



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“DIVERSIDAD GENÉTICA Y PERFIL TOXIGÉNICO DE CEPAS DEL GRUPO *Bacillus cereus* AISLADAS DE ALIMENTOS COMERCIALIZADOS EN EL ESTADO DE GUERRERO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

NÉSTOR ARROYO AYALA

Director de tesis: Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Codirector de tesis: Dr. Arturo Ramírez Peralta

Chilpancingo, Gro., noviembre de 2014.

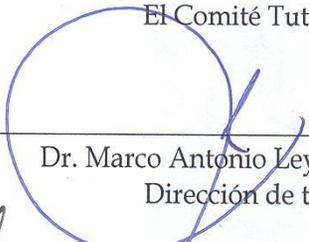


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 30 días del mes de junio de dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **“Diversidad genética y perfil toxigénico de cepas del grupo *Bacillus cereus* aisladas de alimentos comercializados en el estado de Guerrero”**, presentada por el alumno Néstor Arroyo Ayala, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

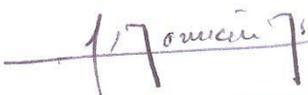
El Comité Tutorial



 Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
 Dirección de tesis



 Dr. Eduardo Castañeda Saucedo



 Dr. Adolfo Román Román



 Dra. Natividad Castro Alarcón



 Dr. Luis Arturo Bello Pérez



 Dra. Isela Parra Rojas
 Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 **UAGro**
 Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas


 Dra. Amalia Vences Velázquez
 Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la Ciudad de Chilpancingo, Gro.

Bajo la dirección de:

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

y coordinación de:

Dr. Arturo Ramírez Peralta

y

la asesoría de:

Dra. Natividad Castro Alarcón

Dr. Adolfo Román Román

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Luis Arturo Bello Pérez.

Esta investigación fue financiada con beca para el estudiante por el CONACyT durante dos años, la cual es otorgada a estudiantes inscritos en posgrados afiliados al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad.

Agradecimientos

Para quien no hay imposibles, **Dios**, gracias por darme la sabiduría y fortaleza para superar este peldaño en mi formación académica.

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, por todo su apoyo durante el transcurso de la maestría, por la confianza que depositó en mí para realizar este proyecto y por brindarme su amistad. Sinceramente gracias.

Dr. Aturo Ramírez Peralta, por brindarme su apoyo y conocimientos para la realización de este proyecto, por permitirme no solo ser su asesorado si no también su amigo y por enseñarme que siempre hay tiempo para un experimento más!!!
Gracias "Doc".

Dra. Natividad Castro Alarcón, Dr. Adolfo Román Román, Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, Dr. Luis Arturo Bello Pérez y Dra. Ma. Elena Moreno Godínez, por sus aportaciones durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

QBP. Natividad Sales, M. en C. Alinne Rivas y QBP. Josué Feliciano, (responsables del Laboratorio de Biomedicina Molecular) por las facilidades y apoyo técnico brindado para la realización de este proyecto.

Ismene Toledo (mi hermanita académica), por tu amistad incondicional gracias. Es un honor ser tu amigo.

Rocío Romero, por estar presente en esta etapa de mi vida y no desesperar!
Gracias peque.

A mis compañeros de la generación de maestría 2012-2014.

A todos y cada una de las personas que de forma directa o indirecta ayudaron en el desarrollo este proyecto.

Néstor Arroyo Ayala.

Con infinito amor a
Irene y Néstor, mis padres
Edgar y Alfredo, mis hermanos

Diversidad genética y perfil toxigénico de cepas del grupo *Bacillus cereus* aisladas de alimentos comercializados en el estado de Guerrero

ÍNDICE

Página

I. RESUMEN.	1
II. ABSTRACT.	2
III. INTRODUCCIÓN.	3
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	5
VI. RESULTADOS.	9
VI. DISCUSIÓN.	15
VII. CONCLUSIONES.	22
VIII. REFERENCIAS.	23

I. RESUMEN

Las especies del grupo *Bacillus cereus* son un conjunto de microorganismos esporulados ampliamente distribuidas en el ambiente, algunas de estas especies han sido descritas como causantes de intoxicación alimentaria de tipo emética y/o diarreica en diferentes regiones del mundo. En México, la frecuencia de brotes de intoxicación alimentaria es elevada, sin embargo, la identificación de los agentes etiológicos de dichos brotes es limitada, es por ello, que en el presente estudio se determinó la frecuencia y perfil toxigénico de cepas del grupo *B. cereus* en alimentos comercializados en la Ciudad de Chilpancingo Guerrero, ubicada al suroeste de México.

Se analizaron 400 muestras de 6 diferentes grupos de alimentos (Alimentos ricos en almidón, alimentos listos para su consumo, Frutas y vegetales crudos, Especias, Lácteos, Cárnicos). El 21% (84/400) de los alimentos analizados estaban contaminados con cepas del grupo *B. cereus* (en fase vegetativa y esporas), en algunas muestras con más de una especie de este grupo, aislándose en total 92 cepas bacterianas.

En las 92 cepas aisladas se determinó la presencia de genes codificantes de toxinas diarreogénicas (Hbl, Nhe y CytK) y toxina emética (Cerulida). El 83% (76/92) de las cepas presentaban genes codificantes de toxinas. Los genes de las toxinas diarreogénicas Nhe, Hbl y CytK fueron más prevalentes entre las cepas; con un 63%, 51 y 24% respectivamente, en tanto que el gen de la toxina Cerulida solo fue identificado en una de las cepas.

Estos resultados sugieren que el 83% de las cepas aisladas pueden potencialmente expresar toxinas diarreogénicas, y de ser consumidas en inóculos de tamaño considerables, causar intoxicación alimentaria.

II. ABSTRACT

Species of the *Bacillus cereus* group is a set of sporulated microorganisms widely distributed in the environment, some of these species have been reported to cause emetic type food poisoning and / or diarrhea in different world regions. In Mexico, frequency of outbreaks of food poisoning is high, however, the identification of etiologic agents of these outbreaks is limited. In this study the frequency and profile toxigenic of *B.cereus* group strains was determined in food market in the city of Chilpancingo, Guerrero, in southwestern Mexico.

We analyzed 400 samples of 6 different food groups (starchy foods, ready-to-eat foods, raw fruits and vegetables, spices, dairy, meat) in 21% (84/400) of the food samples were contaminated with *B. cereus* group strains (vegetative and spores) in some samples with more than one species of this group, isolating total 92 bacterial strains.

In the 92 isolates the presence of genes encoding toxins diarrheagenic (Hbl, Nhe and CytK) and emetic toxin (Cerulide) was determined. 83% (76/92) of the strains had genes encoding toxins. The genes of diarrheagenic toxin Nhe, Hbl and CytK were more prevalent among strains; with 63% 51 and 24% respectively, while the toxin gene Cerulide was only identified in one strain.

These results suggest that 83% isolates can potentially express diarrheagenic toxins, and to be consumed in substantial inoculum size cause food poisoning.

III. INTRODUCCIÓN.

El grupo *Bacillus cereus* está formado por 6 especies bacterianas estrechamente relacionadas entre sí: *Bacillus cereus* sensu stricto, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus weihentephanensis* (Vilas *et al.*, 2007). Este grupo de bacilos Gram positivos formadoras de esporas tiene una amplia distribución en el ambiente, materia orgánica en descomposición, cuerpos de agua dulce o salada, fómites y de manera natural en el tracto intestinal de organismos invertebrados; de estos reservorios pueden contaminarse los alimentos que al ser ingeridos colonizan el intestino humano (Logan, 2011).

