



INEI
Instituto Nacional de
Enfermedades Infecciosas
"Dr. Carlos G. Malbrán"



**ANLIS
MALBRÁN**
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS
E INSTITUTOS DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRÁN"

Manual de Procedimientos

Bacillus grupo *cereus* asociado a enfermedad transmitida
por alimentos

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA
SERVICIO BACTERIOLOGÍA ESPECIAL

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Octubre 2021

Prieto MA; Rocca MF; Martínez C; Cipolla L; Armitano R; Martínez G; D'angiolo G. Manual de Procedimientos *Bacillus grupo cereus* asociado a enfermedad transmitida por alimentos. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud(ANLIS), 2021. Disponible en: <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/2377>

“Este recurso es el resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la política de gestión del conocimiento de la ANLIS”.



[Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

AUTORAS Y AUTORES:

MÓNICA PRIETO

FLORENCIA ROCCA

CLAUDIA MARTÍNEZ

LUCÍA CIPOLLA

RITA ARMITANO

GISELA MARTÍNEZ

GASTÓN D'ANGIOLO

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA
SERVICIO BACTERIOLOGÍA ESPECIAL
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, octubre 2021

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
TAXONOMÍA	5
SIGNIFICACIÓN CLÍNICA	7
FACTORES DE VIRULENCIA	8
EPIDEMIOLOGÍA	9
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	11
MUESTRAS CLÍNICAS	11
7.1 Tipo y toma de muestra	11
7.2 Transporte	11
7.3 Procesamiento de la muestra	12
7.4 Pre-tratamiento de la muestra	12
7.5 Recuento de viables <i>B. cereus</i>	12
8. PREPARACIÓN DEL MEDIO SELECTIVO PARA AISLAMIENTO DE <i>B. CEREUS</i> SEGÚN MOSSEL	13
9. IDENTIFICACIÓN	15
10. AISLAMIENTO A PARTIR DEL ALIMENTO	15
11. SUBTIPIFICACIÓN	15
11.1. PCR para detección de enterotoxina HBL	16
11.2. PCR para detección de enterotoxina NHE	18
11.3. Detección de toxina emética o cereulida	20
11.4. Subtipificación molecular	21
12. Resistencia a los antibióticos	21
BIBLIOGRAFÍA	22

1. INTRODUCCIÓN

Bacillus cereus es un bacilo anaeróbico facultativo, formador de esporas y grampositivo, que es ubicuo y se encuentra en el polvo, el suelo, la superficie de las plantas o la rizosfera. A partir del ambiente, las células vegetativas y especialmente las esporas pueden entrar fácilmente en la cadena alimentaria. Pueden contaminar los alimentos crudos o cocidos y elaborados. Se multiplica entre 10 °C y 48 °C. Por lo tanto, si los alimentos contaminados se mantienen a temperatura ambiente los microorganismos se pueden multiplicar produciendo y liberando toxinas que ocasionan brotes de enfermedad alimentaria. La presentación clínica de la enfermedad por consumo de alimentos contaminados depende del tipo de toxina producida. El síndrome emético es causado por una toxina preformada termoestable y el síndrome diarreico está asociado a la producción *in vivo* de una enterotoxina termolábil.

2. TAXONOMÍA

El grupo *Bacillus cereus*, también llamado *Bacillus cereus sensu lato (s.l.)*, es un grupo de bacterias filogenéticamente muy relacionadas que provienen de diversos ecosistemas. El grupo incluye especies no patógenas y patógenas que pueden producir cuadros clínicos muy distintos como carbunco, enfermedad invasiva (bacteriemia, meningitis, endocarditis, etc) o enfermedad diarreica y/o emética transmitida por alimentos. El tipo de enfermedad dependerá de la presencia y expresión de ciertos factores de virulencia. Hasta el momento el grupo *B. cereus* comprende 21 especies con nombres válidamente publicados: *B. albus*, *B. anthracis*, *B. cereus s.s.*, *B. cytotoxicus*, *B. gaemokensis*, *B. fungorum*, *B. luti*, *B. manliponensis*, *B. mobilis*, *B. mycoides*, *B. nitratireducens*, *B. pacificus*, *B. paramycoides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. tropicus*, *B. weihenstephanensis* y *B. wiedmannii*¹.

