

Detección directa de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en fécula de maíz y harina de trigo mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (mPCR)

Direct detection of toxigenic genes of *Bacillus cereus* in corn starch and wheat flour using multiplex polymerase chain reaction (mPCR)

Jennifer A. Sánchez-Chica MIA¹, Margarita M. Correa-Ochoa PhD²,
Ángel E. Aceves-Díez PhD³, Laura M. Castañeda-Sandoval PhD⁴

Introducción: *Bacillus cereus* es una bacteria contaminante de alimentos y patógena en humanos, cuya toxina emética o cereúlica (Ces) causa el síndrome emético y las enterotoxinas hemolítica o hemolisina BL (Hbl), no hemolítica (Nhe) y citotoxina K (CytK), el síndrome diarreico. **Objetivo:** Determinar la presencia de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en muestras de ADN obtenido directamente de fécula de maíz y de harina de trigo, mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple. **Materiales y métodos:** Se determinaron los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en muestras de ADN extraído directamente de fécula de maíz y harina de trigo, utilizando una reacción en cadena de la polimerasa múltiple específica para los genes *cesB*, *hblC*, *nheA* y *cytK*. **Resultados:** De 76 muestras de fécula de maíz, el 60,5% presentó los genes toxigénicos de *Bacillus cereus*, que fueron agrupados en seis consorcios: I: *hblC*, *cytK* (30,4%), II: *nheA*, *hblC*, *cytK* (21,7%), III: *hblC* (19,6%), IV: *nheA* (15,2%), V: *nheA*, *hblC* (10,9%), VI: *nheA*, *hblC*, *cytK*, *cesB* (2,2%). De 79 muestras de harina de trigo, el 65,8% presentó los genes toxigénicos de *Bacillus cereus*, que se agruparon en cuatro consorcios: I: *nheA*, *hblC*, *cytK* (80,8%), II: *hblC*, *cytK* (11,5%), III: *hblC* (5,8%), IV: *nheA*, *hblC* (1,9%). **Conclusiones:** En la fécula de maíz los consorcios enterotoxigénicos predominaron sobre el emético y en la harina de trigo únicamente se detectaron los enterotoxigénicos. La reacción en cadena de la polimerasa múltiple permitió detectar directa, rápida y simultáneamente los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en los alimentos.

Palabras clave: *Bacillus cereus*, enterotoxinas, toxina emética, inspección de alimentos, reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

Introduction: *Bacillus cereus* is a human pathogen that causes two kinds of foodborne diseases, the emetic syndrome caused by emetic toxin or cereulide (Ces), and the diarrheal syndrome caused by three different enterotoxins, the hemolytic enterotoxin or hemolysin BL (Hbl), the nonhemolytic enterotoxin (Nhe) and the cytotoxin K (CytK). **Objective:** To determine the presence of toxigenic genes of *Bacillus cereus* in DNA samples directly obtained from corn starch and wheat flour using multiplex polymerase chain reaction. **Material and methods:** The presence of toxigenic genes of *Bacillus cereus* were determined in DNA samples directly extracted from corn starch and wheat flour, using a multiplex polymerase chain reaction technique specific for *cesB*, *hblC*, *nheA* and *cytK* genes. **Results:** From a total of 76 corn starch samples, 60.5% had toxigenic genes of *Bacillus cereus* and were grouped in six consortia: I: *hblC*, *cytK* (30.4%), II: *nheA*, *hblC*, *cytK* (21.7%), III: *hblC* (19.6%), IV: *nheA* (15.2%), V: *nheA*,

¹ Microbióloga Industrial y Ambiental. Investigadora Grupo Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Bacterióloga, MSc en Microbiología, PhD en Microbiología. Docente, coordinadora Grupo Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Químico Biólogo, MSc en Ciencias, PhD en Ciencias – Biotecnología. Gerente de Investigación y Desarrollo, Laboratorios Minkab S.A. de C.V. Guadalajara, México.

⁴ Bacterióloga, MSc en Biotecnología, PhD en Ciencias – Biología Molecular. Docente Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. e-mail: laura.castaneda@udea.edu.co

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tienen conflicto de intereses
Medicina & Laboratorio 2014; 20: 441-452

Módulo 19 (Investigación), número 26. Editora Médica Colombiana S.A. 2014^o

Recibido el 21 de septiembre de 2014; aceptado el 23 de octubre de 2014

hblC (10.9%) and VI: *nheA*, *hblC*, *cytK*, *cesB* (2.2%). From 79 wheat flour samples tested, 65.8% had toxigenic genes of *Bacillus cereus* and were grouped into four consortia: I: *nheA*, *hblC*, *cytK* (80.8%), II: *hblC*, *cytK* (11.5%), III: *hblC* (5.8%) and IV: *nheA*, *hblC* (1.9%). **Conclusions:** It was found that in corn starch the enterotoxigenic consortia predominated over the emetic while in wheat flour only enterotoxigenic consortia were detected. The study describes a multiplex polymerase chain reaction that allowed direct, rapid, and simultaneous detection of toxigenic genes of *Bacillus cereus* in foods.