Algunas especies del grupo *B. cereus* pueden producir intoxicación alimentaria por la producción de diferentes toxinas, la cerulida, es una toxina termo estable resistente al pH ácido y a proteasas, constituida por cuatro aminoácidos y/o oxiácidos [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val] que forman un complejo cíclico (dodecadepsipeptido) (Arnesen *et al.*, 2008). Esta toxina causa la estimulación del nervio vago aferente a través de la unión al receptor 5-HT₃ de serotonina, originando el síndrome emético el cual es caracterizado por náuseas y vómito. Los principales alimentos relacionados son arroz, pastas y productos lácteos. La presencia de la toxina preformada en el alimento es suficiente para causar la enfermedad (Delbrassinne *et al.*, 2012; Dommel *et al.*, 2010).

En contraste, las toxinas diarreogénicas, como la hemolisina BL (Hbl), enterotoxina no hemolítica (Nhe) y citotoxina K (CytK) son producidas durante el crecimiento vegetativo de la bacteria en el intestino delgado (Ramarao *et al.*, 2013). Las enterotoxinas Hbl y Nhe están constituidas por tres subunidades; L2, L1 B y NheA, NheB, NheC respectivamente, en tanto que la citotoxina K (CytK) se constituye por una sola proteína miembro de la familia de barriles β (Bottone, 2010). Las tres toxinas tienen actividad lítica contra enterocitos, el mecanismo se desconoce con precisión, sin embargo, se sugiere la formación de poros en la membrana lipídica de las células, lo que conduce a una lisis osmótica (Tsilia *et al.*, 2012).

Recientemente, se ha reportado una alta frecuencia de aislamiento de cepas toxigénicas del grupo *B. cereus* en diferentes grupos de alimentos, incluidos alimentos ricos en almidón (arroz y papa), vegetales crudos o mínimamente cocidos, lácteos, productos cárnicos y alimentos listos para su consumo (Samapundo *et al.*, 2011; Chon *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). Estos alimentos han adquirido gran interés por parte de organizaciones encargados de procurar la inocuidad alimentaria, debido al nulo o débil procesamiento térmico a los cuales son sometidos, estos procesamientos inactivan la flora bacteriana vegetativa, sin embargo, permiten la sobrevivencia de esporas bacterianas (Guinebretiere *et al.*, 2002). Estas esporas al no existir flora competitiva pueden germinar y sintetizar toxinas diarreogénicas o eméticas en el alimento, a la par, las esporas pueden resistir la acción de las proteasas y el pH ácido del estómago y llegar hasta el intestino delgado, donde pueden germinar, crecer y producir enfermedades por la producción de toxinas in situ (Ceuppens *et al.*, 2012).

Las enfermedades atribuidas a alimentos contaminados por especies del grupo *B. cereus* generalmente ocurren cuando cepas toxigénicas se multiplican y alcanzan alrededor de 10^4 a 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC), sin embargo, debido a la gran variabilidad de las dosis infectivas así como a la producción de toxinas y la formación de esporas, no es posible descartar el riesgo de inóculos de menor tamaño (Logan, 2011).

En Estados Unidos de América, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, siglas en inglés) calculan más de 63 000 casos de intoxicación alimentaria causados por *B. cereus* anualmente (Scallan *et al.*, 2011) a su vez, en países como Noruega, Finlandia, Hungría *B. cereus* ha sido descrito como causante de enfermedades gastrointestinales (síndrome diarreico) en tanto que en países como China, Japón y Bélgica, es asociado al síndrome emético. (Granum *et al.*, 1997).

En México, anualmente se reportan más de 40 000 casos de intoxicación alimentaria, sin embargo, el agente etiológico de estos casos no es identificado en la mayoría de las veces (SSA-SINAVE, 2010).

Por ello, este trabajo contribuirá conocer la frecuencia de contaminación en los alimentos analizados por cepas de *B. cereus* y a identificar las cepas toxigénicas de *B. cereus*, las cuales, al ser consumidas podrían potencialmente ser causantes de brotes de intoxicación alimentaria.

El objetivo principal de este estudio fue determinar la frecuencia, diversidad genética y potencial toxigénico de cepas de *B. cereus* presentes en diferentes tipos de alimentos comúnmente consumidos y comercializados en el Estado de Guerrero, México.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Alimentos analizados.

Se analizaron 400 muestra de 6 diferentes grupos de alimentos para conocer la presencia, replicación y transmisión de *B. cereus* y/o toxinas y que además no fuera necesario someterlos a procesos de cocción; alimentos ricos en almidón (n=66), frutas y vegetales crudos (n=66), especias (n=66), lácteos (n=66), cárnicos (n=69), alimentos listos para su consumo (n=67). Las muestras se incluyeron solo si se encontraban dentro de su fecha de caducidad. Las muestras se colectaron en el periodo de abril de 2013 a marzo de 2014 en diferentes puntos de venta de la Ciudad de Chilpancingo, Guerrero.

Aislamiento de cepas del grupo *B. cereus*.

El aislamiento e identificación de las cepas del grupo *B. cereus* se realizó por el método de recuento de colonias a partir de lo establecido en la ISO 7932: 2004.

Se homogenizaron 10 g de la muestra a analizar con 90 ml de solución salina 0.9%. Se realizaron diluciones seriadas hasta dilución 1^{-5} , de estas se seleccionaron 3 diluciones consecutivas, y se inocularon 100 μ L en agar manitol yema de huevo y polimixin (MYP) por estría masiva. Las placas se incubarán a 30 °C por 24 a 48 h.

Las cepas presuntivas *B. cereus* se identificaron como colonias rosas opacas (manitol negativo) rodeadas de un halo de precipitación por la producción de lecitinasa. A estas cepas se les aplicará pruebas de hemólisis en agar sangre de carnero al 5% para confirmar identificación. La diferenciación entre *B. cereus* y *B. mycoides* se realizó por discriminación de morfología colonial. La diferenciación entre *B. cereus* y *B. thuringiensis* se realizó mediante la detección del gen de la toxina cristalizable (*cry*) por PCR de punto final, utilizando los iniciadores y condiciones de reacción descritas por Mendoza *et al.*, (2012).

Los aislamientos fueron conservados en caldo BHI con 20% de glicerol por congelación directa con hielo seco y almacenados a -80 °C hasta su posterior análisis.

Determinación de esporas totales en alimentos.

La determinación de la presencia de esporas se realizó a la par del procesamiento de las muestras. De la dilución inicial 10^{-1} , se depositaron 4 mL en un tubo estéril, el cual es puesto en baño metabólico a 80 °C por 10 minutos con la finalidad de inactivar la flora vegetativa presente, posteriormente, se inoculan 100 uL de la dilución por estría masiva, en una placa de agar MYP y en una placa de agar soya tripticasa, se incuban a 30 °C por 24 h para observar la morfología colonial característica de las especies del grupo *B. cereus*.

Capacidad psicrófila de especies del grupo *B. cereus*.

Las cepas del grupo *B. cereus* aisladas, se inocularon por separado en agar sangre de carnero al 5%, y se incubaron a 7 °C durante 21 días. El crecimiento visiblemente identificable se tomó como positivo a psicrófilia.

Detección de genes de toxinas diarreogénicas y toxina emética.