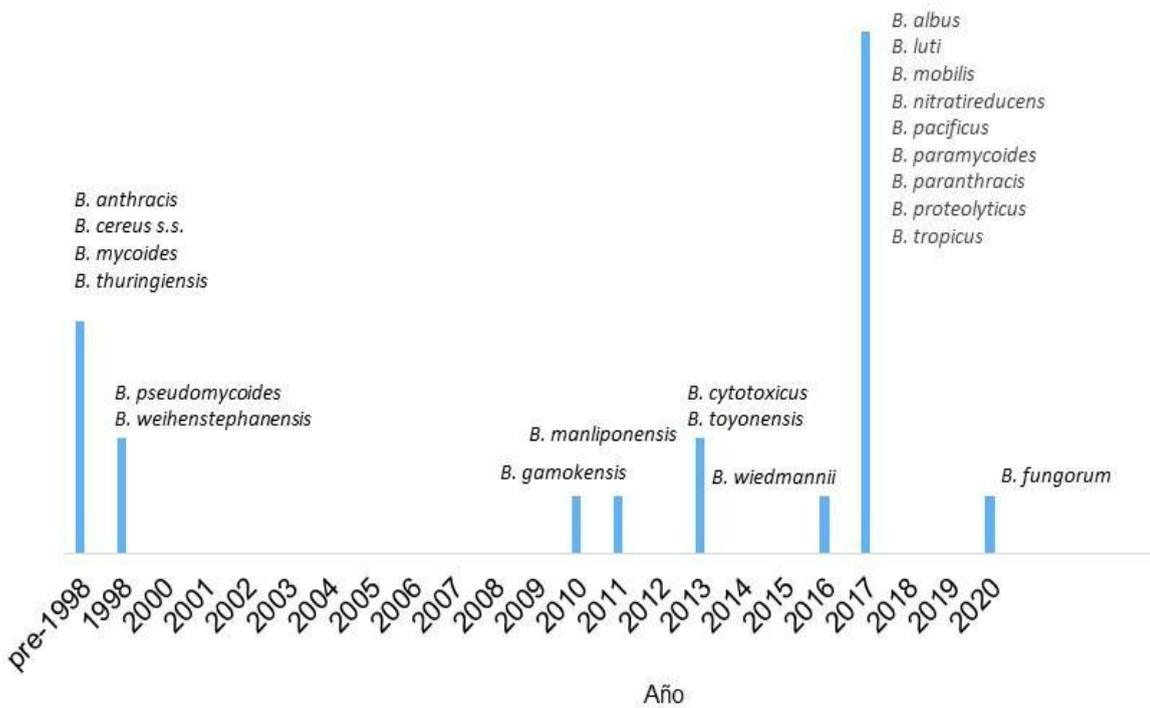
Antes de 1998, *B. cereus s.l.* agrupa cuatro especies, que fueron descubiertas por ser agentes etiológicos de una enfermedad, o debido a su morfología distintiva de la colonia. A partir de 1998, fueron definidas más especies mediante hibridación de DNA, comparación de la composición de ácidos grasos, y similitud de 16S rADN. En el año 2003 fueron secuenciados los primeros genomas de las especies *B. anthracis* y *B. cereus s.s.* Con el crecimiento explosivo de la utilización de secuenciación de genoma completo con fines taxonómicos y de investigaciones poblacionales, el número de genomas disponibles en bases de datos públicas, aumentó rápidamente y la descripción de especies de *B. cereus s.l.* se triplicó entre 2017 y 2018². (Figura 1).

Es importante conocer la creciente complejidad taxonómica de *B. cereus s.l.* y las especies filogenéticamente muy relacionadas y fenotípicamente indistinguibles que conforman dicho grupo,

principalmente si se implementan nuevas tecnologías de identificación como la espectrometría de masas MALDITOF-MS. Muchas de dichas especies están representadas en la base de datos comerciales, y es importante que el microbiólogo esté familiarizado con la taxonomía del grupo para reconocer que la identificación de alguna de esas especies, debe ser informada como *Bacillus* grupo *cereus*.

Las especies *B. weihenstephanensis* y *B. wiedmannii* son psicotolerantes y pueden crecer a 7 °C o menos, a diferencia del resto de las especies del grupo, que no desarrollan a temperaturas inferiores a 10 °C. Estas especies psicotolerantes poseen genes de enterotoxina o toxina emética y pueden sobrevivir durante la producción, distribución y almacenamiento de diversos alimentos refrigerados³.

Figura 1: Descripción de especies de *B. cereus* s.l. en los últimos 25 años.



Los cromosomas de la mayoría de las cepas del grupo *B. cereus* miden entre 5.3 y 5,9 Mb aunque algunos son considerablemente más pequeños, como en la especie *B. cytotoxicus* con un cromosoma de solo 4,1 Mb. Los miembros del grupo *B. cereus* suelen tener uno o más plásmidos (hasta 12) de tamaños de 2 a 600 kb. La relación filogenética entre las bacterias se basa en genes ubicados en los cromosomas, donde también se localizan la mayor parte de los factores de virulencia generales, mientras que genes importantes para la virulencia de este grupo, como los genes de la toxina del ántrax (*B. anthracis*) y los genes de síntesis de la toxina cereulida o genes *cry* que codifican para productos útiles actividad bioplaguicidas (*B. thurigiensis*) se encuentran en plásmidos ¹.

3. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

Si bien algunos miembros del grupo *B. cereus* son capaces de causar ántrax y enfermedades similares al ántrax, enfermedades gastrointestinales eméticas y / o diarreicas transmitidas por los alimentos, infecciones no gastrointestinales graves y / o deterioro de alimentos, otros tienen usos importantes en la agricultura y la industria (*B. thurigiensis*) ².

Clínicamente, excepto *B. anthracis*, las especies del grupo *B. cereus* son patógenos oportunistas asociados a infecciones localizadas (por ejemplo, ojos, piel y heridas) y sistémicas (por ejemplo, bacteriemia, septicemia, meningitis, peritonitis, endocarditis, infección del tracto respiratorio y urinario). Las esporas de *B. cereus* son resistentes a muchos desinfectantes y fueron descritas infecciones asociadas a cuidados de la salud fueron asociadas a guantes, batas, ropa de cama, apósitos, dispositivos médicos (por ejemplo, catéteres, derivaciones e implantes, equipos de broncoscopia y ventiladores ⁴.

Sin embargo, la mayoría de los aislamientos del grupo *B. cereus* están asociados a enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Hay dos tipos de presentación clínica de las enfermedades por *B. cereus* transmitidas por los alimentos. En la primera, los alimentos contaminados (muchos tipos de alimentos, a menudo dejados a temperatura ambiente) llegan al intestino delgado donde se libera la enterotoxina, en este caso, una proteína de gran peso molecular. Esto puede provocar diarrea, calambres y, a veces, náuseas. Por lo general, los vómitos no están presentes en esta forma de enfermedad. La incubación es de 6 a 15 horas después del consumo del alimento contaminado y el cuadro clínico es similar al causado por *Clostridium perfringens*. En la segunda presentación clínica, los alimentos afectados, con mayor frecuencia alimentos con almidón y, clásicamente, arroz, contienen un tipo diferente de toxina (toxina emética) de bajo peso molecular que es estable al pH y resistente al calor y a las proteasas. Esta toxina causa la enfermedad de tipo emético. El período de incubación para este tipo es de 30 minutos a 6 horas después del consumo del alimento contaminado. El cuadro clínico es similar al causado por *Staphylococcus aureus* ⁵.