Key words: *Bacillus cereus*, enterotoxins, emetic toxin, food inspection, multiplex polymerase chain reaction.

Sánchez-Chica JA, Correa-Ochoa MM, Aceves-Díez AE, Castañeda-Sandoval LM. Detección directa de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en fécula de maíz y harina de trigo mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (mPCR). *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 441-452.

B*acillus cereus* es un bacilo Gram positivo esporulado, móvil y aerobio facultativo, que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, principalmente en suelos y vegetación, de donde puede contaminar diferentes alimentos y que al ser ingerido por el humano causa los síndromes emético, diarreico o ambos [1]. El síndrome emético es producido por la ingestión de la toxina cereúlica o emética, sintetizada por la bacteria directamente en el alimento durante la fase estacionaria de su crecimiento. Una vez la toxina se encuentra en el estómago del humano es liberada al duodeno donde interactúa con los receptores de la 5-hidroxitriptamina (5-HT₃) del nervio vago, induciendo vómito generalmente de una a seis horas después de la ingestión. Además, esta toxina puede actuar como un ionóforo de cationes que inhibe la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias de los hepatocitos, que resulta en la degeneración masiva de éstos, y finalmente, en una insuficiencia hepática [1, 2]. La toxina emética es un péptido pequeño, cíclico, termoestable y resistente a la acidez y a las proteasas, codificado por el operón *ces*, que está compuesto por siete genes, *cesH*, *cesP*, *cesT*, *cesA*, *cesB*, *cesC* y *cesD*, y se encuentra localizado en un plásmido de 208 Kb [3].

Por su parte, el síndrome diarreico es generado por tres diferentes enterotoxinas, la hemolítica o hemolisina BL (Hbl), la no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K (CytK). Luego de ingerir los alimentos contaminados, las células vegetativas o las esporas de *Bacillus cereus* colonizan las células epiteliales del intestino delgado humano, donde durante la fase exponencial de su crecimiento producen las enterotoxinas [2, 4]. La diarrea se produce ocho a 16 horas después del consumo del alimento contaminado, producto de la estimulación del sistema del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y de la formación de poros en la membrana de las células epiteliales intestinales, que generan la pérdida de sodio, cloro y agua, y que desencadena en el desequilibrio electrolítico [2]. La hemolisina BL es codificada por el operón *hbl*, constituido por los genes *hblC*, *hblD* y *hblA*; la enterotoxina no hemolítica por el operón *nhe*, compuesto de los genes *nheA*, *nheB* y *nheC*; y la citotoxina K por el gen *cytK*; todos ellos localizados en el cromosoma bacteriano [5].

Las células vegetativas y las esporas de *Bacillus cereus* pueden encontrarse en diversos alimentos como el arroz, la carne de res y de pollo, la pasta, las frutas, los granos, las especias, las verduras y la leche y sus derivados [2, 6]. Los alimentos en polvo como la fécula de maíz y la harina de trigo son frecuentemente contaminados por *Bacillus cereus*, debido a que estas bacterias son productoras de amilasas que degradan el almidón y sus esporas son resistentes a la pasteurización y a los tratamientos térmicos como el secado, los cuales eliminan otros microorganismos competidores presentes en los alimentos. Durante la preparación de los alimentos, al entrar en contacto con el agua, las esporas de *Bacillus cereus* germinan, lo que contribuye a su deterioro y a la producción de la intoxicación alimentaria del consumidor final [7].

En Colombia la detección de *Bacillus cereus* se basa en la Norma Técnica Colombiana NTC 4679, en la cual se estipula la siembra de la muestra en el medio de cultivo selectivo MYP (manitol, yema de huevo y polimixina), para realizar el recuento de las colonias presuntivas de *Bacillus cereus*, las cuales deben ser sometidas posteriormente a diversos cultivos y ensayos bioquímicos para su confirmación [8]. No obstante, esta metodología presenta ciertas desventajas como la gran inversión de tiempo y recursos para su realización, además que no permite identificar el potencial toxigénico de los aislamientos obtenidos [2].

Con los adelantos alcanzados en el campo de la biología molecular se han desarrollado técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), la cual es económica y fácil de realizar, para la detección rápida de genes toxigénicos de *Bacillus cereus*, sin necesidad de aislar e identificar previamente los aislamientos [9]. Específicamente, la variante múltiple de la reacción en cadena de la polimerasa se considera una prueba más rápida, sensible y específica que el cultivo; además, permite evaluar de forma simultánea el conjunto de genes toxigénicos de los aislamientos de *Bacillus cereus* obtenidos de los alimentos o del ADN extraído directamente de los alimentos que han estado en contacto con la bacteria, viable o no viable, sin realizar su aislamiento [10].