Para la búsqueda de los genes codificantes de las toxinas Nhe, Hbl, CytK, Ces, Cry, se utilizó la PCR en punto final con los iniciadores y las condiciones de amplificación descritas en el cuadro 1. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 14579 de *B. cereus*, la cual presenta los genes de las toxinas, Nhe, Hbl, CytK y cerulida.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2% a 90V durante 45 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV.

Programa de ciclaje; desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 40 °C por 1 min, 60° durante un minuto y para una extensión final, 65 °C por 5 min. Se realizó electroforesis en geles de agarosa 2% a 90V durante 45 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Para establecer las distancias genéticas de los perfiles se calculó el coeficiente de similitud de Dice. La matriz de distancias genéticas se analizó por el método UPGMA (siglas en inglés de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Se elaboró un dendrograma con los datos analizados utilizando el paquete BioNumerics 7.1 (Applied Maths Inc, US).

Análisis estadístico.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS 19.0 para la elaboración de la base de datos y análisis estadístico. Para variables cualitativas nominales se reportaron frecuencias simples y se analizaron con la prueba de Ji cuadrada de independencia. Estableciendo relación entre las variables tipo de alimento y contaminación por cepas del grupo *B. cereus*, hidrólisis de almidón y psicrofilia. Para determinar relación entre las variables porcentaje de hemólisis y presencia de genes codificantes de toxinas, se aplicó la prueba de Correlación de Pearson la cual es utilizada para determinar relación en variables cuantitativas.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ en ambas pruebas.

V. RESULTADOS.

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

Se analizaron 400 muestras de diferentes grupos de alimentos, en el 21% (84/400) de las muestras se detectó presencia de microorganismos del grupo *B. cereus*, en algunas de las muestras se aislaron 2 especies diferentes del grupo *B. cereus*, aislándose en total 92 cepas.

La mayor frecuencia de contaminación se observó en las especias 41%, seguido por las frutas y vegetales crudos y productos lácteos con un 29 y 23% respectivamente. En los alimentos listos para su consumo y alimentos ricos en almidón la frecuencia fue menor al 20%. En los productos cárnicos únicamente 2 muestras presentaron contaminación por cepas del grupo *B. cereus* (Cuadro 2).

En las 84 muestras positivas, se demostró la presencia de esporas así como de células vegetativas, en un rango entre 10 a >10,000 UFC/g. El 33% (28/84) de las muestras presentaron contaminación con menos de 1000 UFC/g, 49% (41/84) de las muestras dentro del rango de 1000 a 10,000 UFC/g y el 18% (15/84) de las muestras restantes presentaron más de 10,000 UFC/g de alimento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de contaminación de alimentos con cepas del grupo *B. cereus*.

Tipo de alimento	Muestras analizadas	Muestras positivas	p	Muestras con cepas del grupo <i>B. cereus</i> n (%)		
	n	n (%)		<1000 UFC g ⁻¹	1000- 10,000 UFC g ⁻¹	> 10,000 UFC g ⁻¹
Ricos en almidón	66	10 (15)	0.025	2 (20)	6 (60)	2 (20)
Frutas y vegetales crudos	65	19 (29)		8 (42)	9 (47)	2(11)
Especias	66	27 (41)		12 (44)	14 (52)	1 (4)
Lácteos	68	15 (23)		4 (27)	5 (33)	6 (40)
Cárnicos	69	2 (3)		0	2 (100)	0
Listos para su consumo	66	11 (17)		2 (18)	5 (46)	4 (36)

Nota. p: Prueba de X².

Tras la diferenciación de las 92 cepas del grupo *B. cereus*, se identificaron 74 (80%) cepas de la especie *B. cereus sensu stricto*, 6 (7%) cepas de *B. thuringiensis* y 12 (13%) cepas de *B. mycoides*. Al agrupar por alimento se encontró que las cepas de *B. thuringiensis* y *B. mycoides* solo se encontraron en alimentos ricos en almidón; frutas y vegetales crudos y en especias (cuadro 3).

Cuadro 3. Cepas del grupo *B. cereus* por tipo de alimento.

Tipo de alimento	Cepas de <i>B. cereus</i>	Cepas de <i>B. mycoides</i>	Cepas de <i>B. thuringiensis</i>	Total	p
Ricos en almidón	9	4	1	14	0.114
Cárnicos	2	0	0	2	
Listos para su consumo	11	0	0	11	
Lácteos	15	0	0	15	
Frutas y vegetales crudos	14	4	3	21	
Espicias	23	4	2	29	
Total	74	12	6	92	

Nota. p: Prueba de χ^2 .

Capacidad psicrófila e hidrólisis de almidón por cepas del grupo *B. cereus*.

Se determinó la capacidad psicrófila y la hidrólisis de almidón en 92 cepas del grupo *B. cereus* aisladas previamente. El 87% (80 de 92) de las cepas presentaron capacidad psicrófila, además, las cepas aisladas de alimentos ricos en almidón, frutas y vegetales crudo y especias presentaron capacidad de hidrólisis de almidón en un 79%, 100% y 90% respectivamente (cuadro 4)

Cuadro 4. Capacidad psicrófila y amilolítica de cepas del grupo *B. cereus* por grupo de alimento.

Tipo de alimento	Crecimiento 7°C	p	Hidrólisis de almidón	p
	No. y porcentaje de muestras positivas N (%)		No. y porcentaje de muestras positivas N (%)	
Ricos en almidón	14 (100)	0.076	11 (79)	>0.001
Cárnicos	2 (100)		0	
Listos para su consumo	9 (82)		3 (27)	
Lácteos	14 (93)		2 (13)	
Frutas y vegetales crudos	20 (95)		21 (100)	
Espicias	21 (72)		26 (90)	
Total	80 (87)		63 (68)	

Nota. p: Prueba de χ^2 .

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

Se agruparon las 92 cepas por presencia o ausencia de los genes codificantes del complejo Hbl, Nhe, Citotoxina K, Cerulida y toxina Cristalizable. Esta clasificación permitió la identificación de las cepas de *B. thuringiensis*. El 17% (16/92) de las cepas no presentó ninguno de los genes analizados, en tanto que el 10% (9/92) de las cepas presentaron todos los genes codificantes de las toxinas diarreogénicas (cuadro 5)

Cuadro 5. Perfiles toxigénicos de cepas del grupo *B. cereus* aisladas de alimentos.