La dosis infectiva por gramo de alimento es de 10^5 a 10^8 UFC de células vegetativas o 10^4 a 10^9 UFC de esporas. Se considera que todas las personas son susceptibles a la infección por *B. cereus*. La mortalidad es rara. Se ha descubierto que la enterotoxina emética está asociada con algunos casos de insuficiencia hepática y muerte en personas inmunocompetentes^{6,7}.

4. FACTORES DE VIRULENCIA

La patogenicidad de *B. cereus*, ya sea dentro o fuera del tracto gastrointestinal, está asociada con la producción de exoenzimas. Entre las toxinas secretadas se encuentran cuatro hemolisinas, tres fosfolipasas distintas, una toxina inductora de vómito (toxina emética) y tres enterotoxinas formadoras de poros: hemolisina BL (HBL), enterotoxina no hemolítica (NHE) y citotoxina K. En el tracto gastrointestinal, las células vegetativas, ingeridas como células viables o esporas, producen y secretan una enterotoxina proteica e inducen un síndrome diarreico, mientras que la toxina emética (cereulida), un péptido cíclico sintetizado por una enzima no ribosomal codificada por el operón *ces*, situado en un plásmido de 208Kb similar al plásmido de virulencia pXO1 de *B. anthracis*, se produce en productos alimenticios y se ingiere como una toxina formada^{8,9}.

La toxina emética o cereulida es un polipéptido cíclico hidrofóbico termoestable sintetizado al final de la fase logarítmica de crecimiento, bajo condiciones aeróbicas o micro aeróbicas que actúa como un ionóforo de potasio afectando los gradientes de concentración de iones transmembrana necesarios para el buen funcionamiento celular y asociado comúnmente a síntomas de náusea y vómitos. Se ha demostrado que la producción de la toxina emética ocurre en la leche descremada en el rango de temperatura 12-37 °C, con mayor producción a 12 - 15 °C. La toxina emética es altamente resistente a los factores ambientales. Muestran estabilidad en pH 2-11 y resisten el calentamiento a 100 °C durante 150 minutos¹⁰. Se ha detectado la producción de cereulida en la especie psicrófila *B. weihenstephanensis*. Esto demuestra que el plásmido que lleva la toxina emética puede sufrir una transferencia lateral, lo que confiere las mismas propiedades a cepas que de otro modo no serían patógenas¹¹. La eficiencia de la producción de cereulida varía entre las cepas eméticas con la distinción de productores nulos / bajos, medios y altos que producen, respectivamente, <1-50 ng,> 50-500 ng y > 500-1600 ng / mg de masa bacteriana. En un estudio reciente, se demostró que concentraciones de cereulida que oscilaban entre 2 y 6 µg / g de alimento provocaron vómitos profusos entre los grupos de población de alto riesgo. Además, se ha demostrado que las dosis sub-eméticas de la toxina son suficientes para alterar la actividad mitocondrial y afectar la salud. Sin embargo, las cepas que portan el gen *ces* representan una minoría, generalmente el 1% o menos, de las cepas de los alimentos o del medio ambiente¹⁰.

Las enterotoxinas o toxinas ligadas a un cuadro diarreico, incluyen moléculas de naturaleza proteica termolábiles como, (1) la hemolisina BL (HBL) codificada por los genes *hblA*, *hblC* y *hblD*, (2) citotoxina K codificada por el gen *CytK* y que guarda similitud a la β -toxina producida por *C. perfringens* y (3) la enterotoxina no hemolítica (NHE) formada de tres diferentes genes codificantes como el *nhe A*, *nhe B* y *nhe C* incluidos en el operón *nhe*, siendo la expresión de todos los genes un producto biológicamente activo. Otros factores de virulencia son proteínas simples como la enterotoxina FM, enterotoxina bcET, fosfolipasa PI-PLC, enterotoxina S, esfingomielinasa, cereolisina (Clo), *InhA1*, *NprA* y *HlyII* ⁵. Las enterotoxinas son generadas una vez que se realiza la colonización del intestino delgado, formándose así poros en las membranas de las células epiteliales, resultando en un desequilibrio osmótico y promoviendo el proceso diarreico ¹². Las enterotoxinas diarreicas se pueden producir en el rango de temperatura de 10 a 43 °C, con un óptimo de 32 °C. La producción ocurre entre pH 5,5-10, con un pH óptimo de 8. Las enterotoxinas se inactivan a 56 °C durante 5 minutos ⁵.

Hasta el 26% de las células vegetativas de *B. cereus* pueden sobrevivir a condiciones que simulan el paso a través del estómago. La tasa de supervivencia de las células vegetativas depende de la cepa, tipo, fase de crecimiento celular vegetativo y pH gástrico. Las enterotoxinas son inestables a pH bajo y son degradadas por las enzimas digestivas, por lo cual, las enterotoxinas preformadas en los alimentos se destruirían durante el paso por el estómago y por lo tanto no causan enfermedades si se ingieren. Por el contrario, las esporas de *B. cereus* pueden atravesar la barrera gástrica sin verse afectadas. Las esporas contienen receptores que necesitan ser activados por ciertas sustancias de bajo peso molecular para comenzar la germinación. Estos inductores pueden estar presentes tanto en los alimentos como en las células epiteliales intestinales. En el intestino delgado las esporas germinan, crecen y producen enterotoxinas ¹³.

