

**Trabajo Fin de Máster:**

**Intoxicaciones alimentarias por *Bacillus cereus***

***Bacillus cereus* food poisoning**

**Sergio Calero Domínguez**



**Tutor/a: Ana María Rodríguez Pérez**  
**Área de conocimiento: Microbiología**  
**Departamento: Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética**  
**Curso 2021-2022**  
**Convocatoria de julio**

# ÍNDICE

<i>Resumen</i> .....	1
Palabras clave: <i>B. cereus</i> , intoxicación, cereulida, enterotoxinas.....	1
<i>Abstract</i> .....	1
Key words: <i>B. cereus</i> , poisoning, cerulide, enterotoxins.....	1
1. <i>INTRODUCCIÓN</i> .....	2
2. <i>OBJETIVOS</i> .....	4
3. <i>MATERIAL Y MÉTODOS</i> .....	4
4. <i>EPIDEMIOLOGÍA</i> .....	5
5. <i>FACTORES DE VIRULENCIA</i> .....	6
6. <i>PATOGÉNESIS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS</i> .....	9
7. <i>DETECCIÓN DE CÉLULAS Y TOXINAS DE B. cereus</i> .....	13
8. <i>PREVENCIÓN Y CONTROL</i> .....	16
9. <i>CONCLUSIONES</i> .....	18
10. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	19

## Resumen

*Bacillus cereus* es un bacilo móvil, Gram positivo, anaerobio facultativo y formador de esporas altamente resistentes. Este patógeno se puede encontrar en diferentes entornos debido a su buena adaptabilidad y la termorresistencia de sus esporas, a partir de los cuales se pueden transferir a los alimentos. *B. cereus* puede causar dos tipos de enfermedades gastrointestinales: el síndrome emético y el síndrome diarreico. El síndrome emético se produce por la ingesta de alimentos contaminados con cereulida, una toxina preformada que la bacteria produce en los alimentos, los síntomas que produce esta toxina son náuseas y vómitos. El síndrome diarreico es causado por diversas enterotoxinas producidas en el intestino delgado después de la ingestión de alimentos contaminados con bacterias viables o esporas. Estas enterotoxinas son la hemolisina BL (HBL), la enterotoxina no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K (CytK), y pueden producir diarreas y dolor abdominal.

Palabras clave: *B. cereus*, intoxicación, cereulida, enterotoxinas.

## Abstract

*Bacillus cereus* is a motile, Gram-positive, facultative anaerobic, highly resistant spore-forming bacillus. This pathogen can be found in different environments because of its good adaptability and the heat resistance of its spores, from which they can be transferred to food. *B. cereus* can cause two types of gastrointestinal diseases: emetic syndrome and diarrhoeal syndrome. The emetic syndrome is caused by ingestion of food contaminated with cereulide, a pre-formed toxin that the bacterium produces in food, the symptoms of which are nausea and vomiting. Diarrhoeal syndrome is caused by various enterotoxins produced in the small intestine after ingestion of food contaminated with viable bacteria or spores. These enterotoxins are haemolysin BL (HBL), nonhaemolytic enterotoxin (Nhe) and cytotoxin K (CytK) and can cause diarrhoea and abdominal pain.

Key words: *B. cereus*, poisoning, cereulide, enterotoxins.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Bacillus cereus* es una bacteria (**Figura 1**) con forma de bacilo, anaerobia facultativa, Gram positiva, móvil, formadora de esporas y de toxinas. Esta bacteria es ubicua ya que se puede encontrar en el suelo, agua, vegetación y aire, desde donde se puede transferir a los alimentos (**1**).

Tabla 1 Taxonomía de *B. cereus*



<b>Taxonomía</b>
<b>Dominio:</b> Bacteria
<b>Filo:</b> Firmicutes
<b>Clase:</b> Bacilli
<b>Orden:</b> Bacillales
<b>Familia:</b> Bacillaceae
<b>Género:</b> <i>Bacillus</i>
<b>Grupo de especies:</b> grupo <i>Bacillus cereus</i>
<b>Especie:</b> <i>Bacillus cereus</i>

Figura 1 Tinción de Gram de *B. cereus* (2)

El grupo *B. cereus* (**Tabla 1**), también conocido como *B. cereus* sensu lato (sl), es un complejo de especies que contiene numerosos linajes estrechamente relacionados, que varían en su capacidad para causar enfermedades en humanos y animales. La clasificación de los aislamientos de *B. cereus* sl en unidades taxonómicas a nivel de especie es, por lo tanto, esencial en el ámbito de la salud pública y seguridad alimentaria. Sin embargo, la clasificación taxonómica de estos organismos es compleja. Durante las últimas dos décadas se han propuesto numerosos cambios taxonómicos, a menudo contradictorios, de forma que la taxonomía de este grupo se encuentra actualmente en revisión (**3**).

El grupo *B. cereus* incluye varias especies con filogenias estrechamente relacionadas. Los miembros más destacados de este grupo son *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*, conocidos por su potencial patógeno (**Figura 2**). Los aspectos morfológicos, fisiológicos, y la similitud de la secuencia de sus genomas respaldan las estrechas relaciones evolutivas de estas especies. Sin embargo, las tres especies difieren en sus factores de virulencia y capacidad patogénica. *B. cereus* es reconocido como un contaminante alimentario común, responsable de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. *B. anthracis* es el agente etiológico del ántrax o carbunco, cuyas esporas se pueden utilizar como arma biológica. Por su parte, *B. thuringiensis* se utiliza como biopesticida para el control de plagas

agrícolas, ya que se trata de una bacteria entomopatógena que causa una infección letal en los insectos (4).

