

DEPARTAMENT MEDICINA PREVENTIVA I SALUT
PÚBLICA

DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL
CONTROL DEL BACILLUS CEREUS EN ALIMENTOS

JUAN FRANCISCO MARTÍNEZ BLANCH

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 12 de setembre de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Javier Hernández Haba
- D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz
- D. Buenaventura Guamis López
- D. David Rodríguez Lazaro
- D^a. M^a José Ocio Zapata

Va ser dirigida per:

D^a. Rosa Aznar Novella

D^a. Esperanza Garay Aubán

©Copyright: Servei de Publicacions
Juan Francisco Martínez Blanch

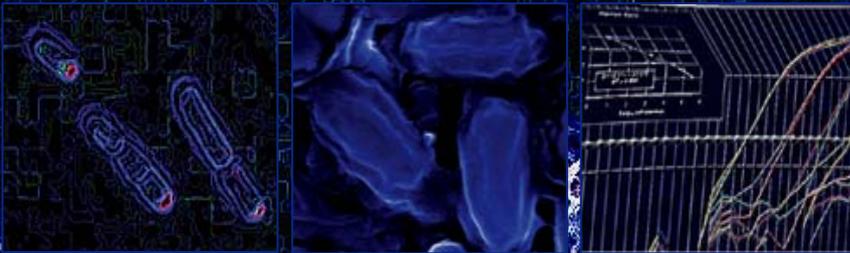
Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7346-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT D VALÈNCIA



DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL CONTROL DE *Bacillus cereus* EN ALIMENTOS

Juan Fco. Martínez Blanch

Tesis doctoral
Valencia, 2008

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultad de Farmacia

**DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL
CONTROL DE *Bacillus cereus* EN ALIMENTOS**

Juan Fco. Martínez Blanch

Tesis Doctoral

Valencia, 2008



Universidad de Valencia
Facultad de Farmacia
Dept. Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencia
de los Alimentos, Toxicología y Medicina Legal



Instituto de Agroquímica y Tecnología de los
Alimentos (IATA), Dept. de Biotecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Colección Española de Cultivos Tipo (CEPT)
Universidad de Valencia

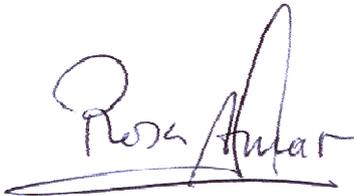
Rosa Aznar Novella, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, y miembro del Claustro Científico ampliado del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC, Valencia) y

Esperanza Garay Aubán, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia y Directora de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT),

CERTIFICAN:

Que Juan Fco. Martínez Blanch ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral “**Desarrollo de métodos rápidos para el control de *Bacillus cereus* en alimentos**” en las instalaciones del IATA, dentro de la línea de investigación “**Detección de bacterias en alimentos por técnicas moleculares**” y en las instalaciones de la Colección Española de Cultivos Tipo, y autorizan la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Burjasot, a 29 de mayo de 2008.



Rosa Aznar Novella



Esperanza Garay Aubán

EL presente trabajo de Tesis ha sido realizado dentro del proyecto “Detección e identificación rápida de bacterias alterantes de alimentos por PCR”, financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (ref. AGL2000-1462, 2001-2003) y la CECT. El doctorando ha disfrutado de una beca dentro del programa de Formación de Doctores en Unidades Asociadas entre Universidades y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (ref. UA-BPD2002).

A mis padres

Agradecimientos

En esta Tesis no podrían faltar unas líneas dedicadas a la multitud de personas que de forma desinteresada, me han ayudado en la realización de este proyecto, contribuyendo de esta forma, a forjar estrechos lazos de amistad. ¡Muchas gracias, siempre podréis contar conmigo!

Quiero agradecer en primer lugar a mis directoras Rosa Aznar, compañera de viaje desde el principio, y Esperanza Garay, actual directora de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), el haber hecho posible esta tesis doctoral. Ha sido un placer poder formar parte de vuestros grupos de trabajo, no sólo a nivel profesional sino también personalmente. Gracias por vuestro apoyo constante, ánimo y buenos consejos.

A Federico Uruburu, director de Tesis, maestro y amigo, aunque desafortunadamente ya no se encuentre entre nosotros, seguirá siempre vivo en nuestra memoria. Es y será referencia constante en mi vida. Loly y Federico me dieron la primera oportunidad y agradezco el poder haber formado parte de la CECT. Recuerdo con mucho cariño aquella época de alumno colaborador y les doy gracias porque me enseñaron a ver el mundo desde otro punto de vista. Loly me inició en el trabajo de laboratorio y siempre recordaré sus clases, consejos y buen sentido del humor. Tiempo después aún sigo descubriendo cuanto me enseñaron tanto a nivel personal como a nivel científico. De forma especial, agradezco a Laura el acogerme y enseñarme todo lo que sé de hongos filamentosos y mucho más, toda su amistad, apoyo y dedicación. Tampoco me puedo olvidar de mis compis, con los que he aprendido muchas cosas además de vivir momentos muy bonitos: gracias a M^a José, Patri, Merche, Ana, Pedro, Begoña, Chemi, Inma, Lucia, Raquel, Carmela, Mapy, Bea, Rosa, David, y M^a Carmen.

A mis compañeros de bancada del laboratorio 306 del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA): Benito, Alicia, Patri, Mapy, Edu, Miriam, Ana, Montse y en especial a Empar, Bea y Patri. Todos habéis hecho que mi trabajo en el laboratorio haya sido realmente agradable. No olvidaré los buenos momentos que hemos pasado juntos. Quiero agradecer también a nuestros vecinos de laboratorio, el estar ahí cuando os necesité: Mariam, Josep, Pepa. Esther, Meritxell, Fátima, Pedro, M^a José, JV, Daniel, Patri M., Roseta,

Patri R., Carmela, M^a José, Teresa, Amparo, Mariola, Ivan, Begoña, Antonio, Emilia, Maria, Oscar, Juanan, Boro, Lluïsa, Marga, Andrew, Maria, Fernando, Salvador, Paloma, Manolo y Gaspar. En general a todas las personas que forman o han formado parte del departamento de Biotecnología, de los distintos servicios o departamentos del IATA o de Biópolis. He disfrutado mucho compartiendo con todos vosotros tertulias, comidas, fiestas, seminarios y congresos. ¡A todos, gracias!

A las personas de los diferentes grupos de investigación de la Universidad de Valencia, muchos de ellos profesores y amigos durante mis estudios. A Javi mi compañero de Tesis del laboratorio de Esperanza y en general a toda la gente del departamento de Microbiología y Ecología; a Neus, Pilar, Loles... del departamento de Fisiología Animal; a Ana y Joan Ferré del departamento de Genética; a David Conhesa del departamento de Estadística y a Amparo del Servicio de Secuenciación. Gracias por el soporte técnico e instrumental que ha enriquecido enormemente este trabajo.

A Nela, Joan Quiles, Silvia Guiral y Vicent Yusá de la Consejería de Sanidad, y a Odorina Tello, del Centro Nacional de Epidemiología, por la buena disponibilidad mostrada para facilitarme información muy interesante.

A mis compañeros de Ainia Centro Tecnológico, Amparo, Carol, David, José Luís, Tere, Begoña, Cristina, Raquel, Susana, Alejandro... por vuestros ánimos y ayuda.

A mis amigos, gracias por estar cuando os he necesitado.

Y por último, a mi familia. A mis padres, por haber confiado siempre en mí, a mi hermana y a mis sobrinas Maria e Irene, a mis abuelos, tíos y primos, gracias por vuestros ánimos y apoyo.

Juan. Fco. Martínez Blanch

ÍNDICE

ÍNDICE

	Pág.
Certificado.....	V
Agradecimientos.....	XI
Índice.....	XV
Índice de tablas.....	XXI
Índice de figuras.....	XXIII
Abreviaturas.....	XXV
Resumen.....	XXVIII
Abstract.....	XXXII
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- El “grupo <i>Bacillus cereus</i>”: Aspectos taxonómicos y filogenéticos.....	3
2.- La especie <i>B. cereus</i>.....	12
2.1.- Toxiinfecciones alimentarias clásicas.....	13
2.2.- Otros factores de virulencia.....	15
3.- Epidemiología de las toxiinfecciones causadas por <i>B. cereus</i>.....	17
4.- Métodos tradicionales de análisis de <i>B. cereus</i> en alimentos.....	19
5.- La PCR como técnica para la identificación, detección y cuantificación de <i>B. cereus</i>.....	21
5.1.- Detección e identificación.....	24
5.2.- PCR cuantitativa a Tiempo Real (Q-PCR): fundamento y tipos.....	26
5.2.1.- Sistemas inespecíficos.....	28
5.2.2.- Sistemas específicos.....	29
5.3.- Aplicación de la Q-PCR en alimentos.....	31
5.4.- Detección y cuantificación de formas viables.....	35
5.4.1.- Monoazida de Etidio-Q-PCR (EMA-PCR).....	36
5.4.2.- NASBA cuantitativo (Q-NASBA).....	37
5.4.3.- Q-PCR con transcripción inversa (Q-RT-PCR).....	38
II.- OBJETIVOS.....	41

III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	47
2.- Caracterización fenotípica.....	50
3.- Preparación de suspensiones calibradas de <i>B. cereus</i>.....	50
3.1.- Suspensiones de células.....	50
3.2.- Suspensiones de esporas.....	51
4.- Ensayos de germinación de esporas.....	51
5.- Aislamiento de ácidos nucleicos.....	53
5.1.- Extracción de DNA genómico de células vegetativas.....	53
5.2.- Extracción de DNA genómico a partir de suspensiones de esporas	54
5.3.- Extracción de RNA total a partir de células vegetativas.....	55
6.- Cuantificación de ácidos nucleicos.....	56
6.1.- Métodos espectrofotométricos.....	56
6.2.- Métodos espectrofluorimétricos.....	57
7.- Selección del gen diana para la detección de <i>B. cereus</i>.....	58
7.1.- Detección de genes de virulencia mediante PCR convencional.....	58
7.2.- Diseño de oligonucleótidos para Q-PCR.....	60
7.3.- Secuenciación de DNA y análisis de secuencias.....	61
8.- PCR cuantitativa.....	62
8.1.- Sistema SYBR Green.....	62
8.2.- Sistema TaqMan.....	63
8.3.- Rectas patrón de cuantificación.....	63
9.- PCR cuantitativa con transcripción inversa.....	64
9.1.- Eliminación de DNA: tratamientos con DNAsa I.....	65
9.2.- Sistema SYBR Green.....	65
9.3.- Sistema TaqMan.....	66
9.4.- Rectas patrón de cuantificación.....	67
10.- Ensayos en alimentos.....	67
10.1.- Contaminación artificial con células vegetativas.....	67
10.2.- Contaminación artificial con esporas.....	68
10.3.- Alimentos con contaminación natural.....	68
11.- Análisis estadísticos.....	69

IV.- RESULTADOS	71
1.- Caracterización fenotípica	73
2.- Detección de genes de virulencia por PCR convencional	83
3.- Especificidad de los oligonucleótidos diseñados para PCR cuantitativa	86
4.- PCR cuantitativa a Tiempo Real	92
4.1.- Puesta a punto de la Q-PCR: Sistema SYBR Green.....	92
4.2.- Puesta a punto de la Q-PCR: Sistema TaqMan.....	94
4.3.- Rectas patrón de cuantificación: SYBR Green y TaqMan.....	95
4.4.- Aplicación en alimentos.....	101
4.4.1.- Ensayos en alimentos inoculados artificialmente: huevo líquido y leche en polvo infantil.....	101
4.4.2.- Análisis de alimentos con contaminación natural.....	104
5.- Ensayos con suspensiones de esporas de <i>B.cereus</i>	105
5.1.- Tratamientos con diferentes germinantes.....	105
5.2.- Aislamiento de DNA genómico.....	108
5.3.- Aplicación en alimentos inoculados artificialmente.....	113
6.- PCR cuantitativa con transcripción inversa	117
6.1.- Aislamiento del RNA total.....	117
6.2.- Optimización del tratamiento con DNasa I.....	117
6.3.- Q-RT-PCR: Sistema SYBR Green.....	118
6.4.- Q-RT-PCR: Sistema TaqMan.....	120
6.5.- Aplicación en huevo líquido inoculado artificialmente.....	122
V.- DISCUSIÓN	125
1.- Diversidad fenotípica	128
2.- Perfiles genéticos de virulencia	130
3.- Desarrollo de la PCR cuantitativa	133
4.- Obtención de DNA a partir de esporas	138
5.- Desarrollo de la PCR cuantitativa con transcripción inversa	141
6.- Aplicación de la PCR cuantitativa en alimentos	142
7.- Detección de esporas en alimentos	147

8.- Aplicación de la PCR cuantitativa con transcripción inversa en alimentos.....	148
VI.- CONCLUSIONES.....	149
VII.- APÉNDICE.....	153
VIII.- ANEXOS.....	159
IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	177

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Posición sistemática de los géneros constituyentes del género *Bacillus sensu lato*. Pág. 5-6.

Tabla 2.- Características diferenciales entre las especies del “grupo *B. cereus*”. Pág. 9.

Tabla 3.- Cepas bacterianas utilizadas en este estudio. Pág. 47-49.

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados en este estudio para el análisis de la presencia de los diferentes genes de virulencia. Pág. 60.

Tabla 5.- Resultados de la caracterización fenotípica en las cepas analizadas. Pág. 78-81.

Tabla 6.- Oligonucleótidos diseñados en este estudio para su utilización en PCR cuantitativa. Pág. 86.

Tabla 7.- Homología de los cebadores diseñados con las secuencias diana en diferentes cepas del “grupo *B. cereus*”. Pág. 87.

Tabla 8.- Caracterización genotípica de las cepas utilizadas en el estudio (perfiles RAPDs y genes de virulencia) y resultados de la amplificación por PCR con los cebadores diseñados. Pág. 88-91.

Tabla 9.- Valores de C_T obtenidos para la construcción de las rectas patrón de cuantificación a partir de diluciones de DNA, utilizando los sistemas SYBR Green y TaqMan. Pág. 96.

Tabla 10.- Valores de C_T obtenidos para la construcción de las rectas patrón de cuantificación a partir de suspensiones calibradas de células, utilizando los sistemas SYBR Green y TaqMan. Pág. 97.

Tabla 11.- Valores obtenidos para establecer el límite de cuantificación utilizando los intervalos al 95% obtenidos por Simulación Montecarlo. Pág. 100.

Tabla 12.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR en huevo líquido contaminado artificialmente. Pág. 102.

Tabla 13.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR en leche en polvo infantil contaminada artificialmente. Pág. 103.

Tabla 14.- Detección de *B. cereus* en alimentos con contaminación natural. Pág. 104.

Tabla 15.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR a partir de sus- pensiones de esporas. Pág. 114.

Tabla 16.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR a partir de ali- mentos inoculados con esporas. Pág. 115.

Tabla 17.- Resultados de los análisis de regresión correspondientes a los ensayos con suspensiones de esporas, esporas inoculadas en huevo líquido y en le-che en polvo infantil recogidos en las Tablas 15 y 16. Pág. 117.

Tabla 18.- Curva patrón para cuantificación de células viables de *B. cereus* mediante TaqMan Q-RT-PCR. Pág. 122.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación gráfica del aumento de la fluorescencia (ΔRn) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de C_T para las muestras A y B. Pág. 27.

Figura 2.- Principales tipos de sondas utilizadas en Q-PCR: a) sondas de hidrólisis, b₁) sondas de hibridación en bucle y b₂) sondas de hibridación (FRET). Pág. 31

Figura 3.- Aspecto típico de las colonias de *B. cereus* en Agar selectivo PEMBA y respuestas a las pruebas de confirmación empleadas según la Norma ISO 7932, A) 1993/Cor.1 1997 y B) 2004. Pág. 73.

Figura 4.- Dendograma UPGMA, obtenido utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, donde se muestra el agrupamiento de los perfiles fenotípicos de API para las cepas en estudio. Pág. 82.

Figura 5.- Productos de amplificación por PCR correspondientes a los distintos cebadores específicos de genes de virulencia ensayados. Pág. 84.

Figura 6.- Dendograma UPGMA, obtenido utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, donde se muestra el agrupamiento de las cepas en estudio en función de los perfiles de factores de virulencia. Pág. 85.

Figura 7.- Curvas de amplificación obtenidas mediante SYBR Green Q-PCR. Pág. 92.

Figura 8.- Análisis de las curvas de disociación de los amplificadores obtenidos para las cepas de *B. cereus* que muestra el rango de T_m de las especies del "grupo *B. cereus*". Pág. 93

Figura 9.- Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón, a partir de DNA y de células mediante el sistema SYBR Green y TaqMan. Pág. 98.

Figura 10.- Cinética de germinación en las cepas *B. cereus* CECT 148^T (A), *B. cereus* CECT 131 (B), *B. thuringiensis* CECT 197^T(C), *B. mycoides* CECT 4128^T (D), *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T (E) y *B. pseudomycooides* CECT 7065^T (F), para las condiciones ensayadas. Pág. 107.

Figura 11.- Productos de la amplificación por PCR convencional, utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3, y como molde el DNA obtenido mediante extracción con Qiagen (A), y una dilución 10^{-3} del mismo (B), para los tratamientos ensayados T-2) 80 °C, 10 min; T-3) 100 °C, 10 min y T-4) 121 °C (1 atm.), 20 min. Pág. 109.

Figura 12.- Rendimiento de la extracción de DNA (%) respecto a la muestra control, estimado mediante PicoGreen (A) y SYBR Green Q-PCR utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3 (B), para los tratamientos ensayados. Pág. 110.

Figura 13.- Representación gráfica LSD (“Least Significant Difference”) del análisis de la varianza para los diferentes tratamientos analizados. Pág. 111.

Figura 14.- Rendimiento de los procedimientos ensayados en la extracción de DNA (%) respecto a la muestra control, estimado mediante SYBR Green Q-PCR para distintas especies del “grupo *B. cereus*”. Pág. 112-113.

Figura 15.- Electroforesis de RNA total aislado con tres métodos comerciales diferentes. Pág. 117.

Figura 16.- Secuencia del producto de amplificación de $T_m = 82$ °C obtenido por Q-RT-PCR. Pág. 119.

Figura 17.- Optimización de la reacción de Q-RT-PCR en modo SYBR Green, curvas de disociación de los amplificadores obtenidos a diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (derivada de la ΔRn frente a la temperatura en °C). Pág. 120.

Figura 18.- Curvas de amplificación obtenidas mediante TaqMan Q-RT-PCR para las diferentes concentraciones de células ensayadas (ufc/reacción). Pág. 121.

Figura 19.- Curvas de amplificación obtenidas por TaqMan Q-RT-PCR de muestras de huevo líquido inoculadas con *B. cereus* y tabla de valores de C_T correspondientes a 4 repeticiones (dos replicados en ensayos independientes). Pág. 123.

ABREVIATURAS

A	Adenina
A _{xxx}	Absorbancia a una longitud de onda determinada
AL	“Aproved list” nombre de especie incluido en la lista del ICNB
APT	Agua de peptona tamponada
atm.	Atmósfera(s)
<i>B. c.</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. m.</i>	<i>Bacillus mycooides</i>
<i>B. pm.</i>	<i>Bacillus pseudomycooides</i>
<i>B. w.</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
cDNA	DNA copia de RNA
C	Citosina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
C _T	“Threshold cycle” (ciclo umbral)
CCY	Medio de esporulación
dATP	Desoxi-adenina-tri-fosfato
dCTP	Desoxi-citosina-tri-fosfato
DDBJ	“DNA Data Bank of Japan”
DE	Desviación estándar
dGTP	Desoxi-guanina-tri-fosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNasa	Desoxiribonucleasa
DNAr	DNA ribosómico
dNTP	Desoxi-nucleótidos tri-fosfato
dUTP	Desoxi-uracilo-tri-fosfato
<i>E</i>	Eficiencia de amplificación
EAC	Control externo de amplificación
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético (Na ₂ EDTA-2-H ₂ O)
<i>e. g.</i>	Por ejemplo (<i>exempli gratia</i>)
EMA	Monoazida de etidio
EMA-PCR	PCR cuantitativa con tratamiento con EMA previo

EMBL	“European Molecular Biology Laboratory” (Laboratorio Europeo de Biología Molecular)
ER	Exactitud relativa
<i>et al.</i>	y colaboradores (<i>et alii</i>)
FAM	6-carboxilfluoresceína
fg	Fentogramo
FRET	“Fluorescent Resonance Energy Transfer” (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia)
g	Gramo
G	Guanina
h	Hora
<i>hν</i>	Energía de un fotón
IAC	“Internal Amplification Control” (Control Interno de Amplificación)
ICNB	“International code of bacteriological nomenclature (Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica)
ID	Identificación
IN	“Invalid name” (nombre no admitido por el ICNB)
INRA	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
ISO	“International Organization for Standardization” (Organización Internacional para la Estandarización)
ISR	Región espaciadora intergénica
Kb	Kilobase
L	Litro
Log ₁₀	Logaritmo en base 10
LSD	“Least Significant Difference” (Diferencia Mínima Significativa)
M	Molar
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
mm	Milímetro(s)

NA	Agar nutritivo
NASBA	“Nucleic Acid Sequence-Based Amplification”
ng	Nanogramo(s)
NT	Cepa neotipo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEMBA	Agar yema de huevo, manitol y polimixina B
pg	Picogramo
pH	Inversa del logaritmo de la concentración de H ⁺
p/v	Peso/volumen
Q-PCR	PCR cuantitativa
Q-RT-PCR	PCR cuantitativa con transcripción inversa
Q-NASBA	NASBA cuantitativa
R ²	Coefficiente de correlación
Rn	Fluorescencia normalizada
ΔRn	Variación de fluorescencia normalizada
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RAPD	“Random amplified polymorphic DNA” (polimorfismo de productos de amplificación con cebadores arbitrarios)
RFLP	“Restriction Fragment Length Polimorphism” (polimorfismo de fragmentos de restricción de longitud variable)
rpm	Revoluciones por minuto
RNA _r	RNA ribosómico
RT-PCR	PCR con transcripción inversa
s	Segundo(s)
(s)	Pendiente
sp	Especies
SDS	“Sodium dodecyl sulfate” (dodecil sulfato sódico)
SST	Solución salina con Tween 80, 0,1 % (p/v)
T	Timina
T	Especie tipo
T*	Índice de tipicidad

T(°C)	Temperatura
T _m	“Melting temperature” (temperatura de fusión)
TAE	Tris-acetate (40 mM); EDTA (1 mM)
TE	Tris-HCl (10 mM); EDTA (1 mM)
Tris-HCl	“Tris-hidroximetil-aminometane choride hydroxide”
TSA	Triptona soja agar
TSPB	Caldo triptosa soja y polimixina B
U	Unidades
ufc	Unidades formadoras de colonias
UNG	Uracil N-glicosidasa
UPGMA	“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean” (método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética)
UV	Luz ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
VP	“Valid name” (nombre de especie válidamente publicado)
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micra
°C	Grados Celsius
% ID	Porcentaje de positividad

RESUMEN

RESUMEN

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo esporulado contaminante habitual de alimentos tanto frescos como procesados. La detección y cuantificación de este patógeno de alimentos se realiza habitualmente por técnicas culturales. Dichas técnicas consumen mucho tiempo y, en ocasiones, llevan a identificaciones erróneas. Como alternativa, las técnicas moleculares basadas en la PCR tienen como ventaja una mayor rapidez y seguridad en la identificación del microorganismo, e incluso permiten su cuantificación mediante PCR a tiempo real (Q-PCR). En este estudio se han desarrollado diferentes métodos para el control de este microorganismo en alimentos, basados en la técnica de la PCR.

A partir de una colección de cepas de referencia y aislados de alimentos, identificados previamente por métodos fenotípicos, (ISO 7932 y API-50CH/B) y genotípicos, (ISR-PCR y RAPD), se determinó la presencia de genes relacionados con factores de virulencia mediante PCR convencional. El gen *pc-plc* se detectó en un mayor porcentaje en las cepas del “grupo *B. cereus*”, y dado que se encuentra en una única copia por genoma, fue seleccionado como gen diana. Se diseñaron 5 oligonucleótidos para el desarrollo de procedimientos de Q-PCR en modo SYBR Green y Taqman. Se optimizaron los parámetros de la reacción de cuantificación, y se evaluó su especificidad para el “grupo *B. cereus*”, resultando más adecuado el procedimiento de SYBR Green Q-PCR. A continuación se ensayó la capacidad para la detección y cuantificación en alimentos contaminados artificialmente: huevo líquido y leche en polvo infantil. Como resultado el sistema desarrollado ha demostrado su capacidad para la cuantificación de *B. cereus* entre 10^5 y 10^0 ufc/ml a partir de la matriz ensayada, que corresponde al mismo nivel que el método de referencia por recuento en placa.

Dado que *B. cereus* puede estar presente en alimentos tanto en forma vegetativa como esporulada, para su detección por PCR se abordó, asimismo el desarrollo de un protocolo para asegurar la liberación del DNA a partir de esporas. Se partió de suspensiones calibradas de esporas que fueron sometidas a diferentes tratamientos: a) térmicos y b) adición de germinadores en diferentes combinaciones. Tras los tratamientos, se realizó la extracción de DNA con DNeasy Tissue kit (Qiagen), se cuantificó y se evaluó el rendimiento espectrofluorimétricamente (PicoGreen, Invitrogen) y mediante PCR convencional y SYBR Green Q-PCR. El tratamiento de germinación con 0,5 mM L-alanina/inosina resultó el más eficiente en suspensiones concentradas de esporas. Sin embargo, cuando se ensayó en alimentos inoculados (10^4 - 10^0 esporas/ml), la extracción con DNeasy Tissue Kit, sin necesidad de tratamientos previos, resultó satisfactorio.