Cuadro 1: Condiciones óptimas para el crecimiento de *B. cereus* y la producción de toxinas

	Crecimiento bacteriano		Producción de toxina emética		Producción de enterotoxina	
	ÓPTIMO	RANGO	ÓPTIMO	RANGO	ÓPTIMO	RANGO
Temperatura (° C)	30-40	4-55	12-15	12-37	32	10-43
PH	6.0-7.0	4.9-10.0	-	-	8	5.5-10

5. EPIDEMIOLOGÍA

La ETA relacionada con *B. cereus* no es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayoría de los países y, por lo tanto, los datos de incidencia son extremadamente limitados. Existe una subnotificación

significativa de la enfermedad por *B. cereus* debido a que los síntomas generalmente son leves, de corta duración y autolimitados. El paciente generalmente no busca atención médica y la búsqueda de *B. cereus* en heces no es una práctica rutinaria en el laboratorio de bacteriología clínica. Por lo tanto, *B. cereus s.l.* se diagnostica muy raramente en casos esporádicos, generalmente es pesquisado e informado cuando es responsable de un brote.

Se estima que *B. cereus* es responsable del 1,4% al 12% de todos los brotes de ETA en todo el mundo ¹⁴. En la Unión Europea, las toxinas bacterianas (*Clostridium*, *Staphylococcus* y *B. cereus*) representaron el 17,7% (2016) y el 15,9% (2017) de todos los brotes registrados transmitidos por alimentos y agua, lo que los clasificó en segundo lugar detrás de *Salmonella* ¹⁵. El Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de los EE. UU estima que hay más de 63000 casos de enfermedad por *B. cereus* cada año en ese país, y que el 100% de los casos son ETAs ¹⁶. En el 2016, Colombia informó que *B. cereus* como uno de los principales agentes patógenos asociados con los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, especialmente por el queso y las verduras crudas en hogares y establecimientos educativos ¹². En Argentina, durante el período 2008-2013 ocurrieron 26 brotes asociados a *B. cereus* y 9 ocurrieron en 2011. En 2015, se informó un caso de intoxicación alimentaria grave en una mujer adulta sana asociada a una cepa hipervirulenta de *B. cereus*. Las cepas aisladas de la paciente y del alimento involucrado (pollo cocido) fueron altamente citotóxicas, y fueron positivas para los genes *hblA*, *hblB* y *hblC* del complejo HBL, *bceT*, *entS* y *ces* ¹⁷.

Si bien el aislamiento de *B. cereus s.l.* a partir de muestras de alimentos y clínicas es esencial para vincularlas a un posible brote transmitido por los alimentos, se necesita más información para demostrar definitivamente que el brote fue causado por esta bacteria. La enfermedad emética causada por miembros del grupo *B. cereus* se atribuye a la producción de la toxina cereulida. Debido a que esta toxina se produce dentro de la propia matriz del alimento antes del consumo, la mera presencia de cepas de *B. cereus s.l.* gen *ces* positivas no puede probar definitivamente que un brote fue causado por un miembro de este grupo. La presencia de cereulida en sí misma es esencial para vincular con alta confianza muestras clínicas y de alimentos con un brote. Sin embargo, no existe un método de referencia y de rutina para la detección de cereulida. Por lo tanto, no hay pruebas definitivas para confirmar que un brote haya sido causado por *B. cereus* emético y no por un patógeno similar transmitido por los alimentos (p. Ej., Enterotoxinas producidas por *S. aureus*, que se manifiestan en síntomas similares a los asociados con la cereulida. En estos casos, será indispensable demostrar la relación clonal de las cepas eméticas aisladas en muestras clínicas y en los alimentos y también contar con datos epidemiológicos sólidos que respalden la relación entre los aislamientos analizados ¹⁸.

Una amplia variedad de alimentos, que incluyen carnes, leche, verduras y pescado, se han asociado con la intoxicación alimentaria de tipo diarreico. Los brotes de tipo emético generalmente se han asociado

con productos de arroz; sin embargo, también se han implicado otros alimentos con almidón, papas, pasta y productos de queso. Las mezclas de alimentos, como salsas, budines, sopas, guisos, pasteles y ensaladas, con frecuencia se han relacionado con brotes de intoxicación alimentaria asociada a *B. cereus s.l.* ¹¹.

6. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Debido a la amplia distribución de *B. cereus s.l.* en los productos alimenticios, la bacteria se ingiere en pequeñas cantidades y se convierte en parte de la flora intestinal transitoria del ser humano. No está claro si la recuperación de *B. cereus* en cultivos de muestras de heces es función de la germinación de esporas o del crecimiento de células vegetativas ¹⁹.

La confirmación de *B. cereus* como agente etiológico en un brote transmitido por alimentos requiere:

- (1) aislamiento de cepas de *B. cereus s.l.* de los alimentos sospechosos y las heces o el vómito del paciente y demostrar su relación genética.
- (2) aislamiento de recuento mayor a 10^5 UFC/ml de *B. cereus s.l.* de alimentos sospechosos y determinación de su enterotoxigenicidad. El tiempo de inicio rápido de los síntomas en la forma emética de la enfermedad, junto con alguna evidencia alimentaria, a menudo es suficiente para diagnosticar este tipo de intoxicación alimentaria.
- (3) aislamiento de reciente mayor a 10^5 UFC/ml de *B. cereus s.l.* de dos o más personas enfermas y no del grupo control.