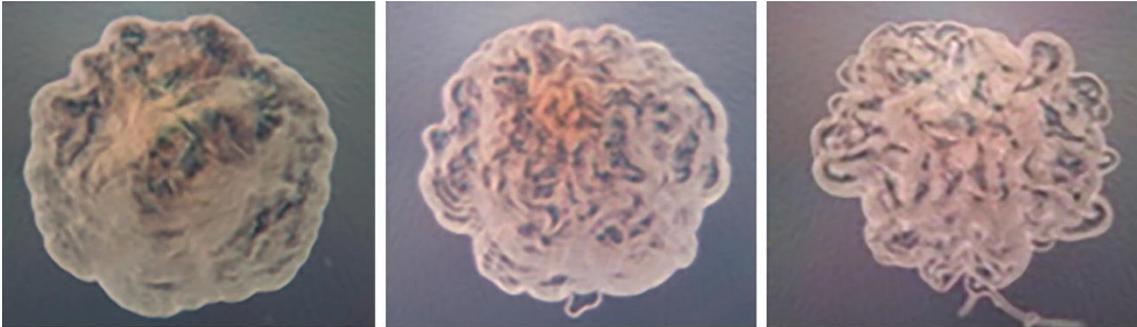


Figura 2 Morfología de las colonias de *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, los diámetros de las colonias son de aproximadamente 1mm (5)

La colonización de diferentes nichos ecológicos por *B. cereus* es posible debido a su buena adaptabilidad, a la termoresistencia de sus esporas y a la capacidad para crecer en ambientes ácidos, con altas concentraciones de sales y húmedos (Tabla 2). Las esporas pueden resistir varios desinfectantes o procesos, como la pasteurización. Una vez que las esporas germinan, las células vegetativas se multiplican y producen toxinas, las cuales son los principales factores de virulencia de este patógeno. Sin embargo, *B. cereus* no puede producir toxinas en ausencia de oxígeno o a temperaturas inferiores a los 10 °C (6).

Tabla 2 Condiciones de crecimiento de *B. cereus* (1)

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	4	30-40	55
pH	5	6-7	8,8
Actividad del agua	0,93	-	-

*B. cereus* es responsable de dos tipos de enfermedades gastrointestinales relacionadas con los alimentos. Mientras que la intoxicación alimentaria de tipo emética se manifiesta como náuseas y vómitos, las infecciones alimentarias producidas por cepas patógenas entéricas pueden causar diarrea y dolor abdominal. Las toxinas causantes son el dodecadepsipéptido cíclico cereulida (toxina emética) y las enterotoxinas proteicas

hemolisina BL (Hbl), enterotoxina no hemolítica (Nhe) y citotoxina K (CytK), respectivamente (7).

Los alimentos vegetales sin procesar son una fuente importante de *B. cereus*. Esto es debido a la amplia distribución del organismo, la capacidad de las esporas para sobrevivir en alimentos deshidratados y su notable resistencia térmica. Como resultado, la mayoría de los alimentos ingeridos pueden contener *B. cereus*, por lo que se deben adoptar medidas de control para prevenir su crecimiento en los alimentos, especialmente después de la cocción que elimina la microbiota competidora. Las cepas que producen la toxina emética crecen bien en el arroz y otros alimentos ricos en almidón, mientras que las cepas que producen las toxinas asociadas con la forma diarreica crecen en una amplia variedad de alimentos, por ejemplo: verduras, salsas, guisos, etc (6).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre *B. cereus* como agente causal de enfermedades transmitidas por alimentos, en el que se abordarán los siguientes puntos:

- Determinar la incidencia de *B. cereus* en España y países de nuestro entorno.
- Definir los factores de virulencia de este patógeno.
- Describir su patogénesis y los síntomas clínicos que produce.
- Identificar los métodos disponibles para detectar la bacteria y sus toxinas en los alimentos.
- Reseñar las medidas de prevención y control a seguir frente a *B. cereus*.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevo acabo una revisión sistemática de documentos científicos sobre la intoxicación alimentaria causada por *B. cereus*. Se realizó una búsqueda de artículos en las principales bases de datos bibliográficas disponibles en Internet (desde el 2011 al 2022), concretamente en: PubMed, SCOPUS y Web of Science, aunque también se realizaron búsquedas en páginas web de instituciones oficiales de ámbito nacional como es la Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (Elika) y en el ámbito europeo como es la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Los criterios de exclusión que se siguieron fueron el descarte de artículos repetidos, que no se consideraron de interés o cuyos contenidos no se ajustan a los objetivos de este trabajo. Las palabras claves que se utilizaron, en diferentes combinaciones, fueron: “*B. cereus*”, “*cereulide*”,

“*enterotoxin*”, “food poisoning”, “foodborne outbreak”, “emetic syndrome” y “diarrheagenic syndrome”.

#### 4. EPIDEMIOLOGÍA

En la Unión Europea (UE), las toxinas de *B. cereus* fueron la causa de 324 brotes de origen alimentario (26 de ellos en España) durante los años 2018-2020. En la **Tabla 3** se muestra el número de brotes por año en España y en el conjunto de la Unión Europea, con indicación del número de casos, hospitalizaciones y muertes (**8, 9, 10**).

Tabla 3 Brotes de origen alimentario causados por *B. cereus* en la Unión Europea y en España durante los años 2018-2020 (**8, 9, 10**)

Año	Región/País	Brotos	Casos	Hospitalizaciones	Muertes	Referencia
2020	Unión Europea	71	685	10	1	<b>(8)</b>
	España	1	6	1	0	
2019	Unión Europea	155	1636	44	7	<b>(9)</b>
	España	13	241	3	1	
2018	Unión Europea	98	1539	111	1	<b>(10)</b>
	España	12	124	3	0	

Sin embargo, la verdadera incidencia de *B. cereus* se desconoce. Esto ocurre porque los datos epidemiológicos sobre las infecciones por *B. cereus* se ven limitados por varias razones:

- Los síntomas leves, de corta duración, y la naturaleza autolimitada de la mayoría de las infecciones por *B. cereus*, se traduce en que las personas afectadas generalmente no buscan atención médica.
- Las infecciones no son de declaración obligatoria en la mayoría de los países, lo que lleva a numerosos casos no documentados y/o transmisión en la comunidad.
- La dificultad para confirmar, mediante pruebas de laboratorio, si *B. cereus* es el agente causal de los síntomas y/o la enfermedad del paciente.
- La vigilancia epidemiológica se complica aún más por la existencia de otros patógenos que pueden inducir síntomas similares a los causados por *B. cereus*, como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, lo que cuestiona la validez de los informes epidemiológicos de *B. cereus* en el contexto de los brotes de origen alimentario.