Perfil	Cepas	No. de cepas	Complejo Hbl			Complejo Nhe			CytK	Gen de la toxina emética ces	Cry
			<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>			
1	016BC, 050BC, 072BC, 074BC, 082BC, 102BC, 104BC, 127BC, 139BC, 158BC, 162BC, 170BC, 176BC, 194BM, 271BC, 300BC.	16	-*	-	-	-	-	-	-	-	-
2	100BC, 116BC, 118BC.	3	-	-	-	+	+ ⁹	-	-	-	-
3	114BC, 179BC, 307BC.	3	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	115BC, 178BC.	2	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5	119BC, 122BC.	2	-	-	-	+	+	+	+	-	-
6	124BC, 290BC.	2	-	-	-	+	-	+	-	-	-
7	126BC, 128BC, 129BC, 130BC, 136BC, 137BC, 147BC, 272BC, 302BC, 384BC.	10	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8	144BC, 184BC, 194BC, 206BC, 321BC, 323BC, 392BM, 287BC, 316BC.	9	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9	180BC	1	-	+	+	+	+	+	-	-	-
10	186BC	1	+	+	-	+	+	+	+	-	-
11	186BM	1	-	-	+	+	+	+	-	-	-
12	188BM, 240BC, 240BM, 244BC, 274BC	5	+	+	+	+	+	+	-	-	-
13	191BM, 274 BM, 295BC	3	+	-	+	-	-	-	-	-	-
14	196BC	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
15	196BM, 221BC	2	+	+	-	+	-	+	-	-	-
16	199BT	1	-	-	-	+	+	+	+	-	+
17	200BT, 203BT	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+
18	205BT	1	+	+	+	+	+	-	+	-	+
19	220BC, 293BC, 292BC	3	+	-	+	+	+	-	-	-	-
20	226BC, 257BC	2	+	-	-	+	-	+	-	-	-
21	249BC, 283BC, 315BC	3	+	+	-	+	+	+	-	-	-
22	254BC	1	+	-	-	-	-	+	-	-	-
23	255BC	1	+	-	+	+	-	-	-	-	-
24	260BT	1	+	-	-	+	-	+	+	-	+
25	260BM	1	+	+	-	-	+	+	-	-	-
26	265BT	1	+	+	+	-	+	+	+	-	+
27	266BC	1	+	-	+	+	+	+	+	-	-
28	297BC	1	+	+	+	-	+	+	-	-	-
29	301BC	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
30	301BM	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-
31	309BC	1	-	+	-	+	-	+	-	-	-
32	313BC	1	+	-	+	-	+	+	-	-	-
33	317BM	1	+	-	+	-	-	+	-	-	-
34	318BC	1	+	-	+	+	-	+	+	-	-
35	320BC	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
36	324BC	1	+	+	+	+	-	-	+	-	-
37	350BC	1	-	-	+	+	+	+	-	-	-
38	352BC	1	+	-	+	-	+	-	-	-	-
39	353BM	1	+	+	-	-	-	-	-	+	-
40	396BC	1	+	+	-	+	-	+	+	-	-

Nota. *: Ausencia de amplicón, ⁹: Presencia de amplicón.

El 17% de las cepas analizadas presentaban los 3 genes codificantes de las subunidades de la toxina Hbl en tanto que el 40% de estas cepas fue negativo para estos genes, el 60% de las cepas presentaron uno o dos genes. La prevalencia de los genes codificantes de las subunidades de la toxina Nhe fue mayor, el 29% de las

cepas presentaban los 3 genes del complejo Nhe, en tanto que el 80% de las cepas presentaban uno o dos genes de dicho complejo (cuadro 6).

Cuadro 6. Frecuencia de genes de las enterotoxinas hbl y nhe en *B. cereus*, *B. mycooides* y *B. thuringiensis*

Aislamientos	Frecuencia de genes hbl n (%)							
	hblA	hblC	hblD	hblA+ hblC	hblA+ hblD	hblC+ hblD	hblA+ hblC+ hblD	Negativos
<i>B. cereus</i>	33 (36)	24 (26)	24 (26)	20 (22)	22 (24)	15 (16)	11 (12)	37 (40)
<i>B. thuringiensis</i>	5 (5)	4 (4)	4 (4)	4 (4)	4 (4)	3 (3)	1 (1)	1 (1)
<i>B. mycooides</i>	9 (10)	6 (7)	8 (9)	6 (7)	4 (4)	4 (4)	4 (4)	1 (1)
Aislamientos	Frecuencia de genes nhe n (%)							
	nheA	nheB	nheC	nheA+ nheB	nheA+ nheC	nheB+ nheC	nheA+ nheB+ nheC	Negativos
<i>B. cereus</i>	47 (51)	33 (36)	35 (38)	27 (29)	26 (28)	22 (24)	20 (22)	18 (20)
<i>B. thuringiensis</i>	5 (5)	5 (5)	5 (5)	4 (4)	3 (3)	4 (4)	3 (3)	0
<i>B. mycooides</i>	6 (7)	5 (5)	7 (8)	4 (4)	5 (5)	5 (5)	4 (4)	4 (4)

Únicamente una cepa fue portadora del gen codificante de la toxina emética. El 24% (22 de 92) de las cepas fueron portadoras del gen *cytK*. La frecuencia de genes de las toxinas NHE, HBL, Citotoxina K y cerulida por especie bacteriana se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Frecuencia de genes de enterotoxinas en *B. cereus*, *B. mycooides* and *B. thuringiensis*

Gen blanco	n (%) de cepas de <i>B. cereus</i> (n=74)	n (%) de cepas de <i>B. thuringiensis</i> (n=6)	n (%) de cepas de <i>B. mycooides</i> (n=12)	Total n (%) (n=92)
<i>nheA</i>	47 (64)	5 (83)	6 (50)	58 (63)
<i>nheB</i>	33 (45)	5 (83)	5 (42)	43 (47)
<i>nheC</i>	35 (47)	5 (83)	7 (58)	47 (51)
<i>hblA</i>	33 (45)	5 (83)	9 (75)	47 (51)
<i>hblC</i>	24 (32)	4 (67)	6 (50)	34 (37)
<i>hblD</i>	24 (32)	4 (67)	8 (67)	36 (39)
<i>cytK</i>	15 (20)	6 (100)	1 (8)	22 (24)
<i>ces</i>	0	0	1 (8)	1 (1)

Se determinó la actividad hemolítica en las 92 cepas del grupo *B. cereus* aisladas previamente. El 100% (92/92) de las cepas lisan eritrocitos humanos y el 75% (69/92) presentó actividad hemolítica detectable contra eritrocitos de carnero. La producción de hemólisis fue mayor en aquellas cepas portadoras de genes de toxinas diarreogénicas, (Figura 1a), de éstas, las portadoras de genes de las toxinas Hbl y Citotoxina K, produjeron mayor porcentaje de hemólisis comparadas con las portadoras de genes de la toxina Nhe (Figura 1b, 1c, 1d).

La producción de hemólisis entre las cepas portadoras del gen de la Citotoxina K fue mayor en las que presentaban el sitio de unión para el factor transcripcional PLCR

(Figura 1e). La producción de hemólisis en las cepas de *B. thuringiensis* fue de un alto grado, seguido por las cepas de *B. mycooides* que mostraron niveles medios a altos, en tanto que las cepas de *B. cereus* arrojaron principalmente niveles no detectables a bajos de hemólisis (Figura 1f).

