

Presencia de los genes de toxigenicidad *nheA*, *nheB* y *nheC* en cepas de *Bacillus cereus* aisladas de leches deshidratadas en Costa Rica.

Jonathan Rojas, Carlos E. Rodríguez-Rodríguez, Cristian Pérez,
Carolina Chaves y María Laura Arias

Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET) y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Centro de Investigaciones en Contaminación Ambiental (CICA) y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Hospital Nacional del Niños, San José, Costa Rica.

RESUMEN: La leche en polvo es un producto de alto consumo humano que no precisa de ser conservado en frío, no obstante, diversos microorganismos pueden deteriorarlo. En la población costarricense, también se observa este alto consumo, por la facilidad del alimento para transporte, preparación y su costo competitivo. *Bacillus cereus* es una bacteria potencialmente patógena asociada a este tipo de producto, capaz de desarrollar toxinas dependiendo de la presencia o ausencia de los respectivos genes codificantes. En este estudio se determinó la presencia de los genes toxigénicos *nheA*, *nheB* y *nheC* en cepas de *B. cereus* aisladas de leche deshidratada vendida en el mercado nacional costarricense. Se examinaron cinco lotes diferentes, de diez marcas comerciales de leche en polvo distribuidos en el área metropolitana de San José Costa Rica. Se procedió a cuantificar *B. cereus* en las muestras de leche en polvo mediante la técnica de Número Más Probable (NMP) e identificar los aislamientos utilizando el equipo automatizado Vitek®. Adicionalmente, se determinó la presencia de los genes *nheA*, *nheB* y *nheC* mediante la técnica de PCR. La frecuencia de aislamiento de *Bacillus cereus* en las muestras de leche en polvo analizadas alcanzó un 50%, con cantidades que oscilaron entre 3 y >100 NMP/g. Se recuperaron 19 cepas de *B. cereus* aisladas, cinco fueron positivas para los tres genes toxigénicos, lo cual revela la presencia de *B. cereus* potencialmente toxigénico en leches deshidratadas del mercado nacional, lo que representa un riesgo para la salud pública.

Palabras clave: Leche en polvo, *Bacillus cereus*, genes *nheA*, *nheB* y *nheC*

SUMMARY: Detection of toxigenic genes *nheA*, *nheB* and *nheC* in *Bacillus cereus* strains isolated from powdered milk samples in Costa Rica.

Powdered milk is a frequently consumed product that does not need to be kept under cold conditions. Nevertheless, different microorganisms may contaminate it. Powdered milk is a highly consumed product by Costa Rican population, and *Bacillus cereus* is a potentially pathogenic bacteria associated to it, with the ability to develop toxins depending on the presence of the respective codifying genes. The aim of this study was to determine the presence of the toxigenic genes *nheA*, *nheB* and *nheC* from *B. cereus* strains, found in powdered milk sold at the Costa Rican national market. Five different lots of ten brands of powdered milk, distributed in the metropolitan area of San José, Costa Rica were analyzed. *B. cereus* load was quantified using the Most Probable Number technique and identified using the Vitek® system. The presence of the toxigenic genes was determined using the PCR technique. The isolation frequency of this bacteria in the powdered milk samples analyzed reached 50%, with populations ranging from 3 to >100 MPN/g. Five out from nineteen strains were found positive for the three toxigenic genes, indicating contamination with potentially toxigenic *B. cereus* in powdered milk distributed in the national market, and an important risk for public health.

Key words: Powdered milk, *Bacillus cereus*, *nheA*, *nheB* and *nheC* genes

INTRODUCCIÓN

La leche en polvo es un producto de alto consumo humano, representa una fuente

importante de proteínas, ácidos grasos y vitaminas, entre otros. Contiene un máximo de 4% de materia grasa, de 20% a 40% de lactosa y

de 22% a 33% de albúmina. Además se le suelen añadir algunas vitaminas como la A y la D3 (1). Es un alimento de vida útil prolongada y de fácil almacenamiento (1).