Todos estos factores conducen a la infranotificación y subestimación de la incidencia real de este patógeno en humanos (**11, 12**). Sin embargo, se estima que entre el 1,4 % y el 12 % de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo pueden atribuirse a *B. cereus* (**13**).

## 5. FACTORES DE VIRULENCIA

*B. cereus* produce varios factores de virulencia, que incluyen toxinas (cereulida y enterotoxinas formadoras de poros) y enzimas (proteasas y fosfolipasas), si bien en este trabajo nos centraremos en las toxinas por ser consideradas como los principales factores de virulencia de esta bacteria (**Figura 3**).

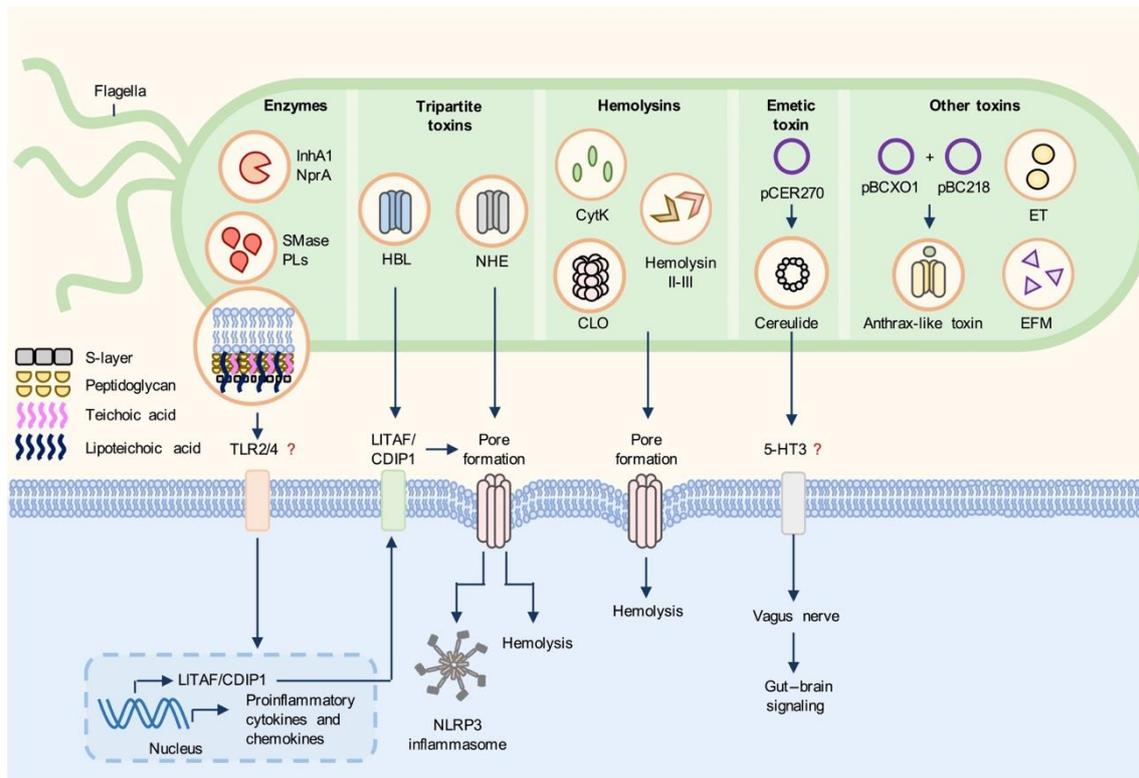


Figura 3 Principales factores de virulencia de *B. cereus*. Toxina emética (cereulida). Enterotoxinas formadoras de poros: hemolisina BL (HbL), enterotoxina no hemolítica (Nhe), citotoxina K (CytK), cereolisina (CLO) y hemolisinas (II) y (III). Enzimas: metaloproteasas (InhA1 y NprA), esfingomielinasa (SMasa) y fosfolipasas (PLs) (11)

La cereulida es un dodecadepsipéptido cíclico, que actúa como un ionóforo de potasio (Figura 4). Se trata de un péptido no ribosómico sintetizado por un gran complejo enzimático que está codificado por el operon *ces*, situado en el plásmido pCER270 (13). Se ha propuesto un mecanismo no canónico de ensamblaje de péptidos no ribosómicos para la biosíntesis de cereulida. A diferencia de la vía canónica, en la que los monómeros individuales son los componentes básicos del ensamblaje de tetradepsipéptidos, la vía no canónica utiliza dipéptidos como componentes básicos del ensamblaje de tetradepsipéptidos (14).

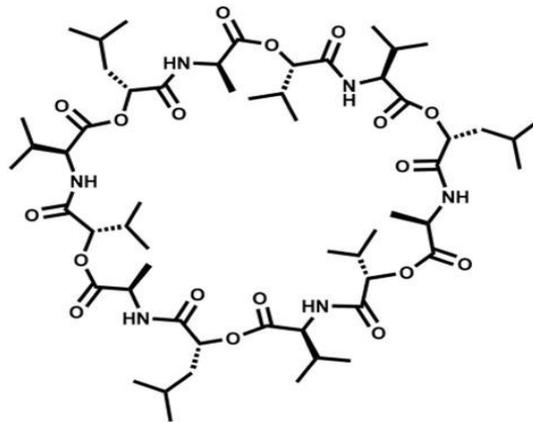


Figura 4 Estructura de la cereulida, la toxina consta de seis  $\alpha$ -aminoácidos y seis fracciones de ácido 2-hidroxicarboxílico dispuestas en tres unidades tetrapeptídicas repetidas [*d*-O-Leu-*d*-Ala-*l*-O-Val-*l*-Val]<sub>3</sub> (**13**)

La cereulida se secreta predominantemente durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, acumulándose en el alimento como toxina preformada. Después de la ingestión, la cereulida se absorbe en el intestino y se distribuye por todo el cuerpo, donde puede cruzar la barrera hematoencefálica o acumularse en el hígado, los riñones, la grasa y el tejido muscular (**15**). Se cree que el efecto emético de la cereulida depende de su interacción con los receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub> expresados en el estómago y el intestino delgado, lo que induce la señalización del intestino al cerebro a través del nervio vago (**11**).

