos a los que son agregados (Banerjee y Sarkar, 2004). Aún conociéndose los efectos antimicrobianos de las especias (Shelef, 1984), estas parecen no limitar la capacidad de producir toxinas de esta bacteria (Banerjee y Sarkar, 2004). Según estudios en especias, esta bacteria muestra una alta contaminación en este tipo de alimentos, detectándose como el aerobio esporulado más frecuente (Seenappa y Kempton, 1981) y presentando prevalencias del 30% en especias de la India (Kamat *et al.*, 1989) y del 19 % en especias inglesas, con poblaciones inclusive mayores a 10<sup>4</sup> UFC por gramo (Little *et al.*, 2003).

## **Productos deshidratados**

Estos alimentos se caracterizan por presentar una actividad del agua -a(w)- alrededor de 0.60 (Belitz *et al.*, 2004). *Bacillus cereus* también se ha asociado a este tipo de alimentos, encontrándose una positividad de hasta el 56% en varios de estos productos (Blakey y Priest, 1980) y a un 54% en leches deshidratadas (Becker *et al.*, 1994).

Estudios de Jaquette y Beuchat en cereales desecados indican que la tasa de muerte de las células vegetativas de cepas psicrotóxicas de *B. cereus*, al igual que la pérdida de viabilidad de sus esporas, no se ve grandemente afectada por la disminución en la a(w). Además al reconstituir estos cereales con leche pasteurizada y mantenerlos a 8°C si se da el crecimiento de la bacteria pero no la producción de toxinas, hecho que sí ocurre cuando se

mantienen a temperatura ambiente (Jaquette y Beuchat, 2006), lo que su vez evidencia la necesidad de refrigerar los alimentos reconstituidos si no se van a consumir inmediatamente.

Se han utilizado muchos métodos para inhibir el crecimiento y la producción de toxinas por parte de *B. cereus* en los alimentos, como es el caso de la nisina (Beuchat *et al.*, 1997), sin embargo, las buenas prácticas de manufactura y los puntos críticos de control deben ser los elementos principales en la producción de alimentos con bajo riesgo por esta bacteria (Notermans y Batt, 1998).

## **Aislamiento e Identificación**

Para el aislamiento de *Bacillus cereus* se han utilizado técnicas selectivas, que inhiben la flora bacteriana encontrada en las muestras, y métodos diferenciales, para poder identificar un aislamiento probable de esta bacteria, basados en su incapacidad para producir ácido a partir de manitol, su capacidad para degradar yema de huevo y su resistencia a la polimixina B (Gordon *et al.* 1973). El agar MYP (Manitol-Yema de huevo-Polimixina), el agar KG (Kim-Goepfert) y el agar PEMBA (Polimixina-Piruvato-Yema de huevo-azul de bromotimol) son ejemplos de medios que utilizan estas características para el aislamiento de *B. cereus* y otras especies relacionadas (Shinagawa, 1990; Vanderzant y Splittstoesser, 1992). También es común el uso de medios de pre-enriquecimiento, como el caldo tripticase soya con polimixina, para que las bacterias afectadas por tratamientos reductores de carga microbiana en alimentos tengan las condiciones necesarias para que se recuperen y puedan ser detectadas en los medios anteriormente mencionados (Downes e Ito, 2001).

Las muestras en cuadros gastrointestinales son usualmente heces o vómito, idealmente con análisis simultáneo del alimento sospechoso de haber producido el cuadro (Drobniewski, 1993) para aumentar la posibilidad de aislamiento y correlacionar el cuadro clínico que se presenta con la cantidad de *B. cereus* en el alimento. Dependiendo del tipo de muestra a analizar se deben considerar los métodos a utilizar ya que algunas pueden

contener un mayor número de esporas, lo que hace posible aprovechar sus propiedades de resistencia al calor y a agentes químicos en técnicas selectivas (Drobniewski, 1993).

Al analizar un alimento se debe considerar si ha sido procesado ya que esto reduciría la cantidad de bacterias en él y sería necesario incluir una fase de pre-enriquecimiento para aumentar la posibilidad de aislamiento del microorganismo, a diferencia de un alimento sin tratar, al cual se le puede realizar un recuento directo sin pasos previos (Downes e Ito, 2001).

En el laboratorio la diferenciación entre las especies de *Bacillus* pertenecientes al grupo *Bacillus cereus* puede ser difícil y requerir el uso de pruebas fenotípicas diferenciales para lograr una identificación satisfactoria. Un listado de estas pruebas con los resultados esperados se anota en el Cuadro I.

Cuadro I. Características fenotípicas distintivas entre especies del Grupo *Bacillus cereus* y su resultado esperado.

| <b>Prueba</b>                | <b><i>B. cereus</i></b> | <b><i>B. thuringiensis</i></b> | <b><i>B. anthracis</i></b> | <b><i>B. mycoides</i></b> |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Cristales de endotoxina      | -                       | +                              | -                          | -                         |
| Movilidad                    | +                       | +                              | -                          | -                         |
| Hemólisis                    | +                       | +                              | -                          | -                         |
| Hidrólisis de gelatina       | +                       | +                              | -                          | -                         |
| Hidrólisis de tirosina       | +                       | +                              | -                          | 50-84%                    |
| Utilización de citrato       | +                       | +                              | 15-49%                     | 50-84%                    |
| Crecimiento en 7% NaCl       | +                       | +                              | +                          | 50-84%                    |
| Susceptibilidad a penicilina | -                       | -                              | +                          | -                         |
| Lisis por fago gama          | -                       | -                              | +                          | -                         |
| Virulencia en ratones        | -                       | -                              | +                          | -                         |
| Crecimiento rizoide          | -                       | -                              | -                          | +                         |

Fuente: Gordon *et al.*, 1973; Vanderzant y Splittstoesser, 1992; Drobniewsky, 1993; Mahon y Manuselis, 2000; Granum, 2005.

## ***Bacillus cereus* como agente patógeno**

El interés en este agente como causante de enfermedades ha venido en aumento debido al incremento de padecimientos relacionados con él, especialmente en brotes alimentarios (Granum y Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Granum 2005), siendo también capaz de producir infecciones oportunistas en hospederos susceptibles, como pacientes inmunosupresos (Mahon y Manuselis, 2000).

*Bacillus cereus* cuenta con una cantidad importante de factores de virulencia como los son las enterotoxinas, toxina emética (cereulida), hemolisinas, fosfolipasa C, proteasas, colagenasas y la estructura de superficie llamada capa S (Kotiranta *et al.*, 2000) lo que contribuye a aumentar el rango de enfermedades que puede ocasionar, sin embargo, debido a la ubicuidad de esta bacteria, su aislamiento en el ambiente no siempre permite relacionarlo como agente etiológico de muchas infecciones, por lo que es importante verificar su capacidad toxigénica si se quiere asociar una cepa a un cuadro o brote (Drobniewsky, 1993).

Estudios de Andersson *et al.* han encontrado un factor de virulencia adicional en algunas cepas esta bacteria. Se trata de la habilidad de producir esporas capaces de adherirse a células epiteliales, lo cual ha sido asociado a brotes con cuadros clínicos más severos y prolongados debido a que se da una mayor permanencia de la bacteria en el intestino, lo que permite la germinación y producción de toxinas directamente sobre su sitio blanco (Andersson *et al.*, 1998).

La interpretación de la presencia de esta bacteria en muestras clínicas es difícil, ya es que frecuente encontrarlo en cultivos mixtos, lo cual introduce la incertidumbre de si es el agente causal de la patología o es un contaminante, sin embargo, siempre debe sospecharse de él como agente etiológico cuando se observa en este tipo de muestras (Drobniewsky, 1993).

Desde principios del siglo pasado y probablemente desde antes se han documentado diferentes cuadros clínicos causados por *B. cereus* los cuales Drobniowski ha clasificado de manera general en la Figura 1.

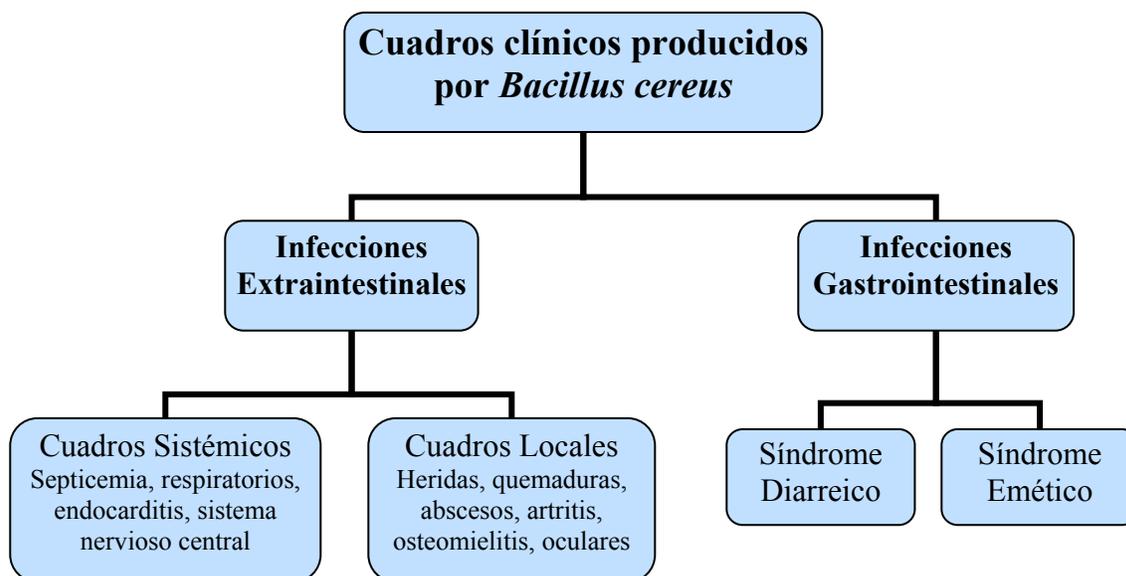


Figura 1. Representación esquemática de los cuadros clínicos producidos por *Bacillus cereus*. Tomado de Drobniowski (1993).

### Patogenicidad de *Bacillus thuringiensis*

Los cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis* presentan propiedades tóxicas sobre lepidópteros y dípteros, por lo que se han utilizado ampliamente suspensiones de esta bacteria como insecticidas (Aronson *et al.*, 1986; Höfte y Whiteley, 1989), esto sumado al descubrimiento de su estrecha relación con *B. cereus* (Tourasse *et al.*, 2006), la similitud entre su perfil toxigénico (Hansen y Hendriksen, 2001), el aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* con capacidad enterotoxigénica a partir de insecticidas (Damgaard, 1995) y la evidencia de que ha sido encontrado causando brotes (Jackson *et al.*, 1995) provocó que surgiera la preocupación de que se incrementaran las patologías producidas por esta bacteria.