Este producto no precisa ser conservado en frío, no obstante, diversos microorganismos incluyendo *Micrococcus*, *Pseudomonas*, coliformes y esporulados pueden deteriorarlo (2). El origen de estos incluye las enfermedades que puede padecer el ganado, incluyendo la mastitis y la tuberculosis, o la mala manipulación de la leche empleada como materia prima, especialmente durante el ordeño mecánico, y su incorrecto almacenamiento en condiciones de escasa higiene y a temperatura ambiente (3). El hallazgo de esporulados está ligado a la formación de biopelículas en diferentes secciones de la línea de proceso, y seleccionados por las altas temperaturas (4).

Por otro lado, el deterioro químico de la leche entera en polvo (LEP) incluye reacciones indeseables en el producto, las cuales modifican sus características organolépticas originales, siendo ésta una de las principales causas que determinan la caducidad de su vida útil. El pretratamiento térmico de la leche cruda, la temperatura de almacenamiento, la actividad acuosa y las condiciones de envasado del polvo son los determinantes de todas estas reacciones químicas. Durante el almacenamiento, la oxidación lipídica es una de las principales causas de la pérdida del valor nutricional y de la capacidad funcional. La lipólisis en la grasa de la leche en polvo ocurre por una oxidación de los ácidos grasos libres y su efecto se ve incrementado por el aumento de la temperatura (5).

A pesar de que la leche en polvo es sometida a un tratamiento térmico fuerte, puede existir el riesgo de sobrevivencia y producción de toxinas por patógenos incluyendo *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (6). Por otro lado, la reconstitución de la leche en polvo permite la multiplicación de los microorganismos contaminantes (7) incluyendo *Geobacillus stearothermophilus*, agente causal de la

acidez plana (flat sour) (6) o bien de agentes potencialmente patógenos como *Cronobacter sakazakii*, bacilo que ha sido aislado en reiteradas ocasiones a partir de brotes esporádicos y brotes epidémicos relacionados con el consumo de fórmulas a base de leche en polvo para lactantes (8) y que se asocia al ambiente de plantas productoras de leche en polvo (9) al ser altamente resistente a la desecación (10,11).

La presencia de *B. cereus* en fórmulas infantiles de leche en polvo es un hecho conocido desde 1920 y ya desde 1950 son cada vez más numerosos los trabajos que aportan pruebas fehacientes de la importancia de esta bacteria como agente causal de intoxicaciones alimentarias y toxiinfecciones en recién nacidos (12). Esta bacteria es reconocida por producir dos tipos de toxina durante su crecimiento exponencial, la toxina emética y la toxina diarreica, las cuales dan lugar a dos distintas formas de cuadro alimentario (7).

La enterotoxina emética es conocida como cerúlida y es una toxina termoestable, mientras que las toxinas asociadas a un cuadro diarreico, que incluyen la enterotoxina T, la hemolisina BL, la enterotoxina no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K son toxinas termolábiles (13). Cabe destacar que la enterotoxina Nhe se encuentra compuesta por tres diferentes genes codificantes, *nheA*, *nheB* y *nheC* incluidas en el operón *nheABC* y es necesaria la expresión de todos estos genes para que se genere un producto con actividad biológica (14). Esta enterotoxina se ha encontrado en el 92-100% de las cepas aisladas en diversos estudios a nivel mundial (7).

Dado el amplio consumo de leche, tanto por niños como por la población adulta en Costa Rica (15), y el potencial patogénico de *B. cereus*, se pretende con este estudio determinar la presencia de los genes toxigénicos *nheA*, *nheB* y *nheC* de *B. cereus* aislados de leche deshidratada vendida en el mercado nacional costarricense.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo.

Se examinaron cinco lotes diferentes de diez marcas comerciales de leche en polvo distribuidas en San José, Costa Rica. Dichas muestras fueron adquiridas en diferentes supermercados del Gran Área Metropolitana entre enero y marzo del 2013 y transportadas en menos de 24 h al Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica en el recipiente original del producto para su análisis.

2. Cuantificación y aislamiento de *B. cereus* mediante la técnica de número más probable (NMP)

Se pesó 25 g de cada muestra de leche en polvo, a los cuales se les agregaron 225 mL de agua peptonada estéril 0,1% (APE 0,1%) y se homogenizó en Stomacher®. Se prepararon diluciones decimales utilizando APE 0,1%. De cada dilución se agregó 1 mL a cada uno de 3 tubos de caldo tripticasa soya (CTS) + polimixina, los cuales fueron incubados por 48h a 30°C. Transcurrido este tiempo, los tubos que presentaron turbidez fueron rayados en agar MYP (Manitol-Yema de huevo-Polimixina) e incubados por 48 h a 35°C (16).