7. MUESTRAS CLÍNICAS

7.1 Tipo y toma de muestra

Heces: Las muestras de materias fecales deben recogerse por defecación espontánea y tan pronto como sea posible, durante la fase activa de diarrea previa al tratamiento antibiótico. Se recogen en un frasco estéril, de boca ancha y con tapa de rosca. Para cultivo de rutina 1-2 g de heces es suficiente. Si se toma más de una muestra por paciente el mismo día, las mismas deben unificadas en un pool. Para aislamiento de *B. cereus* no son aptos los hisopados.

Vómitos: Debe recogerse en un frasco estéril, de boca ancha y con tapa de rosca

7.2 Transporte

La muestra debe enviarse de inmediato, refrigerada y rotulada al laboratorio de microbiología.

Debe procesarse rápidamente, de lo contrario se debe mantener a 4 °C y estudiarse dentro de las 48 horas de recogida. Se puede conservar a -20 °C para la búsqueda posterior de antígenos o

toxinas bacterianas por técnicas inmunológicas o de cultivos celulares y también para la detección de sectores de genoma bacteriano por técnicas de biología molecular.

NOTA: Es importante enviar a los laboratorios de referencia correspondientes las muestras clínicas junto con el aislamiento o la muestra del alimento sospechoso. En Argentina, en caso de recibirse muestra de alimento, derivar al laboratorio de bromatología regional o al Instituto Nacional de Alimentos.

7.3 Procesamiento de la muestra

Características físicas: Registrar siempre si el espécimen es líquido, semisólido, sólido, con o sin mucus, con o sin sangre. Condiciones de bioseguridad: Nivel II

7.4 Pre-tratamiento de la muestra

Preparar una dilución 1:5 de las heces en PBS estéril o solución fisiológica estéril (mínimo 0.1g de heces en 0.5mL de PBS).

- Agregar igual volumen de etanol 95% v/v en agua destilada y agitar (se obtiene una dilución final 1/10).
- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
-

7.5 Recuento de viables *B. cereus*

- De esta dilución realizar dos diluciones seriadas 1/10.
- Tomar 0.5 ml y agregar 4.5 ml de PBS (dilución 1/100).
- De la dilución 1/100 tomar 0.5 ml y agregar 4.5 ml de PBS (dilución 1/1000).
- Sembrar 0.1 ml de las diluciones 1/100 y 1/1000 en agar MOSSEL preparado no más de 48 h antes.
- Incubar en aerobiosis a 35 °C por 18-24 h.
- Contar colonias sospechosas.

Colonia sospechosa: El diagnóstico primario y presuntivo de *B.cereus s.l.*, se basa en la morfología y color de la colonia, en la precipitación de la lecitina hidrolizada y en la no fermentación de manitol. (Figura 2)

Figura 2: Desarrollo de *B. cereus* en agar selectivo según MOSSEL



B.cereus s.l. presenta colonias de tamaño aproximado de 5 mm, rojas, rugosas y secas, con un halo de precipitación de la yema de huevo sobre fondo rosa-púrpura.

7.6 Informe de resultados

Si desarrollan más de 10 colonias en la dilución 1/1000 informar:

Recuento $>10^5$ UFC/g

8. PREPARACIÓN DEL MEDIO SELECTIVO PARA AISLAMIENTO DE *B. CEREUS* SEGÚN MOSSEL

Medio Base

Peptona de carne	10 g
Extracto de carne	1 g
Manitol	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Solución de Rojo de fenol	2.5 ml
Agar	15 g
Agua destilada	900 ml

- Disolver los ingredientes y calentar agitando frecuentemente en baño maría.
- Ajustar el pH a 7.2 + 0.2 si fuera necesario.
- Fraccionar 225 ml de medio base en frascos de 500 ml.
- Autoclavar 121 °C por 15 minutos.

- Pueden utilizarse formulaciones comerciales

Solución de Rojo de fenol

Rojo de fenol	1 g
Etanol 95%	100 ml

Solución de polimixina B

Polimixina B	500000 U
Agua destilada	50 ml

- Esterilizar por filtración. Almacenar a 4 °C en oscuridad.

Emulsión de yema de huevo al 50%

Utilizar huevos frescos de gallina. Lavar los huevos con un cepillo rígido y escurrir. Remojar los huevos 1 hora en etanol al 70%. Escurrir el etanol. Romper los huevos asépticamente y desechar las claras. Retirar las yemas de huevo con una jeringa estéril o una pipeta de boca ancha. Colocar las yemas en un recipiente estéril y mezclar asépticamente con un volumen igual de solución salina estéril al 0,85%. Conservar a 4 °C hasta su uso. La emulsión de yema de huevo (50%) está disponible comercialmente.

Medio completo

Medio base	90 ml
Solución de Polimixina B	1 ml
Emulsión de yema de huevo	10 ml

Fundir el agar base y enfriar en baño de agua a 45 - 50 °C. y agregar los otros ingredientes agitando continuamente.

- Preparación de las placas de Petri: Transferir 15 - 20 ml del medio completo en placas de Petri y solidificar.
- Las placas pueden guardarse a 3 °C ± 2 °C hasta 4 días. Antes de ser usadas, secar las placas en estufa entre 25 °C y 50 °C, preferentemente sin la tapa y con la superficie del agar hacia abajo hasta que la misma esté seca.

Control de Calidad

MICROORGANISMO	DESARROLLO	COLOR COLONIA	PRECIPITADO (lecitinasa)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 o equivalente	+	rojo	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 o equivalente	+	amarillo	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 o equivalente	+	amarillo	+ ⁽¹⁾
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 o equivalente	-		

⁽¹⁾ *S. aureus*, *Serratia marcescens* y *Proteus vulgaris* pueden desarrollar en el medio de cultivo, pero se diferencian de *B. cereus* por la forma y el color de la colonia, y porque producen una reacción de aclaramiento sobre la yema de huevo, a diferencia del precipitado que produce *B. cereus*.