Por último, se realizó una aproximación cuantitativa para la detección de formas viables de *B. cereus*. Para ello se desarrolló un procedimiento de PCR a tiempo real con transcripción inversa (Q-RT-PCR) utilizando como diana el RNA mensajero del gen *pc-plc*, como indicador del estado de viabilidad celular. El nivel de sensibilidad obtenido por Q-RT-PCR fue de 30 células/reacción a partir de suspensiones celulares, y de 847 células/reacción tras su aplicación en huevo líquido.

Los procedimientos de Q-PCR y Q-RT-PCR desarrollados en este estudio han mostrado ser eficientes para detectar la presencia de las especies del “grupo *B. cereus*” en alimentos, al menos al mismo nivel que el método de referencia, permitiendo además la cuantificación incluso de formas viables.

ABSTRACT

ABSTRACT

Bacillus cereus is a rod-shaped, Gram-positive sporeforming bacterium widely recognized as a food poisoning organism. Detection of this pathogen in food is usually carried out by culture techniques that are time consuming and frequently lead to misidentifications. As an alternative, molecular genetic techniques allow rapid, sensitive and accurate detection. In the present work, PCR based systems were applied for a rapid and unequivocal detection of “*B. cereus* group” which would be very valuable in food safety assessment.

The presence of virulence genes was tested by PCR amplification in a collection of reference strains and food isolates that had been phenotypically and genotypically characterized. The *pc-plc* gene showed the highest prevalence among the tested strains and five oligonucleotides were designed in order to develop SYBR Green and TaqMan real-time PCR (Q-PCR) procedures. The SYBR Green Q-PCR was applied on spiked liquid egg and dried infant formulae showing suitable quantification results in a range of 10^5 to 10^0 ufc/ml, and high degrees of correspondence between Q-PCR assays and plate counts. To assess detection of *B. cereus* spores by PCR procedures, several DNA isolation methods were tested on spore suspensions: i) heat treatment and ii) germination triggered by nutrient germinants followed by DNA isolation (DNeasy tissue kit, Qiagen). Recovery of DNA was evaluated by PCR, Q-PCR, and PicoGreen fluorescence (Invitrogen). Germination with L-alanine 0.5 mM/inosine 0.5 mM rendered the maximum rate of DNA at 10^8 spores/ml. However, DNA extraction without any modifications rendered similar DNA recovery on 10^5 to 10^0 spores/ml range. Spore detection was established in 3-4 spores/reaction using both spore suspensions and spiked food samples. Besides pathogen detection, cell viability is important in food safety. Thus a one-step Q-RT-PCR detection system, was established to investigate the presence of

metabolically active cells. By using this approach, 30 cells/reaction and 847 cells/reaction were detected in cell suspensions and spiked liquid egg samples, respectively.

The developed Q-PCR and Q-RT-PCR systems proved to be highly sensitive and specific for the rapid and accurate detection and quantification of species of the “*B. cereus* group” in food, and constitute a promising tool in the detection of *B. cereus* including spores as well as viable cells.

**DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL
CONTROL DE *Bacillus cereus* EN ALIMENTOS**

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

1.- El “grupo *Bacillus cereus*”: Aspectos taxonómicos y filogenéticos

El género *Bacillus*, desde su descripción a finales del siglo XIX (Cohn, 1872) hasta la actualidad, ha sufrido considerables cambios desde el punto de vista taxonómico. En un principio, cualquier microorganismo en forma de bastón podría ser considerado como una especie perteneciente a este género, e.g. *Bacillus coli* (Wilkinson, 1930). Los investigadores rara vez tenían la oportunidad de comparar sus cultivos y, en consecuencia, descripciones morfológicas más o menos rigurosas llevaron a incrementar considerablemente el número de especies en este género, siendo en muchos casos nuevos sinónimos de especies ya descritas. Ante esta situación, Smith y colaboradores establecieron una definición del género *Bacillus* de tipo práctico: “bacterias en forma de bastón capaces de formar endosporas refringentes en aerobiosis, más resistentes al calor, a la desecación y a otros agentes destructivos que la forma vegetativa”, y realizaron una detallada y extensa revisión del género *Bacillus* pasando de 158 especies a 39 (Smith *et al.*, 1952, Gordon *et al.*, 1973). En los años 80, los trabajos realizados por Carl Woese y colaboradores revolucionaron la taxonomía bacteriana, pues propusieron la utilización del gen de la subunidad pequeña de RNAr como un reloj molecular adecuado para el análisis filogenético (Woese y Fox, 1977; Fox *et al.*, 1977, 1980). Cuando los taxónomos moleculares se interesaron por el género *Bacillus*, pronto descubrieron que la definición tradicional de “bacilos capaces de formar endosporas en aerobiosis”, aunque útil desde un punto de vista práctico, no se correspondía con los resultados filogenéticos. Mediante la clasificación filogenética basada en las secuencias del gen de RNAr

16S, diferenciaban hasta 5 grupos de especies en el género *Bacillus* (Ash *et al.*, 1991 y 1993), ampliándose más tarde a 6 grupos por Nielsen *et al.* (1994). Estos resultados mostraban la enorme diversidad filogenética del género, quedando entremezclados algunos grupos con microorganismos Gram positivos no esporulados. Desde entonces, el conjunto de bacterias Gram positivas formadoras de endosporas en aerobiosis, considerado como género *Bacillus sensu lato*, ha ido sufriendo remodelaciones, adaptándose a las nuevas especies descritas a partir de especies ya conocidas y a partir de nuevas descripciones. En la actualidad cuenta con un total de 29 nuevos géneros de microorganismos aerobios formadores de endosporas, distribuidos en 7 familias, de las 11 que integran el orden *Bacillales*. Así mismo, el género *Bacillus sensu stricto* cuenta con 142 especies válidamente descritas pertenecientes a los grupos 1 y 2 de RNAr 16S (J.P. Euzéby: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature; www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html), y sigue siendo el género más extenso y el de mayor diversidad genética de los 17 que integran la familia *Bacillaceae* (ver Tabla 1, actualizada a partir de Fritze, 2004).

Dentro del grupo 1 de RNAr 16S se distinguen los “grupos”: *B. cereus* y *B. subtilis*, constituidos cada uno por un conjunto de especies con un alto grado de similitud en sus secuencias (Fritze, 2004; Blackwood *et al.*, 2004). En el “grupo *B. cereus*” se incluyen 6 especies: *B. cereus* (Frankland y Frankland, 1887), conocido principalmente como causante de intoxicaciones alimentarias; *B. thuringiensis* (Berliner, 1915), ampliamente empleado por sus propiedades como insecticida; *B. anthracis* (Cohn, 1872), agente causal de la enfermedad del ántrax; *B. mycooides* (Flügge, 1886), relacionado con la estimulación del crecimiento de coníferas; *B. weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998), capaz de crecer a temperaturas de refrigeración y *B. pseudomycooides* (Nakamura, 1998), considerado como una especie muy próxima a *B. mycooides*.

Tabla 1.- Posición sistemática de los géneros constituyentes del género *Bacillus sensu lato* (bacterias Gram-positivas formadoras de endosporas en aerobiosis) en negrita, en base al análisis filogenético de las secuencias de 16S rRNA/DNA^a.

Posición Sistemática ^b		Nº especies
Familia I. <i>Bacillaceae</i> ^{AL}		
Género I.	<i>Bacillus</i> ^{AL}	142/2
Género II.	<i>Amphibacillus</i> ^{VP}	3
Género III.	<i>Anoxybacillus</i> ^{VP}	9
Género IV.	<i>Exiguobacterium</i> ^{VP}	
Género V.	<i>Filobacillus</i> ^{VP}	1
Género VI.	<i>Geobacillus</i> ^{VP}	17
Género VII.	<i>Gracilibacillus</i> ^{VP}	3
Género VIII.	<i>Halobacillus</i> ^{VP}	9
Género IX.	<i>Jeotgalibacillus</i> ^{VP}	1
Género X.	<i>Lentibacillus</i> ^{VP}	7
Género XI.	<i>Marinibacillus</i> ^{VP}	2
Género XII.	<i>Oceanobacillus</i> ^{VP}	5/2
Género XIII.	<i>Paraliobacillus</i> ^{VP}	1
Género XIV.	<i>Saccharococcus</i> ^{VP}	
Género XV.	<i>Salibacillus</i> ^{VP}	— ^c
Género XVI.	<i>Ureibacillus</i> ^{VP}	3
Género XVII.	<i>Virgibacillus</i> ^{VP}	9
Familia II. <i>Alicyclobacillaceae</i>		
Género I.	<i>Alicyclobacillus</i> ^{VP}	8/2
Género II.	<i>Sulfobacillus</i> ^{VP}	4
Familia III. <i>Pasteuriaceae</i> ^{AL}		
Género I.	<i>Pasteuria</i> ^{AL}	4
Familia IV. <i>Caryophanaceae</i> ^{AL}		
Género I.	<i>Caryophanon</i> ^{AL}	
Familia V. <i>Listeriaceae</i>		
Género I.	<i>Listeria</i> ^{AL}	
Género II.	<i>Brochothrix</i> ^{AL}	
Familia VI. <i>Paenibacillaceae</i>		
Género I.	<i>Paenibacillus</i> ^{VP}	76/1
Género II.	<i>Ammoniphilus</i> ^{VP}	2
Género III.	<i>Aneurinibacillus</i> ^{VP}	5
Género IV.	<i>Brevibacillus</i> ^{VP}	14
Género V.	<i>Oxalophagus</i> ^{VP}	
Género VI.	<i>Thermicanus</i> ^{VP}	
Género VII.	<i>Thermobacillus</i> ^{VP}	1
Familia VII. <i>Planococcaceae</i> ^{AL}		
Género I.	<i>Planococcus</i> ^{AL}	
Género II.	<i>Filibacter</i> ^{VP}	
Género III.	<i>Kurthia</i> ^{AL}	
Género IV.	<i>Planomicrobium</i> ^{VP}	
Género V.	<i>Sporosarcina</i> ^{AL}	6

Tabla 1.- (Continuación)

Posición Sistemática^b		Nº especies
Familia VIII. <i>Sporolactobacillaceae</i>		
Género I.	<i>Sporolactobacillus</i> ^{AL}	6/2
Género II.	<i>Marinococcus</i> ^{VP}	
Familia IX. <i>Staphylococcaceae</i>		
Género I.	<i>Staphylococcus</i> ^{AL}	
Género II.	<i>Gemella</i> ^{AL}	
Género III.	<i>Jeotgalicoccus</i> ^{VP}	
Género IV.	<i>Macrocooccus</i> ^{VP}	
Género V.	<i>Salinicoccus</i> ^{VP}	
Familia X. <i>Thermoactinomycetaceae</i>		
Género I.	<i>Thermoactinomyces</i> ^{AL}	3
Género II.	<i>Laceyella</i> ^{AL}	2
Género III.	<i>Thermoflavimicrobium</i> ^{AL}	1
Género IV.	<i>Seinonella</i> ^{AL}	1
Familia XI. <i>Turicibacteraceae</i>		
Género I.	<i>Turicibacter</i> ^{AL}	

^a“Taxonomic Outline of Bergey’s Manual” (<http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>) y “List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature” (Euzéby J.P., <http://www.bacterio.cict.fr/mail.html>). ^bSe incluyen las familias y géneros pertenecientes al Orden I, *Bacillales*, de la Clase III, *Bacilli*, del Filo BXIII *Firmicutes*. ^cEspecies transferidas al género *Virginobacillus*. ^{AL}, Nombres incluidos en la lista de nombres aprobados por el Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (ICNB). ^{VP}, Nombres válidamente publicados desde la edición de la lista anterior.

Las especies del “grupo *B. cereus*”, al igual que el resto de especies del género *Bacillus*, pertenecen al grupo de bacterias de bajo contenido en G+C, mostrando los valores más bajos del amplio rango definido para el género (entre 33,2 y 64,6 % mol) (Priest, 1993; De Vos, 2002). Sus células presentan un diámetro de al menos 1 µm, acumulan gránulos de poli-β-hidroxibutirato y presentan esporas elipsoidales (ligeramente cilíndricas), no deformantes del esporangio. Son en general, mesófilos y neutrófilos, anaerobios facultativos y Voges-Proskauer (VP) positivos (Claus y Berkeley, 1986).

Se diferencian del resto de especies del género por la no producción de ácido a partir del manitol, y por la actividad lecitinasas. La diferenciación entre las especies del “grupo *B. cereus*” se basa en las siguientes características: movilidad, capacidad hemolítica, formación del cristal parasporal, crecimiento rizoidal, resistencia a la

penicilina y susceptibilidad a la lisis por fagos gamma. En la Tabla 2 se muestra las principales diferencias entre las especies del “grupo *B. cereus*” (Fritze, 2002; Lindbäck y Granum, 2005).

Sin embargo, es frecuente la presencia de características atípicas en nuevos aislamientos de las especies del “grupo *B. cereus*” lo que dificulta su identificación. Así, una característica fenotípica como la movilidad, está presente en la mayoría de miembros de las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis*, existiendo excepciones de cepas no móviles. La distinción entre *B. cereus* y *B. weihenstephanensis* es problemática debido a la existencia de cepas de *B. cereus* psicrótrofas (presentan crecimiento a 6°C y no a 42°C), que no corresponden con el perfil molecular (gen de RNAr 16S y gen *cspA*) establecido para *B. weihenstephanensis* (Stenfors y Granum, 2001). Las cepas de *B. anthracis* se diferencian del resto de especies del grupo en que presentan susceptibilidad a la penicilina y a los fagos gamma, y en que no son hemolíticas. No obstante, se han descrito cepas de *B. anthracis* que pueden mostrar actividad hemolítica débil (Farrar y Reboli, 1991). En algunos casos la diferenciación sólo es posible por el perfil de ácidos grasos como es el caso de las especies *B. pseudomycooides* y *B. mycooides*. Muchas de las características fenotípicas de las especies del grupo, como la formación del cristal parasporal de *B. thuringiensis*, los factores de virulencia de *B. anthracis* o el crecimiento rizoidal de *B. mycooides*, están codificadas en plásmidos o son dependientes del cultivo. En consecuencia, es frecuente encontrar cepas de *B. thuringiensis* no productoras de la toxina parasporal, *B. anthracis* no virulentas por la pérdida de sus plásmidos, y cepas de *B. mycooides* o *B. pseudomycooides* que han perdido la capacidad de crecimiento rizoidal, y por tanto son indistinguibles de *B. cereus*. Así mismo, las cepas de *B. cereus* que adquieren los plásmidos correspondientes son indistinguibles de *B. thuringiensis* o *B. anthracis*. Por ejemplo, se

ha descrito la existencia de cepas de *B. thuringiensis* que muestran virulencia en humanos tras infecciones en heridas (Damgaard *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1998), así como cepas implicadas en gastroenteritis (Jackson *et al.*, 1995). Más recientemente se ha observado que ciertas cepas de *B. cereus* son capaces de causar una sintomatología similar al ántrax por la presencia de un plásmido análogo al de *B. anthracis* (Hoffmaster *et al.*, 2004, 2006; Okinaka *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista filogenético, los valores de homología de las secuencias del gen de RNAr 16S en todas las cepas del “grupo *B. cereus*” son superiores al 98 %, e incluso superiores al 99 % si se excluye de la comparación a *B. pseudomycooides* y *B. weihenstephanensis*, indicando una estrecha relación entre ellas. Estos valores podrían corresponder a la variación esperada para una única especie o entre los múltiples operones de RNAr presentes en estas especies. Sin embargo, los resultados de hibridación DNA-DNA son contradictorios. Se han encontrado porcentajes inferiores al 70 % para cepas de una misma especie, y porcentajes superiores entre diferentes especies del grupo (Priest, 1993; Fritze, 2002; La Duc *et al.*, 2004).

La aplicación de técnicas moleculares con potencial para la diferenciación a nivel intraespecífico, como la electroforesis de campo pulsante (PFGE), la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y el tipado mediante secuenciación multilocus (MLST), han revelado una gran diversidad intraespecífica en las especies del “grupo *B. cereus*” que no permite la separación en especies (Carlson *et al.*, 1992, 1994, 1996; Carlson y Kolstø, 1994; Lövgren *et al.*, 2002; Helgason *et al.*, 2000a, 2000b y 2004; Priest *et al.*, 2004; Ehling-Schulz *et al.*, 2005; Daffonchio *et al.*, 2006). La caracterización por el análisis de los fragmentos de restricción del producto de

Tabla 2.- Características diferenciales entre las especies del “grupo *B. cereus*”.

	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. pseudomycooides</i> ^a	<i>B. weihenstephanensis</i> ^b
Manitol	-	-	-	-	-	-
Actividad lecitinasa	D	+	+	+	+	+
Movilidad	-	+	+	-	-	ND
Cristal parasporal	-	-	+	-	-	ND
Crecimiento rizoidal	-	-	-	+	+	-
Hemólisis	-	+	+	+	ND	ND
Resistencia penicilina	-	+	+	+	ND	ND
Lisis por fagos gamma	+	-	-	ND	ND	ND

^aSegún la descripción de Nakamura (1998), esta especie es muy similar a *B. mycooides*, no es distinguible por características fisiológicas ni morfológicas, pero sí diferenciable en base a la composición de ácidos grasos y a la secuencia del gen de RNAr 16S.

^bSegún la descripción de Lechner (1998), esta especie es similar a *B. cereus* en morfología celular y utilización de sustratos y se diferencia por la capacidad de crecimiento a 7 °C y no a 42 °C, y mediante PCR utilizando cebadores específicos dirigidos a los genes: RNAr 16S y *cspA* (“cold shock protein A”).

ND, no determinado.

D, débil.

amplificación (PCR-RFLP) (Daffonchio *et al.*, 2000, 2003; Shangkuan *et al.*, 2000; Torkar y Mozina 2000, Joung y Côté 2002; Manzano *et al.*, 2003a; Cherif *et al.*, 2003a; Ouoba *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2005), la amplificación de la región espaciadora entre los genes de RNAr 16S y 23S (PCR-ISR) (Borin *et al.*, 1997; Daffonchio *et al.*, 1998, 2003), el polimorfismo de productos de amplificación con cebadores arbitrarios (RAPDs) (Schraft *et al.*, 1996, Stephan *et al.*, 1996; Shangkuan *et al.*, 1998, Nilsson *et al.*, 1998, Andersson *et al.*, 1999, Svensson *et al.*, 1999; Torkar y Mozina, 2000, Ehling-Schulz *et al.*, 2005), la amplificación con cebadores dirigidos a elementos repetitivos del genoma (Rep-PCR) (Cherif *et al.*, 2003b; Reyes-Ramírez y Ibarra, 2005; Cooper y Mckillip, 2006) y el análisis de los perfiles obtenidos por amplificación de fragmentos de longitud variables (AFLP) (Hill *et al.*, 2004; Ticknor *et al.*, 2001; Keim *et al.*, 1997), tampoco han permitido la separación de las distintas especies o han demostrado un alto grado de diversidad entre las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Sin embargo, *B. anthracis* resultó ser un grupo consistentemente monomórfico. La caracterización genotípica mediante perfiles ISR y RAPDs con 3 cebadores universales (M13, T3 y T7), obtenida en nuestro laboratorio (Anexo I), coincide con la obtenida mediante las técnicas anteriores, agrupando las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, pero separándolas claramente de las especies *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* y *B. pseudomycoides* (Ocio *et al.*, 2002; Martínez-Blanch *et al.*, 2003).

La comparación de las secuencias de los genomas publicados de *B. anthracis* Ames (Read *et al.*, 2003), *B. cereus* ATCC 14579^T (Ivanova *et al.*, 2003) y *B. cereus* ATCC 10987 (Rasko *et al.*, 2004) revela un alto grado de coincidencia, desde aproximadamente un 91 % hasta un 94 % entre varias cepas de *B. cereus* y *B. anthracis*. Aparentemente, los genomas se estructuran en una gran región de genes que es común para diferentes especies del “grupo *B. cereus*”

y presentan otras regiones con genes relacionados con fagos y/o plásmidos que contribuyen especialmente a esta diversidad (Carlson *et al.*, 1994, 1996; Parkhill y Berry, 2003; Rasko *et al.*, 2005). Dichos plásmidos son frecuentemente intercambiados entre los diferentes miembros de las especies del grupo (Jensen *et al.*, 2003; Read *et al.*, 2003), incluso se han encontrado localizaciones para su ensamblaje y/o integración en el cromosoma (Carlson y Kolstø, 1994; Rasko *et al.*, 2004, 2005). De este modo se generan fenotipos específicos que distinguen a las especies del grupo, y al ser intercambiables entre ellas, pueden dar lugar a cambios en el fenotipo original (Helgason *et al.*, 2000b; Rasko *et al.*, 2005).

Las diferentes aproximaciones utilizadas para esclarecer el estatus taxonómico de los integrantes del “grupo *B. cereus*” apuntan a que pueda tratarse de una sola especie, aunque por cuestiones prácticas relacionadas con sus diversas aplicaciones, tanto de tipo económico como social, las especies del grupo se siguen denominando de forma independiente (Turnbull *et al.*, 2002; Priest *et al.*, 2004). Por tanto, el término “grupo *Bacillus cereus*”, aunque no tiene categoría taxonómica, resulta conveniente para nombrar al conjunto de especies filogenéticamente relacionadas que lo integran (Turnbull *et al.*, 2002).

2.- La especie *B. cereus*

B. cereus es un microorganismo ubicuo, que se aísla de gran variedad de muestras ambientales (Granum, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Kramer y Gilbert, 1989), y se considera un habitante saprofito del suelo. Sin embargo, estudios recientes de la composición del genoma (Ivanova *et al.*, 2003), parecen indicar que las especies del “grupo *B. cereus*” han evolucionado a partir de un ancestro común, habitante del intestino de insectos, ya sea como simbiote o parásito (Jensen *et al.*, 2003). Debido a su abundancia y a la resistencia de sus esporas, *B. cereus* es contaminante de prácticamente todos los productos agrícolas y juega un papel importante en la contaminación y alteración de alimentos. Se ha aislado frecuentemente de casi todo tipo de alimentos, incluyendo arroz, productos lácteos, especias, espaguetis y otros tipos de pasta, alimentos desecados, carne, pollo, vegetales, frutas semillas y marisco (Granum *et al.*, 1997; Te Giffel *et al.*, 1997; Ehling-Schulz *et al.*, 2004). La combinación de factores como son la abundancia y ubicuidad del microorganismo, la resistencia térmica y la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración (García-Armesto *et al.*, 1997; Meer *et al.*, 1991; Van Netten *et al.*, 1990), hace difícil el control de *B. cereus* en la cadena de producción de alimentos (Kotiranta *et al.*, 2000). Aunque *B. cereus* no es considerado un microorganismo muy resistente a tratamientos térmicos, comparado con otras especies mesófilas del género “*Bacillus*” se ha observado una gran diversidad en cuanto a termoresistencia (Sarrías *et al.*, 2002; De Vries, 2006), describiéndose incluso, cepas altamente resistentes capaces de resistir tratamientos de 30 s a 125 °C (Te Giffel *et al.*, 2002) o aislados con valores D (tiempo requerido para destruir el 90 % de esporas a una temperatura dada) por encima de 100 y 200 min a 90 °C (Dufrenne *et al.*, 1994, 1995). Además, las esporas de *B. cereus* son muy hidrofóbicas y poseen *exosporium*, apéndices y/o *pili*

(Rönner *et al.*, 1990; Ardenesson *et al.*, 1995; Granum, 1997), por lo que se adhieren con facilidad a multitud de superficies. Dichas características contribuyen a la formación de biopelículas (Andersson *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 2006, Peng *et al.*, 2001), lo que les hace más resistentes a los desinfectantes o detergentes utilizados (Peng *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 2002), persistiendo en las instalaciones y constituyendo una vía de contaminación frecuente de los alimentos.

B. cereus ha sido relacionado con toxiinfecciones alimentarias y su carácter patógeno se debe a la producción de factores de virulencia. Pero además, tanto *B. cereus* como otras especies del grupo, son alterantes de alimentos. Así, en la leche y productos lácteos, *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. weihenstephanensis* se aíslan como alterantes habituales causando malos olores, cuajado dulce y agriado (Heyndrickx y Scheldeman, 2002; Meer *et al.*, 1991).

2.1.- Toxiinfecciones alimentarias clásicas

Bacillus cereus se ha asociado con toxiinfecciones gastrointestinales de diferente sintomatología:

- El síndrome emético se caracteriza por provocar náuseas, vómitos y calambres abdominales, entre 0,5-6 h después del consumo del alimento contaminado (Granum, 2002; Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Los síntomas son similares a los de la intoxicación por *Staphylococcus aureus*, y su rápida aparición indica la presencia de una toxina preformada en el alimento, que en el caso de *B. cereus* se denomina “cereúlida” (Agata *et al.*, 1995a). Se trata de una molécula pequeña de 1,2 KDa, termorresistente y acidorresistente, de la familia de los ionóforos de potasio. Interfiere en la fosforilación oxidativa, llevando a la inactivación de las mitocondrias, lo que constituye el mecanismo de toxicidad. Su síntesis enzimática es de

tipo no ribosómico por una péptido sintasa, codificada por los genes *cesA* y *cesB* situados en un plásmido de gran tamaño (200 kb), formando una molécula cíclica dodecadepsipeptídica. Los primeros datos sobre su toxicidad se obtuvieron en ensayos con animales, evidenciando su capacidad de producir emesis. Posteriormente se desarrollaron métodos más accesibles como los ensayos con líneas celulares HEP-2 o con espermatozoides, en los que provocan vacuolización o parálisis, respectivamente, o por cromatografía (Kramer y Gilbert, 1989; Hughes *et al.* 1988; Andersson *et al.*, 1998, Häggblom *et al.*, 2002). Se han registrado al menos 2 casos de muerte causada por la toxina cereúrida por consumo de espagueti al pesto (Mahler *et al.* 1997) y de ensalada de pasta (Dierick *et al.*, 2003).