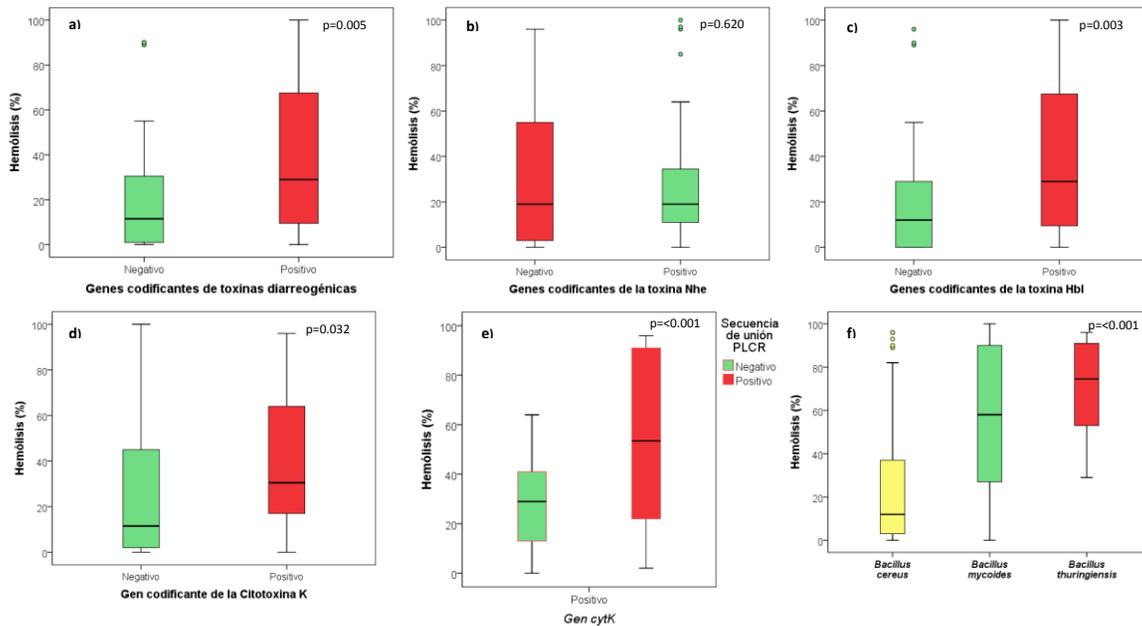


Figura 1. Producción de hemólisis por cepas del grupo *B. cereus*. a) cepas portadoras de genes codificantes de toxinas diarreogénicas, b) cepas portadoras de genes de la toxina Nhe, c) cepas portadoras de genes de la toxina Hbl, d) cepas portadoras del gen *cytK*, e), cepas portadoras del sitio de unión a PLCR del gen *cytK*, f) producción de hemólisis por especie bacteriana.

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

Mediante la técnica de rep-PCR se determinó el perfil rep de 83 cepas del grupo *B. cereus* aisladas de muestras de alimentos, así como de la cepa ATCC 14579 *B. cereus*, el corrimiento electroforético mostró un número entre 2 a 8 bandas de tamaños de 150pb a 1500pb. Tras el análisis de los patrones electroforéticos y obtención de un dendograma, todas las cepas analizadas fueron clasificadas dentro de 55 perfiles rep, 17 de estos con más del 85% de similitud (etiquetados Bc1-Bc55.). (Figura II). Los perfiles Bc21 y Bc24 agruparon 5 cepas, en tanto que los perfiles Bc22, Bc28, Bc34, Bc41, Bc46, Bc54 agruparon 3 cepas, los perfiles Bc7, Bc11, Bc15, Bc19, Bc26, Bc27, Bc29, Bc38, Bc42 agruparon 2 cepas, el resto de los perfiles incluyó solo una cepa.

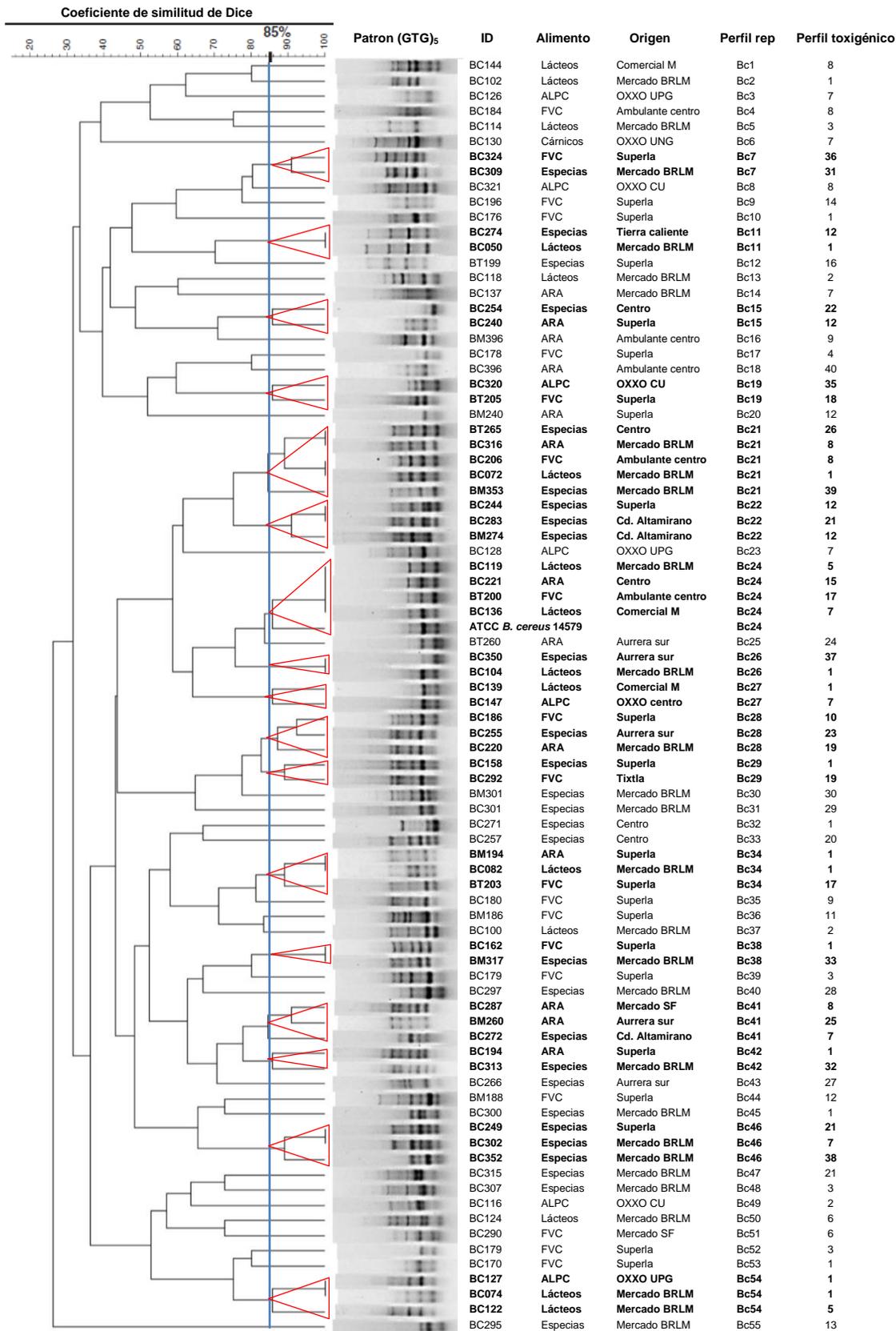


Figura II. Dendrograma de cepas del grupo *B. cereus* mediante rep-PCR. La línea vertical azul delimita al 85% de similitud, los triángulos rojos agrupan perfiles rep con más de una cepa.

VI. DISCUSIÓN.

B. cereus es un microorganismo esporulado descrito como patógeno humano y causante de intoxicación alimentaria de tipo emético y diarreico. En este estudio, se logró demostrar la presencia de cepas toxigénicas del grupo *B. cereus* en diferentes muestras de alimentos comercializadas al sur de México.