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a revisar por crecimiento de colonias típicas y se determinó el NMP/g utilizando la tabla de NMP para serie de tres.

3. Identificación bacteriana

Las colonias que presentaron la morfología característica de *B. cereus* en agar MYP (colonias grandes, planas, secas, rosadas, rodeadas de halo de precipitación por la degradación de la yema de huevo) fueron revisadas mediante tinción de Gram y luego fueron rayadas en agar tripticasa soya (ATS) para ser analizadas en el equipo VITEK® (17).

4. Determinación de la presencia de los genes *nheA*, *nheB* y *nheC* en las cepas de *B. cereus* aisladas mediante la técnica de PCR

Se determinó la presencia de los genes *nheA*, *nheB* y *nheC* en las cepas de *B. cereus* aisladas, por medio de la técnica de PCR, tal como se describe a continuación:

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el equipo MagNAPure LC 2.0®, (Roche). Para ello, se realizó una pre-lisis de 10 min a 70°C, en un tubo de 1,5 mL con 130 µL de buffer de lisis (isotiocianato de guanidino), 20 µL de proteinasa K, 100 µL de PBS y un fragmento de una colonia crecida en agar sangre. Posteriormente, se realizó el protocolo de extracción DNA III para recuperación de ADN bacteriano siguiendo las especificaciones del fabricante, con un volumen de 100 µL de elución.

Primers

Se utilizaron los primers descritos en la Tabla 1.

PCR

Se llevó a cabo el protocolo de amplificación descrito por Blanco et al.(13). Brevemente, se realizó una mezcla de reacción para múltiplex PCR, conteniendo 1 µL de cada primer (100 µM), 17 µL de agua libre de nucleasas, 25 µL de Master Mix 2X

TABLA 1. Primers utilizados para detección de genes codificantes por enterotoxinas no hemolíticas de *B. cereus*.

Primer	Secuencia	Producto esperado (pb)
nheA 344 S	TACGCTAAGGAGGGGCA	499
nheA 843 A	GTTTTATTGCTTCATCGGCT	
nheB 1500 S	CTATCAGCACTTATGGCAG	769
nheB 2269 A	ACTCCTAGCGGTGTTCC	
nheC 2820 S	CGGTAGTGATTGCTGGG	581
nheC 3401 A	CAGCATTCGTACTIONGCCAA	

(Fermentas®) y 2 µL del ADN previamente extraído. Las condiciones de termociclado fueron: desnaturalización inicial 94°C/5 min, 30 ciclos de amplificación de 94°C/15 s, anillamiento a 55°C/45 s y elongación a 72 °C/2 min y extensión final a 72°C/ 5 min. Como control positivo se utilizó ADN de *Bacillus thuringiensis* var. *alzawai* HD137 y como control negativo ADN de *E. coli* ATCC 25922.

Electroforesis en gel de los productos de PCR

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Además se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (Fermentas®).

RESULTADOS

De las 50 muestras de leche deshidratada analizadas para la presencia de *B. cereus*, 50% presentó un NMP menor a 3 lo cual indica ausencia de esta bacteria. Por otra parte, de las restantes muestras, el 32% tuvo un NMP/g que varió entre 3 y 10 mientras que un 8% tuvo un NMP/g entre 11 y 100 y 10% de las muestras un NMP/g superior a 100, tal y como se muestra en la Tabla 2.

Detección de genes codificadores de toxinas

La amplificación de los genes toxigénicos con el multiplex PCR y la electroforesis de los productos de amplificación de la cepa control *B. thuringiensis* var. *alzawai* HD137 corresponden a los genes *nheA*, *nheB* y *nheC* y se presentan en la Figura 1.

TABLA 2. Número más probable por gramo de *B. cereus* determinado en muestras de leche deshidratada distribuidas en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica.