- El síndrome diarreico se caracteriza por dolor abdominal, diarrea y, en ocasiones, náuseas entre 8-16 h después del consumo del alimento contaminado. Está asociado a la producción de varias toxinas: la enterotoxina HBL, la enterotoxina NHE y la citotoxina K. Su sintomatología coincide con la de la intoxicación por *Clostridium perfringens*. La enterotoxina HBL es una proteína con actividad hemolítica, dermonecrotizante, que afecta a la permeabilidad vascular y provoca una acumulación de líquido en los ensayos en asa ileal ligada de conejo (Beecher *et al.*, 1995). Se compone de tres subunidades y está codificada por 4 genes organizados en un operón (*hbl*): el gen *hblA*, el gen *hblB*, el gen *hblC* y el gen *hblD* (Beecher y Wong 1994,1997; Ryan *et al.*, 1997). La toxina no hemolítica NHE (“Non Haemolytic Enterotoxin”, Lund y Granum, 1996) posee una estructura similar a la enterotoxina HBL, y está codificada por los genes, *nheA*, *nheB* y *nheC*, en el operón *nhe*. La enterotoxina Nhe es citotóxica al igual que HBL, pero no es hemolítica. Tanto para la enterotoxina HBL como para la enterotoxina NHE existen ensayos inmunológicos comerciales para la detección de algunos de sus componentes (L2, gen *hblC* y *nheA*).

La citotoxina K (CytK) es una proteína con actividad hemolítica, necrotizante y citotóxica, codificada por el gen *cytK*. Fue aislada en cepas implicadas en una toxiinfección alimentaria, en la que se registraron 3 muertes (Lund *et al.*, 2000). Su toxicidad se debe a la formación de poros en la membrana celular, como en las toxinas β descritas en *C. perfringens* y *Sta. aureus*, provocando la pérdida del equilibrio osmótico celular.

Todas las cepas relacionadas con intoxicaciones del tipo emético forman un grupo muy homogéneo con fenotipo diferenciable (Pirttijärvi *et al.*, 1999; Raevuori *et al.*, 1977) que podría representar un linaje de cepas eméticas de *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Sin embargo, la capacidad de causar infecciones, originando cuadros clínicos de tipo diarreico, parece estar asociada a cepas del “grupo *B. cereus*” que poseen los genes de al menos una de las toxinas HBL, NHE o CytK (Pruß *et al.*, 1999; Guinebretière *et al.*, 2002; Gaviria *et al.*, 2000; Stenfors *et al.*, 2002). Además, no todas las cepas tienen la misma capacidad de causar diarrea. Las cantidades de enterotoxina producida y la actividad citotóxica en líneas celulares Caco2 varían dependiendo de la cepa (Choma *et al.*, 2000, Guinebretière *et al.*, 2002, Dietrich *et al.*, 2005). Aunque se han descrito casos del tipo emético asociados con niveles de 10^3 ufc/g de alimento contaminado (Kramer y Gilbert, 1989), se estima que la dosis infectiva mínima para ambos tipos de toxiinfección, se encuentra aproximadamente entre 10^5 - 10^8 ufc/g de alimento consumido, lo que sugiere que es necesaria una alta dosis para causar el cuadro clínico típico (Granum, 2002).

2.2.- Otros factores de virulencia

Además de las toxinas causantes de toxiinfecciones alimentarias, en *B. cereus* se ha descrito la producción de otras proteínas o factores

de virulencia, así como su participación en otro tipo de enfermedades de tipo no gastrointestinal o en la potenciación de la gravedad de las infecciones o intoxicaciones gastrointestinales. Las afecciones habituales donde se ha aislado a *B. cereus* son de tipo muy variado, tales como endoftalmitis, periodontitis e infecciones sistémicas que pueden complicarse especialmente en pacientes neutropénicos, inmunocomprometidos y en neonatos prematuros (Beecher *et al.*, 2000; Drobniowski *et al.*, 1993; Helgason *et al.*, 2000b).

Entre los metabolitos relacionados con la virulencia de *B. cereus* se encuentran:

a) Otras proteínas con actividad enterotóxica como, la enterotoxina FM, codificada por el gen *entFM* (Asano *et al.*, 1997), o como la enterotoxina BceT, codificada por el gen *bceT* (Agata *et al.*, 1995b) y descartada posteriormente por descubrirse que derivaba de un artefacto en el clonaje (Choma y Granum, 2002; Hansen *et al.*, 2003).

b) Las fosfolipasas C, cuya actividad enzimática consiste en la lisis de los fosfolípidos de las membranas celulares, siendo un mecanismo que permite a las bacterias resistir a los fagocitos. *B. cereus* produce 3 fosfolipasas C diferentes (Drobniowski *et al.*, 1993; Kotiranta *et al.*, 2000). La fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) codificada por el gen *pi-plc*, hidroliza específicamente el fosfatidilinositol y las fosfatidilinositol glicinas. La fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC) y la esfingomielinasa (SM-PLC) están codificadas por los genes *pc-plc* y *sph* (también conocidos como *cerA* y *cerB*) organizados en un mismo operón (Pomerantsev *et al.*, 2003). PC-PLC participa principalmente en la hidrólisis de fosfatidilcolina, y SM-PLC en la de los esfingolípidos, lo que les

confiere actividad hemolítica (el conjunto de las dos fosfolipasas también se conoce como “cereolisina AB” (Gilmore *et al.*, 1989).

c) Las proteínas con actividad hemolítica que actúan formando poros o arcos en las membranas como la cereolisina O (Wang *et al.*, 1997), codificada por el gen *clo*, de la familia de la estreptolisina O, o como la hemolisina II (HlyII) (Baida *et al.*, 1999), la hemolisina III (HlyIII) (Baida y Kuzmin, 1995,1996) y la hemolisina IV (HlyIV) (Bercheer *et al.*, 2000) descritas posteriormente.

d) Otras proteínas y estructuras como metaloproteasas, colagenasas y β -lactamasas que pueden participar en diferentes mecanismos de patogenicidad (Granum, 2002), o como las esporas, o la capa S de algunas cepas, que facilitan la adhesión a las células epiteliales lo que les confiere la resistencia a la fagocitosis constituyendo en sí un factor de virulencia (Andersson *et al.*, 1998, Kotiranta *et al.*, 2000).

3.- Epidemiología de las toxiinfecciones causadas por *B. cereus*

El porcentaje de toxiinfecciones alimentarias asociadas a *B. cereus* está ligado al sistema de vigilancia epidemiológica establecido en cada país, por lo que no es posible su comparación de forma exhaustiva entre países. En general, su incidencia se encuentra infravalorada debido a que la mayoría de las sintomatologías producidas por *B. cereus* son de gravedad media y los casos no son de declaración obligatoria (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). En EE.UU., entre los años 1999 y 2004, el 2,5 % de las toxiinfecciones alimentarias fueron causadas por *B. cereus*, ocupando un séptimo lugar entre los agentes etiológicos de tipo bacteriano (CDC, “Food Disease outbreak Line listing”, <http://www.cdc.gov/foodborne-outbreaks/>). En Europa, entre 1999-2000, *B. cereus* fue declarado el

agente causal del mayor número de toxiinfecciones en los Países Bajos (Holanda) y el segundo en Alemania, correspondiendo al 3,8 % y 1,8% respectivamente del total de casos. Sin embargo, para este mismo periodo en otros países Europeos ocupaba el cuarto o quinto lugar (WHO, “Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe”, <http://www.euro.who.int/foodsafety/Surveillance/>).

En España, al igual que en la mayoría de países de Europa, su incidencia no es destacable, representando el 0,9 % de las intoxicaciones registradas para el período 1994-2003, ocupando un quinto lugar entre los agentes etiológicos de origen bacteriano. No obstante, cabe destacar la toxiinfección que se produjo en un colegio con un número elevado de enfermos (232) debido al consumo de un alimento a base de huevo (huevo/ovoproducto). Así mismo, este tipo de alimento también fue el origen de otro brote en una residencia geriátrica con 57 enfermos (Anexo II, Tabla de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (1994-2003) e Informe de brotes epidémicos de *B. cereus* para el periodo 2001-2005, Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII)).

En la Comunidad Valenciana, según los datos facilitados por el Área de epidemiología de la Consejería de Sanidad (Generalidad Valenciana), correspondientes al total de brotes y toxiinfecciones producidas durante el periodo 1999-2005, *B. cereus* supuso el 1,9 % del total de casos declarados y se situó en el tercer lugar entre los agentes etiológicos de tipo bacteriano, después de *Salmonella* spp. (65,3 %) y de *Sta. aureus* (3,7 %). Todos los brotes de *B. cereus* fueron de tipo comunitario siendo el ámbito más habitual el de la restauración, al igual que en el resto de España. Los alimentos que resultaron positivos tras el análisis microbiológico fueron muy variados encontrándose entre ellos alimentos que presentaron entre

sus ingredientes huevo líquido como: tortillas, natillas, tartas, cremas, mayonesa así como el propio huevo líquido comercial. Ello indica la importancia del control de este microorganismo al menos en este tipo de alimentos, aunque no exista legislación aplicable (Anexo III).

Así mismo, se han considerado también entre los alimentos en los que es importante su control, los preparados para lactantes y las leches de continuación. Efectivamente, *B. cereus* ha sido el agente causal de varias infecciones sistémicas de importancia clínica en bebés (Hilliard *et al.*, 2003) y, su presencia y crecimiento en formulaciones infantiles ha sido descrita por varios autores demostrando el riesgo real que existe en este tipo de alimentos (Becker *et al.*, 1994; Rowan y Anderson, 1997; Shaheen *et al.*, 2006). Como consecuencia, recientemente ha sido publicada la Reglamentación (CE) N 1441/2007, donde se establece el control de *B. cereus* en preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses.

4.- Métodos tradicionales para el análisis de *B. cereus* en alimentos

La detección y cuantificación de *B. cereus* en alimentos por parte de los laboratorios de control de calidad, se realiza habitualmente empleando pruebas de tipo fenotípico, como la caracterización morfológica y fisiológica, y los patrones de fermentación de carbohidratos (Claus y Berkerley, 1986; Farrar y Reboli, 1991). En el caso de *B. cereus*, las Normas Internacionales ISO de análisis microbiológico de alimentos para el consumo humano y animal, por razones prácticas hablan de “identificación presuntiva de *B. cereus*” debido a que las características y pruebas fenotípicas que se

consideran no permiten discriminar *B. cereus* de otras especies próximas, aunque menos frecuentes, como *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* y *B. pseudomycoides*. Dichas normas son:

-ISO 7932:2004, correspondiente a la técnica de recuento en placa a 30°C, en la que se utiliza como medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *B. cereus*, agar MYP manitol-yema de huevo-polimixina B con rojo fenol (“mannitol, egg-yolk, polymyxin agar”) y la prueba de confirmación de la β -hemólisis en agar sangre. El tiempo necesario para obtener el resultado final es de 2 a 3 días.

-ISO 21871:2006, que comprende la técnica del “Número Más Probable” y el método de investigación de *B. cereus*. Comienza con un enriquecimiento de la muestra en caldo TSPB (caldo triptona soja y polimixina B) y para el aislamiento de las colonias típicas se utiliza el agar PEMBA (“polymyxin pyruvate egg-yolk mannitol bromothymol blue agar”). Este medio se basa en el agar MYP, pero con ligeras modificaciones para favorecer la esporulación, y es el medio recomendado por la Federación Internacional de la Industria de Productos Lácteos (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). A continuación se realiza la prueba de confirmación de la β -hemólisis en agar sangre, y además la tinción de los gránulos de grasa (poli-beta-hidroxibutirato). El tiempo total del análisis es de 4 a 5 días.

En ambos medios selectivos, la polimixina B se usa como el agente selectivo primario para la inhibición del crecimiento de las bacterias Gram-negativas. Por su parte, la presencia de huevo, el manitol y un indicador colorimétrico permiten la diferenciación de *B. cereus*, ya que, al contrario de muchas especies del género *Bacillus*, *B. cereus* no fermenta el manitol pero produce fosfolipasa C específica de

fosfatidilcolina siendo positiva para la actividad lecitinasa (Schraft y Griffiths, 1995; Kim *et al.*, 2000).

No obstante, se han descrito algunas cepas de *B. cereus* que poseen una débil o nula actividad lecitinasa, y que no muestran el halo de precipitación, por lo que éstas no se descartan y se incluyen en las pruebas de confirmación (ISO 7932:2004). Esto, junto al hecho de que la microbiota acompañante puede ser productora de ácido dificultando la distinción de las colonias manitol positivas, supone un mayor esfuerzo analítico ya que requiere de reaislamientos o entorpece el análisis, prolongando el tiempo empleado.

La identificación definitiva de las colonias que resultan ser positivas para las pruebas confirmatorias puede realizarse con ayuda de sistemas comerciales para identificación rápida como el Sistema API (Biomerieux). La utilización del Sistema API 50CH y 20E para identificar las especies del género *Bacillus*, como alternativa a las baterías de pruebas bioquímicas, presenta buena repetitividad en los resultados y permite la estandarización del proceso de identificación (Logan y Berkeley, 1981). Este sistema, ampliamente utilizado en identificación bacteriana, en el caso de *B. cereus* establece diferentes biotipos en función del patrón obtenido (Logan *et al.*, 1979; Te Giffel *et al.*, 1997).

5.- La PCR como técnica para la identificación, detección y cuantificación de *B. cereus*

Los métodos microbiológicos basados en el cultivo, además de requerir más tiempo hasta obtener el resultado final, con frecuencia pueden originar identificaciones erróneas o incluso indeterminaciones, sin llegar a identificar especies que comparten un gran número de caracteres. Además, la identificación basada en pruebas bioquímicas es un método laborioso que lleva implícito problemas de reproducibilidad y ambigüedad, y en general presenta un bajo poder de discriminación a nivel de especie.

Gracias a los avances en la tecnología del DNA recombinante, los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos han revolucionado el campo del diagnóstico microbiano. Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye una de las técnicas que han resultado de mayor utilidad para la detección e identificación de microorganismos como alternativa a los métodos tradicionales debido a la elevada discriminación, precisión y reproducibilidad, así como a la rapidez y sencillez en la realización de dicha técnica.

Kleppe *et al.* describieron por primera vez en 1971 los principios de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). No obstante, hasta 1985 no fueron publicados los primeros datos experimentales por Saiki *et al.* (1985,1988), aunque el descubrimiento de la PCR fue atribuido a Kary B. Mullis, investigador del mismo grupo, el cual fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1993. El fundamento de la PCR es la amplificación *in vitro* de DNA mediante una DNA polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que delimitan el fragmento a amplificar. Consiste en la repetición de un proceso de tres pasos: desnaturalización del DNA molde de doble

cadena, unión de los cebadores al DNA molde, y por último, extensión enzimática del fragmento a partir del cebador. Mediante este proceso, y utilizando cebadores dirigidos a secuencias específicas, se consigue amplificar de forma exponencial un fragmento de DNA (Wolcott, 1991). La detección del producto de PCR se realiza habitualmente mediante visualización directa del fragmento de DNA por electroforesis en gel de agarosa, aunque existen otras aproximaciones como la detección de fluorescencia (Wilhelm y Pingoud, 2003; McKillip y Drake, 2004) o la electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF; Alarcón *et al.*, 2004). El diseño de los cebadores que intervienen en la reacción de PCR determina la especificidad de la amplificación. Generalmente, los cebadores son oligonucleótidos de alrededor de 20 bases de longitud y presentan una alta complementariedad con la secuencia diana. Además, las condiciones más o menos restrictivas de la reacción modulan la especificidad de la amplificación, ya que los cebadores pueden hibridar en zonas de DNA que presentan desapareamientos. La secuencia de los cebadores se establece utilizando como referencia las bases de datos de secuencias públicas (GenBank, EMBL, DDBJ). La detección del fragmento de amplificación del tamaño esperado indica el resultado positivo de identificación, lo que supone la presencia del microorganismo o de su DNA en la muestra analizada (Olsen *et al.*, 1995; Hill, 1996).

La técnica de la PCR puede aplicarse para la identificación a partir de DNA purificado o a partir de colonia, así como para la detección directa desde el homogeneizado del alimento, ya que no precisa del aislamiento previo del microorganismo y por tanto puede aplicarse a poblaciones mixtas. Uno de los inconvenientes de la técnica de la PCR clásica es que no discrimina entre células vivas y muertas, incluso puede amplificar restos de DNA procedentes de células inactivadas (Josephson *et al.*, 1993; Masters *et al.*, 1994). En cuanto

a la metodología, las principales dificultades incluyen hacer accesibles los ácidos nucleicos y eliminar los inhibidores de la reacción de PCR en un rango amplio de matrices alimentarias (Wilson *et al.*, 1997). En este sentido, *B. cereus* presenta el inconveniente adicional de poderse encontrar en el alimento en forma esporulada, con cubiertas resistentes a diferentes condiciones extremas, lo que dificulta la extracción del DNA para su análisis.

5.1.- Detección e identificación

La utilización de cebadores específicos o “PCR específica” permite la identificación y detección del microorganismo de interés e incluso su cuantificación mediante PCR a tiempo real. Las diferentes aproximaciones basadas en la tecnología de la PCR que han sido aplicadas en *B. cereus*, se describen a continuación.

Existen trabajos sobre la identificación por PCR de cepas de *B. cereus* utilizando cebadores dirigidos a los genes conservados, considerados como “housekeeping”, entre los que se encuentran el gen RNAr 16S, y el espaciador intergénico entre los genes de RNAr 16S y 23S (ISR), el gen *gyrB* (subunidad B de la DNA girasa), el gen *groEL* (proteína de choque térmico GroEL) y el gen *rpoB* (subunidad B de la RNA polimerasa). Sin embargo, la especificidad que presentan es a nivel de “grupo *B. cereus*”, por lo que resulta imposible diferenciar claramente entre especies (Daffonchio *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2001, 2002; Yamada *et al.*, 1999; Chen y Tsen 2002; Chang *et al.*, 2003; Manzano *et al.*, 2003b; Blackwood *et al.*, 2004). Lechner *et al.* (1998) diseñaron cebadores dirigidos a los genes RNAr 16S y *cspA* (“cold shock protein”), que permitieron diferenciar un grupo de cepas psicrotófas de *B. cereus* proponiéndolas como una nueva especie, *B. weihenstephanensis*. Posteriormente, Stenfors y Granum (2001), encontraron cepas

psicrotrofas de diferente perfil genético, así como perfiles intermedios entre ambas especies. La aplicación en alimentos de la PCR basada en genes conservados se ha llevado a cabo con cebadores dirigidos al gen *gyrB* que se emplearon para la detección de *B. cereus* en arroz y café (Yamada *et al.*, 1999; Manzano *et al.*, 2003b).

Para la detección/identificación o caracterización toxigénica por PCR de *B. cereus*, se han utilizado también cebadores dirigidos a los genes de virulencia. Entre ellos se encuentran varios genes de los operones *hbl* y *nhe*, o los genes *bceT*, *entFM*, *pc-plc* (*cerA*), *sph* (*cerB*) y *pi-plc* (Asano *et al.*, 1997; Mäntynen y Lindström, 1998; Hsieh *et al.*, 1999; Guttman y Ellar, 2000; Hansen y Hendriksen, 2001; Rowan *et al.*, 2001, 2003; Radhika *et al.*, 2002; Thaenthanee *et al.*, 2005). Posteriormente, en este tipo de estudios se incluiría el gen *cytK* (Guinebretière *et al.*, 2002; Ghelardi *et al.*, 2002 y Fagerlund *et al.*, 2004, Abriouel *et al.*, 2007), el gen plasmídico *ces* que codifica la cereúlida sintasa (Ehling-Schulz *et al.*, 2004, 2006) y, recientemente, los genes de las hemolisinas II y III (Hendriksen *et al.*, 2006). Se observó de este modo el gran potencial enterotoxigénico y la distribución heterogénea de los diferentes genes presentes en las especies del “grupo *B. cereus*”, revelando la importancia del control del conjunto de estas especies en alimentos (Prüß *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2001, 2002; Hansen y Hendriksen, 2001; Hendriksen *et al.*, 2006; Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Para la detección de *B. cereus* en alimentos inoculados artificialmente se han utilizado cebadores dirigidos a genes de virulencia, por ejemplo, los genes *pc-plc* y *sph* en leche (Schraft y Griffiths, 1995) y el gen *sph* en leche, huevo, arroz y cerdo (Hsieh *et al.*, 1999). El gen *clo* se ha empleado en ostras y queso contaminados de forma natural (Wang *et al.*, 1997). En otros casos, los cebadores se diseñaron a partir de una banda de RAPD-PCR característica de cepas eméticas y se ensayaron en muestras de leche, arroz y pasta oriental inoculadas

artificialmente (Nakano *et al.*, 2004). En algunos de estos estudios se incluyó un paso de enriquecimiento para favorecer la detección (Hsieh *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2004).

La técnica de PCR puede ser optimizada para la amplificación simultánea de varios fragmentos en una sola reacción y en un solo tubo. Este formato de PCR se conoce como PCR múltiple. En *B. cereus* se han utilizado como diana para su detección por PCR múltiple genes conservados junto a genes de virulencia, por ejemplo, el gen *hblA* y el gen de RNAr 16S (Tsen *et al.*, 2000) o el gen *rpoB* y el gen *cap* específico para *B. anthracis* (Ko *et al.*, 2003). También ha sido empleada dicha técnica para conocer el perfil toxigénico en una sola reacción, por ejemplo, para los genes de las toxinas HBL, NHE, BceT, CytK y la enzima Ces (Yang *et al.*, 2005) y, recientemente, por Ehling-Schulz *et al.* (2006) para los genes *hblD-A*, *nheA-B*, *cytK* y *ces*, los cuales codifican para las toxinas directamente implicadas en toxiinfecciones, y utilizando cebadores degenerados que contemplan la diversidad genética encontrada en *B. cereus*.

5.2.- PCR cuantitativa a Tiempo Real (Q-PCR): fundamento y tipos

Los últimos avances tecnológicos han llevado al desarrollo de equipos de PCR a tiempo real que permiten la detección cuantitativa y automatizada de la diana elegida. La PCR a tiempo real (Q-PCR) presenta mayor sensibilidad y menor tiempo de detección que la PCR convencional y, además, permite la cuantificación del microorganismo de interés. Esta técnica es capaz de detectar la señal de fluorescencia emitida tras la excitación del o los fluoróforos utilizados, con la correspondiente longitud de onda, ciclo por ciclo, durante el proceso de amplificación, siendo esta señal proporcional al número de copias generado en cada ciclo (Figura 1). De esta forma y estableciendo el nivel umbral sobre la señal de fluorescencia

basal, es posible determinar el ciclo en el cual se inicia la fase exponencial de la amplificación del DNA denominado ciclo umbral (C_T , "threshold cycle"), el cual está relacionado directamente con la cantidad de DNA molde inicial y es el parámetro utilizado en la cuantificación (Higuchi *et al.*, 1993, Heid *et al.*, 1996; Nazarenko *et al.*, 1997). La construcción de una curva estándar o recta patrón a partir de concentraciones conocidas de DNA molde, permite la cuantificación de la muestra problema mediante la interpolación de los valores obtenidos. Dada la detección fluorimétrica de los amplificados, no se requiere la electroforesis posterior por lo que además de automatizar el proceso, evita los problemas de contaminaciones derivados de la apertura de los tubos (Wilhelm y Pingoud, 2003; McKillip y Drake, 2004).

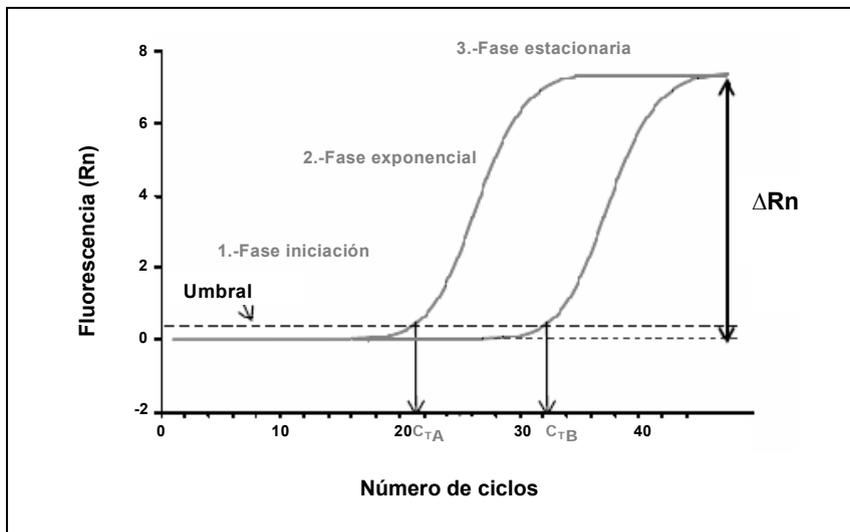


Figura 1.- Representación gráfica del aumento de la fluorescencia (ΔRn) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de C_T para las muestras A y B.

La detección de fluorescencia se puede realizar mediante sistemas inespecíficos o específicos de secuencia (Lee *et al.*, 2004).