A partir de los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* detectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa múltiple a partir del ADN extraído directamente de los alimentos, se pueden establecer diferentes grupos o consorcios [11], entendidos como las agrupaciones de genes toxigénicos que se pueden encontrar en una muestra de alimento que ha estado o está en contacto con una o varias cepas de *Bacillus cereus*. De esta manera, los consorcios se pueden considerar como un reflejo de la diversidad de cepas de *Bacillus cereus* con potencial toxigénico que se encuentran o encontraban en el alimento, independientemente de su viabilidad.

Los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* presentes en los alimentos de consumo en Colombia es desconocido y, hasta nuestro conocimiento, no se han utilizado pruebas moleculares que permitan su rápida detección, y de esta manera, contribuir a minimizar el riesgo de intoxicaciones alimentarias por *Bacillus cereus*. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple, utilizando ADN extraído directamente de muestras de fécula de maíz y de harina de trigo recolectadas en Medellín, Colombia.

Materiales y métodos

Alimentos pulverizados

Debido a la ausencia de estudios previos y similares en Colombia, para la estimación del tamaño muestral se estableció una prevalencia esperada del 50%, para un intervalo de confianza del 95% y un error estimado del 5% en la población del Valle de Aburrá, Antioquia, Colombia. Con base en estos parámetros, se estableció un tamaño de 385 muestras de alimentos pulverizados, distribuidas homogéneamente en cinco diferentes matrices alimenticias pulverizadas (leche en polvo, almidón de yuca, complemento dietario para niños, fécula de maíz y harina de trigo). Específicamente, de la fécula de maíz se tomaron 76 muestras y de la harina de trigo 79, las cuales fueron analizadas en este estudio. Los alimentos se recolectaron semanalmente de forma aleatoria en jardines infantiles, guarderías e instituciones de educa-

ción primaria pública y privada, panaderías y establecimientos dedicados a su producción o comercialización en la ciudad de Medellín, Colombia, durante abril de 2013 y junio de 2014.

Extracción de las esporas y células vegetativas de *Bacillus cereus* en los alimentos pulverizados

De cada alimento pulverizado se disolvieron 25 g en 225 mL de agua destilada estéril y la solución resultante fue tamizada utilizando papel de filtro Whatman® N.º 1 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). La fase acuosa, que contiene las esporas y células vegetativas de *Bacillus cereus*, fue centrifugada a 6.000 g durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se utilizó para la extracción del ADN.

Extracción del ADN de *Bacillus cereus*

El ADN total de las esporas y células vegetativas de *Bacillus cereus* se extrajo de acuerdo a lo descrito previamente por D'Alessandro y colaboradores [12], con algunas modificaciones. Para la lisis de las esporas y las células vegetativas, los precipitados se incubaron durante 90 minutos a 80 °C en una solución tampón (NaOH 0,1 M; NaCl 0,1 M pH 10,8; SDS 1%) que contenía 0,1 M de ditioneitol (DTT) y se sometieron a ruptura mecánica con perlas de vidrio. Posteriormente, los componentes celulares se digirieron utilizando las enzimas lisozima y proteinasa K durante 60 minutos a 37 °C y 56 °C, respectivamente, se adicionó 30 µL de acetato de amonio 8 M y se realizó separación por centrifugación a 13.201 g durante 30 minutos. Finalmente, el ADN en el sobrenadante fue purificado y concentrado utilizando isopropanol y etanol al 70%, respectivamente, y resuspendido en tampón TE.

Reacción en cadena de la polimerasa múltiple para los genes toxigénicos de *Bacillus cereus*

La reacción en cadena de la polimerasa múltiple para detectar los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* a partir de ADN extraído directamente de los alimentos, se realizó utilizando cebadores específicos de fracciones de los genes *hblC*, *nheA*, *cesB* y *cytK*. La región del espaciador intergénico (ITS, del inglés *internal transcribed spacer*) se utilizó como control interno de la amplificación en cada ensayo (ver [tabla 1](#)).

Tabla 1. Características de los cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa múltiple

Gen	Cebador	Secuencia del cebador (5'→ 3')	Tamaño del producto (pb)	Posición del cebador	Nº acceso GenBank	Bibliografía
<i>hblC</i>	hblC F 1318	CGAAAATTAGGTGCGCAATC	411	1.318 - 1.337	U63928	[12]
	hblC R 1728	TAATATGCCTTGCGCAGTTG		1.709 - 1.728		
<i>nheA</i>	nheA F 430	ACGAATGTAATTTGAGTCGC	755	430 - 449	Y19005	[13]
	nheA R 1185	TACGCTAAGGAGGGGCA		1.166 - 1.185		
<i>cesB</i>	ces F 21816	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	1.271	21.816 - 21.839	DQ360825	[14]
	ces R 23087	GTAAGCGAACCTGICTGTAACAACA		23.063 - 23.087		
<i>cytK</i>	cytK F 2	CGACGTCACAAGTTGTAACA	565	286 - 305	AJ318876.2	[15]
	cytK R 2	CGTGTGTAAATACCCAGTT		850 - 831		
ARNr	ITS F 8	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	1.514	9.200 - 9.218	CP001407.1	[16]
16S	ITS R 1511	CGGCTACCTTGTACGAC		10.713 - 10.696		