Rango de Número Más Probable (NMP/g)	Número de Muestras (n%)
<3	25 (50)
3-10	16 (32)
11-100	4 (8)
>100	5 (10)

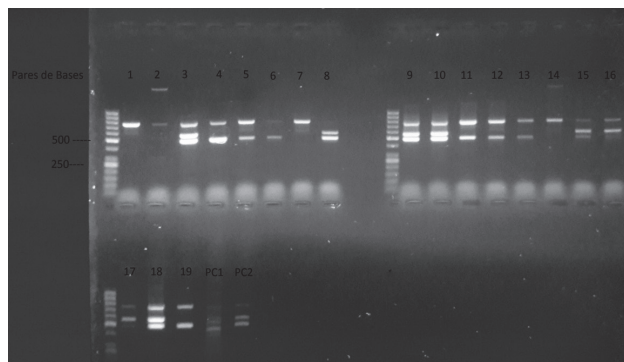


FIGURA 1. Productos amplificados de los genes *nheA*, *nheB* y *nheC* de *B. cereus* en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,0005 mg/mL).

Se logró obtener 19 aislamientos que fueron identificados como *B. cereus* por el VITEK. El análisis de la expresión de los genes *nheA*, *nheB* y *nheC* de *B. cereus* se muestra en la figura 1, destacándose la obtención de cinco cepas positivas para los tres genes toxigénicos de *B. cereus*, (pocillos 3, 9, 10, 15 y 18 respectivamente), nueve positivas por dos de los genes y cuatro solamente por uno.

DISCUSIÓN

La frecuencia de aislamiento de *B. cereus* en las muestras de leche en polvo analizadas en el presente trabajo fue de un 50%, valor que duplica el reporte dado por Blanco y colaboradores a partir de leche deshidratada(13).

El origen de *B. cereus* en la leche deshidratada puede deberse a la materia prima utilizada en la fabricación de cada marca comercial y se asocia a la capacidad de las esporas de soportar tratamientos térmicos fuertes, ya que aunque el alimento contenga una baja actividad de agua, las esporas no se ven afectadas y se encuentran en latencia a la espera de encontrar condiciones más favorables, como sucede cuando la leche es reconstituida (7).

A pesar de haberse obtenido una frecuencia de aislamiento importante, cabe destacar que en la mayoría de casos, el número de bacterias

encontradas fue bajo. Existe una gran cantidad de variables que pueden afectar el crecimiento de la bacteria y que pueden explicar los conteos bajos, incluyendo la estacionalidad, el contenido de grasa del alimento y las condiciones de almacenamiento de cada marca comercial (18).

El 50% de muestras negativas para el aislamiento de *B. cereus* puede deberse a la presencia de formas viables no cultivables en las muestras analizadas. Este estado adaptativo de la bacteria es frecuente cuando se propician condiciones nutricionales bajas, como es el caso de la baja actividad de agua en las leches deshidratadas. En estas condiciones, la bacteria es capaz de llevar a cabo funciones fisiológicas pero no es capaz de crecer bien en un medio de cultivo (19).

En cuanto al análisis toxigénico de las cepas de *B. cereus* aisladas de muestras de leche deshidratada, se encontró que de los 19 aislamientos analizados, todos eran portadores de al menos uno de los genes en estudio (7).

Es importante mencionar que la ausencia de uno o dos genes toxigénicos en un aislamiento no puede considerarse como una ausencia total y definitiva de dicho gen en esa cepa bacteriana, esto debido a que se ha visto que algunas cepas de *B. cereus* presentan polimorfismos en los genes toxigénicos (13), lo cual provoca que los primers utilizados no sean capaces de detectar esas secuencias de nucleótidos codificantes para la toxina.

Al ser la Nhe una enterotoxina que requiere de los tres genes para que se ésta se produzca y sea biológicamente activa (14), sólo se tomaron como positivos los 5 aislamientos que así lo hicieron. Es probable que los demás aislamientos que no presentaron todos los genes no desarrollen una toxina con actividad biológica importante debido a que carecen de uno o de los dos genes restantes. Por otro lado, es importante destacar que es necesario que la bacteria además posea la capacidad de expresar de manera correcta estos genes; si la bacteria posee la información

genética pero no se expresa correctamente, no se va a presentar la actividad biológica de la toxina (7).