La posibilidad anterior se aclaró gracias numerosos estudios que establecen que la dosis infecciosa de *B. thuringiensis* es mayor de  $10^{11}$  UFC, siendo esta una dosis muy difícil de alcanzar; la incidencia de diarrea, asma u otras enfermedades no se ha visto afectada por campañas de fumigación con la bacteria, y que suspensiones bacterianas comerciales son incapaces de producir patología en animales de laboratorio, por lo que los insecticidas basados en *B. thuringiensis* presentan un amplio margen de seguridad (Siegel, 2001).

## **Cuadros clínicos extraintestinales**

La incidencia de infecciones causadas por *Bacillus cereus* no asociadas al sistema gastrointestinal ha tendido a aumentar debido al creciente reconocimiento de este organismo como patógeno fuera del intestino (Drobniowski, 1993). Este tipo de infecciones se han dado principalmente en pacientes inmunocomprometidos (Akiyama *et al.*, 1997; Gaur *et al.*, 2001) y neonatos (Van der Zwet *et al.*, 2000; Hilliard *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 1999).

Dentro de los cuadros descritos se encuentran infecciones a nivel de piel, llegándose a producir fascitis necrotizante (Mori *et al.*, 2002) y gangrena (Darbar *et al.*, 2005). A nivel ocular es posible encontrarlo como agente causante de endoftalmitis (David *et al.*, 1994). A nivel sistémico ha llegado a producir bacteremia (Hilliard *et al.*, 2003; Gaur *et al.*, 2001) y septicemia (Akiyama *et al.*, 1997; Tomiyama *et al.*, 1994; Van der Zwet *et al.*, 2000). También se han documentado casos de infecciones en sistema nervioso central (Gaur *et al.*, 2001, Mori *et al.*, 2002) e infecciones respiratorias (Gray *et al.*, 1999; Strauss *et al.*, 2001), inclusive neumonías fatales (Hoffmaster *et al.*, 2006).

En cuanto al tratamiento de estas infecciones es bien sabido la capacidad de *B. cereus* de producir  $\beta$ -lactamasas (Lim *et al.*, 1988; Carfi *et al.*, 1995; Kotiranta *et al.*, 2000), por lo que es resistente a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación; no obstante es usualmente susceptible a vancomicina,

clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol, imipenem, gentamicina, ciprofloxacina y eritromicina (Weber *et al.*, 1988). La resistencia no intrínseca a antibióticos por parte de esta bacteria es de importancia para evaluar la posibilidad de que funcione como reservorio de genes de resistencia ya que es una bacteria de alta frecuencia en el ambiente y alimentos, dándose así la posibilidad de transmisión a otras bacterias (Palva *et al.*, 1990; Muhammad *et al.*, 1993; Licht *et al.*, 1999; ECDC, 2002).

## **Cuadros clínicos asociados a alimentos**

Aunque en Europa se tenía evidencia anecdótica de que *B. cereus* podía relacionarse con brotes alimentarios, no fue hasta que Hauge en 1955, con sus controversiales experimentos, estableciera definitivamente a esta bacteria como causante de enfermedades gastrointestinales. Este investigador ingirió jarabe de vainilla que contenía  $9,2 \times 10^7$  organismos por mililitro y dentro de las siguientes 16 horas sufrió diarrea profusa acompañada de dolor abdominal (Hauge, 1955).

En la actualidad *Bacillus cereus* es frecuentemente encontrado como agente causal de enfermedades asociadas a alimentos provocando dos tipos de cuadros, el diarreico, más prevalente en el hemisferio oeste, y el emético, con una alta prevalencia en Japón (Granum, 2005), descritos más adelante.

Esta bacteria ha sido asociada a varios brotes de gastroenteritis (Slaten *et al.*, 1992; Raevuori *et al.*, 1976; Madura *et al.*, 1970), inclusive llegando a producir casos fatales (Dierick *et al.*, 2005) por la ingestión de alimentos mal preparados o almacenados de forma ineficiente para inhibir el crecimiento y producción de toxinas bacterianas. Entre las comidas frecuentemente asociadas a brotes alimenticios se encuentran arroz hervido y frito, pasta cocida, carne cocida, vegetales cocidos, sopas, ensaladas y vegetales. (Downes e Ito, 2000).

También se han descrito brotes en los cuales se ha encontrado como agentes etiológicos a *B. cereus* y *B. thuringiensis*, encontrándose en las cepas aisladas de ambas

especies efectos citotóxicos característicos de la producción de enterotoxina (Jackson *et al.*, 1995), sin embargo, esta asociación de *B. thuringiensis* a brotes intestinales es una excepción.

Los brotes sospechosamente causados por *B. cereus* deben ser considerados en contexto de su epidemiología, incluyendo periodos de incubación, síntomas clínicos, cantidad de bacterias en el alimento y producción de toxinas por parte de las cepas involucradas ya que debido a la gran frecuencia con que los alimentos se encuentran contaminados naturalmente con esporas de *B. cereus*, es posible encontrar a la bacteria en un alimento sin contar con la presencia de síntomas clínicos (Drobniewsky, 1993), por lo que la valoración en conjunto de los elementos anteriores determinará la posibilidad de que el cuadro sea causado realmente por *B. cereus*.

En el caso de una intoxicación con toxina emética, la imposibilidad de aislar a *B. cereus* a partir del alimento sospechoso no debe eliminar a esta bacteria como posible agente causal ya que si se dio un tratamiento térmico del alimento después de la contaminación, el organismo pudo haber sido eliminado sin afectar a la toxina emética termoestable (Drobniewsky, 1993).

Se ha encontrado que dosis de *B. cereus* iguales o mayores a  $10^4$  bacterias por gramo son consideradas como peligrosas (Notermans y Batt, 1998), sin embargo, dosis de  $10^3$  bacterias por gramo no pueden ser consideradas como seguras (Granum y Lund, 1997), pudiendo variar la dosis infecciosa con la capacidad toxigénica de la cepa, ya que el nivel de expresión de los genes toxigénicos puede variar entre cepas, y el estado inmune del hospedero, siendo más propensas las personas inmunosupresas a presentar cuadros clínicos (Granum, 2005).

La capacidad de *B. cereus* de sobrevivir, crecer y producir enterotoxinas en el intestino, se ve afectada por el tipo de comida con que sea ingerido, por la tolerancia a la bilis que presente la cepa y la concentración de bilis que tenga el intestino (Clavel *et al.*, 2007). Otro factor que lo afecta es la acidez estomacal y si la forma que entra en el tracto

gastrointestinal es la célula vegetativa o la espora, ya que esta última presenta mayor tolerancia a la acidez estomacal (Clavel *et al.*, 2004).

A continuación se describirán los cuadros clínicos causados por *B. cereus* asociados a la ingesta de alimentos contaminados.

### **Síndrome diarreico**

Se debe a enterotoxinas, descritas más adelante, que pueden estar preformadas en el alimento o pueden ser producidas en el intestino (Drobniewsky, 1993). Es usualmente asociado la ingestión de alimentos proteínicos, como carne roja o pollo, se caracteriza por tener un periodo de incubación de 8 a 16 horas, manifestándose con dolor abdominal y diarrea sin presencia de fiebre, puede verse acompañado con vómitos en alrededor de 25 % de los individuos, la duración promedio del cuadro es de 24 horas y es indistinguible de la diarrea causada por *Clostridium perfringens* (Mahon y Manuselis, 2000). Para este cuadro no se aplica ningún tipo de terapia antimicrobiana y solo se aplica terapia de soporte en los casos que se requiera (Drobniewsky, 1993).

### **Síndrome emético**

Es producido por la toxina emética termoestable preformada en el alimento (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008), presenta un periodo de incubación de 1 a 5 horas, luego del cual se manifiesta predominantemente con vómito y calambres intestinales, puede presentar diarrea en un tercio de los casos. Ha sido asociado a la ingestión de arroz frito, especialmente al preparado en restaurantes orientales, y pastas, teniendo este cuadro una duración promedio de 9 horas (Mahon y Manuselis, 2000). La terapia de soporte es rara vez necesaria y la terapia antimicrobiana no es requerida del todo ya que el síndrome es autolimitante y similar al cuadro emético causado por *Staphylococcus aureus* en cuanto a sintomatología y periodo de incubación (Drobniewsky, 1993).

La asociación *B. cereus* con el arroz frito obedece factores ecológicos, económicos y culturales ya que este agente es común en suelos y contamina los granos de arroz en el campo, estos son cocinados en grandes cantidades en los restaurantes y dejados a temperatura ambiente, en donde se enfrían y almacenan hasta el día siguiente para hacer arroz frito, lo que permite la germinación de esporas y el crecimiento de células vegetativas capaces de producir la toxina a temperatura ambiente, dicha producción de toxina se ve favorecida al adicionarle proteína al arroz, como huevo y carne; la subsiguiente cocción es demasiado corta para eliminar la toxina, por lo que está se encuentra en su forma activa en el arroz listo para ingerir (Drobniewsky, 1993).

## **Toxinas**

*Bacillus cereus* es capaz de producir una gran cantidad de toxinas, entre ellas varias enterotoxinas (HBL, Nhe y CytK), la toxina emética (Cereulida), fosfolipasas, proteasas y hemolisinas (Drobniewski, 1993; Granum y Lund, 1997; Lund *et al.*, 2000). A continuación se describen las toxinas encargadas de producir los cuadros clínicos asociados a alimentos.

### **Toxina emética**

También conocida como Cereulida, es un dodecadepsipeptido cíclico con masa molecular de 1,2 kDa (Agata *et al.*, 1995) altamente estable al calor, resiste más de una hora a 150°C (Rajkovic *et al.*, 2008), y a la degradación proteolítica (Granum, 2005). Su producción es mínima por debajo de los 8°C o por encima de los 40°C (Hägglom *et al.*, 2002), con una temperatura óptima entre 25 y 30°C (Drobniewsky, 1993) y se da durante la etapa tardía de la fase de crecimiento logarítmico independientemente de la esporulación (Hägglom *et al.*, 2002).

La estabilidad de esta toxina se ve influenciada por el pH, disminuyendo a pH superiores a 10; concentración de toxina, entre menos cantidad de toxina exista va a presentar menor resistencia; y sustancias protectoras, como el aceite (Rajkovic *et al.*, 2008). Tiene la particularidad de resistir todos los tratamientos utilizados en la industria alimenticia (Rajkovic *et al.*, 2008) por lo que la seguridad de los alimentos en los que se podría producir recae en la prevención de la contaminación y del crecimiento de *B. cereus*.

La codificación de esta toxina se da en plásmidos (Hoton *et al.*, 2005), llamados plásmidos tipo pXO1, ya que presentan un alto grado similitud con la secuencia del plásmido pXO1 que codifica para la producción de toxina de *Bacillus anthracis*, sin embargo carece de la isla de patogenicidad que si tiene el pXO1 (Rasko *et al.*, 2007). Estos plásmidos codificantes para la toxina emética son frecuentemente encontrados en aislamientos clínicos (Rasko *et al.*, 2007) lo que demuestra la asociación entre su presencia y la capacidad patógena de la bacteria.