Por otra parte, *B. cereus* secreta dos toxinas formadoras de poros de tres componentes llamadas hemolisina BL (Hbl, formada por las subunidades Hbl-B, Hbl-1 y Hbl-L2) y enterotoxina no hemolítica (Nhe, constituida por las subunidades Nhe-A, Nhe-B y Nhe-C), y una toxina de un solo componente llamada citotoxina K (CytK, también conocida como hemolisina IV). Estas toxinas se producen y secretan principalmente durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano y están reguladas por el regulador transcripcional PlcR. Durante la infección, el ambiente anaeróbico o microaerófilo del intestino promueve la producción y secreción de Hbl y Nhe. Estas enterotoxinas causan daño a las células epiteliales al formar poros que conducen a lesiones en las microvellosidades, lisis osmótica de las células epiteliales intestinales y la diarrea subsiguiente (**16**). El análisis genómico de cepas clínicas, alimentarias y ambientales de *B. cereus* ha revelado que los genes que codifican Hbl, Nhe y CytK son muy prevalentes, con *hbl* presente en el 40–92% de los aislamientos, *nhe* en el 95–98 % de los aislamientos, y *cytK* en 50–80% de los aislamientos (**17**). La alta prevalencia de estos genes sugiere que la probabilidad de que una cepa porte genes de, al menos, una de estas toxinas es muy alta y que cualquiera de estas cepas portadoras de genes toxigénicos sería capaz de causar enfermedad (**11**).

En la **Tabla 4** se recogen las características de las principales toxinas producidas por *B. cereus*.

Tabla 4 Principales toxinas producidas por *B. cereus* (18, 19)

Toxinas	Propiedades
Cereulida (Ces)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termoestable.</li> <li>• Resistente a proteasas y pH ácido.</li> <li>• Dodecadepsipéptido cíclico no ribosómico.</li> <li>• Actividad citotóxica en varias líneas celulares de mamíferos.</li> </ul>
Hemolisina BL (Hbl)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termolábil.</li> <li>• Proteína heterotrimérica.</li> <li>• Enterotoxina formadora de poros, con actividad hemolítica y citotóxica.</li> </ul>
Enterotoxina no hemolítica (Nhe)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termolábil.</li> <li>• Proteína heterotrimérica.</li> <li>• Enterotoxina formadora de poros, produce lisis osmótica de células del epitelio de la mucosa intestinal.</li> </ul>
Citotoxina K (CytK)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termolábil.</li> <li>• Proteína monomérica.</li> <li>• Enterotoxina formadora de poros, con actividad hemolítica, citotóxica y necrotizante.</li> </ul>

## 6. PATOGÉNESIS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

*B. cereus* es bien conocido como un importante patógeno transmitido por los alimentos, que puede causar dos tipos diferentes de enfermedades gastrointestinales: el tipo emético y el diarreico (**Figura 5**). Además de su papel como patógeno de transmisión alimentaria, *B. cereus* también puede producir infecciones locales y sistémicas en el ambiente hospitalario, afectando principalmente a pacientes inmunocromprometidos, con heridas (quirúrgicas o traumáticas), portadores de catéteres y recién nacidos (4).

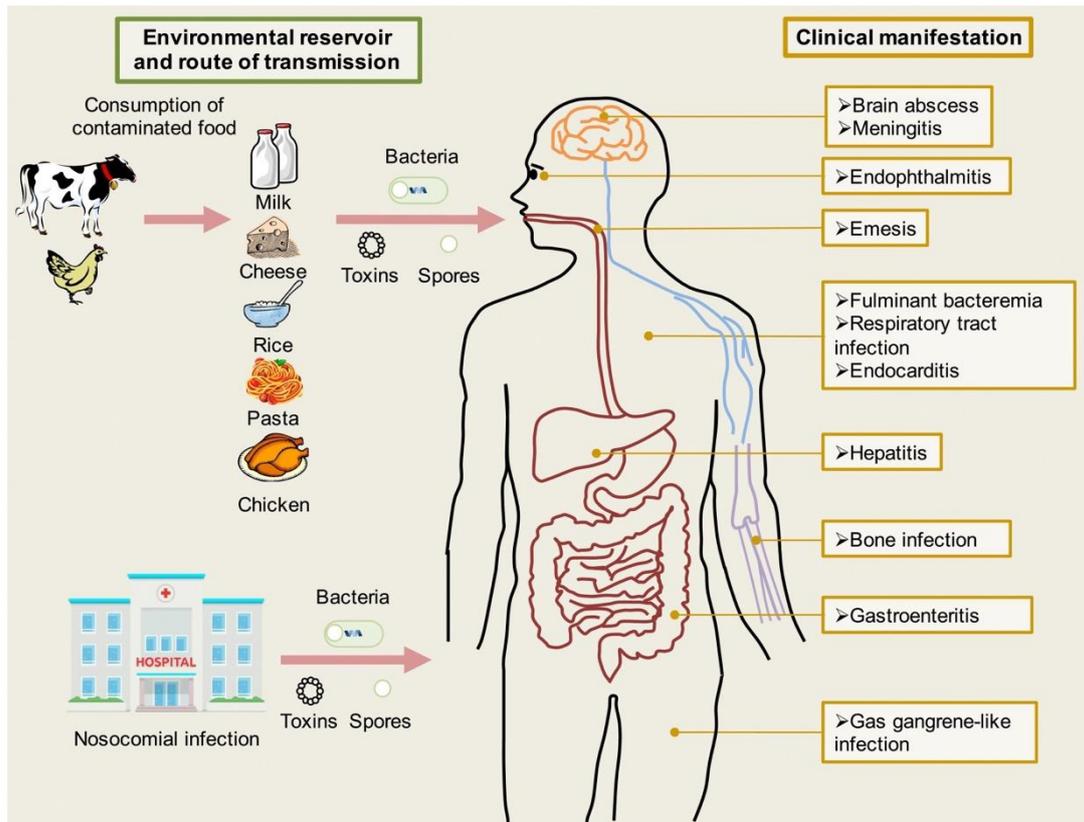


Figura 5 Reservorios ambientales y rutas de transmisión de *B. cereus* (11)

