

## DetECCIÓN DE *Bacillus cereus* TOXIGÉNICOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS CON ESPECIAS Y LECHE DESHIDRATADAS COLECTADAS EN COSTA RICA

Walter Blanco, María Laura Arias, Cristian Pérez, César Rodríguez, Carolina Chaves

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz H. San José, Costa Rica; Hospital Tomás Casas, Puerto Cortés, Puntarenas, Costa Rica

**RESUMEN.** *Bacillus cereus* es un bacilo Gram-positivo de amplia distribución en la naturaleza y asociado a diversos tipos de alimentos que, bajo ciertas circunstancias causa patologías de diversa índole. Se han descrito cepas diarrogénicas y eméticas basándose en el tipo de toxinas producidas. Con el fin de determinar el riesgo de salud que representa en esta bacteria, se determinó el potencial toxigénico de cepas aisladas a partir de quesos maduros con especias, quesos crema con especias y leches deshidratadas expandidas en San José, Costa Rica, mediante un PCR múltiple con oligonucleótidos específicos para los genes codificantes de las toxinas HBL y Nhe. A partir de 45 muestras recolectadas, se obtuvieron 15 aislamientos de *B. cereus*, (60% provenientes de queso crema con especias, 7% de leche deshidratada y 13% de queso maduro con especias). Todas las cepas estudiadas presentaron al menos uno de los genes analizados, seis de ellas provenientes de leches deshidratadas y quesos crema, exhibieron evidencia molecular de los genes *nheB*, *nheA*, *nheC*, *hblD*, *hblA* y *hblC* lo cual permite confirmar la correlación descrita para la presencia de los operones codificantes para la HBL y la Nhe. No obstante, la no detección de un gen no puede considerarse como prueba definitiva de su ausencia dado que existen polimorfismos en las secuencias de los genes aquí analizados. Los resultados demuestran que múltiples cepas de *B. cereus* encontradas en lácteos comprados en Costa Rica contienen los genes necesarios para sintetizar toxinas, por lo tanto es importante el manejo adecuado de estos productos ya que eventualmente pueden representar un riesgo para la salud pública.

**Palabras clave:** *Bacillus cereus*, toxinas, leche deshidratada, queso.

### **SUMMARY. Toxigenic *Bacillus cereus* detection in lactic products with spices and dehydrated milk collected in Costa Rica.**

*Bacillus cereus* is a Gram positive rod widely distributed in nature and associated to different types of food that, under some circumstances, may cause pathology to human beings. Diarrheic and emetic strains have been described based on the type of toxins produced. In order to determine the risk to health represented by this bacteria, the toxigenic potential of strains isolated from cheese with spices, spread cheese with spices and dehydrated milk, all sold in San José, Costa Rica, were determined using a multiplex PCR technique with oligonucleotides specific for the genes coding toxins HBL and Nhe. From 45 samples collected, 15 isolates of *B. cereus* were obtained (60% coming from spread cheese with spices 7% from dehydrated milk and 13% from cheese with spices). All the strains analyzed presented at least one of the genes analyzed; six of them, coming from dehydrated milk and spread cheese, showed molecular evidence of the genes *nheB*, *nheA*, *nheC*, *hblD*, *hblA* y *hblC*, confirming the correlation described for the presence of operons codifying for HBL and Nhe. Nevertheless, the no detection of a gene cannot be considered as a definitive proof of its absence, given the existence of polymorphism in the sequences of the genes analyzed. The results obtained show that multiple of the *B. cereus* strains found in lactic products from Costa Rica have the necessary genes for synthesizing toxins, so the correct handling of these products is very important since they can represent a risk for public health.

**Key words:** *Bacillus cereus*, toxins, dehydrated milk, cheese.

### INTRODUCCION

*Bacillus cereus* es un bacilo Gram-positivo ubicuo que bajo ciertas circunstancias causa patologías de diversa índole (11,12). Este microorganismo se ha aislado a partir de productos lácteos, incluyendo leches deshidratadas (6,8), especias (1,9), comidas deshidratadas, arroz hervido, arroz frito, pastas, carne, pollo, postres, sopas, ensaladas y vegetales (3,6).

Las cepas diarrogénicas asociadas a brotes alimenticios e infecciones oportunistas sintetizan un complejo de enterotoxinas que incluyen la enterotoxina T (BcET), la hemolisina BL (HBL), la enterotoxina no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K (CytK) (2,10), así como una toxina emética

conocida como cerúlida (5). Las enterotoxinas arriba mencionadas, que son termolábiles y susceptibles a la degradación proteolítica, pueden encontrarse en los alimentos o ser sintetizadas por la bacteria dentro del intestino delgado de los humanos (3,4). La toxina emética, por el contrario, resiste más de una hora a 150°C (14), lo cual hace que sea posible encontrarla activa en productos que durante su manufactura son sometidos a elevadas temperaturas, como es el caso de las leches deshidratadas.