Para detectar y cuantificar esta toxina se han implementado varias técnicas como pruebas de alimentación de monos (Shinagawa *et al.*, 1995), ensayos citotóxicos (Beattie y Williams, 1999), bioensayos de inhibición de la movilidad sobre espermatozoides (Andersson *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 2004), cuantificación mediante HPLC y espectrometría de masas (Häggbloom *et al.*, 2002) y recientemente se ha evaluado la utilidad del PCR en tiempo real como método diagnóstico (Fricker *et al.*, 2007).

## **Enterotoxinas**

Anteriormente se pensaba que era una sola toxina y fue conocida como toxina diarreogénica, agente diarreico, factor de acumulación de fluido, factor de permeabilidad vascular, toxina dermonecrótica y toxina intestinonecrótica (Turnbull *et al.*, 1983). En la actualidad se ha relacionado la acción diarreogénica de *B. cereus* con un complejo de enterotoxinas compuesto por la enterotoxina T (BcET), la hemolisina BL (HBL), la

enterotoxina no hemolítica (NHE) y la Citotoxina K (Cyt K) (Agata *et al.*, 1995; Beecher *et al.*, 1995; Lund y Granum, 1996; Lund *et al.*, 2000).

La actividad de la enterotoxinas es susceptible a la degradación proteolítica, es termolábil, aunque reporta una mayor termoestabilidad en leche que en otras sustancias, y se puede encontrar preformada en el alimento o puede ser producida por la bacteria dentro del intestino delgado (Drobniewsky, 1993; Downes e Ito, 2001). Su producción se puede asociar a las condiciones de oxígeno presentes en el medio, aumentándose en condiciones de anaerobiosis gracias a sistemas de transducción de señal Redox (Duport *et al.*, 2006).

### **Enterotoxina T (BcET)**

Fue descrita como una toxina diarreica de *B. cereus* por Agata *et al.*, ya que al expresar su gen en una *Escherichia coli* recombinante presentaba citotoxicidad y actividad en la permeabilidad vascular (Agata *et al.*, 1995), sin embargo en estudios posteriores, Choma y Granum demuestran lo contrario ya que al realizar un ensayo similar en el cual clonaron, secuenciaron y expresaron el gen *bceT* en otra *E. coli* recombinante, esta no presentó actividad citotóxica alguna, obteniendo el mismo resultado al tomar un extracto de *B. cereus* toxigénico y neutralizar los demás componentes por medio de anticuerpos monoclonales para que solo actuara la BcET, lo que evidencia que esta proteína tiene una acción enterotóxica desconocida o no presenta ninguna acción del todo (Choma y Granum, 2002).

### **Hemolisina BL (HBL)**

Está formada por tres componentes, B, L1 y L2, (Beecher y Macmillan, 1991) que presentan una mayor actividad cuando se administran los tres juntos que cuando se administran dos o uno (Beecher *et al.*, 1995). Posee actividad hemolítica, citotóxica, dermonecrótica, de permeabilidad vascular y su presencia se puede denunciar por un patrón discontinuo de hemólisis en agar sangre (Beecher y Wong, 1994; Beecher *et al.*, 1995).

Los genes codificantes para los componentes de esta enterotoxina se transcriben como parte de un operón (Ryan *et al.*, 1997) y están distribuidos entre las especies del

grupo *Bacillus cereus*, pudiéndose producir parte de la toxina en algunas de ellas y la toxina completa en otras (Prüss *et al.*, 1999).

### **Enterotoxina No Hemolítica (Nhe)**

También interviene en el síndrome diarreico y es una enterotoxina compleja formada por 3 componentes A, B y C (Lund y Granum, 1996), en los cuales el NheB funciona como componente de enlace entre los componentes NheA y NheC (Lindback *et al.*, 2004). Los componentes se encuentran codificados por tres genes (*nheA*, *nheB* y *nheC*) que se transcriben dentro de un operón (Granum *et al.*, 1999; Lindback *et al.*, 2004). Las cepas de *B. cereus* que poseen los genes *nhe* usualmente expresan el set completo de tres componentes (Dietrich *et al.*, 2005) y la expresión de todos los componentes es requerida para que el complejo presente actividad biológica (Lindback *et al.*, 2004).

La secuencia de los genes productores de HBL y Nhe no muestran similitud con ninguna otra secuencia codificante para proteína conocida pero si muestran homología entre sí, evidenciando que provienen de un gen común (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Se ha propuesto que los mecanismos de acción son similares para las dos toxinas e involucran la formación de poros transmembrana a través de un haz de hélices- $\alpha$  y una única horquilla- $\beta$ , sin embargo, no se tiene la certeza de que solo presenten este mecanismo (Beecher y Wong, 1997; Fagerlund *et al.*, 2008).

### **Citotoxina K (Cyt K)**

Fue descrita por Lund *et al.* en el año 2000 como una proteína de 34 kDa altamente citotóxica capaz de producir necrosis y hemólisis sin efecto sinérgico aparente con las otras toxinas. No presenta similitud con las otras enterotoxinas de *Bacillus cereus* pero si lo hace con la hemolisina II de esta bacteria, además de la leucocidina y  $\gamma$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus* y con la  $\beta$ -toxina de *Clostridium perfringens*, todas pertenecientes a la familia de toxinas formadores de canales, lo que explicaría la semejanza entre los cuadros diarreicos causados por *C. perfringens* y *B. cereus* (Lund *et al.*, 2000).

Hardy y colaboradores en el 2001 confirmaron que el mecanismo de acción de la Cyt K es a través de la formación de poros transmembrana y que presenta citotoxicidad en células del epitelio intestinal (Hardy *et al.*, 2001). Se han descrito dos tipos de Cyt K, la Cyt K-1 y Cyt K-2, siendo la primera alrededor de 5 veces más tóxica sobre células epiteliales que la segunda, pero en eritrocitos se ha observado una actividad similar (Michelet *et al.*, 2006).

## **Métodos de Detección**

Se han creado diferentes métodos para detectar las enterotoxinas de *B. cereus*, entre ellos se puede enumerar:

### **Ensayos biológicos**

Dentro de estos se encuentran los tradicionales ensayos realizados en animales, como la acción sobre asas iliacas de conejo (Rabbit ileal loops -RIL-) (Spira y Goepfert, 1972) y ensayos de reacción de permeabilidad vascular (VPR) (Glatz *et al.*, 1974), en los cuales se evalúa la acumulación de líquidos al administrar las enterotoxinas. Además se han utilizado ensayos citotóxicos en líneas celulares CHO, Caco-2, Vero y McCoy (Beattie y Williams, 1999; Fletcher y Logan, 1999; Fagerlund *et al.*, 2004).

### **Ensayos inmunológicos**

Comercialmente se pueden encontrar ensayos como la aglutinación pasiva en látex de enterotoxina reversa (BCET-RPLA de Oxoid), que detecta el componente L<sub>2</sub> de la toxina HBL, y el inmunoensayo visual de enterotoxina diarreica (BDE-VIA de Tecra), el cual detecta 2 proteínas aparentemente no tóxicas con papel desconocido en la producción de patología, lo cual refleja la necesidad de ser muy críticos y prudentes con el uso de estos métodos (Beecher y Lee, 1994).

### **Técnicas moleculares**

Estas han sido utilizadas para detectar los genes codificantes para enterotoxinas en cepas bacterianas, lo que ha permitido comprobar que la presencia de estos genes en cepas de *B. cereus* tiene una estrecha relación con su patogenicidad, siendo capaces de producir

factores de virulencia, cuadros clínicos y brotes (Ghelardi *et al.*, 2002). En aislamientos obtenidos de varios alimentos se han encontrado los genes de la toxina no hemolítica con una frecuencia del 97 % y de HBL del 66% (Wijnands *et al.*, 2006), lo que evidencia la posibilidad de que estas bacterias provenientes de alimentos puedan producir cuadros clínicos. La variación en la frecuencia con que las cepas de *B. cereus* presentan los genes toxigénicos se puede deber a que estas toxinas constituyeran una ventaja evolutiva desarrollada por especies primitivas de esta bacteria para aumentar su supervivencia y al darse el proceso de selección natural de estas cepas y la distribución de estos genes de forma horizontal (Cardazzo *et al.*, 2008), se llegó a la alta frecuencia con que se observan en la actualidad.

La secuenciación de los genes de los componentes enterotoxigénicos, el componente B de la HBL (Heinrichs *et al.*, 1993), los componentes L1 y L2 de la HBL (Ryan *et al.*, 1997) y los componentes NheA, NheB y NheC de la Nhe (Granum *et al.*, 1999), ha permitido la deducción de los primers para su detección (Hansen y Hendriksen, 2001) y así poder determinar el potencial toxigénico de cepas de *B. cereus*.

Se ha encontrado que los genes que codifican por los dos complejos de enterotoxinas, HBL y NHE, tienen una asociación significativa entre si, siendo frecuente encontrarlos juntos, y a la vez no muestran una relación significativa con los genes de la BceT (Hansen y Hendriksen, 2001), indicando que las bacterias toxigénicas van a tender a presentar las dos toxinas con actividad biológica o por lo menos partes de estas, con lo que aumenta su potencial patógeno.

Según un estudio de los investigadores Hansen y Hendriksen, en el cual se detectaron los genes codificantes para enterotoxinas en cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, todas las cepas de esta última bacteria presentan los genes codificantes para la HBL y la Nhe, encontrándose que el 58,5 % de las cepas presenta el set completo de 6 genes para estas toxinas y que los genes necesarios para producir al menos una enterotoxina completa se dan en el 90,2 % de las cepas. Datos de este estudio revelan que para *B. cereus* la presencia de los 6 genes se da en 36,4 % de las cepas estudiadas, siendo frecuente que si

se da la ausencia de varios genes estos sean codificantes para componentes de la misma toxina, por lo que 81,8 % de las cepas produce al menos una enterotoxina completa. Solo una de las cepas de *B. cereus* presentó ausencia de los genes que codifican para HBL y NHE (Hansen y Hendriksen, 2001). Este estudio es una muestra de la gran frecuencia con que estas bacterias presentan capacidad toxigénica, por lo que es importante prevenir que se den las condiciones para que se produzcan estas toxinas.

En la actualidad se han estado estudiando métodos de prevención de enfermedades causadas por *B. cereus* y *B. anthracis*, como lo son estudios de proteómica para averiguar cuales antígenos podrían funcionar como posible vacuna contra estas bacterias (Del Vecchio *et al.*, 2006). Con este tipo de estudio y con estudios sobre prevalencia y detección de cepas patógenas de *Bacillus cereus* que ayuden a evidenciar la importancia de controlar la contaminación de los productos con esta bacteria, se esperaría en un futuro reducir al mínimo la incidencia de cuadros clínicos provocados por esta.

# Materiales y métodos

## 1. Muestreo

Las muestras a analizar fueron todas las marcas de quesos con especias y quesos crema con especias encontrados en el mercado costarricense y las leches deshidratadas (en polvo) de mayor distribución nacional, vendidos entre Octubre y Noviembre del 2007, de origen nacional e internacional. Dichos productos se obtuvieron en diferentes supermercados y se llevaron al Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología para su análisis. Cada producto se analizó por triplicado con diferentes lotes. En total se analizaron 12 muestras de queso, 21 muestras de queso crema y 12 de leche deshidratada. La lista con los productos se detalla en el Anexo I.