La forma emética de *B. cereus* es causada por la toxina cereulida, un péptido termoestable que se forma directamente en los alimentos. La forma emética se caracteriza por náuseas y vómitos que aparecen de 0,5 a 6 h después del consumo de alimentos contaminados. Por lo general, los síntomas no duran más de un día, pero en ocasiones se requiere hospitalización y cada vez se notifican más intoxicaciones. Las intoxicaciones graves pueden provocar insuficiencia hepática aguda y encefalopatía. Recientemente, se han descrito varias isoformas de la toxina cereulida, incluida la isocereulida A que muestra una citotoxicidad diez veces mayor que la cereulida en ensayos *in vitro*. Estas isoformas se producen en las condiciones en las que se producen y procesan los alimentos, pero su contribución exacta a las intoxicaciones aún debe dilucidarse. Además, los resultados de estudios *in vitro* realizados con niveles bajos de cereulida sugieren un papel potencial de la cereulida en la inducción de la diabetes. Por lo tanto, incluso las dosis subeméticas de cereulida pueden presentar un riesgo, que debe estudiarse con más detalle (20).

Los síntomas de la forma diarreica de *B. cereus* se caracterizan por dolor abdominal y diarrea acuosa. A diferencia de la toxina emética, las enterotoxinas asociadas con la diarrea no se producen en los alimentos en sí, sino en el intestino. Después de la ingestión de células vegetativas y esporas de *B. cereus*, la mayoría de las bacterias son destruidas

en el estómago (pH ácido, pepsina) e intestino delgado (bilis). Sin embargo, las esporas permanecen viables, pudiendo germinar y producir enterotoxinas en el intestino delgado, antes de volver a esporular en el colon debido a la limitación de nutrientes en este último (**Figura 6**) (13).

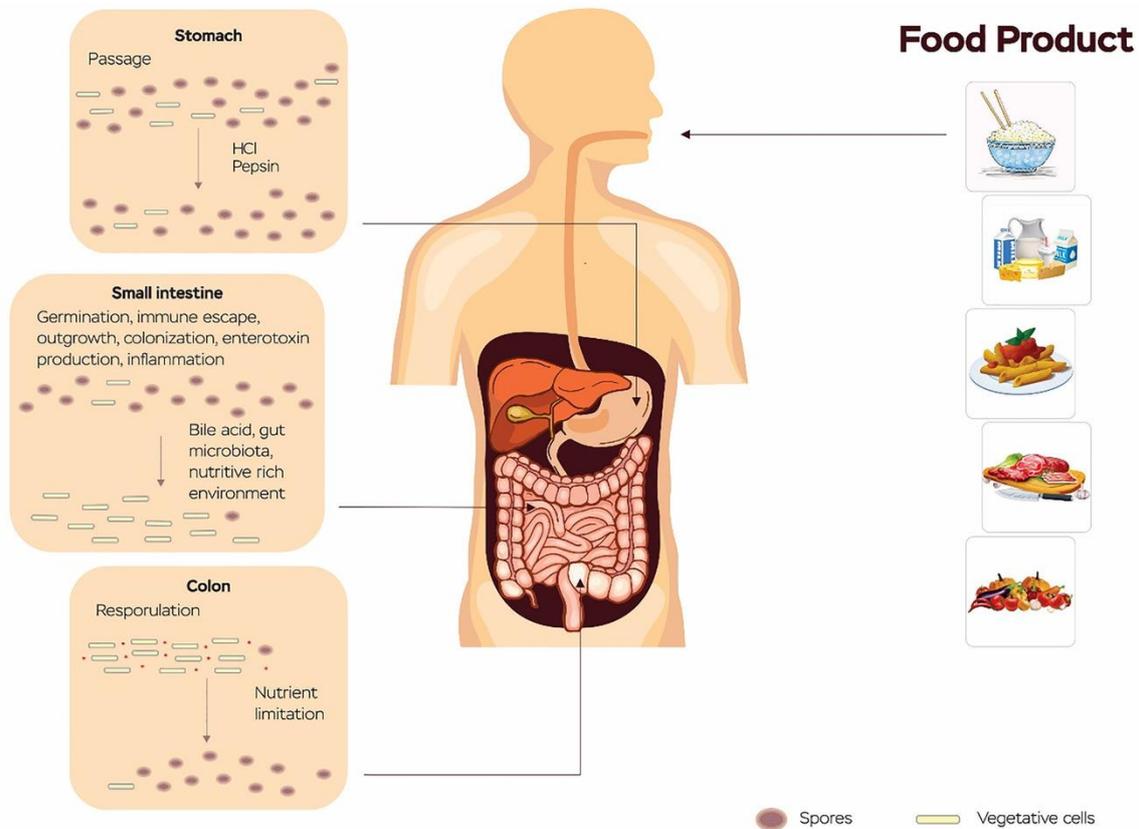


Figura 6 Ciclo de vida de *B. cereus* (células vegetativas y esporas) en el tracto gastrointestinal humano. Las esporas ingeridas con los alimentos germinan y crecen en el intestino delgado, donde se producen las enterotoxinas (13)

Como ya se ha indicado, las principales tóxicas relacionadas con el síndrome diarreico son la hemolisina BL (Hbl), la enterotoxina no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K (CytK). Además, se han discutido otros factores de virulencia que pueden contribuir a la enterotoxicidad de *B. cereus*. Por ejemplo, se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que la esfingomielinasa (SMasa) de *B. cereus* interactúa sinérgicamente con Nhe y con Hbl; por lo tanto, es tentador especular que la SMasa contribuye a la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, se necesitan más estudios para descifrar el papel exacto de la SMasa y otros factores de virulencia putativos en la patogenicidad de *B. cereus* (21, 22).