5.2.1.- Sistemas inespecíficos

Se basa en el uso de agentes intercalantes de DNA que se unen al surco menor del DNA de doble cadena. Tras esta unión se produce un cambio de conformación que da lugar a un incremento de la fluorescencia. Entre ellos se encuentran los fluorocromos como el bromuro de etidio (Higuchi *et al.*, 1993; Le Pecq y Paoletti, 1996; Wittwer *et al.*, 1997), el YOPRO[®] y YoYo[®] de Molecular Probes (Ogura *et al.*, 1994; Ishiguro *et al.*, 1995; Tseng *et al.*, 1997), el SYBR[®] Green I (Becker *et al.*, 1996) y el SYBR Green Gold. Recientemente se ha descrito otra molécula intercalante, BEBO, de características similares al SYBR Green I (Bengtsson *et al.*, 2003). Uno de los más utilizados es el SYBR Green I por su facilidad de utilización y disponibilidad comercial. La excitación de la molécula se produce con luz azul a una longitud de onda de 480 nm y el espectro de emisión es comparable al de la fluoresceína con un máximo a 520 nm. La fluorescencia de la molécula unida al DNA es 1000 veces mayor que cuando está libre, siendo adecuada para la monitorización de la acumulación de amplificado durante la PCR (Wittwer *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1998). Esta modalidad permite comprobar que el producto de amplificación es el esperado mediante el análisis de la curva de disociación, en el cual se determina la T_m del amplificado obtenido (Ririe *et al.*, 1997), así como comprobar la ausencia de productos de amplificación de PCR inespecíficos que podrían interferir en la cuantificación (Simpson *et al.*, 2000).

5.2.2.- Sistemas específicos

En los sistemas específicos de secuencia se utilizan sondas que corresponden a uno o a varios oligonucleótidos marcados con fluoróforos, cuya diana se encuentra en el producto de amplificación constituyendo un elemento más para conseguir la especificidad deseada. La señal fluorescente se genera por la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). El método utiliza fluoróforos que actúan como donadores o aceptores de fotones y están unidos a una o varias sondas. Otras estrategias basadas en sistemas FRET, incluyen el marcaje de cebadores o del propio amplificado.

Durante la amplificación de un fragmento específico se altera la posición relativa de dichas moléculas, produciéndose un incremento en la fluorescencia (Figura 2) (Lee *et al.*, 2004). Además, la utilización de este tipo de sondas, que son específicas de la secuencia diana, permite en Q-PCR el formato múltiple ya que se monitorizan independientemente los productos de amplificación generados por diferentes cebadores (Bernard *et al.*, 1998; Wittwer *et al.*, 2001) o con un único par de cebadores, utilizando diferentes sondas combinadas (Edwards y Logan, 2004). Existen varios tipos de sondas pero de forma general se pueden clasificar en dos grandes grupos:

a) Las sondas de hidrólisis, o sondas TaqMan, son oligonucleótidos marcados en un extremo con un fluoróforo (donador de fotones), y en el otro poseen una molécula aceptora de fotones o silenciador (“quencher”) que evita que el fluoróforo emita fluorescencia mientras ambas moléculas se encuentren próximas. Durante la amplificación, la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa hidroliza la sonda separando el silenciador del fluoróforo, y como resultado este último emite fluorescencia (Holland *et al.*, 1991; Livak *et al.*, 1995; Wilhelm

y Pingoud, 2003; Mackay, 2004). Dentro de este tipo de sondas se encuentran las llamadas sondas MGB (“Minor Group Binding”) de alta afinidad al surco menor del DNA de doble cadena, rico en enlaces A-T (Afonina *et al.*, 1997). En el extremo 3’ posee una molécula aceptora de fotones no fluorescente (“dark quencher”), que mejora la monitorización de las variaciones de fluorescencia emitidas por el fluoróforo (Kutyavin *et al.*, 2000). En este mismo extremo lleva incorporado un tripéptido MGB que incrementa la temperatura de hibridación de la sonda, posibilitando el diseño de sondas de menor tamaño y, además, refuerza la unión al DNA a modo de anclaje, produciéndose una mayor estabilidad y especificidad en el acoplamiento (Kutyavin *et al.*, 2000; Salmon *et al.*, 2002). Así, es posible la detección de dianas incluso con un único despareamiento (SNPs, “Single Nucleotide Polymorphism”).

b) Las sondas de hibridación se basan en que la unión a la diana en sí misma va a facilitar las condiciones para la emisión de la fluorescencia. Las más utilizadas son las sondas en bucle (e.g. “molecular beacon”) y las sondas de hibridación FRET (“Dual-hybridization probes”). Las primeras poseen una parte central complementaria a la secuencia diana, y en ambos extremos presentan secuencias repetidas invertidas, complementarias entre ellas (Tyagi y Kramer, 1996; Tan *et al.*, 2000). En un extremo se encuentra un fluoróforo (donador de fotones) y en el otro una molécula aceptora de fotones o silenciador. Este diseño permite que adopte una estructura de bucle en su forma libre. En la fase de la hibridación se produce un cambio en su estructura secundaria, la sonda se extiende dejando alejado el fluoróforo del silenciador y permitiendo que se produzca la emisión de fluorescencia (Kostrikis *et al.*, 1998; Tygai *et al.*, 1998). Las sondas de hibridación FRET están compuestas por dos oligonucleótidos, uno con un fluoróforo donador y otro con un fluoróforo aceptor de fotones (Wittwer *et al.*, 1997). Al

contrario que en los casos anteriores, ambas moléculas quedan próximas durante la fase de hibridación y es el fluoróforo aceptor de fotones el que es excitado por la transferencia de energía de la molécula donadora y como consecuencia emite fluorescencia (Bernard y Wittwer, 2000).

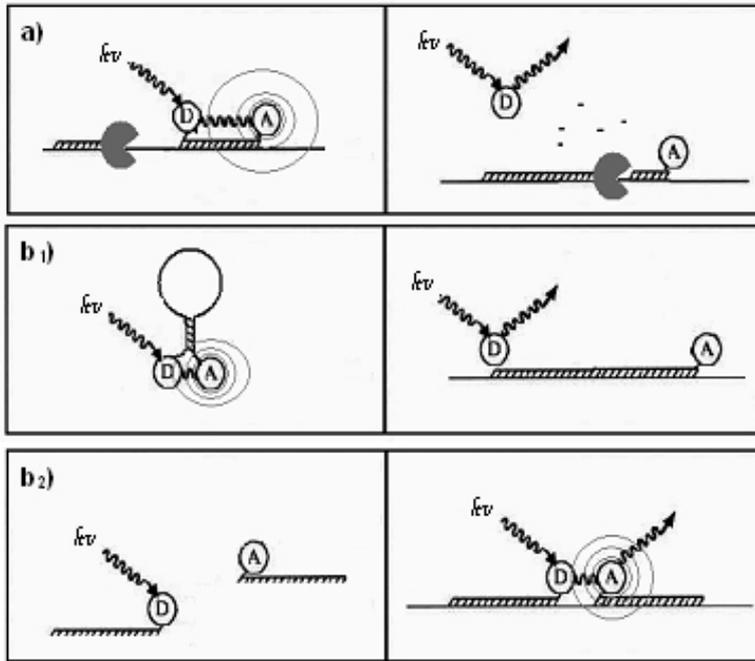


Figura 2.- Principales tipos de sondas utilizadas en Q-PCR: a) sondas de hidrólisis, b₁) sondas de hibridación en bucle y b₂) sondas de hibridación FRET. D, molécula donadora de fotones; A, molécula aceptora de fotones.

5.3.- Aplicación de la Q-PCR en alimentos

Existen numerosos trabajos sobre la aplicación de la Q-PCR en la detección de patógenos en alimentos, bien para cuantificación directa o tras enriquecimiento de la muestra (ver ANEXO IV). El

sistema SYBR Green ha sido utilizado por ejemplo, para *Sta. aureus* en queso (Hein *et al.*, 2001b) y en carne picada (Alarcón *et al.*, 2006), para *Salmonella* spp. en pollo (Wolffs *et al.*, 2006), para *Vibrio vulnificus* en marisco (Panicker *et al.*, 2004) o para *Campylobacter jejuni* en aguas (Cheng y Griffiths, 2003). No obstante, de los sistemas presentados en el apartado anterior el más utilizado es, sin lugar a dudas, el sistema TaqMan como se desprende del número de trabajos que se encuentran en la literatura científica (ver ANEXO IV). Incluyen procedimientos dirigidos a diferentes patógenos y han sido investigados en diversas matrices alimentarias, como por ejemplo, *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, salmón, ensaladas, leche, paté y queso (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004a; 2005b; Rossmannith *et al.*, 2006), *Salmonella enterica* en helado y en pollo (Seo *et al.*, 2006; Malorny *et al.*, 2007a) o *Salmonella* spp. en carne picada, pollo, salmón y leche (Hein *et al.*, 2006), *Sta. aureus* en carne picada y leche (Alarcón *et al.*, 2006, Goto *et al.*, 2007), *Escherichia coli* o *E. coli* O157:H7 en carne de ternera y carne picada (Holicka *et al.*, 2006; Auvray *et al.*, 2007; Stefan *et al.*, 2007) y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en agua y leche (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2005a). Las sondas de hibridación FRET, aunque en menor medida, también se han empleado para *L. monocytogenes* en ensaladas (Berrada *et al.*, 2006), *Salmonella* spp. en pollo, cerdo y lechuga (Bohaychuk *et al.*, 2007), *Sta. aureus* en platos preparados (Berrada *et al.*, 2006), *E. coli* O157:H7 en carne de ternera (O'Hanlon *et al.*, 2004) o *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en leche y ganado (Tasara *et al.*, 2005; Bosshard *et al.*, 2006). Menos abundantes son los trabajos donde utilizan las sondas de hibridación en bucle, como por ejemplo para la identificación y cuantificación de *Salmonella* spp. en frutas y verduras, o en pollo (Liming *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2006).

En el caso de *B. cereus*, la primera aproximación para su detección cuantitativa se basó en un ensayo semiautomático en el que la amplificación y la medición de fluorescencia eran independientes. Se ensayó en leche en polvo desnatada inoculada artificialmente. Los cebadores y las sondas estaban dirigidos al gen *pc-plc* y la especificidad se analizó en un total de 72 cepas de la especie *B. cereus* y 5 cepas de *B. thuringiensis*, pero no se comprobó en el resto de especies del “grupo *B. cereus*” ni en otras especies relacionadas (Kim *et al.*, 2000). En estudios posteriores se utilizaron como diana genes que se encuentran en número variable de copias por genoma, como los de RNAr (Priha *et al.*, 2004; De Clerk *et al.*, 2004), o el gen de virulencia *clo* (Fykse *et al.*, 2003; Fukushima *et al.*, 2003), asumiendo el consiguiente error en la cuantificación. Recientemente se ha publicado un ensayo para la detección cuantitativa de *B. cereus* utilizando como diana el gen de una péptido sintasa implicada en el ensamblaje de la toxina emética, el cual se encuentra en un plásmido contenido en número de 1-3 copias por célula (Friker *et al.*, 2007). Este ensayo permite la detección cuantitativa de *B. cereus* eméticos, pero no detecta aquellas cepas que pueden causar cuadros clínicos del tipo diarreico.

La utilización de sondas ha permitido el formato múltiple que ha sido aplicado, ya sea para la incorporación de un control interno de amplificación (IAC) para asegurar la ausencia de inhibidores de la PCR (ver Anexo IV), o por ejemplo para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7/*Salmonella*, o *E. coli* O157:H7/*Salmonella*/*Shigella*, *Campylobacter*/*Salmonella*, *L. monocytogenes*/*Salmonella* o de las diferentes toxinas de *E. coli* e incluso de ocho patógenos de alimentos a la vez (Jefré *et al.*, 2005, Grant *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 2007; Wolffs *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). En concreto para la detección simultánea de *B. cereus* y otras especies en reacciones de Q-PCR múltiple se han desarrollado varios

procedimientos, como es el caso de *B. cereus* y *Sta. aureus* (Fukushima *et al.*, 2003; Friker *et al.*, 2007), *B. anthracis* y *B. cereus* (Kim *et al.*, 2005) o de *B. cereus sensu lato*, *B. licheniformis* y *B. furmarili* (De Clerk *et al.*, 2004).

Para la aplicación de la PCR en alimentos es necesario el desarrollo de protocolos estandarizados y validados en distintas matrices alimentarias frente a métodos de referencia (Malorny *et al.*, 2003a, 2003b, 2007b). Con la Norma ISO 16140:2003 se establecieron los requisitos básicos necesarios para su consecución. Como se ha mencionado anteriormente ciertas sustancias que interfieran en la lisis celular, DNA inespecífico, RNAsas o DNAsa que degradan los ácidos nucleicos y/o cebadores, sustancias quelantes de magnesio necesario para la reacción de PCR están presentes en los alimentos y pueden inhibir total o parcialmente la amplificación (Rossen *et al.*, 1992; Akane *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1997; Bickley y Hopkins, 1999). Gracias a diversos proyectos europeos (FOOD-PCR, <http://www.pcr.dk>) se validaron metodologías para 5 microorganismos que originaban los mayores problemas en Europa: *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes* y *E. coli* (EHEC). Además, varias organizaciones de validación acreditadas, tales como AOAC (<http://www.aoac.org>) y Nordval (<http://nmkl.org/NorVal/NordVal.html>) han certificado en estos últimos años métodos alternativos de detección de patógenos alimentarios mediante PCR tales como, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Sistema Bax, Qualicom; Roche; Nordval). La experiencia en la aplicación de la PCR en alimentos ha ido en aumento y ha llegado al establecimiento de Normas ISO para regular la utilización de la PCR en la detección de patógenos alimentarios. Las Normas ISO 20837:2004 y ISO 20838:2004 recogen los aspectos relacionados con el equipamiento y la metodología. Así mismo, se contempla la recomendación de incluir controles internos

de amplificación (IAC). Un IAC es una herramienta para evaluar el método de extracción de DNA utilizado, pues debe asegurar tanto la liberación de los ácidos nucleicos celulares como la eliminación de los inhibidores (Hoorfar *et al.*, 2003, 2004a). El formato de PCR múltiple ha permitido en gran medida el desarrollo de diferentes tipos de IAC, pueden ser del tipo competitivo cuando corresponde a un ácido nucleico quimérico que se añade a la reacción para ser co-amplificado por los mismos cebadores del ácido nucleico diana, o de tipo no competitivo cuando los cebadores son distintos (Rodríguez-Lázaro, 2004).

5.4.- Detección y cuantificación de formas viables

En el caso de patógenos de alimentos no sólo es importante detectar la presencia del microorganismo, sino que resulta crucial conocer si se trata de formas viables para estimar el riesgo que conllevaría su consumo. A pesar de permitir una detección rápida, sensible y precisa, uno de los inconvenientes de la PCR, que utiliza el DNA como molécula diana, es que no discrimina entre células vivas y muertas del microorganismo investigado. No obstante, existen otras aproximaciones para abordar la detección de células viables realizando previamente a la Q-PCR una eliminación del DNA de células muertas (Nogva *et al.*, 2003, Rudi *et al.*, 2005a, 2005b), o amplificando el RNA bien de forma continua e isotérmica mediante la técnica de NASBA (Compton, 1991), bien mediante una reacción de PCR con transcripción inversa, RT-PCR (Norton *et al.*, 1999; Vaitilingom *et al.*, 1998). La primera aproximación se basa en las diferencias físicas entre células vivas y muertas en cuanto a protección de los ácidos nucleicos por las envolturas celulares externas, quedando más expuestos a la acción de enzimas si se trata de células muertas. En los otros casos, se utilizan como diana

los RNAs que son más lábiles y menos resistentes a la muerte celular que los DNAs.

5.4.1.- Monoazida de Etidio Q-PCR (EMA-PCR)

Una de las primeras estrategias utilizadas para la detección de células viables fue desarrollada por Nogva *et al.* (2000a), donde, tras tratamientos térmicos de inactivación, se eliminaba el DNA de las células muertas de *C. jejuni* utilizando DNAsas y posterior lavado, quedando protegido el DNA de las células viables por sus cubiertas celulares. Posteriormente, este mismo grupo de investigación desarrollaría un nuevo método, EMA-PCR, que mejoraba al anterior pero basándose en el mismo principio. La EMA-PCR, consiste en la capacidad de penetración de la molécula de monoazida de etidio (EMA) en las células a través de las membranas citoplasmáticas dañadas que, tras una fotoactivación, el fluorocromo EMA se une covalentemente al DNA quedando inaccesible durante la reacción de Q-PCR (EMA-PCR). La utilización de EMA junto a la Q-PCR se ha aplicado para comprobar la efectividad de diferentes tratamientos térmicos y de desinfección para los patógenos *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp., obteniendo una buena correlación con los resultados de recuento en placa y con técnicas de microscopía (Nogva *et al.*, 2003; Guy *et al.*, 2006). También se ha aplicado para la detección de *C. jejuni* en pollo y de *L. monocytogenes* en queso tipo gouda (Rudi *et al.*, 2005a, 2005b). No obstante, Flekna *et al.* (2007) en un estudio reciente describen que el tratamiento con EMA y posterior Q-PCR producía una infravaloración del número de células viables de *L. monocytogenes* y *C. jejuni*, cuestionando su utilidad.

5.4.2.- NASBA cuantitativo (Q-NASBA)

Es un método de amplificación isotérmica de RNA que se basa en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA) y está diseñado para la detección rápida y selectiva del RNA sin interferencia del DNA residual. Consiste en una única reacción, normalmente a 41 °C, con una duración de unos 90 min. Existen dos aproximaciones para la monitorización de los productos NASBA de forma continua, mediante electroquimioluminiscencia o por la tecnología FRET, permitiendo la detección y cuantificación a tiempo real (Q-NASBA). Esta aproximación se ha utilizado para la detección de formas viables de bacterias patógenas en alimentos como *Salmonella* spp. (D'Souza y Jaykus, 2003), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004b), *C. jejuni* y *C. coli* (Cools *et al.*, 2006; Churruca *et al.*, 2007), *L. monocytogenes* (Nadal *et al.*, 2007) y *Vibrio cholerae* (Fykse *et al.*, 2007). En el caso de *B. cereus* y otras especies del género *Bacillus*, se ha utilizado en estudios de expresión del gen *hblC* en leche inoculada artificialmente, para establecer tiempos de vida media del alimento y condiciones en las que la producción de dicha toxina es máxima (Gore *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos con estos estudios presentan la técnica NASBA como una herramienta prometedora en la detección de células viables en el alimento. Comparada con la PCR, además de ser más cara, presenta una mayor complejidad en cuanto a los reactivos utilizados, siendo más difícil su automatización, y no es aplicable a cualquier secuencia de RNA diana (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2006).

5.4.3.- PCR cuantitativa con transcripción inversa (Q-RT-PCR)

La PCR con transcripción inversa convencional (RT-PCR) consiste en una PCR en la cual se realiza un paso de transcripción inversa previo, donde a partir del RNA se generan fragmentos de DNA, siendo éstos el molde para la reacción de amplificación. Se ha utilizado para detectar y comprobar la viabilidad de *L. monocytogenes*, directamente en productos cárnicos (Klein y Juneja, 1997), de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Mucor racemosus* en leche después de tratamientos térmicos (Vaitilingom *et al.*, 1997), para seleccionar el mejor gen indicador de la viabilidad en *E. coli* tras tratamientos térmicos y con etanol (Sheridan *et al.*, 1998), en la comparación de la expresión de toxinas por varias especies del género *Bacillus* (Phelps y Mckillip, 2002) y en la detección de la toxina Shiga de *E. coli* (McIngvale *et al.*, 2002).

La PCR cuantitativa con transcripción inversa (Q-RT-PCR), aúna las ventajas de la PCR convencional con transcripción inversa (RT-PCR) y las de la Q-PCR a tiempo real en cuanto a la detección de RNA de una forma más sensible, lo que le permite ser usada como una aproximación cuantitativa para la detección de la presencia de células metabólicamente activas. La Q-RT-PCR consiste en la incorporación de un proceso de transcripción inversa previamente a la amplificación por Q-PCR. Por un lado, un oligonucleótido intervendrá durante la transcripción uniéndose a la cadena codificante de RNA e iniciando la síntesis de las cadenas de DNA mediante la transcriptasa inversa. Este DNA copia (cDNA) será el molde para la reacción de amplificación por Q-PCR pudiendo ser monitorizado y analizado durante este proceso tal y como se especifica en el apartado anterior (Bustin y Mueller, 2005). Para la obtención del DNA copia en la transcripción se han utilizado tres tipos de estrategias (Zhang *et al.*, 1999): a) mediante el uso de

cebadores de secuencia aleatoria obteniendo una mayor cantidad de transcritos derivados del RNAr, que se encuentra en una mayor cantidad, b) mediante oligo-dT cuya diana son las colas poliA de los RNA mensajeros y c) mediante cebadores específicos, los cuales permiten una cuantificación más precisa (Lekanne Deprez *et al.*, 2002), aunque es necesario el tratamiento con DNAsas o que las dianas de los cebadores o sondas correspondan a zonas flanqueantes de intrones (Bustin, 2002). Si ambas reacciones, transcripción y amplificación, se realizan secuencialmente en el mismo tubo, se denomina modo “one-step” (o Q-RT-PCR en una etapa), utilizando dos enzimas, una transcriptasa inversa y una Taq DNA polimerasa, o utilizando una sola enzima, DNA polimerasa dependiente de DNA que presenta actividad polimerasa tanto para el RNA como para el DNA. Si las reacciones se realizan de forma separada en dos tubos, se denomina modo “two-steps” (o Q-RT-PCR en dos etapas). La mayor ventaja de la Q-RT-PCR en una etapa respecto a la de dos etapas es que requiere menos manipulación y por tanto menor riesgo de contaminación. Sin embargo, su mayor inconveniente es que no es posible la optimización de ambos procesos de forma separada, favoreciéndose la formación de dímeros de cebadores (ver revisión, Bustin y Nolan, 2004).

Esta técnica ha sido empleada en estudios de respuestas a condiciones de estrés de *Oenococcus oeni* (Desroche *et al.*, 2004), inactivación por calor de *L. monocytogenes* (Norton y Batt, 1999), inhibición de la producción de neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum* por diferentes aditivos alimentarios (Shin *et al.*, 2006), y se ha desarrollado, al menos una Q-RT-PCR para la cuantificación de células de *Salmonella* spp. como bacteria modelo en aguas (Fey *et al.*, 2004). La Q-RT-PCR se aplica fundamentalmente para la detección y cuantificación directa de virus entéricos tales como, rotavirus, virus Norwalk, poliovirus y hepatitis A en el análisis de

aguas y alimentos (Parshionikar *et al.*, 2004; Jothijumar *et al.*, 2005; Costafreda *et al.*, 2006; Doubois *et al.*, 2007; Boxean *et al.*, 2007).

II.- OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis ha sido el desarrollo y la aplicación de un procedimiento para la detección rápida y cuantitativa de *B. cereus* en alimentos mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR). Para abordar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos particulares:

1.- Desarrollo de un sistema rápido y específico para la detección de *B. cereus* enterotoxigénicos mediante PCR cuantitativa.

1.1.- Selección del gen diana para el diseño de cebadores a partir del análisis por PCR de diferentes genes de virulencia de *B. cereus* en una colección de cepas de referencia y cepas ambientales, previamente caracterizadas.

1.2.- Diseño de oligonucleótidos para detectar, mediante Q-PCR, cepas toxigénicas de *B. cereus*.

1.3.- Obtención de la recta patrón de cuantificación a partir de muestras con niveles conocidos de *B. cereus* y determinación de los niveles de detección.

2.- Puesta a punto de un método para la liberación de ácidos nucleicos a partir de esporas de *B. cereus*.

2.1.- Obtención de suspensiones calibradas de esporas y selección de diferentes tratamientos, térmicos y de germinación, para facilitar la liberación del DNA a partir de las esporas.

2.2.- Cuantificación del DNA por métodos espectrofluorimétricos y por métodos basados en la Q-PCR, para la selección del tratamiento más adecuado.

3.- Desarrollo de un sistema de detección cuantitativa de formas viables de *B. cereus* enterotoxigénicos mediante Q-RT-PCR.

3.1.- Aislamiento de RNA total libre de DNA para su utilización en ensayos de Q-RT-PCR.

3.2.- Desarrollo de un sistema de Q-RT-PCR en modo “one-step” basado en la detección del RNA mensajero.

3.3.- Obtención de la recta patrón para la detección y cuantificación de formas viables de *B. cereus*, a partir del RNA de suspensiones celulares calibradas.

4.- Aplicación de los procedimientos establecidos para la detección de *B. cereus* en alimentos.

Los procedimientos de detección y cuantificación desarrollados, se ensayarán utilizando alimentos susceptibles de contaminación con *B. cereus* inoculados artificialmente.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En este trabajo se han utilizado un total de 75 cepas del “género *Bacillus*”, 29 de referencia pertenecientes a las especies del “grupo *B. cereus*”, 30 aislados ambientales y de alimentos, y 16 cepas pertenecientes a otras especies del “género *Bacillus*”. Todas estas cepas habían sido caracterizadas genotípicamente mediante perfiles ISR (amplificación de la región espaciadora entre los genes de RNAr 16S y 23S) y RAPD-PCR combinando los perfiles obtenidos con los cebadores M13, T3 y T7 (RAPD-M13, RAPD-T3 y RAPD-T7), con el fin de comprobar su adscripción taxonómica (Ocio *et al.*, 2002 y Martínez-Blanch *et al.*, 2003) (Anexo I). Además, se han incluido 4 cepas de otros géneros (Tabla 3). Todas ellas se cultivaron en caldo nutritivo o en agar nutritivo (OXOID), durante 18 horas a 30 °C.