## 2. Aislamiento

Debido a que se analizaron alimentos procesados, el análisis incluyó un paso de pre-enriquecimiento para recuperar a las bacterias deterioradas y aumentar la sensibilidad del aislamiento. La metodología utilizada se basa en la descrita por el Compendium de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos (Downes e Ito, 2001) para el aislamiento de *Bacillus cereus*.

El método consistió en pesar 25 g del alimento analizado y se mezclarlos con 225 mL de Agua Peptonada Estéril (APE) 0,1% mediante un ciclo del homogenizador Stomacher, de esta suspensión se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-3}$ . De cada dilución se inoculó 1 mL en 3 tubos de Caldo Trypticase Soya (CTS) con Polimixina, los cuales se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2\text{h}$ . Los tubos que presentaron turbidez se platearon en placas de agar Manitol – Yema de huevo – Polimixina (MYP), las cuales se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2\text{h}$ .

### **3. Identificación**

A las colonias que presentaron la morfología característica de *Bacillus cereus* en agar MYP (colonias grandes, planas, secas, rosadas, rodeadas de halo de precipitación por la degradación de la yema de huevo) se les realizó tinción de Gram, pruebas de catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa, indol, movilidad, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina y utilización de nitratos como se describe en el Compendium de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos (Downes e Ito, 2001) con el fin de hacer la identificación presuntiva de *B. cereus*.

A manera de criterio confirmatorio se ensayaron con la batería de utilización de carbohidratos API CH50 de la casa Biomeriux. Para el análisis de los resultados se utilizó el software de identificación APILAB, según el cual se clasificaron los grados de similitud con *Bacillus cereus* en excelente (perfil con igual o más de 99,9% de similitud), muy bueno (entre 99.0 y 99.8%), bueno (entre 90.0 y 98.9%), aceptable (entre 80.0 y 89.9%) y dudoso (entre 65 y 79.9%).

Se realizó una prueba de identificación diferencial de *Bacillus thuringiensis* mediante la observación de inclusiones parasporales cristalinas en microscopía de luz a 100X de frotis de las bacterias, previamente incubadas durante 5 días a 37°C, teñidos con azul de Coomasie (azul de coomasie al 3,75% en 1:1 de ácido acético y etanol). Esto debido a que *B. cereus* y *B. thuringiensis* presentan los mismos resultados para las demás pruebas realizadas.

### **4. Prueba de sensibilidad a antibióticos (PSA)**

Se realizó mediante una prueba de difusión de disco según está descrita por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Los antibióticos evaluados fueron amoxicilina – ácido clavulánico, azitromicina, cefotaxime, eritromicina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina, penicilina y ciprofloxacina ya que estos son los usualmente ensayados, según la literatura, para esta bacteria (Weber *et al.*, 1988; Mohammed *et al.*, 2002; Turnbull *et al.*, 2004).

Cada aislamiento a evaluar se cultivó en agar sangre por 24 horas a 37°C, con el crecimiento correspondiente se realizó una suspensión al 0,5 MacFarland y se rayó confluentemente en agar Müeller-Hinton, posteriormente se colocaron los discos de antibióticos, se incubaron las placas por 24 horas a 37°C y se determinaron los halos de inhibición. Debido a la ausencia de puntos de corte en la prueba de difusión de disco para especies de *Bacillus* se utilizaron los puntos de corte de *Staphylococcus aureus* como referencia para clasificar la susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos, de igual forma a lo realizado en estudios anteriores (Coker *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2002; Turnbull *et al.*, 2004), ya que para la mayoría de antibióticos ensayados estas dos bacterias presentan concentraciones mínimas inhibitorias similares (CLSI, 2008). Se utilizaron como cepas control a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

## **5. Detección de los genes productores de enterotoxinas**

Se detectaron los genes productores de enterotoxinas debido a que en nuestro hemisferio son más frecuentes y de mayor importancia los cuadros diarreicos provocados por *B. cereus* asociados a este tipo de toxinas que los cuadros eméticos (Granum, 2005).

### **a) Extracción de ADN**

La extracción se realizó mediante choque térmico para lo cual las cepas bacterianas se cultivaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2\text{h}$  en agar MYP, tomando posteriormente una colonia y realizando una suspensión con 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Esta suspensión se incubó durante 20 minutos a  $95^\circ\text{C}$ , para lisar las células vegetativas, y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada a  $4^\circ\text{C}$ , para sedimentar los detritos celulares. Del sobrenadante, que contenía el ADN extraído, se almacenaron 300  $\mu\text{L}$  para ser utilizados como ADN base para la amplificación.

### **b) Primers**

Se utilizaron primers para detectar 2 de los 3 genes que codifican para las enterotoxinas HBL y Nhe, estos son los genes *hbla*, *hblD*, *nheA* y *nheB* que codifican para los componentes B y L<sub>1</sub> de la hemolisina BL (HBL) y los componentes A y B de la

enterotoxina no hemolítica (Nhe) respectivamente. Estos primers fueron escogidos de los deducidos por Hansen y Hendriksen para detectar los genes que codifican para los tres componentes de la HBL y los tres componentes de la Nhe (Hansen y Hendriksen, 2001) y son descritos en el Cuadro II.

Cuadro II. Secuencia de nucleótidos y posición de los primers utilizados para la detección de genes codificantes para toxinas HBL y Nhe, así como el tamaño de los productos esperados.

| Nombre y secuencia (5'→3')                                                                                    | Posición                   | Producto esperado (pares de bases) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Componente B (gen <i>hblA</i> ) de HBL<br>HBLA1: GTGCAGATGTTGATGCCGAT<br>HBLA2: ATGCCACTGCGTGGACATAT          | 671-690 →<br>990-971 ←     | 300                                |
| Componente L <sub>1</sub> (gen <i>hblD</i> ) de HBL<br>L1A: AATCAAGAGCTGTCACGAAT<br>L1B: CACCAATTGACCATGCTAAT | 2854-2873 →<br>3283-3264 ← | 410                                |
| Componente A (gen <i>nheA</i> ) de Nhe<br>nheA 344 S: TACGCTAAGGAGGGGCA<br>nheA 843 A: GTTTTTATTGCTTCATCGGCT  | 344-360 →<br>843-823 ←     | 479                                |
| Componente B (gen <i>nheB</i> ) de Nhe<br>nheB 1500 S: CTATCAGCACTTATGGCAG<br>nheB 2269 A: ACTCCTAGCGGTGTTCC  | 1500-1518 →<br>2269-2253 ← | 753                                |

### c) Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para hacer la amplificación de los genes toxigénicos se estandarizó el PCR partiendo de un dúplex PCR con los genes *nheA* y *hblA* y otro dúplex PCR con los genes *nheB* y *hblD*, luego se mezclaron los 4 juegos de primers para obtener un cuádruplex PCR. Las muestras fueron analizadas utilizando este cuádruplex PCR. Se utilizó como control positivo a la cepa *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD 137, la cual presenta todos los genes para las toxinas HBL y Nhe, y como control negativo a *Escherichia coli* ATCC 25922.

La mezcla para la amplificación se hizo utilizando 1 µL de cada primer a 100 µM, 5 µL del ADN extraído, 25 µL de Mastermix 2X y 17 µL de agua libre de nucleasas (Fermentas ®) para llegar a un volumen final de 50 µL. Esta mezcla se amplificó mediante 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineación a 55°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos.

### d) Electroforesis en gel de los productos de la PCR

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio a una concentración de 0,0005 mg/mL. El gel se cargó con 10  $\mu$ L de mezcla de carga (10  $\mu$ L de las muestras amplificadas con 1  $\mu$ L de buffer de carga) y se corrió a 120 V durante 1 hora. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (Fermentas <sup>®</sup>).

# Resultados

## 1. Aislamiento e identificación

De las 48 muestras analizadas se lograron obtener 21 aislamientos con la morfología esperada en agar MYP para *Bacillus cereus*. Al realizar las pruebas fenotípicas todos los aislamientos resultaron catalasa positivos, oxidasa negativos, indol negativo, movilidad positivo y fermentadores de glucosa. En el Cuadro III se detalla el resultado de las pruebas bioquímicas que dieron de forma variable durante la identificación.

Cuadro III. Pruebas fenotípicas con resultado variable realizadas a colonias sospechosas por *Bacillus cereus* aisladas en productos lácteos.

| Aislamiento | Gram              | Hidrólisis Almidón | Hidrólisis Gelatina | Utilización Nitratos | Similitud con <i>B. cereus</i> API CH50B (%) | Identificación API CH50B     |
|-------------|-------------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------------------------------|------------------------------|
| LD1         | BG+Esporulado     | -                  | +                   | +                    | 89.2                                         | Aceptable                    |
| LD2         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 87.4                                         | Aceptable                    |
| LD3         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 81.7                                         | Aceptable                    |
| LD4         | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | +                    | 82.2                                         | Aceptable                    |
| LD5         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 87.3                                         | Aceptable                    |
| LD6*        | BG+ No Esporulado | -                  | -                   | +                    | No ensayado                                  | No ensayado                  |
| LD7*        | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | NR                   | <i>B. stearothersophilus</i>                 | <i>B. stearothersophilus</i> |
| LD8*        | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | NR                   | No aceptable                                 | No aceptable                 |
| Q1          | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | +                    | 86.3                                         | Aceptable                    |
| Q2          | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | +                    | 86.3                                         | Aceptable                    |
| Q3*         | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | +                    | <i>B. coagulans</i>                          | <i>B. coagulans</i>          |
| QC1         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 84.6                                         | Aceptable                    |
| QC2         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 85.2                                         | Aceptable                    |
| QC3         | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | +                    | 80.2                                         | Aceptable                    |
| QC4         | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | +                    | 89.2                                         | Aceptable                    |
| QC5         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 82.3                                         | Aceptable                    |
| QC6         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 87.3                                         | Aceptable                    |
| QC7         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 85.2                                         | Aceptable                    |
| QC8         | BG+ Esporulado    | -                  | +                   | +                    | 83.5                                         | Aceptable                    |
| QC9         | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | NR                   | 81.5                                         | Aceptable                    |
| QC10*       | BG+ Esporulado    | +                  | +                   | NR                   | <i>B. mycoides</i>                           | <i>B. mycoides</i>           |

\*Aislamientos descartados como *Bacillus cereus*.

LD: Leche deshidratada. Q: Queso. QC: Queso crema. NR: No reductor.

A excepción de uno de los aislamientos que no presentó esporas y no hidrolizó gelatina (LD6), todos fueron bacilos gram positivos esporulados y sí hidrolizaron la gelatina. El aislamiento mencionado no se ensayó con el sistema API CH50B. Además de este aislamiento se descartaron cuatro más, LD7, LD8, Q3 y QC10, como posibles cepas de *B. cereus* al ser identificados como *B. stearothermophilus*, perfil no aceptable, *B. coagulans* y *B. mycooides*, respectivamente con el sistema de identificación API CH50B.