En la **Tabla 5** se presentan las principales características del síndrome emético y del síndrome diarreico.

Tabla 5 Principales características de las enfermedades transmitidas por alimentos asociadas a *B. cereus* (23, 24)

Enfermedad	Síndrome emético	Síndrome diarreico
Tipo	Intoxicación.	Toxiinfección.
Síntomas	Náuseas, vómitos, malestar general (a veces seguidos de diarrea), en algunos casos insuficiencia hepática.	Dolor abdominal, diarrea acuosa (ocasionalmente de tipo sanguinolento), a veces con náuseas.
Alimentos implicados	Alimentos ricos en almidón: arroz, pasta, patatas, pan, etc.	Alimentos ricos en proteínas, por ejemplo: productos cárnicos, pescado, productos lácteos, etc.
Periodo de latencia	0,5-6 horas.	8-16 horas.
Duración de la enfermedad	6-24 horas.	12-24 horas.
Toxinas implicadas	Cereulida: extremadamente estable inactivada a 121 °C, 90 min.	Hbl, Nhe y CytK: lábiles, inactivadas a 56 °C, 5 min
Producción de toxinas	En el alimento.	En el intestino delgado del huésped.
Dosis infectiva	10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup> ufc/g alimento. (Intoxicación: 0,02-1,83 µg cereulida/ kg de peso corporal).	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> ufc/g alimento.

## 7. DETECCIÓN DE CÉLULAS Y TOXINAS DE *B. cereus*

**Métodos convencionales (cultivo).** El aislamiento y recuento de *B. cereus* en los alimentos generalmente se realiza mediante siembra en medios selectivos y diferenciales convencionales. El medio estándar para *B. cereus* es agar manitol, yema de huevo y polimixina (MYPA) en el que las colonias de esta bacteria presentan un aspecto característico (**Figura 7**). Si la siembra en medio MYPA es positiva, es necesario confirmar la identidad de los aislados mediante una siembra en placas de agar sangre, en las que *B. cereus* produce  $\beta$ -hemólisis (**Figura 8**) (25).



Figura 7 *B. cereus* en medio MYPA, las colonias de *B. cereus* aparecen de color rosado debido a su incapacidad de fermentar el manitol, y con un halo opaco alrededor que indica actividad lecitinasa (26)



Figura 8 Confirmación de la  $\beta$ -hemólisis producida por *B. cereus* en agar sangre (halo transparente alrededor de las colonias) (2)

**Métodos moleculares.** Actualmente se dispone de pruebas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que, en combinación con los métodos convencionales, permiten identificar *B. cereus* de forma rápida y fiable. Este tipo de técnicas también se pueden aplicar a muestras de alimento para detectar el patógeno directamente, sin necesidad de aislarlo previamente, pero con ciertas limitaciones: la PCR no discrimina entre células viables y no viables y, a menudo, la amplificación del ADN se ve obstaculizada por la presencia de inhibidores en las matrices alimentarias. Por otra parte, la caracterización de cepas mediante la detección de genes que codifican diferentes toxinas (genes *ces*, *hbl*, *nhe*, *cytK*), utilizando PCR simple o múltiple, ofrece un alto nivel de sensibilidad y especificidad. No obstante, la detección de estos genes no implica que las cepas que los portan sean toxigénicas, ya que no se puede asegurar la expresión fenotípica de los mismos (27, 28).

**Métodos inmunológicos.** Las enterotoxinas producidas por *B. cereus* pueden detectarse utilizando pruebas inmunológicas comerciales, basadas en la utilización de anticuerpos que reconocen componentes de dichas enterotoxinas. El kit BCET-RPLA (Oxoid, Reino Unido) detecta la porción L2 de la enterotoxina Hbl, mientras que Tecra BDE-VIA (Tecra Diagnostics, Australia) detecta la subunidad Nhe-A de Nhe. Por su parte, la prueba Duopath Cereus Enterotoxins (Merck KGaA Chemicals, Alemania) permite detectar simultáneamente las fracciones L2 y Nhe-B de las enterotoxinas Hbl y Nhe, respectivamente (29).

**Técnicas instrumentales.** Las toxinas producidas por *B. cereus* pueden analizarse mediante técnicas cromatográficas y espectrométricas. Para la detección y cuantificación de la toxina emética se puede utilizar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o de ultra-alto rendimiento (UPLC) conectadas en tandem a espectrometría de masas (LC-MS/MS) (30) y la espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización por láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) (23). Esta última técnica también se ha incorporado al laboratorio de diagnóstico microbiológico para la identificación rutinaria de patógenos a nivel de especie, mediante la comparación del espectro proteico generado a partir de la muestra problema (células intactas de la bacteria a identificar) con los perfiles proteicos existentes en la base de datos. Recientemente se ha propuesto un nuevo método que permite la detección y cuantificación relativa de cereulida empleando sistemas de cromatografía de fase inversa (31), así como la aplicación de la técnica MALDI-TOF MS para detectar las enterotoxinas CytK y Nhe (32).

En la **Tabla 6** se recogen las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de detección comentados.