La mezcla final de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple se llevó a un volumen final de 16 μL , compuesto por 0,6 mM de los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), 4 mM de MgCl_2 , 0,2 μM de los cebadores directo (del inglés *forward primer*) y reverso (del inglés *reverse primer*) para los genes toxigénicos *hblC*, *nheA*, *cesB* y *cytK*, y 0,1 μM para la región ITS1, utilizada como control interno de amplificación, 1,3 U de la Taq ADN polimerasa Platinum® (Invitrogen, California, Estados Unidos), 100 ng de ADN extraído de cada uno de los alimentos y 1,6 μL de la solución tampón de reacción 10X.

La amplificación se realizó en un termociclador G-Storm GS482 (G-Storm Ltda., Somerset, Inglaterra), utilizando el programa: desnaturalización inicial a 94 °C por cinco minutos; 35 ciclos constituidos por un minuto de desnaturalización a 94 °C, 40 segundos de alineamiento a 49 °C y dos minutos de elongación a 72 °C; y una elongación final de 10 minutos a 72 °C. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP Gel Doc (UVP, California, Estados Unidos).

Determinación de la especificidad y sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple

La especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple estandarizada se evaluó incluyendo en la prueba un conjunto de cepas de referencia de *Bacillus cereus* toxigénicos: *B. cereus* F4810/72 (*ces*, *nhe*), *B. cereus* 1257 (*ces*, *nhe*), *B. cereus* ATCC 10987 (*hbl*, *nhe*, *cytK*) y *B. cereus* ATCC 14579 (*hbl*, *nhe*, *cytK*). Así mismo, se incluyeron otras cepas bacterianas de importancia en el control microbiológico de alimentos, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

La cantidad mínima de ADN de *Bacillus cereus* detectable por medio de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple se estableció adicionando por separado 0,1 ng, 0,5 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng y 500 ng del ADN extraído a los tubos que contenían la mezcla final de la reacción.

Clonación y secuenciación de los productos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa

Los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa fueron ligados al vector de clonación pCR™ 2,1, usando como templado el ADN de cada una de las cepas de referencia de *Bacillus cereus*, empleando el estuche comercial TA Cloning® (Invitrogen, California, Estados Unidos), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El vector ligado al producto amplificado se utilizó para transformar las células de *Escherichia coli* One Shot® TOP10 químicamente competentes (Invitrogen, California, Estados Unidos), por medio de choque térmico, siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del cultivo de las bacterias transformadas en placas de agar Luria Bertania suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y X-gal (20 mg/mL) se seleccionaron las colonias recombinantes, las cuales se inocularon en 5 mL de caldo Luria Bertania suplementado con ampicilina. Posteriormente, se realizó la extracción del ADN plasmídico por medio de lisis alcalina y se corroboró la inserción de los productos amplificados al vector mediante la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (Fermentans, Life Technologies, California, Estados Unidos).

La secuenciación de cada uno de los productos amplificados fue realizada por MacroGen Inc. (Maryland, Estados Unidos) utilizando los cebadores del vector de clonación M13. Las secuen-

cias obtenidas fueron analizadas y comparadas con las disponibles en la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, del inglés *National Center for Biotechnology Information*) de los Estados Unidos.

Análisis estadístico

Para establecer la asociación entre el tipo de muestra y la presencia de los genes toxigénicos de *Bacillus cereus*, y comparar las frecuencias obtenidas, se realizó la prueba chi-cuadrado, utilizando los paquetes estadísticos Epidat (Dirección General de Innovación y Gestión de la Salud Pública-Junta de Galicia, Galicia, España) y SPSS Statistics (IBM, Illinois, Estados Unidos).

Resultados

Especificidad y sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple

Las secuencias obtenidas para los genes *hblC*, *nheA*, *cesB* y *cytK*, y el ITS1 de las cepas de referencia de *Bacillus cereus* presentaron valores de identidad entre 95% y 100% respecto a las secuencias registradas en la base de datos de nucleótidos del NCBI, lo que indica que los productos amplificados fueron los esperados. Por su parte, no se obtuvieron productos de amplificación con el ADN de las cepas de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, lo que sugiere que la reacción en cadena de la polimerasa múltiple realizada presentó una alta especificidad. El límite de detección del ADN fue 100 ng, correspondiente a la mínima concentración a la que fue posible visualizar claramente todas las bandas en el gel de electroforesis (ver figura 1).