Tabla 3.- Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Especie	Cepa	Origen
a) Cepas de referencia “grupo <i>B. cereus</i>”		
<i>Bacillus cereus</i>	CECT 131	Matraz contaminado
	CECT 148 ^T	
	CECT 193	
	CECT 495	Heces de pollo
	CECT 496	
	CECT 4014	Cultivo mixto
	CECT 4094	
	CECT 4387	
	CECT 4989	Contaminación
	CECT 5144	
	CECT 5148	Suelo
	CECT 5314	
	CECT 40	

Tabla 3.- (Continuación)

Especie	Cepa	Origen
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CECT 197 ^T	Suelo mediterráneo
	CECT 996	
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , IN	CECT 4454	Larva de insecto
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> , IN	CECT 4494	Insecto
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , IN	CECT 4495	Insecto
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> , IN	CECT 4496	
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , IN	CECT 4497	
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> , IN	CECT 7034	
<i>Bacillus mycoides</i>	CECT 4123	Suelo
	CECT 4124	Suelo
	CECT 4125	Suelo
	CECT 4126	Hoja de maíz
	CECT 4127	Raíz de cebolla
	CECT 4128 ^T	Suelo
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	CECT 5894 ^T	Leche pasteurizada
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	CECT 7065 ^T	Suelo
b) Cepas ambientales “grupo <i>B. cereus</i>”⁽¹⁾		
<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	INRA P21S	Vegetales
	INRA TZ415	Vegetales
	INRA P2101	Vegetales
	B40	Ambiental
	B41 ⁽²⁾	Crema de cacao
	B42 ⁽²⁾	Galleta digestiva
	B43 ⁽²⁾	Galleta tostada
	B45 ⁽²⁾	Galleta
	B46 ⁽²⁾	Crema chocolate
	B47 ⁽²⁾	Galleta
	B48 ⁽²⁾	Galleta
	B49 ⁽²⁾	Galleta
	B50 ⁽²⁾	Espesante
	B54 ⁽²⁾	Galleta
	B55 ⁽²⁾	Galleta
	B60 ⁽²⁾	Galleta
	B62 ⁽²⁾	Espesante
	B63 ⁽²⁾	Crema de cacao
	B64 ⁽²⁾	Crema de cacao
	B65 ⁽²⁾	Crema de cacao
	B67 ⁽²⁾	Galleta
	B68	Interlaboratorio
	B70 ⁽²⁾	Crema de cacao

Tabla 3.- (Continuación)

Especie	Cepa	Origen
	B73 ⁽²⁾	Galleta
	B77 ⁽³⁾	Aros de cebolla
<i>B. mycoides</i> / <i>B. pseudomycoides</i> / <i>B. weihenstephanensis</i>	B44	Natilla
	B69	Ambiental
	B66	Ambiental
	B72 ⁽²⁾	Crema de cacao
	B74	Bulbo subterráneo
c) Otras especies del “género Bacillus”		
<i>Bacillus circulans</i>	CECT 10 ^T	Suelo
	INRA P1198	Vegetales
<i>Bacillus firmus</i>	CECT 14 ^T	
<i>Bacillus lentus</i>	CECT 18 ^T	
<i>Bacillus licheniformis</i>	CECT 20 ^T	
	INRA B2186	Vegetales
<i>Bacillus megaterium</i>	CECT 4313 ^T	
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	INRA Z1186	Vegetales
<i>Bacillus pumilus</i>	CECT 29 ^T	
	INRA Z2166	Vegetales
	B51	Contaminación
	B52	Contaminación
	B53	Contaminación
<i>Bacillus sphaericus</i>	CECT 33 ^T	
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 39 ^T	Sangre
	INRA K21101	Vegetales
d) Especies de otros géneros		
<i>Escherichia coli</i>	CECT 515 ^{NT}	Humano
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4031 ^T	Conejo
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CECT 915 ^T	
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 86 ^T	Humano

^T, cepa tipo. ^{NT}, cepa neotipo. CECT, Colección Española de Cultivos Tipo. INRA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Francia. ⁽¹⁾Según agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente de Pearson, para los perfiles electroforéticos obtenido tras el análisis de caracterización genotípica por ISR-PCR y RAPDs : *B. c./B. t.* o *B. m./B. pm./B. w.* (Martínez-Blanch *et al.*, 2003, ANEXO I). ⁽²⁾Cepa aislada por Ainia, Centro Tecnológico (Valencia). ⁽³⁾Cepa aislada por el Centro Tecnológico de la Conserva (CTC, Murcia).

2.- Caracterización fenotípica

Con el fin de asegurar la identificación de las cepas de este estudio, se realizó una caracterización fenotípica en base a las pruebas morfológicas y bioquímicas recogidas en las normas ISO para la detección de *B. cereus* en alimentos (ISO 7932:2004, ISO 7932:1993, ISO 7932:1993 /Cor.1:1997). Se comenzó con la observación de la morfología colonial en agar PEMBA, selectivo para *Bacillus cereus* que contiene polimixina B, manitol y yema de huevo (PEMBA, Oxoid). Las colonias con morfología típica se sometieron a las pruebas confirmatorias: β -hemólisis en “Blood Sheep TSA” (Biomerieux), asimilación de glucosa en caldo glucosa rojo fenol, producción de butanodiol mediante la prueba de Voges-Proskauer, asimilación de nitratos en caldo nitrato. Para la identificación a nivel de especie se utilizaron las galerías comerciales API 50CH/B y API 20E (Biomerieux). Se realizó la lectura tras 24 y 48 h de incubación a 30 °C como indica el fabricante y los perfiles numéricos se analizaron mediante la herramienta informática APIweb v. 4.0 para obtener el resultado de la identificación. A fin de detectar la presencia del cristal parasporal característico de *B. thuringiensis* se realizó tinción simple con fucsina básica fenicada, a partir de cultivos de 3 días en agar nutritivo.

3.- Preparación de suspensiones calibradas de *B. cereus*

3.1.- Suspensiones de células

A partir de un cultivo de 100 ml en fase exponencial en caldo nutritivo, se recogieron las células a 3.000 rpm, durante 30 min a 18 °C en una centrífuga Universal 16R (HETTICH). El precipitado de células obtenido se resuspendió en solución salina y se ajustó a un valor de absorbancia a 580 nm (A_{580}) de 1 (aprox. 10^8 células/ml), utilizando el espectrofotómetro “S-20 spectrophotometer” (BOECO).

Se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina, sembrando 1 ml de cada dilución por triplicado en placas de medio agar nutritivo. Las lecturas del recuento se realizaron a las 24 y 48 h de incubación a 30 °C.

3.2.- Suspensiones de esporas

Se seleccionaron las cepas tipo de las especies representantes del “grupo *B. cereus*” (*B. cereus* CECT 148^T, *B. thuringiensis* CECT 197^T, *B. mycoides* CECT 4128^T, *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T y *B. pseudomycoides* CECT 7065^T), y además, la cepa *B. cereus* CECT 131, ampliamente utilizada en estudios de germinación por otros autores (Clements y Moir, 1998; Barlass *et al.*, 2002 y Moir, 2003). Con el fin de obtener cultivos de esporas sincronizados, se inocularon diferentes matraces con el medio CCY (Stewart *et al.*, 1981), que se incubaron en agitación a 30 °C durante 48 h hasta alcanzar la fase estacionaria. Alícuotas de 2 ml de estos cultivos fueron sometidos a una activación térmica (70 °C, 30 min) y utilizados para inocular 200 ml del mismo medio. Se incubaron en agitación a 30 °C durante 48-96 horas hasta comprobar por microscopia óptica de contraste de fases, que más del 99 % de las esporas estuvieran libres. Las esporas se recogieron mediante centrifugación del volumen total distribuido en tubos de 250 ml a 10.000 rpm, durante 12 min a 5 °C, utilizando una centrífuga SORVALL® RC 26 Plus (SORVALL). El precipitado se lavó con 40 ml de solución 1 M de NaCl y 10 mM de EDTA, a 10.000 rpm, y 5 °C durante 12 min utilizando una centrífuga 3K 30 (SIGMA). Este proceso se realizó de 6-8 veces para eliminar restos celulares. El último lavado se realizó en 40 ml de solución 10 mM de KCl, y tras centrifugación a 7.500 rpm durante 15 min a 5 °C, las esporas recogidas se resuspendieron en 20 ml de solución 10 mM de KCl y se almacenaron en oscuridad a 5 °C. Previamente a su utilización,

las esporas fueron lavadas de 2 a 3 veces, como se indica anteriormente, y finalmente resuspendidas en tampón Tris-HCl (10 mM Tris pH 8,0, 10 mM NaCl).

Para la cuantificación de las suspensiones de esporas, después de cada tratamiento, se emplearon 2 técnicas de recuento: a) recuento en placa en agar nutritivo, mediante siembra por triplicado de 0,1 ml de diluciones decimales seriadas preparadas en solución salina 0,1 % Tween 80 (SST). Las lecturas de recuento se realizaron a las 24, 48 y 72 h de incubación a 30 °C, y b) recuento en cámara cuentaglóbulos (cámara de Neubauer) bajo microscopía de contraste de fases a 400X en un microscopio “elipse E600” (Nikon).

4.- Ensayos de germinación de esporas

Los ensayos de germinación se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de Barlass *et al.* (2002), midiendo la absorbancia a 595 nm (A_{595}). Se basa en la pérdida de la refringencia de las esporas durante el desarrollo del proceso de germinación, lo que provoca una disminución en la absorbancia. Se partió de una suspensión de esporas ajustadas a un valor de A_{595} de 1-0,7 (aproximadamente 10^8 esporas/ml) y activadas térmicamente durante 30 min a 70 °C, en baño termostatado SW 20 (JULABO). Con el fin de conseguir la germinación de las esporas, se utilizaron 3 soluciones, preparadas en tampón fosfato (10 mM KH_2PO_4 , pH 8,0):

- a) 100 mM de L-alanina.
- b) 25 mM de L-alanina y 1 mM de inosina.
- c) 0,5 mM de L-alanina y 0,5 mM de inosina.

Los ensayos se realizaron en placa de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Se utilizaron alícuotas de 200 µl de la suspensión de esporas, que se adicionaron por duplicado, con las diferentes soluciones de germinación. Se monitorizó la absorbancia a 595 nm durante 60 min en incubación a 37 °C y con agitación automática, utilizando el espectrofluorímetro “SPECTRA-Fluor microplate reader” (TECAN).

5.- Aislamiento de ácidos nucleicos

5.1.- Extracción de DNA genómico de células vegetativas

La extracción del DNA total se realizó utilizando dos métodos:

a) El método descrito por Pitcher *et al.* (1989), comienza con una lisis enzimática con lisozima 50 mg/ml en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), recomendado en el caso de bacterias Gram positivas. Se basa en la utilización de isotiocianato de guanidina, agente con elevado poder desnaturante de proteínas, e incluye una precipitación selectiva del DNA con 2-propanol en presencia de 7,5 M de acetato de amonio.

b) El método comercial “DNeasy tissue kit” (Qiagen), comienza con dos tratamientos enzimáticos consecutivos para la rotura de las membranas y la eliminación de proteínas (solución de lisozima 50 mg/ml en TE y solución de proteinasa K en tampón con isotiocianato de guanidina, respectivamente). El lisado obtenido se introduce en la columna de purificación en presencia de etanol lo que facilita la unión selectiva del DNA a una membrana de intercambio iónico (silica-gel) de la columna. Cuando el DNA se encuentra ligado a la membrana, se procede al lavado de este para la eliminación de restos celulares

y restos de la matriz del alimento. Se realizan dos lavados con tampones que presentan una alta concentración de etanol para evitar la elución del DNA. Tras los lavados, el DNA se eluye de la membrana con 100 µl de AE (Elution Buffer, Qiagen).

5.2.- Extracción de DNA genómico a partir de suspensiones de esporas

Antes de proceder a la extracción del DNA, alícuotas de 100 µl de suspensiones de esporas calibradas a una A_{595} entre 1-0,7 se sometieron a diferentes tratamientos:

-Tratamientos térmicos:

- a) 70 °C, 30 min, en baño termostático.
- b) 80 °C, 10 min, en termobloque "Dri-Block DB-3" (Techne).
- c) 100 °C, 10 min, en termobloque.
- d) 121 °C (1/2 atm.) 20 min, en autoclave (Matachana).

-Tratamientos de germinación con y sin activación térmica:

- e) germinación sin activación térmica.
- f) activación térmica, 70 °C durante 15 min, y germinación.
- g) activación térmica, 70 °C durante 30 min, y germinación.
- h) activación térmica, 80 °C durante 10 min, y germinación.

En todos los casos se obtuvo el DNA mediante el método comercial "DNeasy tissue kit" (Qiagen), tal y como se ha descrito anteriormente.

5.3.- Extracción de RNA total a partir de células vegetativas

Se utilizaron alícuotas de 1 ml de cultivo líquido en fase exponencial ($A_{580}=0,4$) y cuantificado por recuento en placa. La extracción del RNA se realizó con los siguientes métodos comerciales:

a) “RNeasy[®] Mini Kit” (Qiagen), comienza con dos tratamientos enzimáticos consecutivos para la rotura de las membranas y la eliminación de proteínas (solución de lisozima 15 mg/ml y solución con β -mercaptoetanol en tampón con isotiocianato de guanidina). Al igual que en el caso del DNA, el lisado obtenido se introduce en la columna de purificación en presencia de etanol, lo que facilita la unión selectiva de ácidos nucleicos a una membrana de intercambio iónico de la columna. Una vez que el RNA se encuentra ligado a la membrana, se procede al lavado de éste para la eliminación de restos celulares. Se realizan tres lavados para evitar la elución del RNA. Tras los lavados, el RNA se eluye de la membrana con 50 μ l de AE (Elution Buffer, Qiagen).

b) “UltraClean[™] Microbial RNA Kit” (Mo Bio, Laboratories), se basa en un tratamiento de lisis en presencia de isotiocianato de guanidina y ditioneitol (DTT), agentes desnaturalizantes de proteínas, en incubación a 65 °C y a continuación lisis mecánica con perlas de sílice. El lisado obtenido se centrifuga para recuperar el sobrenadante libre de restos celulares, y se introduce en la columna donde el RNA queda retenido en una membrana de intercambio iónico (silica-gel). Tras varios lavados con tampones que presentan una alta concentración de etanol, el RNA se eluye de la membrana con 50 μ l de agua libre de RNasas (SIGMA).

c) “Total Quick RNA Cells & Tissues” (Talent), consiste en un tratamiento enzimático a temperatura ambiente durante 5 min con

una solución proporcionada por el fabricante. El lisado se mezcla con etanol, para precipitar los ácidos nucleicos, y a continuación con una resina líquida de sílice. El RNA ligado a la resina se introduce en la columna de purificación depositándose en la membrana de la columna. Se realizan tres lavados y a continuación la columna con la resina se incuba a 65 °C con 50 µl agua libre de RNAsas (SIGMA), lo que favorece la elución selectiva del RNA.

En todos los casos se analizaron 5 µl del eluido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, en tampón TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM Na₂EDTA, pH 8,0), tras tinción con bromuro de etidio (5 µg/ml) y posterior irradiación con luz UV.

6.- Cuantificación de ácidos nucleicos

6.1.- Métodos espectrofotométricos

Se utilizó un espectrofotómetro GeneQuant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech) y una cubeta de 50 µl Sub-Micro Z15 (Pharmacia Biotech). Este equipo posee una lámpara de deuterio, que permite analizar 4 longitudes de onda fijas: 230, 260, 280 y 320 nm. Se estimó la concentración de DNA o RNA, sabiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm en cubeta de paso de luz de 1 cm, equivale a una concentración aproximada de 50 µg/ml o 40 µg/ml, respectivamente. La pureza de la muestra viene dada por el cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm. Valores mayores o iguales a 1,8 para el DNA y a 2,0 para el RNA se relacionan con un grado de pureza adecuado. Las proteínas absorben a 280 nm, de modo que dicho coeficiente disminuye al aumentar el nivel de contaminación proteica. La presencia de otras impurezas, tales como, péptidos o contaminación con Tris-HCl, EDTA u otras sales, presentes en los

tampones utilizados se correlaciona con valores elevados de absorbancia a 230 nm. Cuando se trabaja con RNA, otro indicador de la pureza de la muestra es el coeficiente 260/230 que debe ser mayor de 2,0, valores menores podrían indicar contaminación con isotiocianato de guanidina, reactivo que absorbe en este rango de longitudes de onda (230-260 nm). Por último, el valor de absorbancia a 320 nm permite detectar la interferencia producida por turbidez o, por tampones cuyos componentes presentan una alta absorbancia.

6.2.- Métodos espectrofluorimétricos

Para conseguir una mayor precisión en la cuantificación de DNA y RNA se realizó el análisis espectrofluorimétrico en presencia de un fluorocromo como se indica a continuación:

a) DNA. Se empleó el método comercial “Fluorescent DNA Quantitation Kit” y el espectrofluorímetro VersaFluor[®] (Bio-Rad). Consiste en la utilización del fluorocromo bisbenzimidida (Hoechst 33258) que se une al surco menor del DNA y preferentemente a las secuencias que contienen A+T. La variación de fluorescencia se mide usando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de emisión de 460 nm. Permite la cuantificación entre 10 ng/ml y 5 µg/ml. Para la construcción de la recta patrón se utiliza DNA de timo de ternera que presenta una concentración del 58 % de contenido en A+T y es de doble cadena.

También se empleó el método comercial “Quant-iT PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit” (Molecular Probes), el cual incorpora el fluorocromo “Picogreen” de alta afinidad al DNA de doble cadena. La variación de fluorescencia se mide usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y otra de emisión de 535 nm. Permite la cuantificación de hasta 25 pg/ml de DNA. Para la construcción de la

recta patrón se utiliza DNA del fago lambda, proporcionado por el fabricante.

b) RNA. Se empleó el método comercial “RiboGreen[®] RNA Quantitation Kit” (Molecular Probes), el cual incorpora el fluorocromo “Ribogreen” de alta afinidad por el RNA. Permite la cuantificación en un rango de 1 µg/ml a 1 ng/ml. Para la construcción de la recta patrón se utiliza RNA ribosómico proporcionado por el fabricante.

Tanto con “Picogreen” como con “Ribogreen” se adaptaron los protocolos a placa de 96 pocillos (Black microwell SH, Nalge Nunc International) para el equipo “SPECTRA-Fluor microplate reader” (TECAN), siguiendo el protocolo desarrollado por Deane *et al.* (2003), que incorpora tratamientos con DNasa o RNasa según el caso, para reducir la posible interferencia del ácido nucleico correspondiente, en la cuantificación.

7.- Selección del gen diana para la detección de *B. cereus*

7.1.- Detección de genes de virulencia mediante PCR convencional

Se comprobó la presencia de diferentes genes de virulencia en el total de cepas en estudio, mediante la amplificación por PCR convencional utilizando cebadores específicos descritos previamente (Tabla 4).

Las reacciones de amplificación para los genes *pc-plc*, *sph*, *clo* y *entFM* se realizaron en un volumen total de 50 µl que contenían 100 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, 1,5 mM MgCl₂, 1 µM de cada oligonucleótido, 0,5 U de Taq polimerasa (Genotag polymerase,

Genotek), 1 x de tampón de PCR (67 mM Tris-HCl, pH 8,8; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 % Tween-20) y 200 ng de DNA molde. En todos los casos se incluyó un control negativo de reacción con las mismas concentraciones de los reactivos, sin DNA molde. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) con el siguiente programa térmico: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 56 °C y 45 s a 72 °C, y un último ciclo de extensión final de 5 min, a 72 °C.

Para los cebadores diseñados en este estudio (ver resultados, apartado 3, Tabla 6), se utilizó 3 mM de MgCl_2 y una temperatura de hibridación de 60 °C. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM Na_2EDTA , pH 7,6), y visualizados tras tinción en bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y posterior irradiación con luz UV.

Se estudió, así mismo, la presencia de los genes *hbl*, *nhe*, *cytk* y *ces* por PCR, cuyas toxinas han sido detectadas en casos de toxiinfecciones alimentarias causadas por *B. cereus*. Se utilizaron volúmenes totales de 50 μl que contenían 100 μM de cada desoxinucleótido trifosfato, 1,5 mM MgCl_2 , 1 μM de cada oligonucleótido, 1 x de tampón de PCR y 0,5 U de Taq polimerasa (Genotaq polymerase, Genotek). Se utilizaron 200 ng de DNA y el siguiente programa térmico: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 49 °C y 1 min a 72 °C, y un último ciclo de extensión final de 2 min a 72 °C.

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados en este estudio para la detección de los genes de virulencia.

Cebadores	Longitud	Producto PCR (pb)	T (°C) ^a	Diana	Proteína	Referencia bibliográfica	
HD2 F	22	1091	49	<i>hbl</i>	Hemolisina BL	Ehling-Schulz, <i>et al.</i> (2006)	
HA4 R	20						
NA2 F	18	766	49	<i>nhe</i>	Enterotoxina no hemolítica		
NB1 R	20						
CK F2	20	421	49	<i>cytK</i>	Citotoxina K		
CK R5	20						
CesF1	24	1271	49	<i>ces</i>	Cereúlida		
CesR2	25						
Pf	26	411	56	<i>pc-plc</i>	Fosfolipasa C ^b		Schraft & Griffith (1995)
Pr	21						
Pf	26	1461	56	<i>pc-plc</i>	Fosfolipasa C ^b		
Cr	26					<i>sph</i>	
BC-1	21	185	56	<i>clo</i>	Cereolisina O	Wang, <i>et al.</i> (1997)	
BC-2	20						
ENT-A	21	1269	56	<i>entFM</i>	Enterotoxina FM	Asano, <i>et al.</i> (1997)	
ENT-B	21						

^aTemperatura de hibridación.

^bFosfolipasa C específica de fosfatidilcolina

7.2.- Diseño de oligonucleótidos para Q-PCR

Para el diseño de cebadores específicos se utilizó la secuencia M24149, de la cepa GP-4 de *B. cereus*, obtenida de la base de datos pública del NCBI. Dicha secuencia se analizó con el programa Primer Express versión 1.0 (ABI Prism, PE Biosystems) siguiendo las especificaciones de Applied Biosystems y considerando zonas del gen de la fosfolipasa C descritas previamente por Kim *et al.* (2000) como específicas para *B. cereus*. La especificidad de los cebadores y la sonda, se comprobó “*in silico*”, utilizando la base de datos del NCBI y el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e “*in vitro*”, mediante amplificación por PCR convencional.

7.3.- Secuenciación de DNA y análisis de secuencias

Con el fin de tener una mayor información sobre las secuencias del gen de la fosfolipasa C, se amplificaron y secuenciaron un total de 17 cepas del “grupo *B. cereus*”. De la especie *B. cereus*, 3 correspondían a cepas de referencia (CECT 193, CECT 495, CECT 496) y 2 a cepas aisladas de alimentos (B68 y B69). De la especie *B. thuringiensis*, 3 eran cepas de referencia (CECT 197^T, CECT 4494, CECT 4495). De la especie *B. mycoides*, se estudiaron 5 de referencia (CECT 4123, CECT 4124, CECT 4125, CECT 4127, CECT 4128^T) y un aislado (B74); la cepa tipo de la especie *B. weihenstephanensis* (CECT 5894^T) y la cepa tipo de *B. pseudomycoides* (CECT 7065^T). Para la amplificación por PCR del fragmento del gen *pc-plc* delimitado por los cebadores Pf-Cr se siguieron las condiciones descritas anteriormente, aumentando la concentración de MgCl₂ a 3 mM. Los productos de amplificación fueron purificados con “UltraClean PCR clean-up Kit” (Mo Bio, Laboratories) y secuenciados en el secuenciador automático ABI-PRISM 377 y el “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se almacenaron en una base de datos para su posterior comparación y análisis con ayuda del programa ARB (Ludwig *et al.*, 2004). Se incorporaron las secuencias disponibles en la base de datos pública del NCBI: 7 correspondían a cepas de la especie *B. cereus* (M24149, cepa GP-4; X12711, IAM 1208; AY195600, cepa 569; M20194-X12854, cepa SE-1; X64140-X64141, cepa BKM-B164 y AE016877-017000, ATTC 14579^T), una secuencia a *B. thuringiensis* subsp. *gelechia* (Y16268, cepa Bt13), y una a la cepa *B. anthracis* Ames A2012 (AAAC01000001).

Para asegurar la identificación de las cepas fenotípicamente adscritas al género *Bacillus* se realizó el análisis de la secuencia del

DNAr 16S. Para la amplificación y secuenciación de dicho gen se utilizaron los cebadores, 616Valt (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3') y 630R (5'-CAK AAA GGA GGT GAT CC-3'), con las mismas condiciones de amplificación (utilizando 1,5 mM de MgCl₂) y los mismos procedimientos de purificación y secuenciación que los descritos para los genes de virulencia. La secuencias se analizaron utilizando la base de datos del NCBI y el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

8.- PCR cuantitativa

8.1.- Sistema SYBR Green

La amplificación por Q-PCR con el fluorocromo SYBR Green I se realizó utilizando SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 U de Amperase[®] uracil N-glycosylase (UNG) y 5 µl de DNA molde, en un volumen final de reacción de 25 µl. La reacción de Q-PCR se llevó a cabo en un aparato GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), compuesto por un termociclador con bloque térmico peltier de 96 pocillos (GeneAmp[®] PCR System 9600) junto a un sistema de detección fluorimétrica y captación de imagen CCD (GeneAmp[®] 5700 Electronics y GeneAmp[®] 5700 Sequence Detector). El equipo posee una lámpara halógena de tungsteno que le permite analizar las longitudes de onda de 485 nm y 520 nm.