Tabla 6 Ventajas y desventajas de los métodos de detección de *B. cereus* (13, 33, 34)

Métodos	Ventajas	Desventajas
Convencionales (cultivo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sencillo y económico.</li> <li>• Solo detecta células viables.</li> <li>• Permite calcular la concentración del patógeno en el alimento y su aislamiento en cultivo puro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poca sensibilidad y especificidad.</li> <li>• Laborioso.</li> <li>• Requiere incubación (varios días para obtener resultados).</li> <li>• No diferencia cepas toxigénicas y no toxigénicas.</li> </ul>
Moleculares (PCR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preciso y rápido</li> <li>• Sensibilidad y especificidad relativamente altas.</li> <li>• Permite detectar, identificar y caracterizar cepas del patógeno.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No diferencia bacterias vivas y muertas.</li> <li>• Equipamiento costoso.</li> <li>• Personal con formación especializada</li> </ul>
Inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sencillo y rápido.</li> <li>• Pruebas comerciales disponibles para enterotoxinas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No desarrollado comercialmente para cereulida (no inmunogénica).</li> </ul>
Instrumentales (cromatografía, espectrometría de masas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preciso y rápido.</li> <li>• Permite detectar y cuantificar la cereulida y otras toxinas de <i>B. cereus</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipamiento costoso.</li> <li>• Personal con formación especializada.</li> </ul>

## 8. PREVENCIÓN Y CONTROL

La industria alimentaria debe cumplir los criterios microbiológicos especificados en el Reglamento (CE) 2073/2005 que establece un nivel máximo de aceptabilidad  $M=500$  ufc/g y un valor umbral  $m=50$  ufc/g para *B. cereus* en los alimentos de mayor riesgo (preparados deshidratados para lactantes y alimentos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses) **(35)**, así como con lo especificado en el Reglamento (CE) 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios **(36)**.

Para prevenir la transmisión de *B. cereus* por alimentos es importante aplicar sistemas de autocontrol basados en el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) y en las Buenas Prácticas de Higiene a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción del alimento hasta que este llega al consumidor. El principal tratamiento de inactivación de *B. cereus* en los alimentos es la esterilización, ya que los tratamientos térmicos convencionales como la cocción y la pasteurización no son suficientes para eliminar las esporas. A pesar de la efectividad de la esterilización, es muy difícil eliminar la cereulida preformada en el alimento debido a su gran termoestabilidad, siendo necesario aplicar esterilización a altas temperaturas en los alimentos procesados (140°C durante 45 segundos) **(5)**. En el hogar, se recomienda seguir unas buenas prácticas de higiene y manipulación de los alimentos, además de adoptar otras medidas para prevenir riesgos en alimentos que vayan a consumirse en crudo o platos preparados ya cocinados **(Tabla 7) (37)**.

Tabla 7 Recomendaciones para prevenir intoxicaciones y toxiinfecciones por *B. cereus* (37)

Buenas prácticas de higiene y manipulación de alimentos
1) Usar agua y materias primas seguras, y lavar las materias primas con abundante agua.
2) Mantener los alimentos a temperaturas seguras. Los alimentos se deben refrigerar a temperaturas inferiores a 6°C para limitar el crecimiento de <i>B. cereus</i> .
3) Separar los alimentos cocinados de los crudos para evitar la contaminación cruzada.
4) Realizar una correcta limpieza y desinfección de los utensilios, las superficies y las tablas para cortar.
5) Calentar uniformemente los alimentos sospechosos (75°C) antes de servirlos y mantenerlos calientes hasta su consumo.
Otras recomendaciones de seguridad alimentaria
1) Mantener la cadena de frío durante todo el transporte.
2) Respetar las indicaciones que figuran en la etiqueta del alimento, como la temperatura de conservación y la fecha de caducidad.
3) No descongelar los alimentos a temperatura ambiente.
4) No consumir embutidos de procedencia no garantizada.

## 9. CONCLUSIONES

Las enfermedades producidas por *Bacillus cereus* suelen ser autolimitadas, con síntomas leves y de corta duración. Esto conduce a una infranotificación e infraestimación de la incidencia real y, como resultado, a subestimar la importancia de esta bacteria como patógeno de transmisión alimentaria. Sin embargo, hoy en día se considera que *B. cereus* es una causa común de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias, por lo que se debe mejorar el seguimiento epidemiológico del patógeno, así como su control en la industria alimentaria.

Las medidas preventivas frente a *B. cereus* deben orientarse a minimizar el riesgo de contaminación de los alimentos y a evitar el crecimiento de la bacteria en los mismos. Para ello, es necesario implementar buenas prácticas de higiene y manipulación de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria, siendo especialmente relevante mantener la cadena de frío.

Dado que el síndrome emético es una intoxicación producida por la cereulida, una toxina preformada en el alimento cuya inactivación es extremadamente difícil, es importante desarrollar pruebas rápidas, más económicas y sencillas que las técnicas disponibles actualmente, con el fin de detectar y cuantificar dicha toxina en los alimentos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Elika. (2015). *Ficha B. cereus*. [www.elika.net](http://www.elika.net)
- (2) Zhang, Y., Fang, X., Chen, X., Wang, H., Liu, J., Liang, X., Gu, Y., Fang, C., & Yang, Y. (2022). *Bacillus cereus* causes fatal disease in soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*). *Aquaculture*, 547, 737473.  
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737473>
- (3) Carroll, L. M., Cheng, R. A., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2021). Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916735>
- (4) Ehling-Schulz, M., Koehler, T. M., & Lereclus, D. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus species* with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3).  
<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0032-2018>
- (5) Bhunia, A. K. (2018). *Bacillus cereus and Bacillus anthracis*. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_11)
- (6) Portuondo, I. P. (2012). *Bacillus cereus* and food poisoning. *Revista Cubana de Salud Pública*, 38(1), 98–108.  
<https://doi.org/10.1590/S0864-34662012000100010>
- (7) Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E., & Granum, P. E. (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2).  
<https://doi.org/10.3390/TOXINS13020098>
- (8) The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. (2021). *EFSA Journal*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6971>
- (9) The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. (2021). *EFSA Journal*, 19(2). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6406>
- (10) The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. (2019). *EFSA Journal*, 17(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5926>
- (11) Enosi Tuipulotu, D., Mathur, A., Ngo, C., & Man, S. M. (2021). *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host–Pathogen Interactions. *Trends in Microbiology*, 29(5), 458–471. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.09.003>