A pesar de necesitar los tres genes para que se exprese la toxina, se ha propuesto que si el *nheC* aumenta en el complejo de la toxina Nhe, la capacidad toxigénica se ve disminuida. Esto ocurre debido a que la *nheC* se une al componente *nheB* y esto inhibe los receptores expresados para la unión a las células. Si por el contrario ésta se encuentra en una proporción adecuada de 1:1:1 (*nheA*, *nheB* y *nheC*) la actividad citotóxica se ve restablecida. Aunque la función específica del componente *nheC* no se ha descrito completamente, parece actuar como un catalizador de la función biológica de la toxina, ya sea al unir los componentes *nheA* y *nheB* una vez que ya el *nheB* se encuentra unido a las células o al promover cambios conformacionales en el complejo toxigénico; de esta manera se ve la necesidad de la correcta expresión de los tres genes para poder expresarla toxina de forma adecuada (14).

El hecho de que en el presente estudio se haya aislado 5 cepas de *B. cereus*, que dentro de su genoma portan los tres genes asociados a la toxina Nhe, pone de manifiesto que en el mercado nacional circulan leches deshidratadas contaminadas con *B. cereus* que pudieran representar un riesgo para la salud pública si al ser reconstituidas son sometidas a condiciones que favorezcan la producción de la toxina.

REFERENCIAS

1. Zavala JM. Aspectos Nutricionales y Tecnológicos de la Leche. Dirección General de Promoción Agraria. 2005. p 11-16
2. Marín B, R Lemus, V Flores & A Vega. La rehidratación de los alimentos deshidratados. Rev Chil Nut. 2006. 33, 220-225
3. Guzmán E, S de Pablo, G Yáñez, G Carmen, I Zacarías & S Nieto. Comparative study of the quality of processed stored milks. Rev Chil Ped. 2003. 74: 277-286.

4. Marchand S, De Block J, De Jonghe V, Coorevits A, Heyndrickx M & L Herman. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Compr Rev Food Sci F*. 2012. 11: 133-147
5. Páez R, M Chávez, N Sabbag, N Pensel, M Taverna & C Zalazar. Deterioro Oxidativo durante la Conservación de la Leche Entera en Polvo en diferentes condiciones de almacenamiento. *Rev Arg Lactolog*. 2005. 23: 51-66.
6. Tortora G, B Funke & C Case. Introducción a la microbiología. 2009. Editorial Panamericana. Argentina. p 842.
7. Granum PE. *Bacillus cereus* in Foodborne pathogens: Microbiology and Molecular Biology. 2009. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
8. Lai K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. *Medicine Baltimore*. 2001. 80: 113-122.
9. Mullane N, Healy B, Meade J, Whyte P, Wall PG & S Fanning. Dissemination of *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Appl Environ Microbiol*. 2008. 74: 5913-5917.
10. Arku B, Mullane N, Fox E, Fanning S & K Jordan. *Enterobacter sakazakii* survives spray powdered. *Int J Dairy Technol*. 2008. 61: 102-108.
11. Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M & HM Joosten. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol*. 2003. 95: 967-973.
12. Cohen J, E Marambio, B Lynch & A Moreno. Infección por *Bacillus cereus* en Recién Nacidos. *Rev Chil Ped*. 2000. 55: 20-24
13. Blanco W, M Arias, C Pérez, C Rodríguez & C Chaves. Detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en productos lácteos con especias y leches deshidratadas colectadas en Costa Rica. *Arch Lat Nut*. 2009. 59: 402-406.
14. Lindback T, A Fagerlund, M S Rodland & PE Granum. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*. 2004. 150: 3959-3967.
15. Gómez G. Consumo de alimentos en niños menores de un año en una zona rural de Costa Rica. *Revista Médica Hospital Nacional de Niños* 1996.31: 21-27.
16. Hansen BM & NB Hendriksen. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl Environ Microbiol* 2001. 67: 185-189.
17. Jordá L, A Vila, A Lanza, P Bonvehi, J Nazar, A Mikietuk, R Labat & J Smayevsky. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad microbiana. *Act Bioq Clín Lat*. 2005. 39: 19-25
18. Austin JW & G Bergeron. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J Dair Res*. 1995. 62: 509 – 519
19. Marín B, R Lemus, V Flores & A Vega. La rehidratación de los alimentos deshidratados. *Rev Chil Nut*. 2006. 33: 220-225

Recibido: 03-07-2014

Aceptado: 25-08-2014