Existen varios estudios que demuestran una alta frecuencia de contaminación por cepas toxigénicas del grupo *B. cereus* en diferentes tipos de alimentos (Lee *et al.*, 2012, Rosenquit *et al.*, 2005). Samapundo *et al.*, 2011, reportaron un frecuencia de contaminación de alimentos con cepas del grupo *B. cereus* del 56.3% (324 de 575) en pastas, salsas, arroz crudo, vegetales frescos y especias comercializadas en Bélgica. En el presente estudio la frecuencia de contaminación por cepas del grupo *B. cereus* fue del 21% (84 de 400) analizando productos ricos en almidón, frutas y vegetales crudos, especias, lácteos, productos cárnicos y alimentos listos para su consumo. La diferencia puede estar relacionada con la utilización de un pre enriquecimiento de las muestras durante el procesamiento, lo que podría elevar la recuperación y frecuencia de contaminación en los resultados de Samapundo *et al.*, (2011). Además, el límite de detección de este estudio fue de 100 UFC/g de muestra, por lo cual todas aquellas muestras con menos de 100 UFC/g fueron identificadas como negativas. Por otra parte en el presente estudio el 86% de las muestras mostraron menos de 10^3 UFC/g, el 10% de las muestras en un rango de 10^3 a 10^4 UFC/g y el 4% de los alimentos arrojó conteos mayores a 10^4 UFC/g, en este aspecto, Rosenquit *et al.*, en el 2005, analizaron 48,900 muestras de diferentes alimentos listos para su consumo comercializados en Dinamarca, encontraron que el 98.7% de los productos, tenían cuentas menores a 10^3 UFC/g. La obtención de una mayor frecuencia de contaminación en este estudio, pudo deberse a la metodología de recuperación de esporas planteada y desarrollada en este estudio, ya que la utilización de un medio nutritivo (agar soya tripticasa) favorece el recuento de esporas, comparado con el agar MYP, el cual es un agar selectivo y diferencial.

Tanto la Administración de Alimentos y Medicamentos Coreana (KFDA) como la Administración de Alimentos y Medicamentos Belga (BFDA) limitan la presencia de organismos del grupo *B. cereus* a menos de 10^3 UFC/g, si estos límites se aplicaran en México, se demostraría que el 14% de los productos analizados no cumple con los límites propuestos por estos organismos reguladores, sin embargo, al tratarse de bacterias esporuladas y potencialmente productoras de toxinas, no se puede descartar inóculos menores a 10^3 UFC/g. En este aspecto, se ha descrito que la dosis infectiva para causar enfermedad se encuentra entre 10^4 UFC y 10^6 UFC (Arnesen *et al.*, 2008). En este estudio, fueron pocas las muestras que alcanzaban la dosis infectiva descrita, sin embargo, se debe considerar la cantidad de alimento que se ingiere, ya que podría llegar a ser un inóculo de tamaño considerable. Por lo tanto, para las normas existentes como para las futuras, no solo se debe considerar el inóculo presente en el alimento, ya que puede haber variación con la cantidad de alimento que se consume, además se debe considerar la presencia de genes codificantes de toxinas, pues son estas, las causantes de los síndromes asociados a *B. cereus*.

La presencia de amilasa en los microorganismos es importante debido a que les permite contaminar determinado grupo de alimentos y causar el deterioro y pérdida de las características organolépticas de los mismos. En el presente estudio, el 68% (63 de 92) de cepas aisladas presentaron capacidad de hidrolizar almidón y se observó que en las cepas aisladas de alimentos ricos en almidón, frutas y vegetales crudo y especias presentaron frecuencias altas de capacidad amilolítica; 79%, 100% y 90% respectivamente, en tanto que en los alimentos listos para su consumo, productos lácteos y productos cárnicos las frecuencias fueron bajas; 27%, 13% y 0% respectivamente, con lo cual se confirma que la presencia de la amilasa en los microorganismos predispone la contaminación de cierto grupo de alimentos.

La psicofilia es la capacidad de los microorganismos de crecer a temperaturas bajas (menores a 10°C). Para poder crecer a temperaturas bajas, *B. cereus* cambia la conformación de la membrana lipídica celular, alterando la fluidez de la misma, así como por la sobre expresión de proteínas choque frío, entre ellas CspA (Haque *et al.*,

2004). Esta proteína evita la formación de estructuras secundarias en el ARN en bajas temperaturas (Mayr *et al.*, 1996).

Se conoce que la síntesis de las toxinas Hbl, Nhe y Citotoxina K de *B. cereus* es regulada por un mecanismo regido por la densidad microbiana (Quorum sensing) (Grenha *et al.*, 2013), sin embargo, para que estas toxinas ejerzan su función es necesario que sean sintetizadas directamente en el intestino humano.

De manera contraria, la toxina emética es sintetizada directamente en el alimento, pues se ha demostrado que la síntesis de esta toxina es restringida a temperaturas entre 10 a 15 °C (Thorsen *et al.*, 2009), lo que convierte a la temperatura en un factor clave asociado a la intoxicación alimentaria. Debido a esto, se determinó la capacidad psicrófila en las 92 cepas aisladas, el 87% (80 de 92) fue capaz de crecer a temperaturas restrictivas (7 °C). Estos resultados indican que un alto porcentaje (87%) de cepas aisladas pueden replicarse a bajas temperaturas y entre más días crezcan en refrigeración, pueden alcanzar inóculos de tamaño considerable para causar intoxicación, dependiendo de la combinación de toxinas que sean portadoras.

B. cereus sensu stricto es reconocido como causante de intoxicación alimentaria, causando tanto síndrome diarreico como emético, dependiendo de la combinación de toxinas que sintetice. Recientemente, otras especies del grupo *B. cereus* como *B. thuringiensis* y *B. mycoides*, se ha demostrado la presencia de genes codificantes de toxinas y la producción de estas (Kim *et al* 2012).

La determinación del perfil toxigénico de las cepas del grupo *B. cereus* aisladas, mostró que el 83% (76 de 92) de las cepas portaba al menos un gen codificante de toxinas diarreogénicas, 12% (11 de 92) de las cepas portaban todos los genes codificantes de las toxinas HBL (*hblA*, *hblC*, *hblD*), NHE (*nheA*, *nheB*, *nheC*) y Citotoxina K (*cytK*). El 91% (10 de 11) de cepas de *B. mycoides* mostró presencia de genes codificantes de toxinas diarreogénicas, y una de estas cepas (353BM) era también portadora del gen codificante de la toxina emética y además psicrotolerante, lo cual indica que potencialmente puede sintetizar la toxina y por tanto producir síndrome emético.

Las 6 cepas aisladas de *B. thuringiensis* presentaron todos los genes de las toxinas diarreogénicas HBL, NHE y Citotoxina K, en tanto que el 80% (59 de 74) de las cepas de *B. cereus* sensu stricto mostraron presencia de alguno de los genes codificantes de toxinas diarreogénicas.

B. thuringiensis es un patógeno de insectos ampliamente conocido, ciertas preparaciones de estas cepas son utilizadas como bioinsecticida para el control de plagas (Logan, 2011). Cepas de *B. thuringiensis* han sido identificadas como portadoras de genes codificantes de las toxinas NHE, HBL y Citotoxina K así como productoras de las mismas (Kim *et al.*, 2014), sin embargo existen pocos reportes de caso de gastroenteritis atribuidos a este microorganismo (McIntyre *et al.* 2008), esto puede deberse en parte a la incapacidad de esta especie para expresar las toxinas. En este estudio se demostró la presencia del gen *cytK* en las 6 cepas de *B. thuringiensis* aisladas, sin embargo al realizar el análisis del promotor de este gen, se observó que el 50% de las cepas no tiene el sitio de unión para el factor de transcripción PlcR, por lo que la expresión de este gen no podría realizarse, y también, a que cepas de *B. thuringiensis* al perder el plásmido portador del gen de la toxina cry son clasificados como cepas de la especie *B. cereus*.