La prueba de hidrólisis de almidón dio resultados variables, siendo positiva en 10 de los 21 aislamientos sospechosos sin presentar ningún patrón asociado a las cepas descartadas. La prueba de reducción de nitratos fue negativa en 4 aislamientos y si presentó relación con el descarte de las cepas ya que de estas cuatro, 3 presentaron un perfil de identificación incompatible con *B. cereus* según el API CH50B.

Según el tipo de producto, se identificaron satisfactoriamente como *Bacillus cereus* 2 aislamientos provenientes de los 12 quesos con especias (17%), 9 de los 21 quesos crema con especias (43%) y 5 de las 12 muestras de leche deshidratada (42%); encontrándose un total de 16 cepas a partir de los productos analizados (33.3%).

La tinción de Azul de Coomasie para observar las inclusiones cristalinas parasporales no detectó la presencia de estas en ninguno de los aislamientos, por lo que no fue posible identificar a ninguno de ellos como *Bacillus thuringiensis*.

## **2. Prueba de Sensibilidad a Antibióticos**

Los aislamientos estudiados resultaron ser sensibles a azitromicina, eritromicina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina, ciprofloxacina y resistentes a los  $\beta$ -lactámicos ensayados, como se esperaba. Una excepción a lo anterior fue el aislamiento QC3, el cual resultó sensible a amoxicilina - ácido clavulánico y penicilina, e intermedio a cefotaxime. Los resultados de los antibióticos para los cuales no se esperaba resistencia intrínseca se presentan en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos de los aislamientos obtenidos de productos lácteos estudiados.

| Aislamiento | Azitromicina | Eritromicina | Gentamicina | Vancomicina | Tetraciclina | Ciprofloxacina |
|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|----------------|
| LD1         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| LD2         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| LD3         | S            | S            | S           | S           | I            | S              |
| LD4         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| LD5         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| Q1          | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| Q2          | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| QC1         | S            | I            | S           | S           | S            | S              |
| QC2         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| *QC3        | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| QC4         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| QC5         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| QC6         | S            | I            | S           | S           | S            | S              |
| QC7         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| QC8         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |
| QC9         | S            | S            | S           | S           | S            | S              |

R: Resistente. I: Intermedio. S: Sensible.

\*Sensible a Amoxicilina – ácido clavulánico y pencilina, intermedio para cefotaxime.

### 3. Detección de genes codificadores de toxinas

La amplificación de los genes toxigénicos con el cuádruplex PCR y la electroforesis de los productos de amplificación de la cepa toxigénica *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD 137 correspondientes a los genes *hblA* (300 pb), *hblD* (410 pb), *nheA* (479 pb) y *nheB* (753 pb), se presenta en la Figura 2.

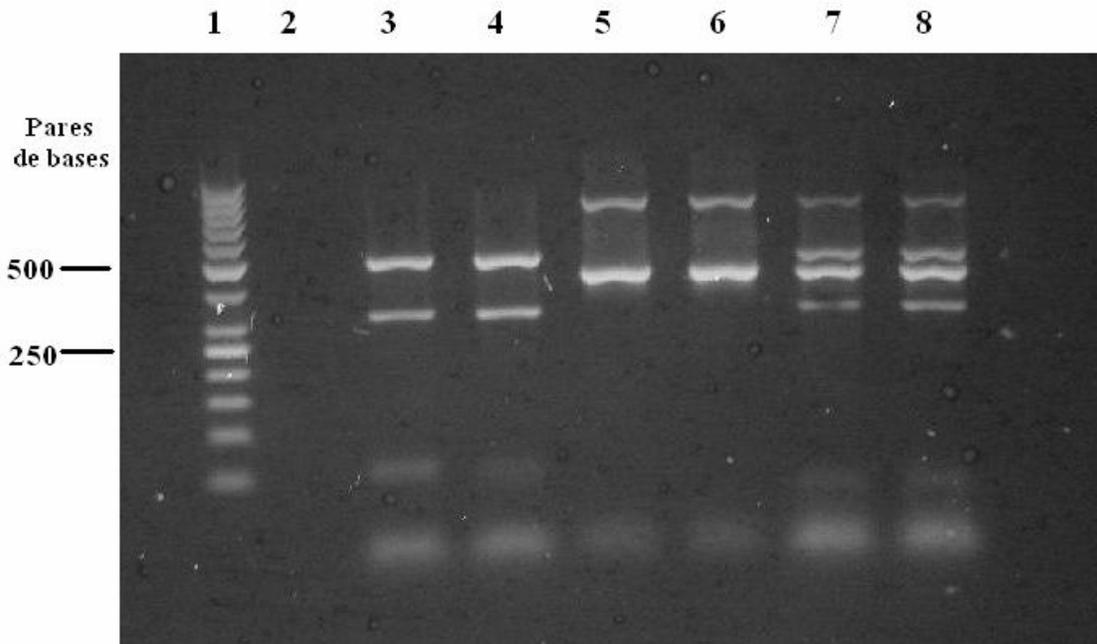


Figura 2. Gel demostrativo con bandas obtenidas a partir de amplificación de los genes *hblA*, *hblD*, *nheA*, y *nheB* de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD 137. Carril 1 - Marcador de peso molecular, Carril 2 - Control Negativo *E. coli* ATCC 25922, Carriles 3 y 4 - Genes *nheA* y *hblA*, Carriles 5 y 6 - Genes *nheB* y *hblD*, Carriles 7 y 8 - Genes *nheA*, *nheB*, *hblA* y *hblD*.

En el Cuadro V se resumen los resultados obtenidos al detectar la presencia de los genes toxigénicos en estudio dentro de las cepas aisladas.

Cuadro V. Presencia de genes toxigénicos en los aislamientos analizados.

| Aislamiento | <i>nheB</i> | <i>nheA</i> | <i>hblD</i> | <i>hblA</i> |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| LD2         | P           | P           | P           | P           |
| LD3         | P           | P           | P           | P           |
| LD5         | P           | P           | P           | P           |
| QC1         | P           | P           | P           | P           |
| QC2         | P           | P           | P           | P           |
| QC5         | P           | P           | P           | P           |
| QC6         | P           | P           | P           | P           |
| QC7         | P           | P           | P           | P           |
| QC8         | P           | P           | P           | P           |
| LD4         | P           | P           | A           | A           |
| Q1          | P           | P           | A           | A           |
| Q2          | P           | P           | A           | A           |
| QC4         | P           | P           | A           | A           |
| QC9         | P           | A           | A           | A           |
| LD1         | A           | P           | A           | A           |
| QC3         | A           | P           | A           | P           |

P: Presente. A: Ausente.

Estos resultados indican que los 16 aislamientos poseen al menos un gen toxigénico, 9 de estos presentan los 4 genes evaluados, 13 presentan los dos genes estudiados de la Nhe y 9 presentan los dos evaluados de la HBL. Al analizar la frecuencia con que se presentan simultáneamente los dos genes que codifican para una misma toxina se encuentra que esto sucede en un 84,6% de los casos.

## Discusión

Al analizar la cantidad de aislamientos según tipo de productos se puede observar que es más frecuente el aislamiento de *B. cereus* en queso cremas con especias (43%) y leches deshidratadas (42%) que en quesos con especias (17%).

En el caso de los quesos cremas con especias, esta frecuencia alta se puede deber al mayor contenido de agua en ellos, lo que es favorable para la eventual germinación de esporas y aumenta la posibilidad de detección (Granum, 2005); a su vez, estos productos presentan un alto contenido de grasa, lo que confiere un mayor grado de protección a las bacterias frente a los tratamientos reductores de la carga microbiana (Schlegelova *et al.*, 2003;; Rajkovic *et al.*, 2008). Estos factores parecen tener más peso que la refrigeración aplicada a los productos para mantener bajo el número de bacterias, aunque existe la posibilidad de que estos contengan cepas psicrotróficas (Van Netten *et al.*, 1990; Larsen y Jørgensen, 1997; Wijnands *et al.*, 2006).

La frecuencia de *B. cereus* en los productos lácteos deshidratados puede verse afectada por la calidad de la materia prima utilizada en su fabricación y por la capacidad de las esporas de soportar tratamientos térmicos fuertes, ya que aunque el alimento contenga una baja actividad del agua, las esporas no se ven afectadas por esto y se encuentran en latencia a la espera de condiciones favorables (Granum, 2005).

La baja positividad observada en los quesos con especias se puede deber a que presentan un menor contenido de agua que los quesos crema y aunque es mayor al presente en las leches deshidratadas, la combinación del almacenamiento en frío con la menor disponibilidad de agua puede lograr controlar el crecimiento bacteriano. Es importante señalar que al igual que en los casos anteriores existe la posibilidad de encontrar cepas psicrotróficas de *B. cereus* en estos productos (Van Netten *et al.*, 1990; Larsen y Jørgensen, 1997; Wijnands *et al.*, 2006), lo que presenta la posibilidad de encontrar una positividad significativa.

Cabe destacar la posibilidad de que no se detecten cepas de la bacteria debido a la presencia de formas viables no cultivables en el alimento. Este es un estado adaptativo a bajas condiciones nutricionales, como una baja actividad del agua en el caso de leches deshidratadas, en el cual la bacteria puede llevar a cabo funciones fisiológicas pero no es capaz de crecer en un medio de cultivo (Morita, 1985). Debido a esta posibilidad no es factible decir que los productos de los cuales no se logró aislar la bacteria en realidad carecían de esta. Esta limitación en la detección de la bacteria se puede dominar al utilizar técnicas moleculares que no requieren cultivo del microorganismo y que detecten directamente el material genético de la bacteria.

Existe una gran cantidad de variables, como la estacionalidad, contenido de grasa, contenido de especias y condiciones heterogéneas de almacenamiento, dentro de las muestras seleccionadas; para las cuales se hace necesario realizar estudios más profundos que logren determinar como se afecta *B. cereus* por estas variables. El estudio de estas variables permitiría establecer el riesgo potencial que puedan conferir y haga posible tomar medidas adecuadas, como tratamientos más fuertes o condiciones de almacenamiento más estrictas, para prevenir eventuales cuadros clínicos debido a esta bacteria.

Con respecto al procedimiento de identificación utilizado se observó una caracterización satisfactoria para *Bacillus cereus* de acuerdo a las pruebas fenotípicas realizadas en 16 de los 21 aislamientos con morfología colonial similar a esta bacteria. En este procedimiento se tomó como criterio excluyente la no formación de esporas por parte de la bacteria, ya que esta especie es definida como un bacilo gram positivo formador de esporas (Gordon *et al.*, 1973; Granum, 2005), por lo tanto el aislamiento LD6, no esporulado, se descartó como *B. cereus* y no fue analizado con el sistema API CH50B. Este aislamiento, a su vez, fue el único en presentar la prueba de hidrólisis de gelatina negativa.

En los resultados del sistema de identificación API CH50B se observa que presenta la capacidad para diferenciar a *B. cereus* de otras especies del grupo como *B. mycoides* y de especies menos relacionadas como *B. coagulans* y *B. stearothermophilus*. También se observa que las cepas identificadas como *B. cereus* provienen de poblaciones heterogéneas,

ya que en muy pocos casos se encuentran los mismos porcentajes de similitud a *B. cereus*, lo que concuerda con su origen, ya que provienen de tipos de alimentos, industrias y lotes diferentes.