Para la amplificación se utilizó el siguiente programa térmico: un primer ciclo de 2 min a 50 °C, un segundo ciclo de 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Para el análisis de las curvas de disociación (T_m), se añadió un ciclo de 15 s a 95 °C, un segundo ciclo de 20 s a 60 °C, y un tercer ciclo en el que

tiene lugar un incremento paulatino de temperatura desde 60 a 95 °C, en 20 min. Este incremento de temperatura permite que se modifique la unión del fluorocromo al DNA de doble cadena, de modo que se obtiene un valor de temperatura de disociación (T_m , temperatura a la cual la mitad de las moléculas de DNA están disociadas) característico del amplicón.

Para optimizar las condiciones de la reacción se ensayaron diferentes combinaciones de concentraciones de cada cebador (50 y 300 nM). Para las reacciones de optimización se utilizó 1 ng de DNA molde. Una vez establecidas las condiciones óptimas se realizaron los ensayos de especificidad utilizando 10 ng de DNA molde.

8.2.- Sistema TaqMan

La amplificación por Q-PCR con la sonda TaqMan MGB se realizó utilizando TaqMan[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems) y se empleó la concentración de cebadores establecida como óptima, 0.2 U de Amperase[®] uracil N-glycosylase (UNG) y 5 μ l de DNA molde, en un volumen final de reacción de 25 μ l. La reacción de Q-PCR se llevó a cabo en un aparato GeneAmp 5700, mediante el siguiente programa térmico: un primer ciclo de 2 min a 50 °C, un segundo ciclo de 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Para la titulación de la sonda se ensayaron diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 300 nM) y se utilizó 1 ng de DNA como molde.

8.3.- Rectas patrón de cuantificación

Para los ensayos de obtención de las rectas patrón de cuantificación se utilizaron tanto células como DNA total de la cepa *B. cereus* CECT 148^T.

a) A partir de células. A partir de suspensiones de células concentradas ($A_{580} = 1$), se prepararon diluciones decimales seriadas. De un mililitro de cada dilución se obtuvo el DNA mediante “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen) y se utilizaron 5 μ l como molde para la reacción de amplificación. Paralelamente se realizó una cuantificación por recuento en placa.

b) A partir de DNA. El DNA obtenido a partir de un cultivo de 18 h, cuantificado espectrofluorométricamente, se utilizó en la preparación de diluciones decimales seriadas para construir la recta patrón de DNA. La equivalencia entre DNA y células se calculó tomando como base el tamaño molecular del genoma publicado para la cepa tipo de *B. cereus*, $5,4 \times 10^6$ bp (Ivanova *et al.*, 2003), y la ecuación descrita por Hoorfar *et al.* (2004a), $m = n \times (1,013 \times 10^{-21})$, donde “m” es la masa en gramos de un genoma y “n” es el número de pares de bases de dicho genoma (10 ng de DNA corresponde a $1,8 \times 10^6$ equivalentes genómicos).

Las rectas patrón para la cuantificación se obtuvieron representando gráficamente los valores medios de C_T , obtenidos de tres replicados en tres ensayos independientes, frente a la cantidad de células o equivalentes genómicos utilizados en cada reacción de Q-PCR.

9.- PCR cuantitativa con transcripción inversa

La reacción implica un paso inicial en que se genera un DNA copia a partir del RNA. Por tanto para evitar interferencias en la cuantificación es necesario asegurar que el RNA extraído no contiene DNA genómico residual.

9.1.- Eliminación del DNA: tratamiento con DNasa I

Se prepararon alícuotas de 0,5 µg de RNA de la cepa *B. cereus* CECT 148^T (cuantificadas espectrofotométricamente), que fueron sometidas a diferentes tratamientos con “RNase-free DNase I” (Takara) en un volumen final de 20 µl:

- a) 0,5 U (60 min, 37 °C).
- b) 0,5 U (30 min, 37 °C).
- c) 1 U (30 min, 37 °C).
- d) 2 U (30 min, 37 °C).

A continuación, se inactivó térmicamente la DNasa residual a 80 °C durante 5 min en termobloque. La ausencia de trazas de DNA fue comprobada mediante amplificación por PCR convencional y Q-PCR, utilizando los cebadores específicos de *B. cereus*. La presencia de RNA se comprobó por RT-PCR. La transcripción inversa y la amplificación se realizaron con una única mezcla de reacción de 25 µl, con 100 µM de dATP, dGTP, dCTP y 200 µM de dUTP, 3 mM de MgCl₂, 0.5 U de “AmpliTaq[®] Gold DNA polymerase”, 1 x de tampón II de PCR y 6 U de Multiscribe[®] Reverse Transcriptase (Applied Biosystem), y como molde 20 ng de RNA tratado con DNasas. La reacción se realizó según el programa térmico que se detalla: un ciclo inicial de transcripción inversa de 30 min a 48 °C, un segundo ciclo de 10 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 56 °C y 45 s a 72 °C, y un último ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C.

9.2.- Sistema SYBR Green

Para el desarrollo de la Q-RT-PCR en modo “one-step”, donde la transcripción inversa y la amplificación ocurren secuencialmente en

un mismo tubo de reacción, se utilizaron 6 U de “MultiScribe[®] Reverse Transcriptase enzyme” (Applied Biosystems), que se incorporaron a la mezcla de amplificación que incluía “SYBR[®] Green PCR Master Mix” o “SYBR[®] Green Core Reagent kit” (Applied Biosystems), para un volumen final de reacción de 25 μ l, añadiendo como molde para la reacción 20 ng de RNA tratados con DNasas. Los ensayos se realizaron en el equipo GeneAmp 5700 Sequence Detection System (ABI Prism, PE Biosystems), utilizando el protocolo térmico de PCR con transcripción inversa recomendado por el fabricante (un primer ciclo de 30 min a 48 °C, un segundo ciclo de 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C). Tras el programa de amplificación se añadió el de análisis de la curva de disociación (T_m). En primer lugar, se ensayaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1,5, 2,5, 3,5 Mm) a partir del “Core Reagent kit” y la concentración del “SYBR[®] Green PCR Master Mix”), utilizando 300 nM de cada cebador. Una vez fijada la concentración de $MgCl_2$ más adecuada, se realizó una nueva titulación de los cebadores (50 y 300 nM) para optimizar la concentración de cebadores en la reacción de Q-RT-PCR.

9.3.- Sistema TaqMan

Para incorporar la sonda TaqMan MGB (Tabla 6, pág. 83) en la Q-RT-PCR, se ensayaron las siguientes concentraciones: 50, 100 y 150 nM. Se emplearon las condiciones de amplificación establecidas previamente como óptimas, 2,5 mM de $MgCl_2$ y 300 nM de cada cebador (“TaqMan[®] Core Reagents Kit”, Applied Biosystems), incorporando simultáneamente 6 U de “MultiScribe[®] Reverse Transcriptase enzyme” (Applied Biosystems) en un volumen final de reacción de 25 μ l. Se utilizaron 20 ng de RNA tratados con DNasa, como molde de la reacción. Los ensayos se

realizaron en el equipo GeneAmp 5700 Sequence Detection System (ABI Prism, PE Biosystems), utilizando el programa térmico de PCR con transcripción inversa recomendado por el fabricante (descrito en apartado anterior, 9.2).

9.4.- Rectas patrón de cuantificación

La recta patrón se construyó a partir del RNA extraído de una suspensión de células de un cultivo de *B. cereus* CECT 148^T en fase exponencial y de concentración conocida, mediante recuento en placa. El RNA fue cuantificado espectrofluorimétricamente con “RiboGreen”. Tras el tratamiento con DNasa se prepararon diluciones decimales seriadas correspondientes a 5 unidades logarítmicas. La recta patrón para la cuantificación se obtuvo representando gráficamente los valores medios de C_T procedentes de dos replicados en dos ensayos independientes, frente a la cantidad de células utilizadas en cada reacción de Q-RT-PCR.

10.- Ensayos en alimentos

10.1.- Contaminación artificial con células vegetativas

Se seleccionaron huevo líquido y leche en polvo infantil, como alimentos susceptibles de contaminación por *B. cereus*. Para preparar el huevo líquido se lavó primero la superficie externa del huevo con 150 µg/ml de hipoclorito sódico. A continuación se abrió y se mezcló el contenido en condiciones asépticas con solución salina (p/v) en la proporción 1/10. La leche en polvo infantil se reconstituyó en proporción 1/10 con solución salina estéril (p/v). Se utilizaron diluciones decimales seriadas de un cultivo en fase logarítmica de la cepa *B. cereus* CECT 148^T para inocular ambas muestras de

alimento. Se tomaron alícuotas de 1 ml de cada muestra y se extrajo el DNA mediante “DNeasy[®] Tissue Kit” (Qiagen), empleando como molde 5 μ l para la reacción de amplificación por Q-PCR. Paralelamente se realizó un recuento en placa, a partir de las muestras de huevo y leche inoculadas.

10.2.- Contaminación artificial con esporas

A partir de una suspensión de esporas calibrada espectrofotométricamente se prepararon diluciones decimales en solución salina con 0,1 % Tween 80 (SST). De cada dilución se tomaron 10 μ l para inocular alícuotas de 990 μ l de cada tipo de alimento (leche en polvo infantil y huevo). Se extrajo el DNA con los protocolos de extracción ensayados y 5 μ l del eluido obtenido se analizaron por Q-PCR. Paralelamente se realizó un recuento en placa a partir de los alimentos contaminados artificialmente.

10.3.- Alimentos con contaminación natural

Con el fin de evaluar la aplicabilidad del sistema de PCR desarrollado se analizaron por PCR convencional y Q-PCR, bien directamente o tras un enriquecimiento, alimentos que presentan habitualmente contaminación natural:

I.- Sin enriquecimiento previo: a) papilla de 8 cereales, b) crema de arroz y c) harina de trigo, una muestra de cada tipo. Los alimentos “a” y “b” son preparados infantiles de alto contenido en espesantes (xantano, garrofín, almidón). Para el aislamiento del DNA, debido a que el alimento obturaba la columna de purificación, se modificó el protocolo del método de Qiagen del siguiente modo: a partir de 100 mg de cada alimento, tras la incubación a 70 °C, durante 30 min con proteinasa K, se introdujo un paso de centrifugación para eliminar los

sólidos. El sobrenadante recuperado se incorporó a la columna de purificación de DNA. Paralelamente se realizó la cuantificación de *B. cereus* por técnicas tradicionales. Para ello se tomaron 10 g del alimento, se homogeneizaron en 90 ml de APT (agua de peptona tamponada) y se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina, a partir de las cuales se inocularon, por triplicado, alícuotas de 0,1 ml en placas de agar PEMBA.

II.- Tras enriquecimiento: a) arroz con leche (3 muestras), b) canela en polvo (una muestra). Se tomaron 25 g del alimento, se homogeneizaron en caldo triptona soja polimixina (TSPB) y se incubaron durante 48 h a 30 °C. Tras el enriquecimiento, se realizó la extracción del DNA a partir de 1 ml del cultivo utilizando el método de Qiagen. Por otro lado, a partir de los cultivos enriquecidos se inocularon placas de agar PEMBA para confirmar la presencia de *B. cereus*.

11.- Análisis estadísticos

Análisis de regresión lineal

Tras procesar los valores de las rectas patrón realizadas por triplicado o duplicado, se calcularon los coeficientes de correlación lineal, R^2 global, mediante la herramienta estadística del programa Microsoft Office Excel 2003.

Simulación Montecarlo

Los valores obtenidos para cada punto de las rectas patrón de cuantificación procedían de diluciones decimales seriadas por lo que no constituían muestras independientes. Para realizar una aproxi-

mación estadística adecuada, se asumió que los resultados de las diferentes repeticiones en cada punto siguen el modelo de distribución binomial (Kay *et al.*, 2001). Se obtuvieron los intervalos de confianza al 95 % reproduciendo el diseño experimental y utilizando los valores simulados de la distribución binomial. En concreto, se realizaron 10^6 repeticiones del proceso en cada punto de la recta mediante Simulación Montecarlo, empleando el programa estadístico R versión 2.2.0 (<http://www.R-project.org/>, R Development Core Team, 2006).

Análisis de la varianza (ANOVA)

Para evaluar las diferencias de los tratamientos utilizados en la recuperación de DNA a partir de esporas, se compararon las medias de los valores obtenidos de concentración de DNA realizando un análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa informático Startgraphics v. 9.0.

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

1.- Caracterización fenotípica

La morfología colonial típica de *B. cereus* en agar PEMBA se observa en la Figura 3 y corresponde a colonias de 2 a 5 mm de diámetro, planas o ligeramente convexas, de borde ondulado o irregular, en forma circular o elipsoide, de color azulado por el pH básico debido a la no asimilación del manitol, y con halo de precipitación debido a la capacidad lecitinasas. En la misma figura también se muestra la respuesta a las pruebas de confirmación de los aislados con morfología típica como son: la fermentación de la glucosa, la producción de butanodiol y la asimilación de nitratos, o bien la β -hemólisis. Los resultados de la caracterización fenotípica quedan recogidos en la Tabla 5.

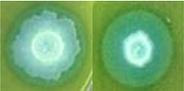
Aspecto típico de <i>B. cereus</i> en agar selectivo (PEMBA)		Respuestas a las pruebas de confirmación		
 <p>Morfología colonial, no asimilación del manitol, actividad lecitinasas</p>				
<p>A</p>		Voges-Proskauer		
		Nitratos		
		Fermentación de glucosa en anaerobiosis.		
<p>B</p>				
		β -hemólisis		

Figura 3.- Aspecto típico de las colonias de *B. cereus* en agar selectivo PEMBA y respuestas a las pruebas de confirmación empleadas según la Norma ISO 7932, A) 1993/Cor.1:1997 y B) 2004.

Las cepas de referencia de las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis*, presentaron la morfología típica descrita para *B. cereus* en agar PEMBA. Las cepas de referencia de *B. mycoides* y *B. pseudomycoides* presentaron crecimiento rizoidal. Las cepas de referencia de otras especies del género *Bacillus* presentaron aspecto colonial bien diferenciable del “grupo *B. cereus*” (color amarillo, sin halo de precipitación). De las ambientales, las cepas B72 y B74 presentaron crecimiento rizoidal y sólo una, la cepa B44, mostró un aspecto colonial no típico de “grupo *B. cereus*”.

De las pruebas confirmatorias, en las cepas de referencia, la mayor variación en el resultado esperado se observó en la prueba de fermentación de la glucosa que resultó negativa para las cepas *B. cereus* CECT 131 y CECT 4014, y *B. thuringiensis* CECT 4495, CECT 4496 y CECT 4497. Todas las cepas fueron positivas para el Voges-Proskauer, la β -hemólisis y la prueba de asimilación de nitratos, excepto *B. mycoides* CECT 4128^T que presentó resultado negativo en la asimilación de nitratos. En el caso de las cepas ambientales, las cepas B40 y B45 fueron negativas para la asimilación de la glucosa, la cepa B72 resultó negativa en la prueba del Voges-Proskauer, y las cepas B66 y B70 resultaron negativas para la asimilación de nitratos.

A continuación, todas ellas fueron sometidas a identificación por API[®] 50CH y 20E. Los perfiles obtenidos se analizaron y los resultados aparecen en la Tabla 5. La adscripción a especie, grupo o género se realizó según los siguientes criterios:

- Si el porcentaje de identificación (% ID) era $\geq 80,0$ y presentaba un único taxón significativo, se aceptó la identificación a nivel de especie o biotipo de API. Si el resultado de identificación correspondía a biotipo *B. cereus* 1 o *B. cereus* 2, y dado que los

perfiles de API no permiten identificar *B. thuringiensis*, su diferenciación se realizó en base a la presencia de cristal parasporal.

- Si el resultado presentaba varios taxones significativos, independientemente del valor del % ID, y todos ellos correspondían a especies del “grupo *B. cereus*”, se consideró identificación a nivel de grupo. Dentro de las adscritas a “grupo *B. cereus*” si presentaba crecimiento rizoidal se consideró perteneciente a la especie *B. mycooides*.

- Si los taxones significativos incluían especies no pertenecientes al “grupo *B. cereus*” se consideró la identificación a nivel de género.

De las 13 cepas de referencia de la especie *B. cereus*, 3 fueron identificadas correctamente como pertenecientes a dicha especie. De las 8 cepas de referencia de *B. thuringiensis*, la cepa CECT 4495 presentó el perfil de *B. cereus* biotipo 1 y las cepas CECT 197^T y CECT 4454 el perfil de “grupo *B. cereus*”, pero todas ellas presentaron cristal parasporal, lo que confirmó su pertenencia a la especie *B. thuringiensis*. La cepa de referencia de *B. weihenstephanensis* fue identificada según API como *B. mycooides* con un 90 %, pero según el esquema propuesto quedaría identificada a nivel de “grupo *B. cereus*” debido a que no presenta crecimiento rizoidal. De las 6 cepas de referencia de *B. mycooides* 4 presentaron el perfil de API de la especie, con ID > 80 %, las otras 2 (CECT 4123 y CECT 4125) presentaban el perfil de “grupo *B. cereus*” con morfología rizoidal, lo que sugería también su pertenencia a la especie de *B. mycooides*. La cepa de referencia de *B. pseudomycooides* mostró un perfil de “grupo *B. cereus*”, pero por su crecimiento rizoidal fue asignada a *B. mycooides*.

Finalmente, en el conjunto de cepas de referencia del “grupo *B. cereus*”, y tomando como criterio la presencia de cristal paraesporal y el crecimiento rizoidal antes mencionados, un total de 13 cepas fueron identificadas en este trabajo a nivel de especie. De ellas, sólo 3 correspondían a la especie *B. cereus*, 3 a *B. thuringiensis* y 7 a *B. mycoides* (incluyendo a *B. pseudomycoides*, especie muy próxima a *B. mycoides*). El resto de cepas de referencia quedaron identificadas a nivel de “grupo *B. cereus*” y una a nivel de género *Bacillus* (CECT 40).

Aplicando los mismos criterios para las cepas de origen ambiental, sólo 3 (B40, B47 y B77) se identificaron como pertenecientes a la especie *B. cereus* por el perfil de API; 2 (B40 y B48) a la especie *B. thuringiensis* por la presencia del cristal parasporal, 2 (B72 y B74) a *B. mycoides* por el crecimiento rizoidal y el resto quedaron identificadas a nivel de género o grupo (ver Tabla 5).

El resultado de la identificación en las especies del “género *Bacillus*” no pertenecientes al “grupo *B. cereus*” según el sistema API fue más satisfactorio: 11 de las 16 especies fueron identificadas a nivel de especie; 4 cepas fueron identificadas a nivel de “grupo *B. subtilis*”; la cepa de referencia de *B. sphaericus*, como *Bacillus* non-reactive (no asimila ninguno de los sustratos de la tira API 50CH) y *B. lentus* CECT 18^T fue identificada a nivel de género.

La figura 4 muestra el dendrograma del agrupamiento UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean”), obtenido a partir de la matriz de similitud calculada con el coeficiente de Jaccard, sobre los perfiles fenotípicos de API. Al 58 % se forman 3 fenones que contienen el total de cepas ensayadas excepto las cepas tipo de las especies *B. lentus*, *B. firmus* y *B. sphaericus*. El fenon I contiene 29 cepas de referencia y 30 aislados de alimentos

del “grupo *B. cereus*”. Dentro de éste se observa un subgrupo de cepas que se diferencia del resto en la no asimilación del almidón y del glicógeno, junto a la no asimilación del gluconato e incluye a la cepa de referencia *B. cereus* CECT 4387 y a 7 aislados identificados como *B. cereus* biotipo 2, “grupo *B. cereus*” y género *Bacillus*. El fenon II comprende cepas tipo de diferentes especies, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lichenimormis*, *B. circulans* y aislados procedentes del INRA de las especies *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *P. polimyxa*. El fenon III comprende a la cepa tipo de *B. pumilus* y a 5 aislados ambientales de esta especie.

Tabla 5.- Resultados de la caracterización fenotípica en las cepas analizadas.

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	MC ⁽²⁾				Pruebas de confirmación ⁽³⁾				API 50CH/20E ⁽⁴⁾				Interpretación ⁽⁵⁾ Identificación
			RF	VP	Nit	β -H	RF	VP	Nit	β -H	Comentario de API y 1 ^{er} Taxón significativo	% ID	T*	Nota	
a) Cepas de referencia "grupo <i>B. cereus</i> "	<i>B. cereus</i>	CECT 131	III	+	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 1	55,7	0,93	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 148 ^T	III	+	+	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 1	94,0	0,81	◇	<i>B. cereus</i> 1
	CECT 193	V	+	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 1	83,9	0,69	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 495	III	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	41,3	0,7	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 496	III	+	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 1	66,3	0,88	◇✱	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 4014	III	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	82,5	0,65	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 4094	III	+	D	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 1	98,4	0,74	◇	<i>B. cereus</i> 1	
	CECT 4387	III	+	D	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 2	97,1	0,93	◇	<i>B. cereus</i> 2	
	CECT 4989	III	+	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 1	61,7	0,62	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 5144	III	+	D	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	96,3	0,69	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 5148	V	+	D	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	94,9	0,63	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 5314	III	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	93,3	0,93	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	CECT 40	IV	+	D	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 2	81,3	0,8	◇●✱	<i>Bacillus</i> sp.	
	<i>B. thuringiensis</i>	CECT 197 ^T	V	+	D	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	89,9	0,92	◇	<i>B. thuringiensis</i> ⁽⁷⁾	
		CECT 996	III	+	D	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 1	93,8	0,81	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
	<i>B. t. subsp. kurstaki</i>	CECT 4454	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	64,1	0,85	◇	<i>B. thuringiensis</i> ⁽⁷⁾	
<i>B. t. subsp. aizawai</i>	CECT 4494	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	74,6	0,79	◇	Grupo <i>B. cereus</i>		
<i>B. t. subsp. kurstaki</i>	CECT 4495	V	+	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 1	93,1	0,62	◇	<i>B. thuringiensis</i> ⁽⁷⁾		
<i>B. t. subsp. thuringiensis</i>	CECT 4496	V	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 1	95,2	0,85	◇	Grupo <i>B. cereus</i>		
<i>B. t. subsp. kurstaki</i>	CECT 4497	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	69,5	0,81	◇	Grupo <i>B. cereus</i>		
<i>B. t. subsp. israelensis</i>	CECT 7034	V	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 2	77,5	0,95	◇	Grupo <i>B. cereus</i>		
<i>Bacillus mycooides</i>	CECT 4123	I	- ^a	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	<i>B. mycooides</i>	48,6	0,77	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾		
	CECT 4124	I	- ^a	D	+	+	+	Buena ID.	<i>B. mycooides</i>	92,1	0,85	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾		
	CECT 4125	I	- ^a	+	+	+	D	Muy buena ID. en el género	<i>B. cereus</i> 2	85,7	0,96	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾		
	CECT 4126	I	- ^a	+	+	+	+	ID. aceptable	<i>B. mycooides</i>	84,5	0,81	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾		

Tabla 5.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	MC ⁽²⁾	Pruebas de confirmación ⁽³⁾				API 50CH/20E ⁽⁴⁾			Interpretación ⁽⁵⁾	
				RF	VP	Nit	β-H	Comentario de API y 1 ^{er} Taxón significativo	% ID	T*	Nota	Identificación
	CECT 4127	I	- ^a	+	+	+	+	ID. aceptable	84,5	0,81		B. mycooides ^(R)
	CECT 4128T	I	- ^a	+	+	-	+	Muy buena ID. en el género	53,6	0,72	◇	B. mycooides ^(R)
B. weihenstephanensis	CECT 5694T	I	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	90,4	0,83	◇	Grupo B. cereus
B. pseudomycooides	CECT 7065T	I	- ^a	ND	ND	ND	+	Excelente ID. en el género	80,9	0,86	◇	B. mycooides ^(R)
b) Cepas ambientales "grupo B. cereus"												
B. cereus/ /B. thuringiensis	INRA P21S	III	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género.	48,5	0,81	◇	Grupo B. cereus
	INRA TZ415	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	64,9	0,61	◇	Grupo B. cereus
	INRA P2101	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	82,5	0,82	◇	Grupo B. cereus
	B40	V	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	56,4	0,91	◇	B. thuringiensis ^(T)
	B41	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	78,0	0,97	◇	Grupo B. cereus
	B42	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	69,5	0,81	◇	Grupo B. cereus
	B43	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	63,1	0,77	◇	Grupo B. cereus
	B45	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	90,8	0,77	◇	Grupo B. cereus
	B46	VI	+	+	+	+	+	Muy buena ID.	99,9	0,5	◇	B. cereus 1
	B47	III	+	+	+	+	D	Buena ID.	90,8	0,76	◇	B. cereus 1
	B48	V	+	+	+	+	D	Muy buena ID. en el género	86,5	0,67	◇	B. thuringiensis ^(T)
	B49	V	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	60,5	0,78	◇	Grupo B. cereus
	B50	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	48,8	0,88	◇	Grupo B. cereus
	B54	III	+	+	+	+	+	Baja discriminación	60,1	0,84	◇×	Bacillus sp.
	B55	III	+	+	+	+	+	Baja discriminación	60,1	0,84	◇×	Bacillus sp.
	B60	VI	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	62,8	0,66	◇	Grupo B. cereus
	B62	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	59,4	0,9	◇	Grupo B. cereus
	B63	V	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	56,8	0,85	◇	Grupo B. cereus
	B64	VI	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	89,4	0,93	◇●	Bacillus sp.
	B65	IV	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	62,2	0,68	◇	Grupo B. cereus
	B67	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	74,0	0,74	◇	Grupo B. cereus
	B68	IV	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	55,4	0,87	◇	Grupo B. cereus
	B70	V	+	+	-	+	+	Muy buena ID. en el género	52,9	0,58	◇	Grupo B. cereus
	B73	V	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	53,8	0,81	◇	Grupo B. cereus