B. mycooides es un miembro del grupo *B. cereus* encontrado en el ambiente, actualmente, no se ha descrito como patógeno humano (Logan, 2011), sin embargo, Walczak y colaboradores (2013), describieron la presencia del gen codificante de la citotoxina K en cepas de *B. mycooides* aisladas de muestras de alimentos, concordando con los resultados obtenidos en este estudio, lo cual sugiere que no solo las cepas de *B. cereus* sensu stricto son potencialmente causantes de síndrome diarreico, ya que las cepas de *B. thuringiensis* y *B. mycooides* identificadas son portadoras de genes codificantes de toxinas diarreogénicas.

Las toxinas Nhe y Hbl están constituidas por 3 subunidades, nheA, nheB, nheC y B, L₁, L₂ respectivamente. Esta descrito que para la total funcionalidad biológica de estas toxinas son necesarias las 3 subunidades que las conforma (Beecher *et al.*, 1991, Lindbäck *et al.*, 2004). Sin embargo, únicamente una de las subunidades de cada toxina, es la que interactúa directamente con la membrana lipídica de la célula, NheB y L₁ pertenecientes a las toxinas Nhe y Hbl respectivamente (Arnesen *et al.*,

2008). En este aspecto, Lindbäck y colaboradores (2010) describen actividad citotóxica contra células vero en cepas que únicamente eran portadoras de los genes codificantes de las subunidades A y B de la toxina Nhe, por lo cual en el presente estudio, no se puede descartar el potencial de causar enfermedad de aquellas cepas portadoras de la combinación de 2 genes codificantes de alguna de las subunidades de las toxinas o incluso de un solo gen de las subunidades de las toxinas Hbl o Nhe. La Citotoxina K es uno de los factores de virulencia de mayor importancia entre las cepas del grupo *B. cereus*, debido a que está asociada directamente al síndrome diarreico (Lund *et al.*, 2000). La síntesis de esta toxina (al igual que las toxinas Hbl y Nhe) está bajo el control del regulador transcripcional PlcR, este regulador se une a una secuencia de ADN específica, denominada caja-PlcR la cual se localiza río arriba entre la posición -35 y el inicio de la transcripción del gen (Brillard *et al.*, 2004). Por otra parte, en el presente estudio, se identificó la presencia del gen de la Citotoxina K en su región codificante en 22 de las 92 cepas analizadas. Conociendo el mecanismo de regulación de expresión de este gen, se buscó la presencia de la denominada caja-PclR en el gen de la Citotoxina K en las 22 cepas. Únicamente 14 de estas cepas presentaron esta región en el promotor del gen de la Citotoxina K. Esto indica que las 14 cepas portadoras del gen *cytK* y que contiene el sitio de unión para el factor de transcripción PlcR, son aptas para expresar dicho gen, esto se pudo observar de manera evidente al determinar la producción de hemólisis en las cepas portadoras del gen *cytK* y que presentaban el sitio de unión para el factor de transcripción PLCR (Figura 1e: cepas positivas a PLCR: IQR de 25%-93%, cepas negativas a PLCR: IQR 14%-43%).

Además, se debe considerar la presencia de 2 isoformas de esta toxina; CytK1 y CytK2, estas isoformas difieren en los niveles de expresión, pues se ha demostrado que CytK1 en las mismas condiciones, se expresa 5 veces más comparada con la CytK2 (Fagerlund *et al.*, 2004).

Para determinar indirectamente la producción y funcionalidad de toxinas, se analizó la actividad hemolítica en las 92 cepas del grupo *B. cereus* aisladas. En las cepas portadoras de genes codificantes de toxinas diarreogénicas el porcentaje de hemólisis fue mayor que en las no portadoras (Figura 1a), y de estas cepas, las que

presentaban genes de las toxinas HBL y Citotoxina K fueron más hemolíticas que las portadoras de genes de la toxina NHE. En este aspecto, se conoce que de las enterotoxinas de *B. cereus* asociadas al síndrome diarreico, únicamente la toxina HBL y la Citotoxina K producen hemólisis en sangre de carnero (Arnesen *et al.*, 2008), lo cual explica los resultados obtenidos en este estudio, sin embargo, se debe considerar que además de las enterotoxinas HBL y Citotoxina K, *B.cereus* es productor de una serie de enzimas; fosfolipasas, colagenasas y hemolisinas como H1yI, H1yII, H1yIII y H1yIV (Ramarao *et al.*, 2013), las cuales podrían ser causantes de la hemólisis en aquellas cepas que no presentan genes codificantes de toxinas diarreogénicas, sin embargo al no estar demostrada su participación en el síndrome diarreico no fueron determinadas en este estudio.

La tipificación molecular de microorganismos es una herramienta epidemiológica utilizada para identificar la vía de transmisión y/o contaminación en brotes hospitalarios o en intoxicaciones alimentarias. Una rápida tipificación puede reducir significativamente los costos asociados al tratamiento, contención y erradicación del brote (Zaidi *et al.*, 2003).

Uno de los métodos de tipificación molecular es la PCR de Elementos Palindrómicos Repetitivos (rep-PCR), esta última basada en el diseño de iniciadores que flanquean secuencias repetitivas intercaladas a lo largo del genoma bacteriano y permite la clasificación y delimitación de especies y subespecies bacterianas (Versalovic *et al.*, 1994). Debido a esto, en el presente estudio se utilizó la técnica de rep-PCR para determinar la relación clonal de 83 de los aislamientos. Se obtuvo un total de 55 perfiles rep, de estos, 38 estaban integrados por una sola cepa, lo que indica un alto grado de diversidad genética entre estas cepas, correspondiente a menos de 30% de similitud. 17 perfiles rep agruparon a 45 aislamientos, estos perfiles se integraron por 2, 3 o 5 cepas. Siguiendo los criterios de Tenover y colaboradores (1995), se pudo identificar si las cepas de un mismo grupo eran genéticamente iguales o relacionadas genéticamente, por la presencia o ausencia de igual número de bandas con igual peso molecular.

Hacemos notar que no se encontraron cepas tipo, pues se observó una gran diversidad entre las cepas, incluso, algunos perfiles clonales mostraron subgrupos,

como fue en los perfiles Bc21, Bc22, Bc24, Bc28, Bc34, Bc41, Bc46 y Bc54. Si bien no se logró asociar un perfil clonal con un grupo de alimento en particular, se observó que en los perfiles rep Bc21 y Bc22 (75% de similitud), 5 de las 8 cepas tipificadas dentro de estos perfiles fueron aisladas de especias, además se identificó que las 8 cepas tenían capacidad psicrófila y 7 hidrolizaban el almidón. Esto nos indica que estos perfiles rep, clasificaron dentro de un grupo con alto porcentaje de similitud a cepas con características metabólicas (hidrólisis de almidón) y de crecimiento en condiciones de estrés (psicrófilia).

En el estudio de incluyeron cepas provenientes de ciudades diferentes a Chilpancingo (Tixtla y Cd. Altamirano), las cuales mostraron ser genéticamente relacionadas o incluso genéticamente iguales, la literatura refiere que *B. cereus* es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente, en este punto Castiaux y colaboradores (2014) describe relación genética entre cepas de *B. cereus* aisladas de pacientes y de alimentos en diferentes países. Además, los productos comercializados en la ciudad de Chilpancingo, son provenientes de otras partes del estado o incluso de estados vecinos.