9. IDENTIFICACIÓN

Seleccionar las colonias rojas con halo de precipitado y sub-cultivar en agar sangre para observar hemólisis. Realizar un extendido para coloración de gram. Bacilos positivos grandes, (puede o no observarse esporulación) que producen lecitinasa, son criterios suficientes para la identificación presuntiva como *Bacillus* grupo *cereus*. MALDITOF-MS identifica correctamente el grupo *B. cereus*, pero no discrimina entre las especies. En estos casos, informar *B. grupo cereus*. Es probable obtener identificación como *B. anthracis*, en estos casos, recordar que esta especie no es hemolítica, es inmóvil y sensible a la penicilina.

10. AISLAMIENTO A PARTIR DEL ALIMENTO

El análisis de *B. cereus* en muestras de alimentos se realiza por medio de la técnica de recuento en placa según el procedimiento descrito en la norma ISO 7932:2004. El procedimiento detallado está disponible en el Manual de Procedimientos de la Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (ReNaLOA) coordinada por el Instituto Nacional de Alimentos, INAL-ANMA. Disponible en:

http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_II.pdf

11. SUBTIPIFICACIÓN

Cuando sea necesario caracterizar aislamientos epidemiológicamente relacionados, es importante investigar el perfil toxigénico.

A continuación, se describen ensayos de PCR para la detección de las toxinas diarreigénicas.

11.1. PCR para detección de enterotoxina HBL

El HBL está formado por tres subunidades proteicas L1, L2 y B codificadas cada una por un gen (*hblC*, *hblD* y *hblB* respectivamente). A continuación, se describe un protocolo de PCR dúplex para detectar las subunidades L1 y L2 y una PCR simple para la subunidad B. Ambas tienen el mismo programa de ciclado. Los productos de amplificación se analizan en un gel de agarosa al 1.5%. Los amplicones esperados se muestran en la figura 3. Los tres genes deben estar presentes para que la enterotoxina sea activa. Los aislamientos informados HBL positivos, amplifican las tres subunidades.

Cebadores

Cebadores	Secuencia ⁽¹⁾	Concentración solución de trabajo
L1a	5' ATA TTC ACC TTA ATC AAG AGC TGT CAG G 3'	10 picomoles/microlitro
L1b	5'CCA GTA AAT CTG TAT AAT TTG CGC CC 3'	
L2a	5'TAT CAA TAC TCT CGC AAC ACC AAT CG 3'	
L2b	5'GTT TCT CTA AAT CAT CTA AAT ATG CTC GC 3'	
B1f	5'ACG AAC AAT GGA GAT ACG GC 3'	
B2r	5'TTG GTA GAC CCA AAA TAG CAC C 3'	
⁽¹⁾ Wijnands <i>et al.</i> (2002) RIVM report 250912002/2002 https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912002.pdf		

PCR L1 L2

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
Buffer Taq 10X	2.5
MgCl ₂ 50mM	0.85
Cebador L1a (10pm/ul)	0.5
Cebador L1b (10pm/ul)	0.5
Cebador L2a (10pm/ul)	0.25
Cebador L2b (10pm/ul)	0.25
dNTPs 2.5 mM	2
Taq 5U/ul	0.52
Agua	16.63

ADN templado	1
Volumen final	25

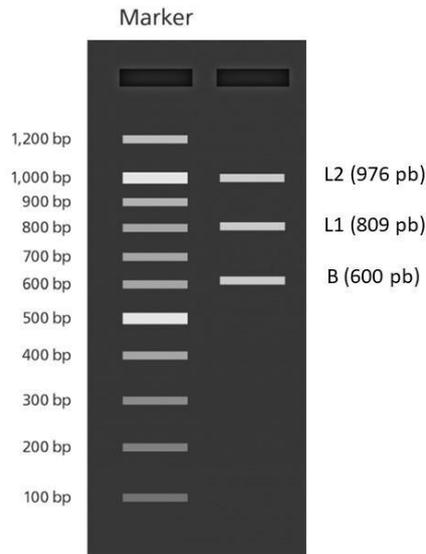
PCR B

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
Buffer Taq 10X	2.5
MgCl ₂ 50mM	0.85
Cebador B1 f (10pm/ul)	0.75
Cebador B2 r (10pm/ul)	0.75
dNTPs 2.5 mM	2
Taq 5U/ul	0.52
Agua	16.63
ADN templado	1
Volumen final	25

PROGRAMA DE CICLADO

94 °C	3 minutos	1 ciclo
94 °C	1 minuto	2 ciclos
64 °C	1 minuto	
72 °C	3 minutos	
94 °C	1 minuto	2 ciclos
62 °C	1 minuto	
72 °C	3 minutos	
94 °C	1 minuto	2 ciclos
60 °C	1 minuto	
72 °C	3 minutos	
94 °C	1 minuto	2 ciclos
58 °C	1 minuto	
72 °C	3 minutos	
94 °C	1 minuto	2 ciclos
56 °C	1 minuto	
72 °C	3 minutos	
94 °C	1 minuto	30 ciclos
54 °C	1 minuto	
72 °C	1 minuto	
72 °C	10 minutos	1 ciclo

Figura 3: Tamaño de los productos de amplificación esperados para un aislamiento HBL positivo



11.2. PCR para detección de enterotoxina NHE

El NHE está formado por tres subunidades proteicas: A, B y C cada una codificada por un gen (*nheA*, *nheB* y *nheC* respectivamente) Los tres genes deben estar presentes para que la enterotoxina NHE sea activa. Se realiza una PCR doble para detectar los genes que codifican las subunidades A y B y una PCR simple para la subunidad C. Los aislamientos informados positivos amplificaron las tres subunidades. Los amplicones esperados se muestran en la figura 4.