Las pruebas de catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa, indol y movilidad no brindaron gran información diferencial entre los bacilos aislados, ya que todos presentaron el mismo resultado. La prueba de reducción de nitratos a nitritos, esperada como positiva para *B. cereus* en un 95,5% de los casos (Gordon *et al.*, 1973), funcionó como criterio preeliminar de exclusión ya que 3 de los 4 aislamientos que la presentaron negativa fueron descartados definitivamente por el sistema de identificación API CH50B, encontrándose una positividad para la prueba del 93,8% entre las cepas confirmadas como *B. cereus*, muy similar a los descrito en la literatura. La hidrólisis de almidón presentó una alta variabilidad en los aislamientos sin mostrar una relación importante con las cepas identificadas como *B. cereus* o las pertenecientes a otras especies, por lo que no ofrece una gran confiabilidad como prueba identificadora del agente en estudio.

En estudios previos de *B. cereus* en lácteos no se ha descrito la presencia de *B. thuringiensis* ya que en la mayoría de ellos no se han hecho pruebas diferenciales entre las 2 bacterias, asumiendo que todos los aislamientos encontrados e identificados como *B. cereus* por pruebas fenotípicas, incluyendo sistemas de identificación API CH50B, en realidad pertenecen a esta especie, por lo que se desconoce con exactitud la prevalencia de *B. thuringiensis* en este tipo de productos. (Wong *et al.*, 1988; Becker *et al.*, 1994; Larsen y Jørgensen, 1997; Te Giffel *et al.*, 1997; Schlegelova *et al.*, 2003). Ya que es posible encontrar a *B. thuringiensis* compartiendo los mismos nichos que *B. cereus* (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008), es necesario realizar pruebas, como la observación de inclusiones parasporales cristalinas (Gordon *et al.*, 1973; Debro *et al.*, 1986), para lograr identificar a cepas de la primera dentro de los aislamientos encontrados. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio no fue posible identificar a ninguna cepa aislada como *B. thuringiensis*, existiendo, sin embargo, la posibilidad de que algunas de ellas pertenezcan en realidad a esta especie.

Conforme a los resultados anteriores se encontró que la combinación de pruebas de identificación fenotípicas más confiable para detectar a *Bacillus cereus* debe contener las pruebas de tinción de Gram, hidrólisis de gelatina, utilización de nitratos, observación de inclusiones parasporales cristalinas y el sistema de identificación API CH 50B. Sin embargo como ya se conoce, una identificación definitiva de *Bacillus cereus* es muy difícil de realizar con este tipo de pruebas debido al alto grado de similitud entre esta especie y otras estrechamente relacionadas, siendo los estudios genotípicos necesarios para un mayor grado de identificación (Rasko *et al.*, 2005; Tourasse *et al.*, 2006), presentando la desventaja de aumentar los costos al requerir equipo y personal especializado.

Al sumar a estos problemas de identificación definitiva la diferencia laxa entre las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Carlson *et al.*, 1994; Helgason *et al.*, 1998; Tourasse *et al.*, 2006; Zahner *et al.*, 2005) se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos de diferenciación que sean fáciles de implementar para los casos en que se quiera alcanzar un alto grado de identificación.

En cuanto a la prueba de susceptibilidad a antibióticos, la carencia de puntos de corte para *Bacillus cereus* al utilizar el método de difusión de disco hace necesario recurrir a los puntos de corte de *Staphylococcus aureus*, medida tomada en trabajos anteriores (Coker *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2002; Turnbull *et al.*, 2004), que si bien posee concentraciones mínimas inhibitorias similares para algunos antibióticos (CLSI, 2008), no está relacionada con el género *Bacillus*. Esto demuestra la necesidad de establecer estos puntos de corte y así determinar de manera más fácil la susceptibilidad a antibióticos de las especies de este género.

Dada la capacidad de *B. cereus* de producir  $\beta$ -lactamasas (Lim *et al.*, 1988; Carfi *et al.*, 1995; Kotiranta *et al.*, 2000) la resistencia a cefalosporinas y penicilinas, tal y como se observó en el estudio, era esperada. Esta resistencia es efectiva incluso contra cefalosporinas de tercera generación, como cefotaxime, y no se ve inhibida por el ácido clavulánico, inhibidor de  $\beta$ -lactamasas efectivo contra otros tipos (Weber *et al.*, 1988).

El hallazgo de que un aislamiento (QC3) resultó sensible a la penicilina y amoxicilina - ácido clavulánico, e intermedio para cefotaxime lleva a pensar que se pudo dar algún defecto en la expresión del gen de las  $\beta$ -lactamasas, como una inactivación por mutación (Klug y Cummings, 1999).

Estudios anteriores han descrito que aislamientos de *B. cereus* presentan sensibilidad a azitromicina, eritromicina, vancomicina, tetraciclina, gentamicina y ciprofloxacina (Weber *et al.*, 1988, Schlegelova *et al.*, 2003, Turnbull *et al.*, 2004), lo cual coincide con los hallazgos de la presente investigación, ya que se encontró que a excepción de 2 cepas intermedias para eritromicina y una intermedia para tetraciclina, todos los aislamientos resultaron sensibles los antimicrobianos anteriores. La importancia de la resistencia a antibióticos de esta bacteria recae en que al ser una bacteria de amplia distribución en el ambiente y alimentos puede funcionar como eventual reservorio de resistencia para los antibióticos que no presenta resistencia intrínseca (Palva *et al.*, 1990; Muhammad *et al.*, 1993; Licht *et al.*, 1999; ECDC, 2002).

En cuanto a el análisis toxigénico de las cepas de *B. cereus* aisladas de productos lácteos con especias y deshidratados, este indica que de los 16 aislamientos analizados todos poseen al menos uno de los genes en estudio, 13 contienen dos de los genes necesarios para codificar la toxina Nhe y, entre estos 13 aislamientos, 9 además contienen dos de los genes necesarios para producir la HBL.

Al ser la Nhe una toxina que requiere la expresión de todos sus genes para que se genere un producto con actividad biológica (Lindback *et al.*, 2004) es posible observar que en al menos 3 aislamientos (LD1, QC3 y QC9) probablemente no va a presentar una actividad importante ya que carece de uno de los genes ensayados. En los aislamientos que si se encontraron los genes *nheA* y *nheB*, la actividad biológica de la toxina queda sujeta a la presencia del tercer gen no ensayado (*nheC*).

En el caso de la HBL el producto de uno solo de los genes que la componen si tiene actividad biológica, sin embargo esta se ve aumentada al incrementarse el número de

componentes expresados (Beecher *et al.*, 1995), esto lleva a pensar que las 9 cepas que presentaron los dos genes de la HBL ensayados (*hblA* y *hblD*) probablemente presenten mayor actividad biológica que la que presentó solo uno de los genes o las que no presentaron ninguno y cuya actividad dependería de la presencia del tercer gen no ensayado (*hblC*). En este caso, la máxima expresión de la actividad biológica de la toxina estaría sujeta a la presencia del gen no evaluado en las cepas que contienen los genes *hblA* y *hblD*.

Esta variación en la toxigenicidad de las cepas de *B. cereus* explica que se logren encontrar cepas más patógenas que otras, que incluso se pueden asociar a brotes (Jackson *et al.*, 1995; Granum y Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Granum, 2005), aunque también debe considerarse la correcta expresión de estos genes ya que si la bacteria posee la información genética pero esta no se expresa de forma adecuada, no se va a desarrollar la actividad tóxica. A su vez, la variación en el contenido de los genes de virulencia concuerda con los diferentes orígenes de las cepas y la variación esperada de una característica evolutiva transmisible de forma horizontal (Cardazzo *et al.*, 2008).

Dado que los grupos de genes codificantes para las enterotoxinas HBL y Nhe se transcriben cada uno dentro de sus respectivos operón con asociaciones de presencia simultánea entre los genes del mismo (Ryan *et al.*, 1997; Granum *et al.*, 1999; Lindback *et al.*, 2004; Dietrich *et al.*, 2005) la posibilidad de que las cepas que presentan los 2 genes ensayados de cada toxina contengan además el tercer gen es alta, con lo se conseguiría alcanzar una capacidad toxigénica importante. En este estudio se da esta posibilidad en 9 aislamientos, ya que presentan los 4 genes evaluados.

Se ha descrito que existe una relación de presencia simultánea entre los operones codificantes para la HBL y la Nhe, estando asociada la presencia de uno con la presencia del otro (Hansen y Hendriksen, 2001). Es posible observar este evento en los resultados del presente estudio ya que en 9 de los 16 aislamientos cuando se da la presencia de los genes ensayados para la toxina HBL también se logran observar los genes ensayados para la Nhe.

La ausencia de detección de un gen toxigénico en algún aislamiento no puede considerarse de forma definitiva como la ausencia de dicho gen en esa cepa bacteriana ya que en algunas cepas de *Bacillus cereus* se ha encontrado polimorfismo en las secuencias de los genes toxigénicos (Mäntynen y Linström, 1998; Prüss *et al.*, 1999), lo cual hace que los primers utilizados sean incapaces de reconocer esas secuencias de nucleótidos codificantes para toxinas. Estos polimorfismos son posibles estudiarlos *in silico* mediante el uso de programas de computación que permitan el análisis de las secuencias genómicas de la bacteria para detectarlos, de esta forma en el futuro no será necesario realizar procedimientos experimentales complejos para conocer las características de las toxinas de esta bacteria.

El método utilizado en este estudio no es suficientemente concluyente sobre la toxigenicidad de las cepas de *B. cereus* analizadas debido a la ausencia de la detección del tercer gen para cada toxina, sin embargo, puede funcionar como método de tamizaje para hacer un estudio preliminar sobre la capacidad toxigénica de las cepas aisladas de diferentes alimentos, dando paso a un estudio toxigénico exhaustivo sobre las cepas que presenten todos los genes evaluados en el primer estudio. Gracias a este estudio tamiz es posible observar que en las cepas de *Bacillus cereus* encontradas en Costa Rica se da la presencia de genes toxigénicos, lo que deja el campo abierto a futuras investigaciones sobre la prevalencia y capacidad patógena de estas cepas.

## Conclusiones

- Entre los productos lácteos analizados es más frecuente el aislamiento de *Bacillus cereus* en quesos crema con especias y leches deshidratadas que en quesos con especias. Esto se puede ver influenciado por la cantidad de agua, grasa, la calidad de la materia prima con la que se elabore y la temperatura de almacenamiento del producto.
- Es posible que no se detecten cepas de *B. cereus* en los productos analizados debido a la presencia de formas viables no cultivables de la bacteria. Esta limitación se puede corregir en el futuro utilizando métodos moleculares.
- Los ensayos de tinción de Gram, hidrólisis de gelatina, utilización de nitratos, observación de inclusiones parasporales cristalinas y el sistema de identificación API CH50B son pruebas fenotípicas confiables para una buena identificación de *B. cereus*. A su vez las primeras pruebas mencionadas presentan una buena correlación con los resultados obtenidos con el API CH50B por lo que se recomienda su inclusión en esquemas de identificación para esta bacteria.
- La identificación definitiva de *B. cereus* requiere de pruebas genotípicas, presentando la desventaja de aumentar los costos al requerir equipo y personal especializado.
- La introducción de pruebas diferenciales para identificar a *Bacillus thuringiensis* en análisis de productos lácteos es necesaria para estudiar la frecuencia de esta bacteria en este tipo de alimentos.