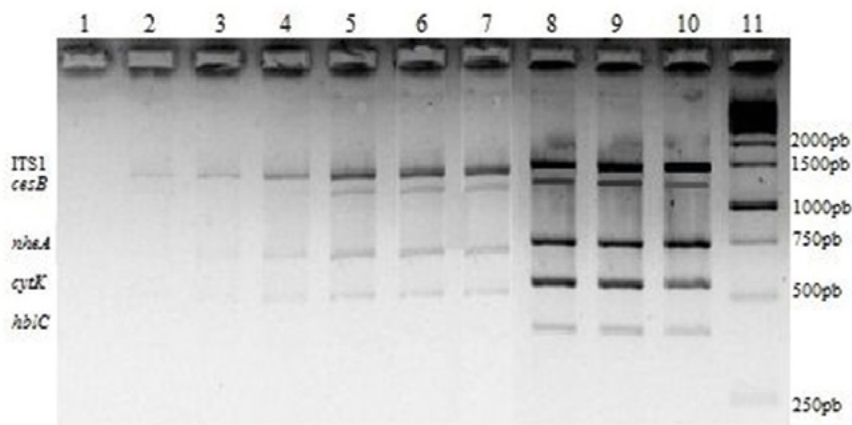


Figura 1. Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple de los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en muestras de ADN de cepas de referencia de *Bacillus cereus* ATCC 14579 y 1257. Carril 1: 0,1 ng. Carril 2: 0,5 ng. Carril 3: 1 ng. Carril 4: 5 ng. Carril 5: 10 ng. Carril 6: 20 ng. Carril 7: 50 ng. Carril 8: 100 ng. Carril 9: 200 ng. Carril 10: 500 ng. Carril 11: Marcador de peso molecular (*GeneRuler DNA 1 kb Fermentans*, Life Technologies, California, Estados Unidos).

En la figura 2 se muestra el ejemplo de un gel de electroforesis de los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple estandarizada, de los genes *cesB*, *nheA*, *cytK* y *hblC*, y el ITS1 detectados en las muestras de ADN de *Bacillus cereus* extraído directamente de los alimentos pulverizados.

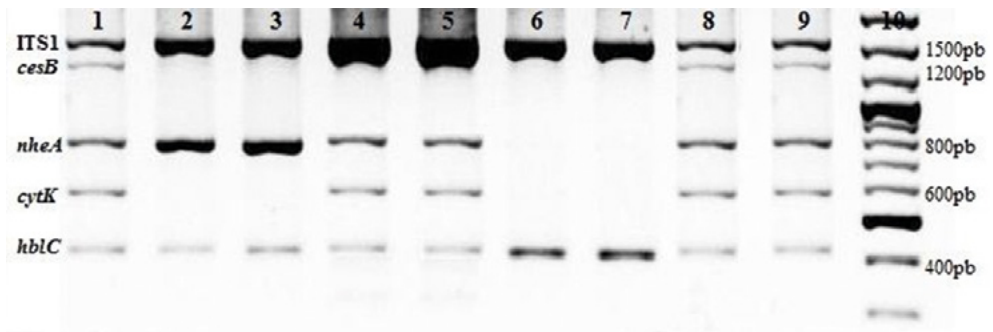


Figura 2. Gel de electroforesis de los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple de los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* detectados en algunos de los alimentos pulverizados evaluados. Carril 1: Control positivo (ADN de las cepas de referencia de *Bacillus cereus* ATCC 14579 y 1257). Carriles 2 al 5: ADN de *Bacillus cereus* toxigénicos proveniente de harina de trigo. Carriles 6 al 9: ADN de *Bacillus cereus* toxigénicos proveniente de fécula de maíz. Carril 10: Marcador de peso molecular (*GeneRuler DNA 100 bp plus Ladder Mix, ready-to-use*; Life Technologies, California, Estados Unidos).

Detección directa de *Bacillus cereus* toxigénicos en fécula de maíz por reacción en cadena de la polimerasa múltiple

Del total de muestras de fécula de maíz analizadas, en el 60,5% (46/76) se logró amplificar uno o más genes que codifican para las toxinas evaluadas, lo que indica que en algún momento del proceso productivo el alimento estuvo en contacto con *Bacillus cereus* toxigénicos. El gen más predominante fue el *hblC*, encontrado en el 84,8% (39/46) de las muestras, seguido por *cytK* en el 54,3% (25/46), *nheA* en el 50,0% (23/46) y *cesB* en el 2,2% (1/46). Además, varios genes fueron encontrados simultáneamente en una misma muestra. Dado que la prueba evalúa el ADN extraído directamente del alimento los resultados permiten identificar la presencia de los genes toxigénicos, con los cuales se establecieron seis consorcios en las muestras de fécula de maíz (ver [tabla 2](#)).