Cebadores

Cebadores	Secuencia ⁽¹⁾	Concentración solución de trabajo
A f	5'GCT CTA TGA ACT AGC AGG AAA C 3'	10 picomoles/micro litro
A r	5'GCT ATT TAC TTG ATC TTC AAC G 3'	
B f	5'CGG TTC ATC TGT TGC GAC AGC 3'	
B r	5'GAT CCC ATT GTG TAC CAT TGG 3'	
C f	5'CCT TAT AAA GAG AAT AGG TG 3'	
C r	5'CGA CTT CTG CTT GTG CTC CTG 3'	

⁽¹⁾ Wijnands *et al.* (2002) RIVM report 250912002/2002
<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912002.pdf>

PCR BC

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
Buffer Taq 10X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
Cebador B f (10pm/ul)	1.5
Cebador B r (10pm/ul)	1.5
Cebador C f (10pm/ul)	1.5
Cebador C r (10pm/ul)	1.5
dNTPs 2.5 mM	4
Taq 5U/ul	0.5
Agua	31
ADN templado	2
Volumen final	50

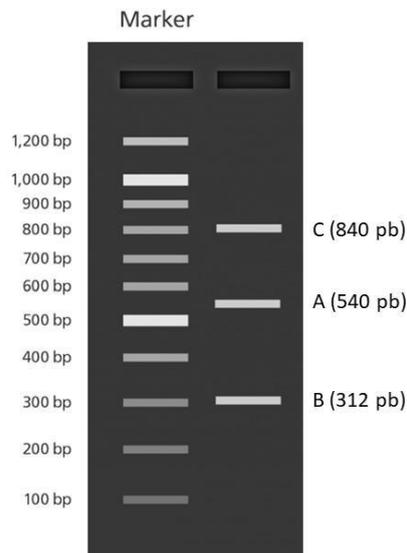
PCR A

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)
Buffer Taq 10X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
Cebador B1 f (10pm/ul)	3
Cebador B2 r (10pm/ul)	3
dNTPs 2.5 mM	4
Taq 5U/ul	0.5
Agua	31
ADN templado	2
Volumen final	50

PROGRAMA DE CICLADO

94 °C	3 minutos	1 ciclo
94 °C	1 minuto	30 ciclos
48 °C	1 minuto	
72 °C	1 minuto	
72 °C	5 minutos	1 ciclo

Figura 4: Tamaño de los productos de amplificación esperados para un aislamiento NHE positivo



Existen equipos de inmunoensayos comerciales que pueden detectar complejos NHE y HBL en el sobrenadante del cultivo de *B. cereus*: inmunoensayo visual de enterotoxina diarreica de *Bacillus* (BDE VIATM) (3M Tecra), test de aglutinación pasiva de látex reversa de enterotoxina de *B. cereus* (BCET-RPLA) (Oxoid) y el equipo Duopath® *Cereus* (Merck).

La detección de enterotoxinas NHE y HBL proporciona un indicador de la toxicidad de una cepa, pero no es suficiente para discriminar totalmente entre cepas potencialmente patógenas y no patógenas. De hecho, varios estudios han demostrado que la producción de NHE por cepas patógenas es variable y que las cepas no patógenas también pueden producirlo en grandes cantidades ¹⁰.

11.3. Detección de toxina emética o cereulida

Se han descrito PCR para el tamizaje de cepas portadoras del gen *ces*, pero una amplificación positiva no confirma la presencia de toxina. También se realizan ensayos de citotoxicidad en células Hep-2, sin embargo, la calibración del ensayo es compleja. No existe un método de rutina para la detección de cereulida en el laboratorio de microbiología clínica. Por lo tanto, para confirmar que un brote haya sido causado por *B. cereus* emético será indispensable demostrar la relación clonal de las cepas eméticas aisladas en muestras clínicas y en los alimentos y también contar con datos epidemiológicos sólidos que respalden la relación entre los aislamientos analizados.

En el año 2017, se publicó la norma EN-ISO 18465 que describe el análisis cuantitativo de la toxina emética cereulida en productos destinados para el consumo humano, mediante el uso de

cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UHPLC) conectadas en tándem a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS). Sin embargo, esta metodología es compleja y está disponible principalmente en laboratorios analíticos especializados.

11.4. Subtipificación molecular

La técnica RAPD-PCR es una herramienta valiosa y ampliamente utilizada para la tipificación molecular de *Bacillus* spp. Sin embargo, a diferencia de otros métodos de tipificación molecular, como la tipificación de secuencia multilocus (MLST), la reproducibilidad de los datos entre laboratorios causa dificultades, por lo cual, el MLST gradualmente se convirtió en el "estándar de oro" durante los últimos años.

La macro-restricción de ADN y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se utiliza como uno de los métodos de tipificación más importantes para un amplio campo de patógenos transmitidos por los alimentos, especialmente para estudios epidemiológicos en situaciones de brotes. PFGE se puede utilizar para la tipificación de *B. cereus*, sin embargo, la red PulseNet International, una red para rastrear infecciones transmitidas por alimentos en todo el mundo, no proporciona un protocolo estandarizado para la tipificación molecular de *B. cereus* hasta el momento^{20,21}.

12. Resistencia a los antibióticos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas con cepas del grupo de *B. cereus* rara vez necesitan ser tratadas con antibióticos. Sin embargo, no se ha investigado bien en qué grado las cepas del grupo *B. cereus* pueden servir como fuente de genes transferibles de resistencia a antibióticos en la cadena alimentaria.