En este trabajo determinamos el potencial toxigénico de cepas de *B. cereus* aisladas a partir de quesos maduros con especias, quesos crema con especias y leches deshidratadas expandidas en San José, Costa Rica mediante un PCR múltiple con oligonucleótidos específicos para los genes

codificantes de las toxinas HBL y Nhe. Lo anterior con el fin de dilucidar si el consumo de estos productos se asocia a un riesgo sanitario.

## MATERIALES Y METODOS

### Colecta y manipulación de las muestras

Se analizaron 12 muestras de queso maduro con especias,

12 muestras de leche deshidratada y 21 muestras de queso crema con especias de producción nacional e importadas compradas en San José, Costa Rica (Tabla 1). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en refrigeración, almacenadas a 4°C y analizadas en un máximo de 24 horas post-colección. Diferentes lotes fueron analizados por triplicado.

TABLA 1  
Características generales de las muestras analizadas en el estudio

Alimento	Peso (g)	Fecha de vencimiento	Alimento	Peso (g)	Fecha de vencimiento
Leche deshidratada marca A	400	Oct-08	Queso marca E con hierbas	252	12/05/2008
Leche deshidratada marca A	400	Oct-08	Queso marca E con hierbas	292	02/06/2008
Leche deshidratada marca A	400	Nov-08	Queso marca E con hierbas	292	02/05/2008
Leche deshidratada marca B	400	Jun-08	Queso marca E con especias	258	03/05/2008
Leche deshidratada marca B	400	Jun-08	Queso marca E con especias	304	16/06/2008
Leche deshidratada marca B	400	Oct-08	Queso marca E con especias	256	16/06/2008
Leche deshidratada marca C	400	Sep-08	Queso marca E con comino	378	23/04/2008
Leche deshidratada marca C	400	Ago-08	Queso marca E con comino	216	04/06/2008
Leche deshidratada marca C	400	Nov-08	Queso marca E con comino	322	04/06/2008
Leche deshidratada marca D	400	Jul-08	Queso marca E con Pimienta negra	296	23/04/2008
Leche deshidratada marca D	400	Jul-08	Queso marca E con Pimienta negra	364	16/04/2008
Queso crema marca F con cebolla	226	03/Jan/08	Queso crema marca G con pico de gallo	250	19/11/2007
Queso crema marca F con cebolla	226	03-Ene-08	Queso crema marca G con pico de gallo	250	02/12/2007
Queso crema marca F con cebolla	226	24-Nov-07	Queso crema marca G con pico de gallo	250	09/12/2007
Queso crema marca G con cebollinos	250	12/11/2007	Queso crema marca G con Salmón ahumado	250	05/11/2007
Queso crema marca G con cebollinos	250	26/11/2007	Queso crema marca G con Salmón ahumado	250	12/11/2007
Queso crema marca G con cebollinos	250	23/12/2007	Queso crema marca G con Salmón ahumado	220	26/11/2007
Queso crema marca G con hierbas y ajo	250	19/11/2007	Queso crema marca H con sabor a jamón	220	03/12/2007
Queso crema marca G con hierbas y ajo	250	05/11/2007	Queso crema marca H con sabor a jamón	220	05/01/2008
Queso crema marca G con hierbas y ajo	250	19/11/2007	Queso crema marca H con sabor a jamón	100	15/12/2007
Queso crema marca G con vegetales	250	19/11/2007	Queso crema marca I regular		23/11/2007
Queso crema marca G con vegetales	250	23/12/2007	Queso crema marca I regular	100	26/11/2007
Queso crema marca G con vegetales	250	30/12/2007	Queso crema marca I regular	100	20/11/2007

### Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus*

Se utilizó la metodología descrita en el Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos para el aislamiento de *Bacillus cereus* partir de productos lácteos (3). En breve, 25 g del alimento se mezclaron con 225 mL de Agua Peptonada Estéril (APE) 0,1% en un homogenizador tipo Stomacher (IUL Instruments, Barcelona). De esta suspensión se hicieron tres diluciones decimales y de cada dilución se inoculó 1 mL en 3 tubos de Caldo Tripticosa Soya (CTS) con Polimixina B (0.06 mg/m). Una alícuota de aquellos tubos que presentaron turbidez tras una incubación de 24 ± 2h a 35 ± 1°C fue inoculada en placas de agar Manitol-Yema de huevo-Polimixina (MYP). Las colonias grandes, planas, secas, rosadas y rodeadas de un halo que aparecieron des-

pués de incubar los platos a 35 ± 1°C por 24 ± 2h fueron identificadas presuntivamente como *Bacillus cereus* si daban una reacción positiva en la tinción de Gram, catalasa, fermentación de glucosa, movilidad y reducción de nitratos y una reacción negativa en las pruebas de oxidasa e indol. Esta identificación se confirmó con la batería de carbohidratos API CH50 y el software de identificación APILAB (Biomeriux®). Para descartar la presencia de *Bacillus thuringiensis* en la colección, se buscaron inclusiones parasporales cristalinas en cultivos esporulados teñidos con azul de Coomassie (3,75% en una mezcla 1:1 de ácido acético y etanol). Todos los aislamientos se crioconservaron a -20°C en caldo infusión cerebro corazón suplementado con 20% de glicerol.

### Detección de los genes *hblA*, *hblD*, *nheA*, *nheB* y *net* mediante PCR

Los genes de las enterotoxinas HBL y Nhe se detectaron mediante un PCR múltiple que utilizó ADN extraído mediante choque térmico como molde. Para esto, una colonia recuperada a partir de platos de agar MYP incubados por 24 horas a 35°C fue resuspendida en 500 µL de solución tamponada de fosfatos ajustada a pH = 6.8 (PBS) e incubada durante 20 minutos a 95°C. Los detritos celulares fueron removidos mediante centrifugación a 4°C por 10 min. Las reacciones de amplificación estuvieron compuestas por 2 µM de los oligonucleótidos HBLA1, HBLA2, L1A, L1B, *nheA* 344, *nheA* 843, *nheB* 1500 S, *nheB* 2269 A, *nheC* 2820 S y *nheC* 3401 A (7), 5 µL del ADN extraído por choque térmico, 25 µl del ready-to use 2X mastermix (Fermentas®) y la cantidad correspondiente de agua para alcanzar un volumen final de 50 µL. El programa de amplificación incluyó 30 ciclos de

desnaturalización a 94°C por 15 segundos, un paso de alineación a 55°C por 45 segundos y un paso de extensión a 72°C por 2 minutos. Como control positivo se usó la cepa *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD 137 la cual presenta todos los genes para las toxinas HBL y Nhe, y como control negativo se empleó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. Los productos de PCR se evidenciaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,0005 mg/mL. Se utilizó el marcador de peso molecular 50 pares de bases (Fermentas®)

### RESULTADOS

Las 45 muestras colectadas dieron lugar a 15 aislamientos de *B. cereus* (Tabla 2). En detalle, se aislaron *B. cereus* en 2 quesos maduros con especias (13.3%), 9 quesos crema con especias (60%) y 4 muestras de leche deshidratada (26.6%).

TABLA 2  
Identificación de los aislamientos según tipo de muestra

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

LD: Leche deshidratada. Q: Queso. QC: Queso crema.

Los quince aislamientos presentaron al menos uno de los genes analizados (Tabla 3). Las cepas LD2, LD3, LD5, QC5, QC7 y QC8, provenientes de leches deshidratadas y quesos crema, exhibieron evidencia molecular de los genes *nheB*, *nheA*, *nheC*, *hblD*, *hblA* y *hblC*. En los aislamientos a partir de quesos crema QC1, QC2 y QC6 no se detectaron los genes

*nheC* ni *hblC*. En la cepa de queso crema QC3 se evidenciaron los genes *nheA*, *nheC* y *hblA*. En las cepas LD4, Q1, Q2 y QC4, recuperadas a partir de leche deshidratada, queso maduro y queso crema, se detectaron únicamente los genes *nheB* y *nheA*. Finalmente, el aislamiento QC9 de queso crema contiene los genes *nheA* y *nheC*.

TABLA 3  
Distribución de genes codificantes por toxinas en los  
aislamientos de *Bacillus cereus* analizados

Aislamiento <sup>#</sup>	<i>nheB</i>	<i>nheA</i>	<i>nheC</i>	<i>hblD</i>	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>
LD2	+	+	+	+	+	+
LD3	+	+	+	+	+	+
LD5	+	+	+	+	+	+
QC1	+	+	-	+	+	-
QC2	+	+	-	+	+	-
QC5	+	+	+	+	+	+
QC6	+	+	-	+	+	-
QC7	+	+	+	+	+	+
QC8	+	+	+	+	+	+
LD4	+	+	-	-	-	-
Q1	+	+	-	-	-	-
Q2	+	+	-	-	-	-
QC4	+	+	-	-	-	-
QC9	+	-	+	-	-	-
QC3	-	+	+	-	+	-