Tabla 2. Frecuencia de los consorcios toxigénicos de *Bacillus cereus* en las muestras de fécula de maíz contaminadas (n=46)

Consortio toxigénico	Genes	Muestras positivas No. (%)
I	<i>hblC, cytK</i>	14 (30,4)
II	<i>nheA, hblC, cytK</i>	10 (21,7)
III	<i>hblC</i>	9 (19,6)
IV	<i>nheA</i>	7 (15,2)
V	<i>nheA, hblC</i>	5 (10,9)
VI	<i>nheA, hblC, cytK, cesB</i>	1 (2,2)

Detección directa de *Bacillus cereus* toxigénicos en harina de trigo por reacción en cadena de la polimerasa múltiple

En el 65,8% (52/79) del total de muestras de harina de trigo se logró amplificar uno o más genes que codifican para las diferentes enterotoxinas de *Bacillus cereus*. El gen más frecuente fue *hblC*, presente en el 98,1% (51/52) de las muestras, seguido de *cytK* en el 90,4% (47/52) y *nheA* en el 80,8% (42/52). El gen *cesB* no se detectó en ninguna de las muestras analizadas. Además, en una misma muestra se encontraron varios genes de forma simultánea. A partir de esta in-

formación se establecieron cuatro consorcios toxigénicos en las muestras de ADN extraído directamente de harina de trigo (ver [tabla 3](#)).

Discusión

Bacillus cereus es una bacteria esporulada, patógena para el humano, que puede sobrevivir en ambientes con bajo contenido de agua, como los alimentos pulverizados [7], lo que hace que su detección en este tipo de alimentos sea obligatoria. Las metodologías convencionales para la detección y recuento de *Bacillus cereus* incluyen el cultivo en placa en medio selectivo y su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas [8]; sin embargo, estas pruebas no proporcionan información sobre el potencial toxigénico de estos aislamientos [2]. Por su parte, las metodologías moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa múltiple, permiten identificar de manera simultánea la presencia o ausencia de cada uno de los genes toxigénicos de *Bacillus cereus*, ya sea a partir de ADN obtenido de las bacterias previamente aisladas de los alimentos o de ADN extraído directamente de las muestras alimenticias, proveniente de las células viables o no viables presentes en ellas [10]. No obstante, en este último caso, la detección de los genes toxigénicos no es equivalente a la detección de la bacteria.

En el presente estudio la reacción en cadena de la polimerasa múltiple demostró ser sensible y específica para la detección de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* que se encontraban presentes en los alimentos pulverizados, como la fécula de maíz y la harina de trigo. Por su parte, no se encontró una asociación entre el tipo de muestra y la presencia de los diferentes genes toxigénicos de *Bacillus cereus*. La frecuencia de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en la fécula de maíz fue del 60,5% y en la harina de trigo del 65,8%, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de alimentos analizados.

La presencia o ausencia de cada uno de los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en los alimentos permite establecer grupos o consorcios [11], los cuales reflejan únicamente los diversos genes toxigénicos presentes en las muestras alimenticias, que a su vez, dan cuenta de la diversidad genética de las cepas de *Bacillus cereus* que están o estuvieron en contacto con el alimento a lo largo del proceso de producción, sin considerar su viabilidad. En general, en la fécula de maíz predominaron los consorcios enterotoxigénicos (I - V) de *Bacillus cereus* sobre el consorcio emético (VI), mientras que en la harina de trigo únicamente se identificaron los consorcios enterotoxigénicos (I - IV). De manera interesante, los cuatro consorcios enterotoxigénicos encontrados en las muestras de harina de trigo también fueron hallados en las muestras de fécula de maíz (consorcios I, II, III y V); mientras que el consorcio enterotoxigénico IV y el emético (VI) sólo se encontraron en la fécula de maíz. Lo anterior refleja la amplia diversidad de genes toxigénicos de *Bacillus cereus*, particularmente de tipo enterotóxico, que pueden ser encontrados directamente en este tipo de alimentos.

El predominio de los genes enterotóxicos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa múltiple directamente en los alimentos o en aislamientos puros de *Bacillus cereus* ha sido reportado previamente en diferentes matrices alimentarias [10, 11]. La reacción en cadena de la polimerasa múltiple realizada a partir de ADN extraído directamente del alimento, sin incluir el paso del cul-

Tabla 3. Frecuencia de los consorcios toxigénicos de *Bacillus cereus* en las muestras de harina de trigo contaminadas (n=52)

Consorcio toxigénico	Genes	Muestras positivas No. (%)
I	<i>nheA, hblC, cytK</i>	42 (80,8)
II	<i>hblC, cytK</i>	6 (11,5)
III	<i>hblC</i>	3 (5,8)
IV	<i>nheA, hblC</i>	1 (1,9)

tivo de la bacteria, pero realizando un proceso de enriquecimiento previo del alimento, ha sido utilizada en la India, donde detectaron con una alta frecuencia la presencia de los genes *nheA*, *nheB* y *nheC*, seguidos de los genes *hblA*, *hblC*, *hblD* y *cytK*, en carnes y derivados [11]. De igual manera, en Kenia, en alimentos como arroz cocido y leche para el consumo humano, se reportó una frecuencia de detección del 12,9% para los genes toxigénicos *ces*, *nheA* y *hblDC*, utilizando la metodología de detección directa [10].