Tabla 5.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Pruebas de confirmación ⁽³⁾				API 50CH/20E ⁽⁴⁾				Interpretación ⁽⁵⁾		
			MC ⁽²⁾	RF	VP	Nit	β -H	Comentario de API y 1 ^{er} Taxón significativo	% ID	T*		Nota	
B. mycooides/ /B.pseudomycooides/ /B.weihenstephanensis	B77	III	+ _b,c	ND	ND	ND	+	Buena ID.	B. cereus 2	98,7	0,79	◇	B. cereus 2
	B44	II	-	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. mycooides	89,3	0,8	◇	Grupo B. cereus
	B66	II	-	+	+	-	+	Muy buena ID. en el género	B. mycooides	94,9	0,74	◇	Grupo B. cereus
	B69	I	+	+	+	D	+	Excelente ID. en el género	B. mycooides	84,2	0,98	◇	Grupo B. cereus
	B72	II	- _a	+	-	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 2	78,7	0,62	◇	B. mycooides ^(R)
	B74	II	- _a	+	+	+	D	Excelente ID. en el género	B. mycooides	57,6	0,78	◇	B. mycooides ^(R)
	c) Otras especies del "género Bacillus"												
Bacillus circulans	CECT 10 ^T		-	+	+	+	-	Muy buena ID.	B. circulans	99,7	0,7		B. circulans
	INRA P1198		-	+	+	+	+	Excelente ID.	B. pumilus	99,9	0,93		B. pumilus
Bacillus firmus	CECT 14 ^T		-	-	+	+	-	Muy buena ID.	B. firmus	99,8	0,97		B. firmus
Bacillus lentus	CECT 18 ^T		-	-	-	-	-	Baja discriminación	B. lentus	70,2	0,72		Bacillus sp.
Bacillus licheniformis	CECT 20 ^T		-	+	+	+	-	Muy buena ID.	B. licheniformis	99,9	0,68		B. licheniformis
	INRA B2186		-	+	+	+	D	Excelente ID.	B. licheniformis	99,9	0,76		B. licheniformis
Bacillus megaterium	CECT 4313 ^T		-	-	-	-	-	Excelente ID.	B. megaterium	99,9	0,97		B. megaterium
Paenibacillus polymyxa	INRA Z1186		-	+	+	+	-	Muy buena ID.	B. subtilis*	99,8	0,64		Grupo B. subtilis
Bacillus pumilus	CECT 29 ^T		-	+	+	+	-	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,59		B. pumilus
	INRA Z2166		-	+	+	+	D	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,54		B. pumilus
	B51		ND	ND	ND	ND	ND	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,72		B. pumilus
	B52		ND	ND	ND	ND	ND	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,87		B. pumilus
	B53		ND	ND	ND	ND	ND	Excelente ID.	B. pumilus	99,9	0,75		B. pumilus
Bacillus sphaericus	CECT 33 ^T		-	-	-	-	-	Buena ID.	B. non-reactive	94,5	0,93		B. non reactive
Bacillus subtilis	CECT 39 ^T		-	-	+	+	D	Buena ID.	B. subtilis*	94,2	0,84		Grupo B. subtilis
d) Especies de otros géneros													
Escherichia coli	CECT 515 ^{NT}		-	ND	ND	ND	ND	Muy buena ID.	B. subtilis*	99,8	0,91		Grupo B. subtilis
Listeria monocytogenes	CECT 4031 ^T		-	ND	ND	ND	ND						
Salmonella choleraesuis	CECT 915 ^T		-	ND	ND	ND	ND						
Staphylococcus aureus	CECT 86 ^T		-	ND	ND	ND	ND						

Tabla 5.- (Continuación).

^T, cepa tipo. CECT, Colección Española de Cultivos Tipo. INRA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Francia.

⁽¹⁾GT, genotipado, identificación derivada del genotipado con ISR y RAPDs (Ocio *et al.*, 2002 y Martínez-Blanch *et al.*, 2003): grupo I y II) *B. mycoides* / *B. pseudomycoides* / *B. weihenstephanensis*, grupo III y IV) *B. cereus* y grupo V y IV) *Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*.

⁽²⁾MC, morfología colonial típica de *B. cereus*, sobre agar PEMBA, “+” si mostraba el total de características típicas o “-” si presentaba alguna de las características siguientes: a) crecimiento rizoidal, b) asimilación del manitol (colonia color amarillento) y c) lecitinasa negativa. ND, no determinado. D, débil.

⁽³⁾Pruebas de confirmación: RF, rojo fenol; VP, Voges-Proskauer modificado; Nit, nitratos y β -H, hemólisis β .

⁽⁴⁾ID, Identificación. % ID, proximidad relativa a los diferentes taxones de la base de datos (porcentajes de positividad). T*, índice de Tipicidad, proximidad al perfil más típico en cada taxón (0-1). Nota: \diamond) posibilidad de *B. thuringiensis*, \bullet) posibilidad de *B. megaterium*, \times) la prueba 27 (celobiosa) determina que sea *Brevibacillus laterosporus* y \otimes) especie altamente patógena. *No es posible discriminar entre *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

⁽⁵⁾Interpretación según este trabajo del resultado de API, se consideró identificación a nivel de “grupo *B. cereus*” cuando aparecía más de un taxón significativo correspondiente a las especies del “grupo *B. cereus*”. Se consideró identificación a nivel género *Bacillus* cuando aparecían otras especies. ^(T)Identificación como *B. thuringiensis*, presencia del cristal parasporal (δ -toxina). ^(R)Identificación como *B. mycoides*, crecimiento rizoidal.

2.- Detección de genes de virulencia por PCR convencional

Con el fin de seleccionar la diana para el diseño de cebadores se investigó la presencia de genes de virulencia en las cepas en estudio mediante PCR convencional con cebadores específicos. Los resultados de la amplificación se muestran en la Figura 5 y la Tabla 8, e indican que de las 59 cepas del “grupo *B. cereus*” analizadas 44 (75 %) poseen el gen *entFM* (enterotoxina FM), 45 (76 %) el gen *sph* (esfingomielinasa), 56 (95 %) el gen *pc-plc* (fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina) y que el gen *clo* (cereolisina O) está presente en todas ellas pero también en otras especies del género *Bacillus*, tales como *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. firmus*.

Estos resultados confirman que el gen *pc-plc* es adecuado como diana para el diseño de los cebadores para Q-PCR, por su presencia mayoritaria en las cepas del “grupo *B. cereus*” y su ausencia en las cepas de otras especies estudiadas. Además, se trata de un gen de copia única como demuestran los genomas del “grupo *B. cereus*” accesibles en bases de datos públicas.

En cuanto al resto de los factores de virulencia ensayados por su relación con intoxicaciones alimentarias (Tabla 8), el gen *hbl* (hemolisina BL) está presente en 48 (81 %) de las cepas del “grupo *B. cereus*”, el gen *nhe* (enterotoxina no hemolítica) en 45 (76 %), el gen *ces* (cereúlida sintetasa) en 2 (3 %) y el gen *cytK* (citotoxina) en 33 (56 %), aunque también se encontró en cepas de otras especies del género *Bacillus*, tales como *B. pumilus* y *B. subtilis*.

Considerando los 8 genes estudiados se distinguen hasta 26 perfiles toxigénicos (Tabla 8). De ellos, 22 (perfiles A-V) corresponden a las 59 cepas del “grupo *B. cereus*” y 4 (perfiles W-Z) a las 16 cepas de otras especies del género *Bacillus* ensayadas, siendo el perfil Z

ausencia de amplificación para todos los genes. El 66 % de las cepas del “grupo *B. cereus*” presentaron de 6 a 7 factores de virulencia, el 29 % de las cepas de 5 a 3 genes y el 5 % sólo dos. Se observó la existencia de perfiles toxigénicos similares para las diferentes especies del “grupo *B. cereus*”. Los perfiles más frecuentes fueron el “D” con 13/59 cepas (*hbl, nhe, cytK, pc-plc, sph, clo, entFM*), el “L” con 9/59 (*hbl, nhe, pc-plc, sph, clo, entFM*) y el “A” con 8/59 (*hbl, cytK, pc-plc, sph, clo, entFM*). Las cepas *B. mycoides* CECT 4125 y *B. pseudomycoides* CECT 7065^T que presentaron el perfil “U” fueron las únicas cepas del “grupo *B. cereus*” que no poseían ninguno de los genes de toxinas relacionadas con toxiinfecciones alimentarias (*hbl, nhe, cytK* o *ces*) (ver Figura 6).

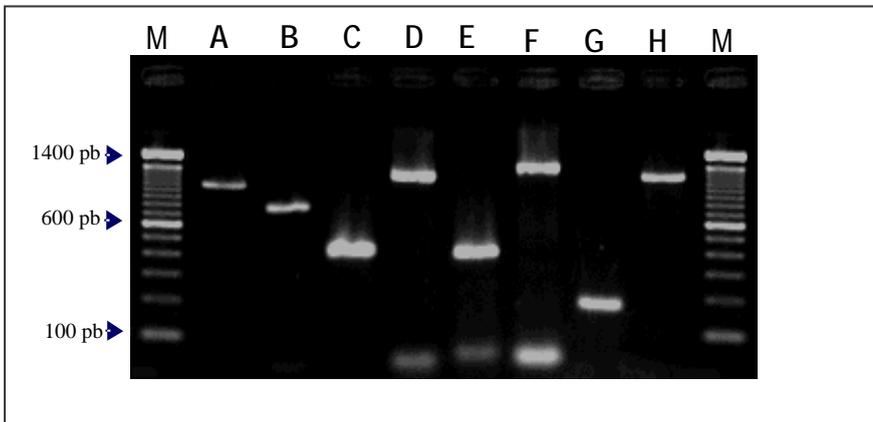


Figura. 5.- Productos de amplificación por PCR correspondientes a los distintos cebadores específicos de genes de virulencia ensayados: **A)** HD2 F/HA4 R, 1091 pb, (gen *hblA-D*), **B)** NA2 F/NB1 R, 766 pb, (gen *nheA-B*) **C)** CK F2/CK R5, 421 pb, (gen *cytK*), **D)** CesF1/CesR2, 1271 pb, (gen *ces*) **E)** Pf/Pr, 411 pb (gen *pc-plc*), **F)** Pf/Cr, 1461 pb, (gen *pc-plc* y *sph*), **G)** BC-1/BC-2, 185 pb (gen *clo*) y **H)** EntA/EntB, 1269 pb (gen *entFM*). M, marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, Invitrogen).

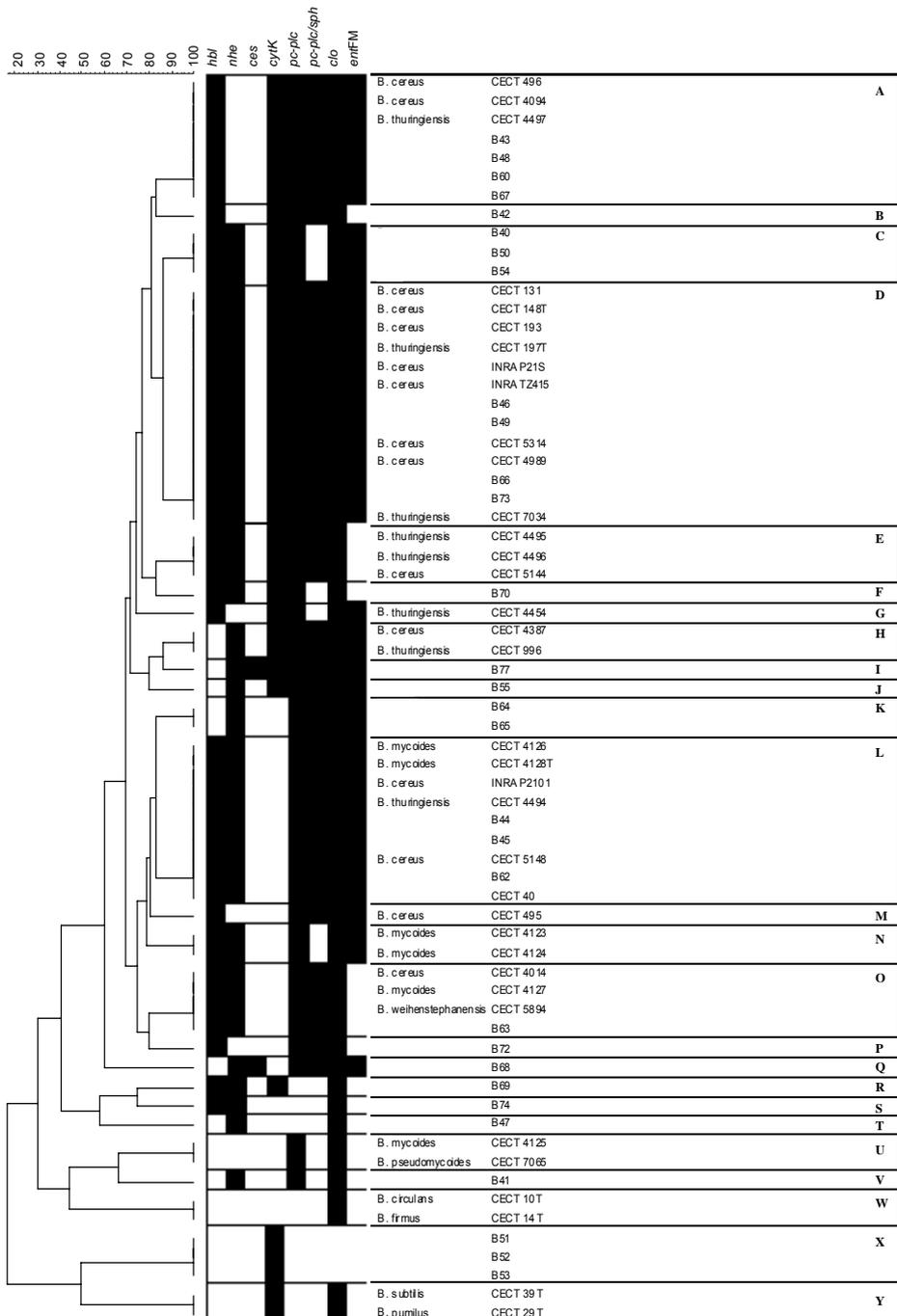


Figura 6.- Dendrograma UPGMA, obtenido utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, donde se muestra el agrupamiento de las cepas en estudio en función de los perfiles de factores de virulencia.

3- Especificidad de los oligonucleótidos diseñados para PCR cuantitativa

Se diseñaron un total de 5 oligonucleótidos (uno directo y 3 reversos, y una sonda TaqMan MGB) para Q-PCR (Tabla 6). La sonda lleva incorporado el fluoróforo FAM (6-carboxi-fluoresceína) en el extremo 5', un silenciador no fluorescente ("Dark Quencher") en el extremo 3', que permite una monitorización más precisa de las variaciones de fluorescencia, y un péptido MGB ("Minor Groove Binder") que aumenta la temperatura de hibridación sin aumentar el tamaño de la sonda y sirve de anclaje uniéndose al surco menor del DNA.

Tabla 6.- Oligonucleótidos diseñados en este estudio para su utilización en PCR cuantitativa.

Nombre	Posición ^a	Secuencia (5'-3')	T (°C) ^b
PCER F	838	GGA TTC ATG GAG CGG CAG TA	60
BCER-MGB	862	CGA AAC AAG ATT ACI CT	70
PCER R1	888	TCT TAC GAA CCA ATC T TT CGT ATT ATC ATT	60
PCER R2	905	GAT ACA GCT GCT CTT ACG AAC CAA	60
PCER R3	956	GCT TAC CTG TCA TTG GTG TAA CTT CA	60

^aPosición en la secuencia del gen *pc-plc* (nº de acceso M24149, NCBI), correspondiente a la cepa *B. cereus* GP-4.

^bTemperatura de hibridación.

La especificidad de los cebadores diseñados se ensayó mediante PCR convencional. La combinación PCER-F y PCER-R1 mostró que en algunas cepas se obtenía un producto de amplificación de tamaño mucho mayor al esperado (900 pb), por lo que fue descartada. Con la combinación PCER-F y PCER-R2 se obtuvo el amplificado en todas las cepas del "grupo *B. cereus*" excepto en *B. mycoides* CECT 4124. Con la combinación PCER-F y PCER-R3, el total de cepas del

“grupo *B. cereus*” presentaron amplificado mientras que no aparecía en otras especies.

Además, se realizó un análisis pormenorizado de las zonas diana de los cebadores a partir de las secuencias obtenidas en este estudio. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y revelan un menor número de desapareamientos en la secuencia de los cebadores PCER-F y PCER-R3, por lo que fueron seleccionados para Q-PCR.

Tabla 7.- Homología de los cebadores diseñados con las secuencias diana en diferentes cepas del “grupo *B. cereus*”, a partir de los amplificados obtenidos con los cebadores Pf/Cr y Pf/PCER-R3.

Especie	Cepa	Cebadores			
		F	R1	R2	R3
<i>B. cereus</i>	CECT 193 y B68	-	1	2	-
	CECT 495 y CECT 496	1	1	2	1
<i>B. thuringiensis</i>	CECT 197 ^T , CECT 4494, CECT 4495	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i>	CECT 4123, CECT 4127 y CECT 4128 ^T	-	2	2	1
	CECT 4125	-	2	2	ND ^a
	CECT4124 y B74	2	6	3	1
	B69	1	1	1	1
<i>B. weihenstephanensis</i>	CECT 5894 ^T	-	2	2	1
<i>B. pseudomycooides</i>	CECT 7065 ^T	-	2	1	ND

⁽¹⁾Combinación de cebadores: F (PCER-F); R1 (PCER-R1); R2 (PCER-R2); R3 (PCER-R3).

^aND, no determinado.

Tabla 8- Caracterización genotípica de las cepas utilizadas en el estudio (perfiles RAPDs y genes de virulencia) y resultados de la amplificación por PCR con los cebadores diseñados.

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Genes de virulencia ⁽²⁾										Perfil ⁽³⁾			Especificidad ⁽⁴⁾		
			hbl	nhe	ces	cytK	pc-plc	pc-plc/sph	clo	entFM	R1	R2	R3					
a) Cepas de referencia "grupo <i>B. cereus</i> " <i>Bacillus cereus</i>	CECT 131	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 148 ^T	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 193	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 495	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 496	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4014	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	CECT 4094	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4387	III	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4989	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 5144	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 5148	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 5314	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 40	IV	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 197 ^T	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 996	III	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CECT 4454	V	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4494	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4495	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4496	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4497	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 7034	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4123	I	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4124	I	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4125	I	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4126	I	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 8.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Genes de virulencia ⁽²⁾										Perfil ⁽³⁾	Especificidad ⁽⁴⁾		
			hbl	nhe	ces	cyiK	pc-plc	pc-plc/sph	clo	entFM	R1	R2		R3		
Bacillus weihenstephanensi	CECT 4127	I	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	CECT 4128 ^T	I	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 5894 ^T	I	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	CECT 7065 ^T	I	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	ND	+
b) Cepas ambientales "grupo B. cereus"⁽¹⁾																
B. cereus/B.thuringiensis	INRA P21S	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	INRA TZ415	III	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	INRA P2101	III	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B40	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B41	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	ND	+
	B42	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	ND	+
	B43	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
	B45	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
	B46	VI	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
	B47	III	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	ND	+
	B48	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
	B49	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
	B50	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
	B54	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
	B55	III	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
B60	VI	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B62	III	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B63	V	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B64	VI	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B65	IV	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B67	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B68	IV	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B70	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	
B73	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	

Tabla 8.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Genes de virulencia ⁽²⁾										Perfil ⁽³⁾	Especificidad ⁽⁴⁾		
			hbl	nhe	ces	cyfK	pc-plc	pc-plc/sph	clo	entFM	R1	R2		R3		
<i>B. mycoides</i> /B.w./B.pm.	B77	III	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B44	II	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B66	II	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B69	I	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+
	B72	II	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B74	II	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+
c) Otras especies del "género <i>Bacillus</i> "																
<i>Bacillus circulans</i>	CECT 10 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND	-	-
	INRA P1198		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus firmus</i>	CECT 14 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus lentus</i>	CECT 18 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	CECT20 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	INRA B2186		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	CECT 4313 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	INRA Z1186		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	CECT 29 ^T		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	ND	-	-
	INRA Z2166		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	B51		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	B52		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	B53		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	CECT 33 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 39 ^T		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	ND	-	-
	INRA K21101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
d) Especies de otros géneros																
<i>Escherichia coli</i>	CECT 515 ^{nr}		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4031 ^T		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CECT 915 ^T		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 86 ^T		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-

Tabla 8.- (Continuación).

^T, cepa tipo. CECT, Colección Española de Cultivos Tipo. INRA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Francia.

⁽¹⁾GT, genotipado, identificación derivada del genotipado con ISR y RAPDs (Ocio *et al.*, 2002 y Martínez-Blanch *et al.*, 2003): grupo I y II) *B. mycooides*/*B. pseudomycooides*/*B. weihenstephanensis*, grupo III y IV) *B. cereus* y grupo V y IV) *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* .

⁽²⁾Amplificación correspondiente a los cebadores (pb): *hbl* (HD2 F/HA4 R, 1091); *nhe* (NA2 F/NB1 R, 766); *ces* (CesF1/CesR2, 1271); *cytK* (CK F2/CK R5, 421); *pc-plc* (Pf/Pr, 411); *pc-plc* y *sph* (Pf/Cr, 1461); *clo*, (BC-1/BC-2, 185) y *entFM* (EntA/EntB, 1269).

⁽³⁾Perfil toxigénico según agrupamiento UPGMA (Figura 4) resultado de las diferentes combinaciones de la presencia de los diferentes factores de virulencia ensayados.

⁽⁴⁾Especificidad de los cebadores ensayados por PCR convencional: R1) PCER-F y PCER-R1, R2) PCER-F y PCER-R2 y R3) PCER-F y PCER-R3.

^aAmplificación inespecífica de un fragmento de 900 pb.

4.- PCR cuantitativa a Tiempo Real

4.1.- Puesta a punto de la Q-PCR: Sistema SYBR Green

Con el fin de optimizar la reacción de Q-PCR se compararon los valores de C_T obtenidos con las diferentes concentraciones de cebadores ensayadas para 1 ng de DNA molde por reacción (Figura 7), y se comprobó la ausencia de formación de dímeros de cebadores y de amplificaciones inespecíficas mediante el análisis de la curva de disociación. La concentración de 300 nM para cada cebador correspondía al valor de C_T más bajo, por lo que fue seleccionada.

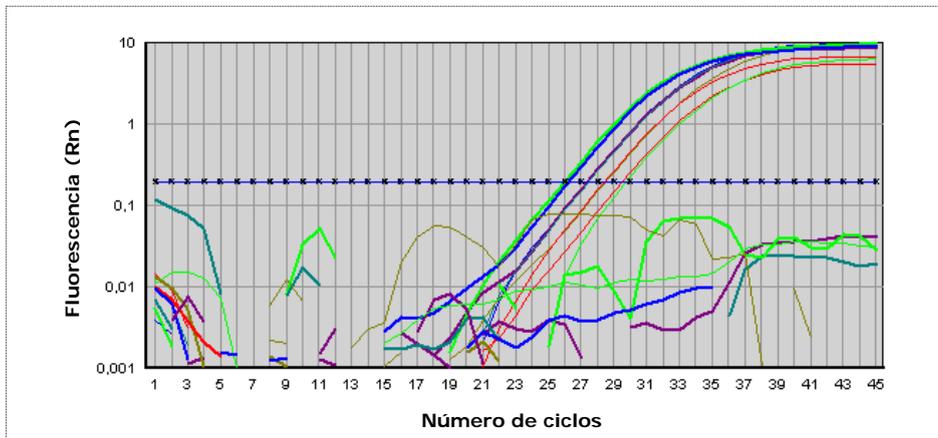


Figura. 7.- Curvas de amplificación obtenidas mediante SYBR Green Q-PCR, utilizando 1 ng de DNA molde, correspondientes a las distintas concentraciones de cebadores ensayadas. De izquierda a derecha, PCER-F/PCER-R3 (C_T correspondiente): 300 nM (26,1); 50 nM/300 nM (27,3); 300 nM/50 nM (28,4) y 50 nM (29,6).

Los ensayos de especificidad se realizaron mediante Q-PCR utilizando como molde 10 ng de DNA y 300 nM de los cebadores PCER-F/PCER-R3. De las 59 cepas del “grupo *B. cereus*” ensaya-

das, el 93 % presentaron valores de C_T de 19.5 ± 1.5 , lo que confirma la validez de los cebadores para la detección de cepas de *B. cereus*. Las cepas de referencia *B. mycooides* CECT 4124, CECT 4125 y CECT 7065^T, y la cepa B74 mostraron valores de C_T fuera del intervalo establecido (30,6, 23,5, 30,0 y 29,6, respectivamente). El análisis de sus secuencias mostró diferencias en la diana de los cebadores, lo que explica los valores más altos de C_T debido a la menor eficacia en la hibridación. Las cepas de otras especies, así como los controles negativos sin DNA molde, presentaron valores de $C_T \geq 40$, por lo que se estableció este C_T como resultado negativo para la presencia de *B. cereus*. Los resultados del análisis de la curva de disociación de los productos de PCR presentaron valores de T_m entre 77,7 °C y 79,2 °C (Figura 8), lo que confirma la amplificación del fragmento esperado, pero indica ligeras variaciones en la secuencia del amplificado entre cepas. Estos resultados ponen de manifiesto que existe una elevada diversidad en la secuencia del gen *pc-plc*.