- Las cepas de *Bacillus cereus* aisladas de productos lácteos no presentan resistencia a azitromicina, eritromicina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina y ciprofloxacina, por lo que no se evidencia que presenten un papel importante en la transmisión de resistencia a estos antibióticos.
- Es necesario establecer los puntos de corte de la técnica de difusión de disco para las especies del género *Bacillus* y así poder ensayar su sensibilidad a antibióticos de forma más práctica y exacta.
- La técnica de detección de los genes *nheA*, *nheB*, *hblA* y *hblD* puede funcionar como prueba tamiz para detectar cepas de *B. cereus* toxigénicas.
- Es posible encontrar en productos lácteos cepas de *Bacillus cereus* que contienen genes que codifican para enterotoxinas, siendo frecuente la asociación de genes.
- Es importante el manejo adecuado de lácteos con especias y deshidratados ya que pueden presentar cepas con potencial patógeno de *Bacillus cereus*, implicando un riesgo si se le brindan las condiciones apropiadas para que alcancen un número capaz de producir un cuadro clínico.

# Bibliografía

- Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y. y Mori, M. (1995) The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology* 141, 983-988.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M. and Isobe, M. (1995) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* 129, 17-20.
- Andersson, A., Granum, P.E. y Rönner, U. (1998). The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International Journal of Food Microbiology* 39 (1-2), 93-99.
- Andersson, A., Rönner, U. y Granum, P.E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* 28, 145-155.
- Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L.M. y Salkinoja-Salonen, M.S. (2004). Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *International Journal of Food Microbiology* 94, 175-183.
- Akiyama, N., Mitani, K., Tanaka, Y., Hanazono, Y., Motoi, N., Zarkovic, M., Tange, T., Iria, H. y Yazaki, Y. (1997). Fulminant Septicemic Syndrome of *Bacillus cereus* in a Leukemic Patient. *Internal Medicine* 36 (3), 221-226.
- Aronson, A.I., Beckman, W. y Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and Related Insect Pathogens. *Microbiological Reviews* 50 (1), 1-24.
- Asano, S.I., Nukumizu, Y., Bando, H., Izuka, T. y Yamamoto, T. (1997). Cloning of Novel Enterotoxin Genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied And Environmental Microbiology* 63 (3), 1054-1057.
- Ash, C. y Collins, M.D. (1992) Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiology Letters* 73 (1-2), 75-80.
- Banerjee, M y Sarkar, P.K. (2004). Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control* 15 (6), 491-496.
- Beattie, S.H. y Williams, A., G. (1999) Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and the other *Bacillus* spp. with a improve cytotoxicity assay. *Letters of Applied Microbiology* 28, 221-225.

- Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W. y Terplan, G. (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology* 23 (1), 1-15.
- Beecher, D.J. y Lee Wong, A.C. (1994). Identification and Analysis of the Antigens Detected by Two Commercial *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin Immunoassay Kits. *Applied And Environmental Microbiology* 60 (12), 4614-4616.
- Beecher, D.J. y Lee Wong, A.C. (1994). Identification of Hemolysin BL-Producing *Bacillus cereus* Isolates by a Discontinuous Hemolytic Pattern in Blood Agar. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (5), 1646-1651.
- Beecher, D.J. y Lee Wong, A.C. (1997). Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1), 233-239.
- Beecher, D.J., y Macmillan, J.D. (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* 59, 1778-1784.
- Beecher, D.J., Schoeni, J.L. y Wong, A.C. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* 63 (11), 4423-4428.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. y Burghagen, M.M. (2004). *Food Chemistry*. (Alemania, Birkhäuser).
- Beuchat, L.R., Clavero, M.R. y Jaquette, C.B. (1997). Effects of Nisin and Temperature on Survival, Growth, and Enterotoxin Production Characteristics of Psychrotrophic *Bacillus cereus* in Beef Gravy. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (5), 1953-1958.
- Blakey, L.J. y Priest, F. G. (1980). The Occurrence of *Bacillus cereus* in some Dried Foods Including Pulses and Cereals. *Journal of Applied Bacteriology* 48, 291-302.
- Cardazzo, B., Negrisolo, E., Carraro, L., Alberghini, L., Patarnello, T. y Giaccone, V. (2008). Multiple-Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in *Bacillus cereus* Food-Borne Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (3), 850-860.
- Carfi, A., Pares, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C., Frere, J.M. y Dideberg, O. (1995). The 3-D structure of a zinc metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *The EMBO Journal* 14 (20), 4914-4921.
- Carlson, C.R., Caugant, D.A. y Kolstø, A. (1994) Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6), 1719-1725.

- Christiansson, A., Naidu, A.S., Nilsson, I., Wadstrom, T. y Pettersson, H.E. (1989). Toxin Production by *Bacillus cereus* Dairy Isolates in Milk at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (10), 2595-2600.
- Choma, C. y Granum, P.E. (2002). The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiology Letters* 217 (1), 115-119.
- Clavel, T., Carlin, F., Dargaignaratz, C., Lairon, D., Nguyen-The, C. y Schmitt, P. (2007). Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1568-1575.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C. y Schmitt, P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97, 214-219.
- CLSI. (2008). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S18*, 28 (1).
- Coker, P.R., Smith, K.L. y Hugh-Jones, M.E. (2002). Antimicrobial Susceptibilities of Diverse *Bacillus anthracis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (12), 3843-3845.
- Crielly, E.M., Logan, N.A. y Anderton, A. (1994). Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of Applied Microbiology* 77 (3), 256-263.
- Damgaard, P.H. (1995). Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 12 (3-4), 245-249.
- Darbar, A., Harris, I. y Gosbell, I. (2005). Necrotizing Infection Due to *Bacillus cereus* Mimicking Gas Gangrene Following Penetrating Trauma. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 19(5), 353-355.
- David, D.B., Kirkby, G.R. y Noble, B.A. (1994). *Bacillus cereus* endophthalmitis. *British Journal of Ophthalmology* 78, 577-580.
- Debro, L., Fitz-James, F.C. y Aronson, A. (1986) Two Different Parasporal Inclusions are Produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*. *Journal of Bacteriology* 165 (1), 258-268.
- Del Vecchio, V.G., Connolly, J.P., Aefantis, T.G., Walz, A., Quan, M.A., Patra, G., Ashton, J.M., Whittington, J.T., Chafin, R.D., Liang, X, Grewal, P., Khan, A.S. y Mujer, C.V. (2006). Proteomic Profiling and Identification of Immunodominant Spore Antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), 6355-6363.

- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M. y Mahillon, J. (2005). Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus* associated Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8), 4277-4279.
- Dietrich, R., Moravek, M., Bürk, C., Granum, P.E. y Märklbauer, E. (2005). Production and Characterization of Antibodies against Each of the Three Subunits of the *Bacillus cereus* Nonhemolytic Enterotoxin Complex. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12), 8214-8220.
- Downes, F. P. y Ito, K. (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4 ed. (Washington DC, Estados Unidos, American Public Health Association).
- Dufrenne, J., Bijwaard, M., Giffel, M., Beumer, R. y Notermans, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 27 (2-3), 175-183.
- Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day T. y Notermans, S. (1994) Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 23 (1), 99-109.
- Duport, C., Zigha, A., Rosenfeld, E. y Schmitt, P. (2006) Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430/73 Involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System. *Journal Of Bacteriology* 188 (18), 6640-6651.
- ECDC (2002). Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission Directorate C – Scientific Opinions.
- Fagerlund, A., Lindbäck, T., Storset, A.K., Granum, P.E. y Hardy, S.P. (2008). *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* 154, 693-704.
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P. y Granum, P.E. (2004). Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150, 2689-2697.
- Fletcher, P. y Logan. N.A. (1999). Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Letters of Applied Microbiology* 28, 394-400.
- Fricker, M., Messelhaüßer, U., Busch, U., Scherer, S. y Ehling-Schulz, M. (2007) Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (6), 1892-1898.

- Gaur, A.H., Patrick, C.C., McCullers, J.A., Flynn, P.M., Pearson, T.A., Razzouk, B.I., Thompson, S.J. y Shenep, J.L. (2001). *Bacillus cereus* Bacteremia and Meningitis in Immunocompromised Children. *Clinical Infectious Diseases* 32, 1456-1462.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A. y Senesi, S. (2002). Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters* 208 (1), 129-134.
- Ghosh, A.C. (1978). Prevalence of *Bacillus cereus* in the Faeces of Healthy Adults. *The Journal of Hygiene* 80 (2), 233-236.
- Gilbert, R.J. y Kramer, J.M. (1986). *Bacillus cereus* food poisoning. *Progress in Food Safety (Proceedings of Symposium)*. (Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison. Estados Unidos. Cliver DC & Cochrane BA), 85-93.
- Glatz, B.A., Spira, W.M. y Goepfert, J. M. (1974). Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species. *Infection and Immunity* 10, 299-303.
- Gordon, R.E., Haynes W. y Hor-Nay, P. (1973). *The Genus Bacillus*. *Agriculture Handbook No. 427*. (Washington D. C, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture).
- Gordon, R.E. y Smith, N.R. (1949). Aerobic Sporeforming Bacteria Capable Of High Temperatures. *Journal of Bacteriology* 58 (3), 327-341.
- Granum, P.E. (2005). *Bacillus cereus*. En: *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology* (Fratamico, P. M., Bhunia, A. K. y Smith, J.L.) (Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic Press).
- Granum, P.E. y Lund, T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters* 157, 223-228.
- Granum, P.E., O'Sullivan, K. y Lund, T. (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* 177 (2), 225-229.
- Gray, J., George, R.H., Durbin, G.M., Ewer, A.K., Hocking, M.D. y Morgan, M.E. (1999). An outbreak of *Bacillus cereus* respiratory tract infections on a neonatal unit due to contaminated ventilator circuits. *Journal of Hospital Infection* 41 (1), 19-22.
- Hägglom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M.A. y Salkinoja-Salonen, M.S. (2002). Quantitative Analysis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, Produced under Various Condition. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5), 2479-2483.