Otros autores en diferentes países han empleado la reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la detección de los genes toxigénicos de *Bacillus cereus* a partir de ADN extraído de las bacterias aisladas de los alimentos [18, 19]. En Corea, en aislamientos de *Bacillus cereus* de productos de arroz y cebada, se detectaron frecuentemente los genes *nheA* y *hblDC*, y en menor proporción el *cytK* [18]. En Bélgica, las cepas de *Bacillus cereus* aisladas de productos alimenticios empacados, como lasaña, salsa bechamel, salsa boloñesa, arroz crudo, carne picada fresca y zanahorias recién picadas, presentaban los genes *hblADC*, *nheABC* y *cytK* que codifican para las enterotoxinas, pero no el gen *ces*, que codifica para la toxina emética [19]. Estos resultados demuestran la predominancia de los genes enterotóxicos tanto en países asiáticos como europeos, de forma similar a lo encontrado en este trabajo.

En el continente americano se han realizado algunos estudios de la diversidad toxigénica de *Bacillus cereus*, en los que se han reportado los genes enterotóxicos de los aislados de la bacteria en diferentes alimentos [20-22]. En Estados Unidos encontraron que los aislamientos puros de *Bacillus cereus* provenientes de arroz portaban principalmente los genes *nheAB* y en menor frecuencia los genes *hblDA*, pero no los genes del operón *ces* [20]. En Argentina, los aislamientos de *Bacillus cereus* a partir de miel presentaron los genes *hblCDAB* en mayor proporción, seguido del gen *bceT*, el operón *nheABC* y el gen *cytK* [21]. El gen *bceT* codifica para la enterotoxina T de *Bacillus cereus*, la cual no tiene una actividad biológica clara descrita hasta la fecha [2]. En Brasil, los aislamientos de *Bacillus cereus* de diferentes alimentos, como leche y derivados, verduras, especias, cereales, postres de chocolate, carne, embutidos, salsas, harina de maíz y yuca, y otros productos en polvo, presentaban frecuentemente los genes del operón *nhe* (*nheA*, *nheB* y *nheC*), seguidos de los genes del operón *hbl* (*hblA*, *hblC* y *hblD*) y el gen *cytK-2*, pero no del operón *ces* [22].

Estudios previos realizados en Bélgica, Estados Unidos y Brasil han reportado la ausencia de los genes eméticos en diversos alimentos [19, 20, 22]. Sin embargo, en el presente estudio el gen *cesB* se encontró únicamente en el consorcio toxigénico VI de *Bacillus cereus*, proveniente de una muestra de fécula de maíz, de forma similar a otros estudios en los que se reportó una baja frecuencia de genes eméticos en productos alimenticios como arroz y sus derivados, y pollo relleno cocido [23-26]. Este hallazgo no es inesperado dado que la producción de la toxina emética parece estar restringida a un linaje particular de *Bacillus cereus* detectado principalmente en países asiáticos [5].

Por otro lado, en Inglaterra se han reportado aislamientos de *Bacillus cereus* productores de la toxina emética provenientes de arroz [23] y en Corea cepas eméticas aisladas e identificadas en alimentos como tortas de arroz [24] y sunsik, un alimento coreano listo para el consumo, preparado a partir de granos, frutas y verduras [25]. En Argentina se aisló e identificó una cepa emética de *Bacillus cereus* a partir de pollo relleno cocido, relacionado con un caso de intoxicación grave por alimentos en una mujer adulta sana [26], lo que constituye el primer reporte de este linaje de *Bacillus cereus* en el continente americano. El hallazgo en el presente estudio del gen *cesB* en una única muestra de fécula de maíz indica que en Medellín, Colombia, también es baja la frecuencia de los genes eméticos en

comparación con los enterotoxigénicos y que, por tanto, las cepas eméticas son menos frecuentes; sin embargo, es necesario realizar más estudios que corroboren estos hallazgos.

Conclusiones

En este estudio la reacción en cadena de la polimerasa múltiple fue exitosamente empleada para evaluar la presencia de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en muestras de alimentos pulverizados. Esta prueba puede ayudar a optimizar el tiempo y los recursos de los laboratorios de diagnóstico para la detección de los genes toxigénicos, ya que no demanda los pasos previos de enriquecimiento de la muestra ni el aislamiento e identificación de la bacteria. Además, los hallazgos de este estudio sirven como base para la realización de otras investigaciones en las que se evalúe el riesgo de la contaminación de diferentes alimentos por *Bacillus cereus* utilizando la metodología descrita.