<sup>#</sup>LD= leche deshidratada. QC= queso crema. Q= queso

## DISCUSION

El aislamiento de *B. cereus* en queso crema con especias (60%) y leche deshidratada (27%), resultado más frecuente que en quesos maduros con especias (13%). La elevada frecuencia de aislamiento de *B. cereus* a partir del primer tipo de muestra puede deberse a su alto contenido de grasa, ya que este factor confiere protección a las bacterias frente a los tratamientos reductores de la carga microbiana (14,15). De igual forma, la actividad de agua ( $A_w$ ) de este producto puede favorecer la germinación de esporas (6). En el caso de las leches deshidratadas, las esporas presentes en estado de latencia pudieron haber sobrevivido los tratamientos térmicos implicados en el proceso de manufactura (6) y para los quesos con especias su menor positividad podría explicarse debido a que se analizaron quesos maduros, los cuales como es conocido, llevan un proceso durante el cual el pH de los mismos desciende a niveles que la mayoría de los patógenos no toleran.

La Nhe es una toxina que requiere la expresión de todos sus genes para que se genere un producto con actividad biológica (8,4). Basado en lo anterior, es posible inferir que 2 aislamientos (QC3 y QC9) no sintetizan toxinas activas. Por su parte, la actividad biológica de la HBL se manifiesta con tan sólo uno de los genes codificantes, sin embargo, dicha actividad se ve incrementada de forma proporcional al número de componentes expresados (2). Con base en lo anterior, es de esperar que las 6 cepas que presentaron dos genes de la HBL presenten mayor actividad biológica que la que presentó solo uno de los genes o las que no presentaron ninguno. En este

trabajo se confirma la correlación descrita para la presencia de los operones codificantes para la HBL y la Nhe (7), ya que 6 de los 15 aislamientos con genes para la toxina HBL también tenían genes para Nhe. Finalmente, queremos destacar que la no detección de un gen no puede considerarse como prueba definitiva de su ausencia dado que existen polimorfismos en las secuencias de los genes aquí analizados (2,13).

Los resultados demuestran que múltiples cepas de *B. cereus* encontradas en lácteos comprados en Costa Rica contienen los genes necesarios para sintetizar toxinas, por lo tanto es importante el manejo adecuado de estos productos ya que eventualmente pueden presentar cepas de *Bacillus cereus*, con potencial patógeno, implicando un riesgo si se le brindan las condiciones apropiadas para que alcancen un número capaz de producir un cuadro clínico.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa colaboración de nuestras compañeras Laura Villalobos Soto y Florencia Antillón Guerrero.

## REFERENCIAS

1. Banerjee M y Sarkar PK. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control*. 2004;15: 491-496.
2. Cardazzo B, Negrisolo L, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-Locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food borne isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(3):850-860
3. Downes FP y Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4 ed. Washington DC, Estados Unidos, American Public Health Association. 2001.
4. Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriology*. 2006;188(18):6640-6651.
5. Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Barsotti C, Baggiani A y Senesi S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters*. 2002;208 (1):129-134.
6. Granum PE. *Bacillus cereus*. En: Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2005.
7. Hansen BM y Hendriksen NB. Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *Applied and Environ Microbiology*. 2001;67 (1):185-189.
8. Lindback T, Fagerlund A, Rodland MS y Granum PE. Characterization of the *Bacillus cereus* The enterotoxin. *Microbiology*. 2004;150:3959-3967.
9. Little C, Omotoye R y Mitchell R. The microbiological quality of ready-to-eatfoods with added spices. *International J Environmen Health Research*. 2003;13(1):31-42.

10. Lund T, De Buyser ML y Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*. 2000;38(2):254-261.
11. Mahon C y Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2 ed. Estados Unidos, Saunders. 2000.
12. McIntyre L, Bernard K, Beniac D, Isaac\_Renton J, Craig D. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environ Microbiology*. 2008;74(23):7451-7453.
13. Prüss BM, Dietrich R, Nibler B, Märtlbauer E y Scherer S. The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and Environ Microbiology*. 1999;65(12):5436-5442.
14. Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, in 't Veld P, Denon Q, Verhe R y Debevere J. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology*. 2008;46:536-541.
15. Schlegelova J, Brychta J, Klimova E, Napravnikova E y Babak V. The prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from food stuffs. *Veterinary and Medicine*. 2003;48(11):331-338.

Recibido: 21-07-2009

Aceptado: 23-09-2009