- Hansen, B.M. y Hendriksen, N.B. (2001). Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1), 185-189.
- Hardy, S.P., Lund, T. y Granum, P.E. (2001). CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiology Letters* 197 (1), 47-51.
- Hauge, S. (1955). Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 18 (3), 591-595.
- Heinrichs, J.H., Beecher, D.J., Macmillan, J.D. y Zilinskas, B.A. (1993). Molecular Cloning and Characterization of the hblA Gene Encoding the B Component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 175 (21), 6760-6766.
- Helgason, E., Caugant, D.A., Lecadet, M.M., Chen, Y.H., Mahillon, J., Lovgren, A., Hegna, I., Kvaloy, K. and Kolstø, A.B. (1998). Genetic diversity of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Current Microbiology* 37, 80-87.
- Henderson, I., Duggleby, C.J. y Turnbull, P.C. (1994). Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 99-105.
- Hilliard, N.J., Schelonka, R.L. y Waites, K.B. (2003). *Bacillus cereus* Bacteremia in a Preterm Neonato. *Journal Of Clinical Microbiology* 41 (7), 3441-3444.
- Hoffmaster, A.R., Hill, K.K., Gee, G.E., Marston, C.K., De, B.K., Popovic, T., Sue, D., Wilkins, P.P., Avashia, S.B., Drumgoole, R., Helma, C.H., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T. y Jackson, P.G. (2006). Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains Are Closely Related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* Virulence Genes. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (9), 3352-3360.
- Höfte, H. y Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53 (2), 242-255.
- Hoton, F.M., Andrup, L., Swiecicka, I. y Mahillon, J. (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology* 151, 2121-2124.
- Hsieh, Y.M., Sheu, S.J., Chen, Y.L. y Tsen, H.Y. (1999). Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *Journal of Applied Microbiology* 87, 481-490.
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Ahmed, R. y Kasatiya, S. (1995). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology* 21 (2), 103-105.

- Jaquette C.B. y Beuchat L.R. (2006). Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *Journal of food protection* 69 (11), 2587-2594.
- Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J. y Mahillon, J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5 (8), 631-640.
- Johnson, K.M. (1984). *Bacillus cereus* food-borne illness. An update. *Journal of Food Protection* 47, 145-153.
- Kamat, A.S., Nerkar, D.P. y Nair, P.M. (1989). *Bacillus cereus* in Some Indian Foods, Incidence and Antibiotic, Heat and Radiation Resistance. *Journal of Food Safety* 10 (1), 31-41.
- Klug, W.S. y Cummings M. R. (1999). *Conceptos de Genética*. 5° Edición. (Madrid, Prentice Hall).
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K. y Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* 2 (2), 189-198.
- Kramer, J.M. y Gilbert, R.J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne Bacterial Pathogens*. (New York, Estados Unidos, Doyle MP). 21-70.
- Larsen, H. D. y Jørgensen, K. (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 34 (2), 179-186.
- Licht, T.R., Christensen, B.B., Krogfelt, K.A. y Molin, S. (1999). Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role community structure and environment. *Microbiology* 145, 2615-2622.
- Lim, H.M., Pene, J.J. y Shaw, R.W. (1988). Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -Lactamase II Structural Gene. *Journal of Bacteriology* 170 (6), 2873-2878.
- Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J.A. y Griffiths, M.W. (1998). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 43 (3), 159-171.
- Lindback, T., Fagerlund, A., Rodland, M.S. y Granum, P.E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150, 3959-3967.
- Little, C., Omotoye, R. y Mitchell, R. (2003). The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices. *International Journal of Environmental Health Research* 13 (1), 31-42.

- Lund, T.; De Buyser, M.L. y Granum, P.E. (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* 38(2), 254-261.
- Lund, T. y Granum, P.E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters* 141 (2-3), 151-156.
- Magnusson, M., Christiansson, A. y Svensson, B. (2007). *Bacillus cereus* Spores During Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk. *Journal of Dairy Science* 90, 2745-2754.
- Mahon, C y Manuselis, G. (2000). *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2 ed. (Estados Unidos, Saunders).
- Michelet, N.; Granum, P.E. y Mahillon, J. (2006). *Bacillus cereus* enterotoxins, bi- and tricomponent cytotoxins, and other hemolysins. En: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3 ed. (Alouf, J.E. y Popoff, M.R.) (Boston, Estados Unidos, Academic Press).
- Midura, T., Gerber, I., Wood, R. y Leonard, A., (1970). Outbreak of Food Poisoning Caused by *Bacillus cereus*. *Public Health Reports* 85 (1), 45-48.
- Mohammed, J.M, Marston, C.K., Popovic, T, Weyant, R.S. y Tenover, F.C. (2002). Antimicrobial Susceptibility Testing of *Bacillus anthracis*: Comparison of Results Obtained by Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Microdilution Reference and Etest Agar Gradient Diffusion Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (6), 1902-1907.
- Mori, T., Tokuhira, M., Takae, Y., Mori, S., Suzuki, H., Abe, T. y Takeuchi, T. (2002). Successful Non-Surgical Treatment of Brain Abscess and Necrotizing Fasciitis Caused by *Bacillus cereus*. *Internal Medicine* 41 (8), 671-673.
- Morita, R.Y. (1985). Starvation and miniaturization of heterotrophs with special emphasis on the maintenance of the starved viable state, paginas 111-130. En Fletcher, M. y Floodgate, G. *Bacteria in the natural environments: the effect of nutrient conditions*. (New York, Academic Press).
- Muhammad, G., Hoblet, K.H., Jackwood, D.J., Bech-Nielsen, S. y Smith K.L. (1993). Interspecific conjugal transfer of antibiotic resistance among *Staphylococci* isolated from the bovine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research* 54, 1432-1440.
- Notermans, S. y Batt, C.A. (1998). A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 84, 51-61.

- Palva, A., Vigren, G., Simonen, M., Rintala, H. y Laamanen P. (1990). Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pBC16 from *Bacillus cereus*. *Nucleic Acids Research* 18, 1635.
- Prüss, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Märtilbauer, E. y Scherer, S. (1999). The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. *Applied And Environmental Microbiology* 65 (12), 5436-5442.
- RAE (2001). Diccionario de la Lengua Española. 22º edición. (España, Real Academia Española).
- Raevuori, M., Kiutamo, T., Niskanen, A. y Salminen K. (1976). An Outbreak of *Bacillus cereus* Food-Poisoning in Finland Associated with Boiled Rice. *The Journal of Hygiene* 76 (3), 319-327.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., in 't Veld, P., Denon, Q., Verhe, R. y Debevere, J. (2008). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology* 46, 536-541.
- Rasko, D. A., Altherr, M.R., Han, C.S. y Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 303-329.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Økstad, O.A., Fouts, D.E., Jiang, L., Cer, R.Z., Kolstø, A.B., Gill, S.R. y Ravel, J. (2007). Complete Sequence Analysis of Novel Plasmids from Emetic and Periodontal *Bacillus cereus* Isolates Reveals a Common Evolutionary History among the *B. cereus*-Group Plasmids, Including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of Bacteriology* 189 (1), 52-64.
- Ryan, P. A., Macmillan, J.D. y Zilinskas, B.A. (1997). Molecular Cloning and Characterization of the Genes Encoding the L1 and L2 Components of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal Of Bacteriology* 179 (8), 2551-2556.
- Schlegelova, J., Brychta, J, Klimova, E., Napravnikova, E. y Babak, V. (2003). The prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from foodstuffs. *Veterinary and Medicine* 48 (11), 331-338.
- Seenappa, M. y Kempton A.G. (1981). A Note on the Occurrence of *Bacillus cereus* and Other Species of *Bacillus* in Indian Spices of Export Quality. *Journal of Applied Microbiology* 50 (2) , 225-228.
- Shelef, L.A. (1984). Antimicrobial Effects of Spices. *Journal of Food Safety* 6 (1), 29-44.
- Shinagawa, K. (1990). Analytical methods of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology* 10, 125-141.

- Shinagawa, K., Konuma, H.; Sekita, H. y Sugii, S. (1995) Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiology Letters 130 (1) , 87-90.
- Siegel, J.P. (2001). The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides. Journal of Invertebrate Pathology 77(1), 13-21.
- Slaten, D.D., Oropeza, R. y Werner, S.B. (1992). An Outbreak of *Bacillus cereus* Food Poisoning - Are Caterers Supervised Sufficiently?. Public Health Reports 107 (4), 477-480.
- Spira, W.M. Y Goepfert, J.M. (1972). *Bacillus cereus* induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. Applied Microbiology 24, 341-348.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A. y Granum, P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology Reviews, 1-28.
- Strauss, R., Mueller, A., Wehler, M., Neureiter, D., Fischer, E., Gramatzki, M. y Hahn, E.G. (2001). Pseudomembranous Tracheobronchitis Due to *Bacillus cereus*. Clinical Infectious Diseases 33, 39-41.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Granum, P.E. y Rombouts, F.M. (1997). Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. International Journal of Food Microbiology 34 (3), 307-318.
- Tomiyaama, T., Hasegawa, Y., Nagasawa, T., Abe, T., Horiguchi, H. y Ogata, T. (1994). *Bacillus cereus* Septicemia Associated with Rhabdomyolysis and Myoglobinuric Renal Failure. Japanese Journal of Medicina 28 (2), 247-250.
- Tourasse, N.J., Helgason, E., Økstad, O.A., Hegna I.K. y Kolstø, A.B. (2006). The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population - structure and genome dynamics. Journal of Applied Microbiology 101, 579-593.
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M., Jørgensen, K., Gilbert, R.J. y Melling, J. (1983). Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. The American Journal of Clinical Nutrition 32 (1), 219-228.
- Turnbull, P.C., Sirianni, N.M., LeBron, C.I., Samaan, M.N., Sutton, F.N., Reyes, A.E. y Peruski, L.F. (2004). MICs of Selected Antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a Range of Clinical and Environmental Sources as Determined by the Etest. Journal Of Clinical Microbiology 42 (8), 3626-3634.
- Van Der Zwet, W.C., Parlevliet, G.A., Savelkoul, P.H., Stoof, J., Kaiser, A.M., Van Furth, A.M. y Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2000). Outbreak of *Bacillus cereus* Infections in a Neonatal Intensive Care Unit Traced to Balloons Used in Manual Ventilation. Journal of Clinical Microbiology 38 (11), 4131-4136.

- Van Netten, P.A., Van de Moosdijk, A., Van Hoensel, P., Mossel, D. A. A. y Perales, I. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxina. *Journal of Applied Microbiology* 69 (1), 73–79.
- Vanderzant, C. y Splittstoesser, F. (1992) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3 ed. (Estados Unidos, American Public Health Association).
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M.B. y Brözel, V.S. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied And Environmental Microbiology* 72 (7), 4970-4977.
- Weber, D.J., Saviteer, S.M., Rutala, W.A. y Thomann, C. A. (1988). In Vitro Susceptibility of *Bacillus* spp. to Selected Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32 (5), 642-645.
- Wijnands, L.M., Dufrenne, J.B., Rombouts, F.M., In 't Veld, P.H. y Van Leusden, F.M. (2006). Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *Journal of Food Protection* 69 (11), 2587-2594.
- Wong, H-C., Chang, M-H. y Fan, J.Y. (1988). Incidence and Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Contaminating Dairy Products. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (3), 699-702.
- Zahner, V., Cabral, D.A., Régua-Mangia, A.H., Rabinovitch, L., Moreau, G. y McIntosh, D. (2005). Distribution of Genes Encoding Putative Virulence Factors and Fragment Length. Polymorphisms in the *vrrA* Gene among Brazilian Isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12), 8107-8114.