Los resultados obtenidos muestran que en la fécula de maíz fueron más frecuentes los consorcios enterotoxigénicos respecto al consorcio emético, mientras que en la harina de trigo sólo se detectaron los consorcios enterotoxigénicos. Estos hallazgos constituyen el primer reporte realizado en Colombia sobre la presencia de genes toxigénicos de *Bacillus cereus* en alimentos pulverizados, lo cual proporciona información importante sobre la diversidad genética de este microorganismo en la harina de trigo y la fécula de maíz de consumo para el humano. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que incluyan alimentos listos para su consumo y que den cuenta de la viabilidad de las bacterias y su potencial para sintetizar las diferentes toxinas con actividad biológica, características que se encuentran directamente relacionadas con la inducción de intoxicaciones alimentarias, para así, poder contribuir a la evaluación del riesgo microbiológico generado por *Bacillus cereus* en los alimentos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS), mediante el contrato 386-2011, y la Universidad de Antioquia.

Bibliografía

1. **Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE.** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 579-606.
2. **Bhunia AK.** *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In: Bhunia A, ed. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Nueva York, Estados Unidos: Springer Science+Business Media; 2008: 135-148.
3. **Dommel MK, Lucking G, Scherer S, Ehling-Schulz M.** Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiol* 2011; 28: 284-290.
4. **Granum P.** *Bacillus cereus*. In: Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL, eds. *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Norfolk, Inglaterra: Caister Academic Press; 2005: 409-419.
5. **Økstad OA, Kolstø AB.** Genomics of *Bacillus* Species. In: Wiedmann M, Zhang W, eds. *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*. Nueva York, Estados Unidos: Springer Science+Business Media; 2011: 29-53.
6. **Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M.** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* 2000; 2: 189-198.
7. **Logan NA.** *Bacillus* and relatives in foodborne

- illness. *J Appl Microbiol* 2012; 112: 417-429.
8. **Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.** Norma Técnica Colombiana NTC: 4679. Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus*. Técnica de recuento de colonias. Bogotá D.C., Colombia; 2006.
 9. **Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S.** Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 232: 189-195.
 10. **Ombui J, Gitahi J, Gicheru M.** Direct detection of *Bacillus cereus* enterotoxin genes in food by multiplex Polymerase Chain Reaction. *Int J Integr Biol* 2008; 2: 172-181.
 11. **Rather MA, Aulakh RS, Gill JPS, Rao TS, Hassan MN.** Direct Detection of *Bacillus cereus* and its Enterotoxigenic Genes in Meat and Meat Products by Polymerase Chain Reaction. *J Adv Vet Res* 2011; 1: 99-104.
 12. **D'Alessandro B, Antúnez K, Piccini C, Zunino P.** DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey and bees using spore-decoating and freeze-thawing techniques. *World J Microbiol Biotechnol* 2007; 23: 593-597.
 13. **Moravek M, Wegscheider M, Schulz A, Dietrich R, Burk C, Martlbauer E.** Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238: 107-113.
 14. **Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C.** Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3053-3056.
 15. **Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Martlbauer E, et al.** Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 105-113.
 16. **Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, et al.** Broad distribution of enterotoxin genes (*hblC-DA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int J Food Microbiol* 2008; 121: 352-356.
 17. **Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindback T, Andersson M, Schulz A, et al.** Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 2005; 151: 183-197.
 18. **Park YB, Kim JB, Shin SW, Kim JC, Cho SH, Lee BK, et al.** Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *J Food Prot* 2009; 72: 612-617.
 19. **Samapundo S, Heyndrickx M, Xhaferi R, Devlieghere F.** Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int J Food Microbiol* 2011; 150: 34-41.
 20. **Ankolekar C, Rahmati T, Labbe RG.** Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int J Food Microbiol* 2009; 128: 460-466.
 21. **López AC, Alippi AM.** Enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* isolates recovered from honey. *Rev Argent Microbiol* 2010; 42: 216-225.
 22. **Chaves JQ, Pires ES, Vivoni AM.** Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *Int J Food Microbiol* 2011; 147: 12-16.
 23. **Altayar M, Sutherland AD.** *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 7-14.
 24. **Kim JB, Park JS, Kim MS, Hong SC, Park JH, Oh DH.** Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. *Int J Food Microbiol* 2011; 150: 66-72.
 25. **Lee N, Sun JM, Kwon KY, Kim HJ, Koo M, Chun HS.** Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from Sunsik. *J Food Prot* 2012; 75: 225-230.
 26. **López AC, Minnaard J, Pérez PF, Alippi AM.** A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. *Food Microbiol* 2014; Ago 27 [Epub ahead of print].