- (12) Griffiths, M. W., & Schraft, H. (2017). *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Foodborne Diseases: Third Edition*, 395–405. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6>
- (13) Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- (14) Marxen, S., Stark, T. D., Rüttschle, A., Lücking, G., Frenzel, E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., & Hofmann, T. (2015). Depsipeptide Intermediates Interrogate Proposed Biosynthesis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific Reports 2015 5:1*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep10637>
- (15) Bauer, T., Sipos, W., Stark, T. D., Käser, T., Knecht, C., Brunthaler, R., Saalmüller, A., Hofmann, T., & Ehling-Schulz, M. (2018). First insights into within host translocation of the *Bacillus cereus* toxin cereulide using a porcine model. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 2652. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02652/BIBTEX>
- (16) Duport, C., Jobin, M., & Schmitt, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1550. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01550/BIBTEX>
- (17) Ramarao, N., & Sanchis, V. (2013). The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus cereus*: A Review. *Toxins 2013, Vol. 5, Pages 1119-1139*, 5(6), 1119–1139. <https://doi.org/10.3390/TOXINS5061119>
- (18) Carlin, F., & Nguyen-The, C. (2013). Pathogen update: *Bacillus* species. *Advances in Microbial Food Safety*, 1, 70–96. <https://doi.org/10.1533/9780857098740.2.70>
- (19) Ehling-Schulz, M., Messelhäusser, U., & Granum, P. E. (2014). *Bacillus cereus* in Milk and Dairy Production. *Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens*, 275–289. <https://doi.org/10.1128/9781555817121.CH19>
- (20) Messelhäuser, U., & Ehling-Schulz, M. (2018). *Bacillus cereus* a Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 120–125. <https://doi.org/10.1007/S40588-018-0095-9/TABLES/1>
- (21) Doll, V. M., Ehling-Schulz, M., & Vogelmann, R. (2013). Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PloS One*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061404>

- (22) Jeßberger, N., Dietrich, R., Bock, S., Didier, A., & Märtlbauer, E. (2014). *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*, 77, 49–57.  
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2013.10.028>
- (23) Delbrassinne, L., Andjelkovic, M., Rajkovic, A., Botteldoorn, N., Mahillon, J., & van Looco, J. (2011). Follow-up of the *Bacillus cereus* emetic toxin production in penne pasta under household conditions using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food Microbiology*, 28(5), 1105–1109.  
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2011.02.014>
- (24) Kumari, S., & Sarkar, P. K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69, 20–29.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.04.012>
- (25) UNE-EN-ISO 7932:2021, Método de horizontal para el recuento de *B. cereus* presuntivos, (2021).
- (26) Altaf, M. S., Willayat, M. M., & Imtiyaz, H. A. (2011). *Study on the prevalence of Bacillus cereus emetic strains in raw milk in and around Srinagar City*.  
<https://biomedpharmajournal.org/vol4no1/a-study-on-the-prevalence-of-bacillus-cereus-emetic-strains-in-raw-milk-in-and-around-srinagar-city-of-j-and-k/>
- (27) Pontieri, E. (2016). *Bacillus cereus* Group Diagnostics: Chromogenic Media and Molecular Tools. *The Diverse Faces of B. cereus*, 15–33.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801474-5.00002-5>
- (28) Porcellato, D., Narvhus, J., & Skeie, S. B. (2016). Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.05.012>
- (29) Linback, T., & Granum, P. E. (2015). *Bacillus cereus* phospholipases enterotoxins and other hemolysins. In *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins* (4th ed., pp. 858–876). [https://www.researchgate.net/profile/Ekaterina-Nestorovich/publication/286973786\\_Inhibiting\\_Bacterial\\_Toxins\\_by\\_Channel\\_Blockage/links/5b97f2cc92851c4ba80fe8f0/Inhibiting-Bacterial-Toxins-by-Channel-Blockage.pdf#page=858](https://www.researchgate.net/profile/Ekaterina-Nestorovich/publication/286973786_Inhibiting_Bacterial_Toxins_by_Channel_Blockage/links/5b97f2cc92851c4ba80fe8f0/Inhibiting-Bacterial-Toxins-by-Channel-Blockage.pdf#page=858)
- (30) UNE-EN-ISO 18465:2017 Análisis cuantitativo de la toxina emética (cereulide) utilizando LC-MS/MS. (2017).

- (31) Kalbhenn, E. M., Bauer, T., Stark, T. D., Knüpfer, M., Grass, G., & Ehling-Schulz, M. (2021). Detection and Isolation of Emetic *Bacillus cereus* Toxin Cereulide by Reversed Phase Chromatography. *Toxins*, 13(2).  
<https://doi.org/10.3390/TOXINS13020115>
- (32) Tsilia, V., Devreese, B., De, I. B., Mesuere, B., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., van de Wiele, T., & Heyndrickx, M. (2012). Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(6–7), 1691–1702. <https://doi.org/10.1007/S00216-012-6254-6/TABLES/4>
- (33) Abbasian, F., Ghafar-Zadeh, E., & Magierowski, S. (2018). Microbiological Sensing Technologies: A Review. *Bioengineering 2018*, Vol. 5, Page 20, 5(1), 20. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING5010020>
- (34) Grutsch, A. A., Nimmer, P. S., Pittsley, R. H., & McKillip, J. L. (2018). *Bacillus* spp. as Pathogens in the Dairy Industry. *Foodborne Diseases*, 15, 193–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00007-5>
- (35) Reglamento (CE) 2073/2005 Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, 31 (2015).  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20180101&from=EN>
- (36) Reglamento (CE) 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios, (2004). <https://www.boe.es/doue/2004/139/L00001-00054.pdf>
- (37) *ELIKA Seguridad Alimentaria | Bacillus - ELIKA Seguridad Alimentaria*. (2021, February 19).  
<https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/bacillus/#limites>