Por otro lado, no se logró demostrar asociación de perfiles rep con perfiles toxigénicos de las cepas estudiadas (cepas con mismos perfiles toxigénicos mostraban diferentes perfiles rep), a pesar de que los genes codificantes de las toxinas se encuentran en el cromosoma bacteriano. Resultados similares observaron Lee y colaboradores (2011), atribuyendo esto a que la presencia de genes codificantes de toxinas no se relaciona al fondo genético, sin embargo Castiaux y colaboradores (2014), demostró relación entre pulsotipos y perfiles toxigénicos de cepas de *B. cereus* aisladas de alimentos y pacientes por la técnica de PFGE. Por lo cual, se consideró que no encontrar relación entre perfiles rep y perfiles toxigénicos se debió a una limitante propia de la técnica de rep-PCR, ya que a diferencia de la PFGE que se basa en la macro-restricción del genoma completo del microorganismo, la rep-PCR solo detecta los fragmentos de ADN que se encuentran entre 2 secuencias rep y estas pueden ser generadas y/o modificadas en su longitud por mecanismos de transferencia horizontal de material genético.

VII. CONCLUSIONES

- En alimentos comercializados en el Estado de Guerrero existe una frecuencia del 21% de contaminación con cepas del grupo *B. cereus*.
- El 83% de las cepas del grupo *B. cereus* aisladas, mostraron presencia de genes codificantes de toxinas diarreogénicas identificándose como potencialmente toxigénicas.
- Las cepas de *B. thuringiensis* y *B. mycoides* aisladas, presentan un alto potencial toxigénico, al ser portadoras de genes codificantes de toxinas diarreogénicas.
- En los alimentos analizados no existe presencia de cepas tipo, pues se evidenció amplia diversidad con más de 50 perfiles rep.

VII. REFERENCIAS.

- Arnesen, L., Fagerlund, A., Granum, P. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 32(4): 579-606.
- Beecher, D., MacMillan, J. (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 59, 1778–1784.
- Bottone, E. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 23(2): 382–398.
- Brillard, J., Lereclus, D. (2004). Comparison of cytotoxin cytK promoters From *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *B. cereus* food-poisoning strain. *Microbiology.* 150(8):2699-705.
- Castiaux, V., N'guessan, E., Swiecicka, I., Delbrassinne, L., Dierick, K., Mahillon, J. (2014). Diversity of pulsed field gel electrophoresis patterns of cereulide-producing isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 353(2):124-31.
- Ceuppens, S., Van de Wiele, T., Rajkovic, A., Ferrer, T., Heyndrickx, M., Boon, N., Uyttendaele, M. (2012) Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol.* 155(3):241-6.
- Chon J., Kim J., Lee S., Hyeon J., Seo K., (2012). Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in sunsik. *Food Microbiol*, 32(1):217-22.
- Delbrassinne, L., Andjelkovic, M., Dierick, K., Denayer, S., Mahillon, J., (2012). Prevalence and levels of *Bacillus cereus* emetic toxin in rice dishes randomly collected from restaurants and comparison with the levels measured in a recent foodborne outbreak. *Foodborne Pathog Dis*, 9(9):809-14.
- Dommel, M., Frezel, E., Strasser, B., Blochinger, C., Scherer, S., Ehling, M. (2010). Identification of the main promoter directing cereulide biosynthesis in emetic *Bacillus cereus* and its application for real-time monitoring of ces gene expression in foods. *Appl Environ Microbiol*, 76(4): 1232–1240.
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S., Granum, P. (2004). Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150, 2689–2697.
- Granum, P., Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*, 157(2):223-8.
- Granum, P., O'Sullivan, K., Lund, T. (1999). The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177:225–229.

Grenha, R., Slamti, L., Nicaise, M., Refes, Y., Lereclus, D., Nessler, S. (2013) Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proc Natl Acad Sci.* 15;110(3):1047-52.

Guinebretière, M., Broussolle, V., Nguyen, C. (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol*, 40(8):3053-6.

Haque, M., Russell, N. (2004) Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiol-UK* 150:1397–1404.

SSA-SINAVE, (2010). Distribución de los casos nuevos de enfermedades por grupo de edad. [Base de datos] Disponible vía internet: http://www.sinais.salud.gob.mx/basesdedatos/eh_sectorial_morbi.html. Acceso: Abril del 2013.

Kim, H., Kim, H., Bang, J., Kim, Y., Beuchat, L., Ryu, J., (2012). Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization processes with and without carbon dioxide injection. *Lett Appl Microbiol*, 55(3):218-23.

Lee, N., Sun, J., Kwon, K., Kim, H., Koo, M., Chun H. (2012). Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from Sunsik. *J Food Prot*, 75(2):225-30.

Lindbäck, T., Hardy, S., Dietrich, R., Sødning, M., Didier, A., Moravek, M., Fagerlund, A., Bock, S., Nielsen, C., Casteel, M., Granum, P., Märtlbauer, E. (2010). Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin Requires Specific Binding Order of Its Three Exoprotein Components. *Infect Immun.* 78(9):3813-21.

Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rødland, M., Granum, P. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959–3967.

Logan, N. (2011). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol*, 112(3):417-29.

Lund, T., De Buyser, L., Granum, P. (2000) A new enterotoxin from *Bacillus cereus* that can cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 38, 254–261.

Mayr, B., Kaplan, T., Lechner, S., Scherer, S. (1996) Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J Bacteriol* 178: 2916–2925.

McIntyre, L., Bernard, K., Beniac, D., Renton, J., Naseby, D. (2008). Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl Environ Microbiol.* 74(23):7451-3.

Mendoza, G., Portillo, A., Arias, E., Ribas, R., Olmos, J. (2012). New combinations of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. *Int Microbiol.* 15(4):211-8.

Ramarao, N., Sanchis, V., (2013). The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus Cereus*: A Review. *Toxins*, 7;5(6):1119-39.

Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S., Jensen, G., Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol Lett*, 250(1):129-36.

Ryan, P., MacMillan, J., Zilinskas, B. (1997). Molecular cloning and characterization of the gene encoding L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 179: 2551–2556.

Samapundo S., Heyndrickx M, Xhaferi R, Devlieghere F. (2011). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int J Food Microbiol*, 150(1):34-41.

Scallan, E., Hoekstra, R., Angulo, F., Tauxe, R., Widdowson, M., Roy, S., Jones, J., Griffin, P. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17(1):7-15.

Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A. (2005). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:105–113.

Stenfors, L., Granum, P. (2001). Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 197(2):223-8.

Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* 33 (9): 2233-9.

Thorsen, L., Budde, B., Henrichsen, L., Martinussen, T., Jakobsen, M. (2009). Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *Int J Food Microbiol.* 31;134(1-2):133-9.

Tsilia, V., Devreese, B., Baenst, I., Mesuere, B., Rajkovic, A., Uyttendaele, M. (2012). Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Anal Bioanal Chem*, 404(6-7):1691-702.

Versalovic, J., Schneider, F., Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5:25–40.

Vilas, G., Peruca, A., Arantes, O. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol.* 53: 673-687.

Walczak, E., Walczak, P. (2013). PCR detection of *cytK* gene in *Bacillus cereus* group strains isolated from food samples. *J Microbiol Methods.* 95(2):295-301.

Zaidi, N., Konstantinou, K., Zervos, M. (2003). The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127:1098–1105.