Las especies del grupo de *B. cereus* muestran resistencia a varios antibióticos. La resistencia más común es contra antibióticos b-lactámicos debido a la presencia de b-lactamasas en casi todas las cepas de todas las especies del grupo, con la notable excepción de *B. anthracis*. Aunque esta especie porta genes de b-lactamasa bla1 y bla2, su expresión está reprimida, lo que resulta en su susceptibilidad a los b-lactámicos. La mayoría de los miembros del grupo *B. cereus* son resistentes al co-trimoxazol aunque con niveles variables dependiendo de las cepas. De manera similar, la resistencia a la fosfomicina está muy extendida. Hasta el 60% de las cepas del grupo *B. cereus* presentan resistencia a clindamicina, 10/30% a tetraciclina y aproximadamente un 10% es resistente a levofloxacina. La resistencia a la vancomicina y a la eritromicina son infrecuentes. Estas bacterias son generalmente susceptibles a tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina e imipenem. La concentración inhibitoria

mínima (CIM) a los antibióticos debe investigarse por el método de microdilución en caldo. Los puntos de corte para ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, imipenem, vancomicina, amicacina, gentamicina, eritromicina, levofloxacina, clindamicina, cloranfenicol y rifampicina se detallan en el documento M45A2E del CLSI. Para otros antibióticos, se utilizan los puntos de corte para *S. aureus* del documento M 100-S22 del CLSI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parte AC, Sardá Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC and Göker M (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70: 5607-5612. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332
2. Carroll LM, Cheng RA, Wiedmann M, Kovac J (2021). Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 3:1-26. DOI: 10.1080/10408398.2021.1916735.
3. Park KM, Kim HJ, Kim MS, Koo M (2021). Morphological Features and Cold-Response Gene Expression in Mesophilic *Bacillus cereus* Group and Psychrotolerant *Bacillus cereus* Group under Low Temperature. *Microorganisms*, 9(6):1255. DOI: 10.3390/microorganisms9061255
4. Glasset B, Herbin S, Granier SA, Cavalié L, Lafeuille E, Guérin C, Ruimy R, Casagrande-Magne F, Levast M, Chautemps N, Decousser JW, Belotti L, Pelloux I, Robert J, Brisabois A, Ramarao N (2018). *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLoS One*, 13(5):e0194346. DOI: 10.1371/journal.pone.0194346.
5. Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*, 32(4):579-606. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112. x.
6. Colaco CMG, Basile K, Draper J, Ferguson PE (2021). Fulminant *Bacillus cereus* food poisoning with fatal multi-organ failure. *BMJ Case Rep*, 14(1): e238716. DOI: 10.1136/bcr-2020-238716.
7. Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, et al. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol*, 43(8):4277-4279. DOI:10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005.
8. Logan NA (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol*, 112(3):417-29. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05204. x.
9. Ehling-Schulz M, Fricker M, Grallert H, Rieck P, Wagner M, Scherer S (2006). Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol*, 6:20. DOI: 10.1186/1471-2180-6-20.
10. Ramarao N, Tran SL, Marin M, Vidic J. (2020) Advanced Methods for Detection of *Bacillus cereus*

- and Its Pathogenic Factors. *Sensors* (Basel). 20(9):2667. DOI:10.3390/s20092667
11. Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, (2017) 2nd ed, US Food and Drug Administration, Silver Spring, p. 93–96. <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>.
 12. Cortés Sánchez AJ, Guzmán Medina CA, Díaz Ramírez M (2018). About *Bacillus cereus* and food safety (a review). *Rev Cienc* [online]., vol.22, n.1, pp.93-108. <https://doi.org/10.25100/rc.v22i1.7101.c>.
 13. Wijnands LM, Pielaat A, Dufrenne JB, Zwietering MH, van Leusden FM (2009). Modelling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach. *J Appl Microbiol*, 106:258–267
 14. Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märtlbauer E, Granum PE (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins* (Basel), 13(2):98. DOI:10.3390/toxins13020098.
 15. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA J*. 2019, 17, e05926.
 16. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17(1):7-15. DOI:10.3201/eid1701.p11101
 17. López AC, Minnaard J, Pérez PF, Alippi AM (2015). A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. *Food Microbiol*, 46:195-199. DOI: 10.1016/j.fm.2014.08.005. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25475284.
 18. Carroll LM, Wiedmann M, Mukherjee M, Nicholas DC, Mingle LA, Dumas NB, Cole JA, Kovac J (2019). Characterization of Emetic and Diarrheal *Bacillus cereus* Strains from a 2016 Foodborne Outbreak Using Whole-Genome Sequencing: Addressing the Microbiological, Epidemiological, and Bioinformatic Challenges. *Front Microbiol*, 10:144. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00144.
 19. Bottone EJ (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 23(2):382-98. DOI: 10.1128/CMR.00073-09.
 20. Kovac J (2019). Characterization of Emetic and Diarrheal *Bacillus cereus* Strains From a 2016 Foodborne Outbreak Using Whole-Genome Sequencing: Addressing the Microbiological, Epidemiological, and Bioinformatic Challenges. *Front Microbiol*, 10:144. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00144. PMID: 30809204; PMCID: PMC6379260.
 21. Ehling-Schulz M, Messelhäusser U. (2013) *Bacillus* "next generation" diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front Microbiol*. 2013 Feb 22; 4:32. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00032.
 22. Fiedler G, Schneider C, Igbinosa EO, Kabisch J, Brinks E, Becker B, Stoll DA, Cho GS, Huch M, Franz

CMAP. (2019) Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. BMC Microbiol. 9;19(1):250. DOI : 10.1186/s12866-019-1632-2.