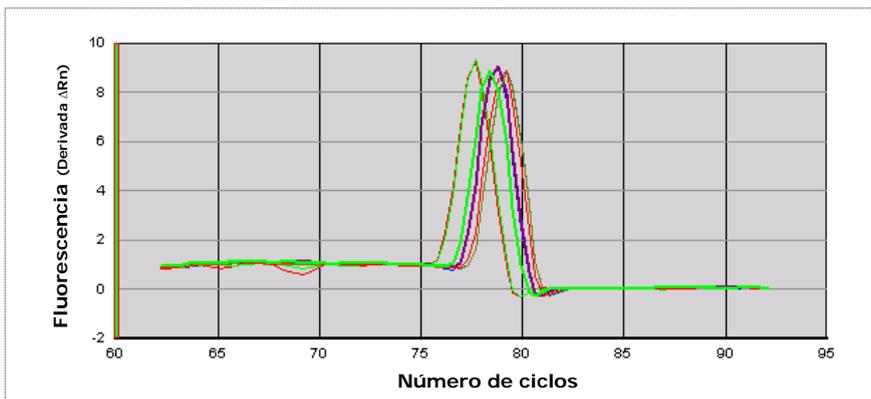


Figura 8.- Análisis de las curvas de disociación (representación gráfica de la derivada de la ΔR_n frente a la temperatura en °C) de los amplificados obtenidos para las cepas de *B. cereus* (T_m): CECT 148^T (78,8 °C), CECT 131 (78,6 °C), CECT 495 (77,7 °C), CECT 4014 (79,2 °C) y CECT 5148 (78,4 °C), que muestra el rango de T_m de las especies del “grupo *B. cereus*”.

4.2.- Puesta a punto de la Q-PCR: Sistema TaqMan

Se ensayaron diferentes concentraciones de la sonda TaqMan BCER-MGB (50,100, 200 y 300 nM) en presencia de 300 nM de los cebadores PCER-F y PCER-R3, concentración óptima en modo SYBR Green, y 1 ng de DNA molde por reacción. El C_T más bajo con una menor concentración de sonda, correspondió a 200 nM, por lo que fue seleccionada como concentración óptima.

A continuación se realizaron los ensayos de especificidad utilizando dichas concentraciones de sonda y cebadores, y 10 ng de DNA molde. El 85 % de las cepas del “grupo *B. cereus*” ensayadas, presentaron un valor de C_T de $21,9 \pm 2$. En el caso de las cepas de referencia *B. mycoides* CECT 4124, CECT 4125 y *B. pseudomycoides* CECT 7065^T y la cepa B74, los valores de C_T fueron de 30,7, 36,9, 28,6 y 30,6, respectivamente, algo mayores que la media como ya se observó en el ensayo con SYBR Green, probablemente debido a diferencias en la secuencia de los cebadores. Sin embargo, no se obtuvo señal de fluorescencia en las cepas de referencia *B. thuringiensis* CECT 4494, CECT 4495 y CECT 7034 y los aislados ambientales B63 y B73 (8 %). En las cepas *B. thuringiensis* CECT 4494 y CECT 4495 se secuenció el amplificado de 1461 pb delimitado por los cebadores Pf/Cr (Tabla 2), que contiene las dianas de los cebadores y la sonda de Q-PCR, y se observó la existencia de, al menos, dos desapareamientos en la secuencia diana de la sonda, lo que explica este resultado. Las cepas de otras especies del género y de otros géneros presentaron valores de $C_T \geq 40,0$ al igual que los controles negativos sin DNA molde, estableciéndose este C_T como resultado negativo para la presencia de miembros del “grupo *B. cereus*”.

4.3.-Recta patrón de cuantificación: SYBR Green y TaqMan

Los resultados de las rectas patrón de cuantificación obtenidas realizadas a partir de DNA purificado, se muestran en la Tabla 9, donde se recoge la media de los valores de C_T para 7 unidades logarítmicas analizadas, cubriendo un rango entre $1,8 \times 10^6$ y 2 equivalentes genómicos por reacción. Las rectas patrón de células se muestran en la Tabla 10, y corresponden a 6 unidades logarítmicas en el caso del sistema SYBR Green para el rango entre $4,4 \times 10^5$ y 5 células por reacción, y de 7 unidades logarítmicas en el sistema TaqMan entre $3,9 \times 10^6$ y 4 células por reacción. Los resultados de cada sistema de Q-PCR de forma independiente, SYBR Green y TaqMan, corresponden a un total de nueve reacciones analizadas en tres ensayos independientes (tres replicados por reacción).

La concentración de DNA o de células se calculó por espectrofluorometría o recuento en placa, respectivamente. Dado que se realizan diluciones decimales seriadas para conseguir los distintos niveles de genomas/células y que se analiza una alícuota de cada una de ellas, se calcularon los niveles de confianza al 95 % mediante Simulación Montecarlo (10^6 repeticiones).

En la Figura 9 se muestran las rectas patrón de cuantificación obtenidas mediante la representación de la media de los valores de C_T , frente a la cantidad de equivalentes genómicos o células utilizadas en cada reacción de Q-PCR para los sistemas SYBR Green y TaqMan.

Tabla 9.- Valores de C_T obtenidos para la construcción de las rectas patrón de cuantificación a partir de diluciones de DNA, utilizando los sistemas SYBR Green y TaqMan.

Equivalentes genómicos ^a	Intervalo de confianza al 95 % ^b		Sistema SYBR Green		Sistema TaqMan	
	inferior	Superior	Ratio ^c	$C_T \pm DE^d$	Ratio	$C_T \pm DE$
$1,8 \times 10^6$	-	-	9/9	$16,82 \pm 0,26$	9/9	$17,97 \pm 0,13$
$1,8 \times 10^5$	184344	186026	9/9	$20,27 \pm 0,27$	9/9	$21,99 \pm 0,22$
$1,8 \times 10^4$	18253	18786	9/9	$23,95 \pm 0,38$	9/9	$25,35 \pm 0,15$
$1,8 \times 10^3$	1768	1937	9/9	$27,51 \pm 0,36$	9/9	$29,25 \pm 0,36$
$1,8 \times 10^2$	159	212	9/9	$30,74 \pm 1,00$	9/9	$32,12 \pm 0,29$
18	11	27	9/9	$34,59 \pm 1,00$	9/9	$35,75 \pm 0,84$
2	0	5	4/9	$36,77 \pm 0,47$	6/9	$38,79 \pm 0,58$

^aCalculados asumiendo que 10 ng de DNA equivalen a $1,8 \times 10^6$ veces el genoma de *B. cereus* y que el gen *pc-plc* es de copia única.

^bIntervalos de confianza al 95 % obtenidos por Simulación Montecarlo.

^cReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^dDesviación estándar.

Tabla 10.- Valores de C_T obtenidos para la construcción de las rectas patrón de cuantificación a partir de suspensiones calibradas de células, utilizando los sistemas SYBR Green y TaqMan.

N° aprox. de células ^a	Intervalo de confianza al 95 % ^b		Sistema SYBR Green		N° aprox. de células	Intervalo de confianza al 95 %		Sistema TaqMan	
	Inferior	superior	Ratio ^c	$C_T \pm DE^d$		Inferior	superior	Ratio	$C_T \pm DE$
$4,4 \times 10^5$	443135	445750	9/9	$18,23 \pm 0,33$	$3,9 \times 10^6$	-	-	9/9	$17,33 \pm 0,16$
$4,4 \times 10^4$	44032	44858	9/9	$22,32 \pm 0,53$	$3,9 \times 10^5$	396266	398733	9/9	$20,44 \pm 0,08$
$4,4 \times 10^3$	4314	4575	9/9	$27,55 \pm 0,50$	$3,9 \times 10^4$	39361	40141	9/9	$24,49 \pm 0,18$
$4,4 \times 10^2$	404	486	9/9	$29,77 \pm 0,41$	$3,9 \times 10^3$	3852	4099	9/9	$28,34 \pm 0,23$
44	32	58	9/9	$32,74 \pm 0,71$	$3,9 \times 10^2$	359	437	9/9	$31,71 \pm 0,32$
5	1	9	9/9	$35,49 \pm 0,88$	39	28	53	9/9	$33,96 \pm 0,33$
					4	1	8	9/9	$35,30 \pm 0,46$

^aNúmero de células cula por recuento en placa.

^bIntervalos de confianza al 95 % obtenidos por Simulación Montecarlo.

^cReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^dDesviación estándar.

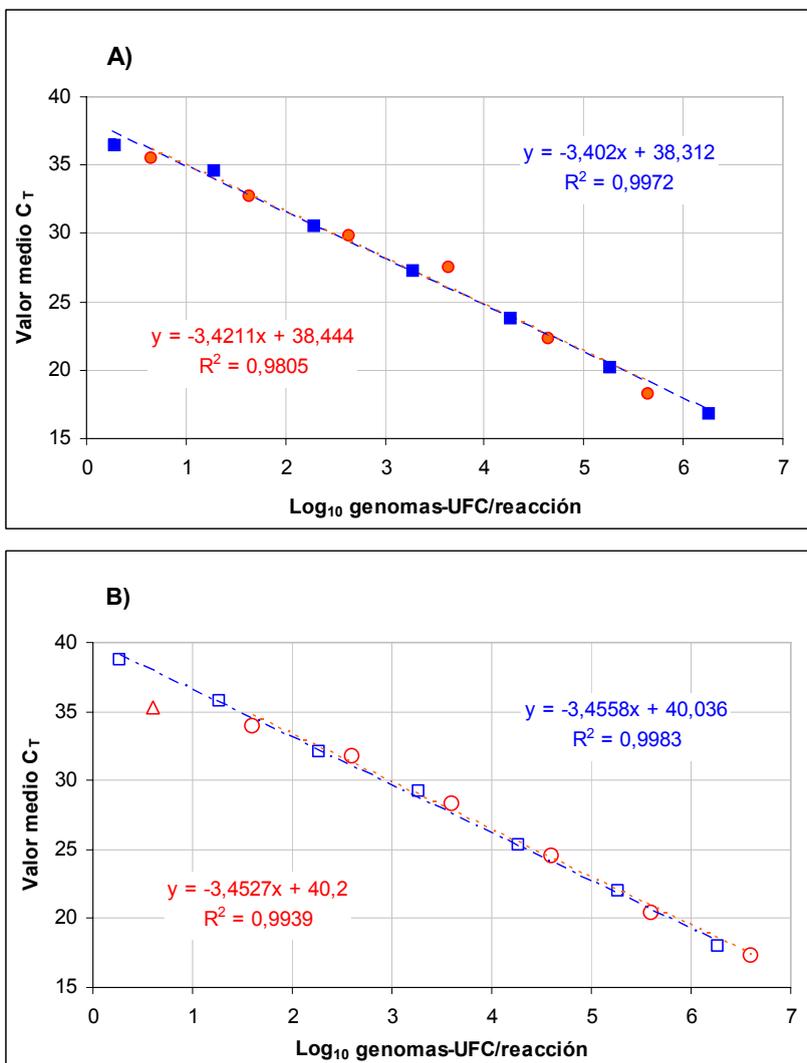


Figura. 9.- Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón, a partir de DNA (■, □) y de células (●, ○) mediante el sistema SYBR Green (A) y TaqMan (B). Δ Valor de C_T no utilizado en el análisis.

El análisis de regresión lineal de los datos obtenidos para las rectas patrón de DNA y células, muestra valores de R^2 cercanos a 1 (0,997 y 0,981 en los ensayos de SYBR Green Q-PCR, y 0,998 y 0,994 en los ensayos TaqMan Q-PCR, respectivamente). Estos resultados indican que las reacciones de amplificación ofrecen una buena linealidad en el intervalo de 10^6 a 1 genomas/células por reacción. Sólo en el ensayo TaqMan con células, el intervalo analizado fue entre 10^6 a 10^1 células por reacción, pues como se observa en la Tabla 10 y en la Figura 9B, el valor medio de C_T obtenido para el nivel de 4 células (35,3) no mantiene la relación lineal respecto del anterior (34,0), por lo que no se tuvo en cuenta para el análisis.

Los valores de las pendientes (s) para las rectas de DNA y células fueron de -3,40 y -3,42 en los ensayos con SYBR Green, y de -3,46 y -3,45 en los ensayos con la sonda TaqMan, valores muy próximos al óptimo teórico de -3,32 (Higuchi *et al.* 1993). La eficiencia de la reacción de PCR (E) fue calculada según describen Knutsson *et al.* (2002) aplicando la fórmula, $E = 10^{-1/s} - 1$. Para las rectas de DNA y células por SYBR Green se obtuvieron eficiencias de 0,97 y 0,96, y en TaqMan Q-PCR de 0,94 y 0,95, respectivamente, valores que demuestran una elevada eficiencia de amplificación y una buena optimización de las condiciones de PCR.

El límite de cuantificación se estableció considerando: i) las concentraciones en las que se mantiene la linealidad de la recta patrón, ii) que el total de replicados analizados fueran positivos y iii) que la desviación estándar fuera inferior a 1. En el caso de DNA correspondió a 18 equivalentes genómicos por reacción tanto para SYBR Green como TaqMan, y en el caso de células a 44 y 39 ufc por reacción, respectivamente. Además, se comprobó que no existía solapamiento entre los intervalos de confianza al 95 % para los valores establecidos como límite de cuantificación, como se observa

en la Tabla 11. Por ejemplo, en el caso del DNA, al valor de detección de 18 genomas /reacción, se asocia el intervalo entre 11 y 27, que se solapa con el intervalo de 4-16 del valor justo inferior de la recta patrón (9), pero no con el intervalo del valor superior (90), el cual comprende entre 74 y 112.

Tabla 11.- Valores obtenidos para establecer el límite de cuantificación utilizando los intervalos al 95 % obtenidos por Simulación Montecarlo.

Recta Patrón DNA		SYBR Green Recta Patrón Células		TaqMan Recta Patrón Células	
Genomas/reacción	Intervalo 95 %	Células/reacción	Intervalo 95 %	Células/reacción	Intervalo 95 %
90	74-112	220	194-252	195	171-226
18 ^a	11-27	44 ^a	32-58	39 ^a	28-53
9	4-16	22	14-32	20	12-29
2	0-5	5	1-9	4	1-8

^aValor establecido como límite de cuantificación.

En cuanto a los niveles de sensibilidad, en los ensayos con SYBR Green y TaqMan fueron de 5 y 4 células en el 100 % de los replicados, y 2 equivalentes genómicos en el 45 % y en el 67 % de los replicados, respectivamente. En base a estos resultados, la detección por Q-PCR es diez veces más sensible que por PCR convencional.

Los resultados de ambos sistemas SYBR Green y TaqMan, muestran una buena correlación entre las cantidades de DNA molde o células y los valores de C_T obtenidos después de la amplificación. El sistema TaqMan Q-PCR presentó valores más bajos de desviación estándar (DE), lo que indica una mayor precisión en la cuantificación. Así mismo, ambos sistemas han mostrado resultados similares en cuanto a sensibilidad y cuantificación. Sin embargo,

debido a la alta diversidad encontrada en la secuencia del gen *pc-p/c*, y con el fin de que el sistema de Q-PCR permita la detección del mayor número posible de especies del “grupo *B. cereus*”, seleccionamos el sistema SYBR Green para los ensayos en alimentos inoculados artificialmente.

4.4.- Aplicación en alimentos

4.4.1.- Ensayos en alimentos contaminados artificialmente: huevo líquido y leche en polvo infantil.

Huevo líquido

En la Tabla 12 quedan recogidos los resultados de cuantificación obtenidos respecto a la recta patrón de DNA y a la recta de células para las muestras de huevo líquido analizadas. Los valores obtenidos a partir de ambas rectas fueron muy similares a los obtenidos en el recuento en placa. Para analizar el grado de coincidencia entre la cuantificación por Q-PCR frente al método de recuento en placa se calculó la exactitud relativa ($ER (\%) = (\text{valor del recuento}/\text{valor Q-PCR}) \times 100$), expresada en porcentaje (ISO 14160:2003). Una ER del 100 % entre los valores del método alternativo (Q-PCR) frente al método de referencia (recuento en placa) indica una total coincidencia. Los valores de exactitud relativa obtenidos para la recta de cuantificación de DNA mostraban valores entre 86 % y 113 %, y en el caso de la recta de células entre 90 % y 116 %, en ambos casos para un intervalo entre 10^1 a 10^5 células o genomas por reacción. Estos valores se consideran aceptables para cuantificación por Q-PCR, y por tanto ambas aproximaciones son adecuadas para estimar la cantidad de *B. cereus* presente en huevo líquido.

El análisis de regresión de los valores de C_T frente al logaritmo decimal de la concentración de células reveló un valor de pendiente de -3,40, correspondiendo a una eficiencia de la reacción de PCR de 0,96 y una R^2 de 0,999. Estos valores muestran una eficiencia igual a la obtenida en ausencia de la matriz alimentaria, llegándose a detectar 4 células en el 89 % de los replicados (8 de 9 reacciones, Tabla 12). No obstante, la desviación estándar de los valores de C_T correspondientes a este nivel de células era superior a 1 (Tabla 12). Este resultado confirma que el límite de cuantificación de la reacción de Q-PCR en el alimento también es de un orden logarítmico (40 células en este caso, 50 células en el ensayo sin matriz alimentaria).

Tabla 12.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR en huevo líquido contaminado artificialmente.

Nº aprox. de células	Ratio ^a	Valores C_T	Recta de DNA		Recta de células	
		Media \pm DE ^b	cuantificación	ER ^c (%)	cuantificación	ER (%)
4×10^5	9/9	19,34 \pm 0,48	$3,9 \times 10^5$	96,92	$3,8 \times 10^5$	95,96
4×10^4	9/9	22,70 \pm 0,26	$4,0 \times 10^4$	99,72	$4,0 \times 10^4$	99,99
4×10^3	9/9	26,13 \pm 0,23	$3,9 \times 10^3$	97,84	$4,0 \times 10^3$	99,40
4×10^2	9/9	29,32 \pm 0,28	$4,5 \times 10^2$	112,94	$4,6 \times 10^2$	116,12
40	9/9	33,12 \pm 0,52	36	86,27	36	89,98
4	8/9	36,26 \pm 1,45	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bDesviación estándar.

^cExactitud relativa, ER (%) = (valor del recuento/valor Q-PCR) x 100.

^dValores por debajo del límite de cuantificación establecido para la reacción.

Leche en polvo infantil

Los resultados de Q-PCR obtenidos a partir de las muestras de leche en polvo infantil inoculadas con diferentes concentraciones de células se presentan en la Tabla 13. Los niveles de células obtenidos a partir de ambas rectas fueron muy similares entre ellos y, aunque

se aproximaban a los del recuento en placa, los valores de exactitud relativa diferían entre un 59 % y un 12 % del valor óptimo teórico del 100 %. Estos resultados indican que en la leche en polvo infantil existe interferencia en la cuantificación debida a la matriz, a diferencia del ensayo en huevo líquido.

En el análisis de regresión se obtuvo un valor de pendiente de -3,61 correspondiente a una eficiencia de la reacción de PCR (E) de 0,89 y una R^2 de 0,989. En este caso se llegaron a detectar 2 células en el 100 % de los replicados, aunque se observó una elevada desviación estándar entre los valores de C_T correspondientes a esta concentración. Al igual que en el ensayo en huevo líquido no se consideró para cuantificación y, de nuevo, confirma el límite de cuantificación establecido, siendo en este caso 16 células (Tabla 13). No obstante, el valor de la pendiente ligeramente inferior indica la interferencia de la matriz en la cuantificación.

Tabla 13.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR en leche en polvo infantil contaminada artificialmente.

Nº aprox. de células	Ratio ^a	Valores C_T	Recta de DNA		Recta de células	
		Media \pm DE ^b	cuantificación	ER ^c (%)	cuantificación	ER (%)
$1,5 \times 10^6$	4/4	$16,62 \pm 0,36$	$2,4 \times 10^6$	153,95	$2,4 \times 10^6$	155,01
$1,5 \times 10^5$	4/4	$20,00 \pm 0,68$	$2,4 \times 10^5$	155,73	$2,5 \times 10^5$	158,82
$1,5 \times 10^4$	4/4	$23,89 \pm 0,80$	$1,7 \times 10^4$	111,74	$1,8 \times 10^4$	115,64
$1,5 \times 10^3$	4/4	$28,65 \pm 0,75$	$6,9 \times 10^2$	44,64	$7,3 \times 10^2$	47,04
155	4/4	$31,77 \pm 0,63$	84	54,03	90	57,61
16	4/4	$33,80 \pm 0,97$	23	137,22	23	147,43
2	4/4	$34,56 \pm 1,53$	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bDesviación estándar.

^cExactitud relativa, ER (%) = (valor del recuento/valor Q-PCR) x100.

^dValores por debajo del límite de cuantificación establecido para la reacción.

4.4.2.-Análisis de alimentos con contaminación natural

El sistema de PCR desarrollado se aplicó en alimentos con contaminación natural que se analizaron, bien directamente o tras un enriquecimiento, por PCR convencional y Q-PCR. En la Tabla 14 se muestran los resultados de la detección por PCR convencional, Q-PCR SYBR Green, recuento en placa y/o aislamiento e identificación.

Tabla 14.- Detección de *B. cereus* en alimentos con contaminación natural, directamente o con enriquecimiento, por PCR convencional, Q-PCR y métodos tradicionales.

Alimento	PCR convencional ^a	SYBR Green Q-PCR (genomas/g) ^b	Métodos tradicionales	Identificación API
I.- Sin enriquecimiento				
Papilla 8 cereales	++	209	30 ufc/g	<i>B. cereus</i> 1
Crema de Arroz	+++	3,5 x 10 ³	210 ufc/g	<i>B. cereus</i> 1
Harina de trigo	+	+ ^c	< 10 ufc/g	-
II.- Con enriquecimiento				
Arroz con leche	++++	ND ^d	Presencia	<i>B. cereus</i> 2
Arroz con leche	++++	ND	Presencia	"grupo <i>B. cereus</i> "
Arroz con leche	++++	Aprox. 10 ⁷	Presencia	"grupo <i>B. cereus</i> "
Canela en polvo	+++	Aprox. 10 ⁴	Presencia	<i>B. cereus</i> 2

^aIntensidad del producto de amplificación detectado por electroforesis en gel de agarosa.

^bCuantificación a partir de la recta patrón de DNA.

^cFuera del rango de cuantificación.

^dNo determinado.

Todas las muestras analizadas fueron positivas por PCR convencional y en todos los casos se confirmó la presencia de *B. cereus* mediante aislamiento e identificación de colonia, excepto en la harina de trigo. Cabe destacar que, en este caso, por PCR convencional se obtuvo una banda de amplificación muy débil, y por Q-PCR un C_T fuera del rango de cuantificación, lo que explicaría su

presencia en un nivel por debajo del límite de detección por recuento en placa.

En la muestra “Papilla de 8 cereales” y “Crema de arroz” los valores de cuantificación de SYBR Green fueron un orden logarítmico superior que los obtenidos por recuento en placa. Cabe señalar que son alimentos con espesantes y compuestos bacteriostáticos que reducen la a_w del medio y pueden incluso impedir el crecimiento bacteriano o la germinación de esporas, lo que explicaría esta diferencia.

5.- Ensayos con suspensiones de esporas de *B. cereus*

5.1.- Tratamientos con diferentes germinantes

El estudio del proceso de germinación en las especies del “grupo *B. cereus*” se abordó a partir del protocolo descrito en la bibliografía para cepas de *B. cereus* por Clements y Moir (1998), que consistía en una activación térmica (70 °C, 30 min) seguida de una incubación a 37 °C durante 30 min con soluciones de germinación de diferente concentración de L-alanina. En la Figura 10 se muestra el comportamiento de las seis especies estudiadas monitorizado por la disminución de la refringencia de las esporas como indicador del inicio del proceso de germinación, frente a las diferentes soluciones de germinadores seleccionadas y descritas por otros autores: a) 100 mM de L-alanina (Collado *et al.*, 2006), b) 25 mM L-alanina y 1 mM inosina (De Vries *et al.*, 2004) y c) 0,5 mM de L-alanina y 0,5 mM de inosina (De Vries *et al.*, 2005). Se puede observar que las diferentes cepas han mostrado comportamientos particulares de germinación.

La cepa *B. cereus* CECT 148^T se caracterizó por una germinación rápida alcanzando una reducción de absorbancia hasta un valor del 45 % en los primeros 10 min con cualquiera de las soluciones de germinadores empleadas. Sin embargo, la cepa *B. cereus* CECT 131 mostró una germinación más lenta y diferentes respuestas a los tratamientos empleados, resultando la combinación “c” la más eficaz. La solución de germinación “a” no tuvo efecto en la cepa *B. thuringiensis* CECT 197^T, ni en *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T. En esta última especie, las combinaciones “b” y “c” mostraron ser las más eficaces. En *B. thuringiensis* CECT 197^T, la combinación “c” mostró la mayor eficacia. *B. mycoides* CECT 4128^T únicamente presentó germinación con la combinación “c”. En *B. pseudomycoides* CECT 7065^T, la influencia de las 3 soluciones en la germinación fue diferente, produciéndose un mayor efecto con la solución “c”.

La mejor combinación para el conjunto de cepas ensayadas resultó ser la solución “c” que produjo la mayor reducción de absorbancia en un tiempo menor.

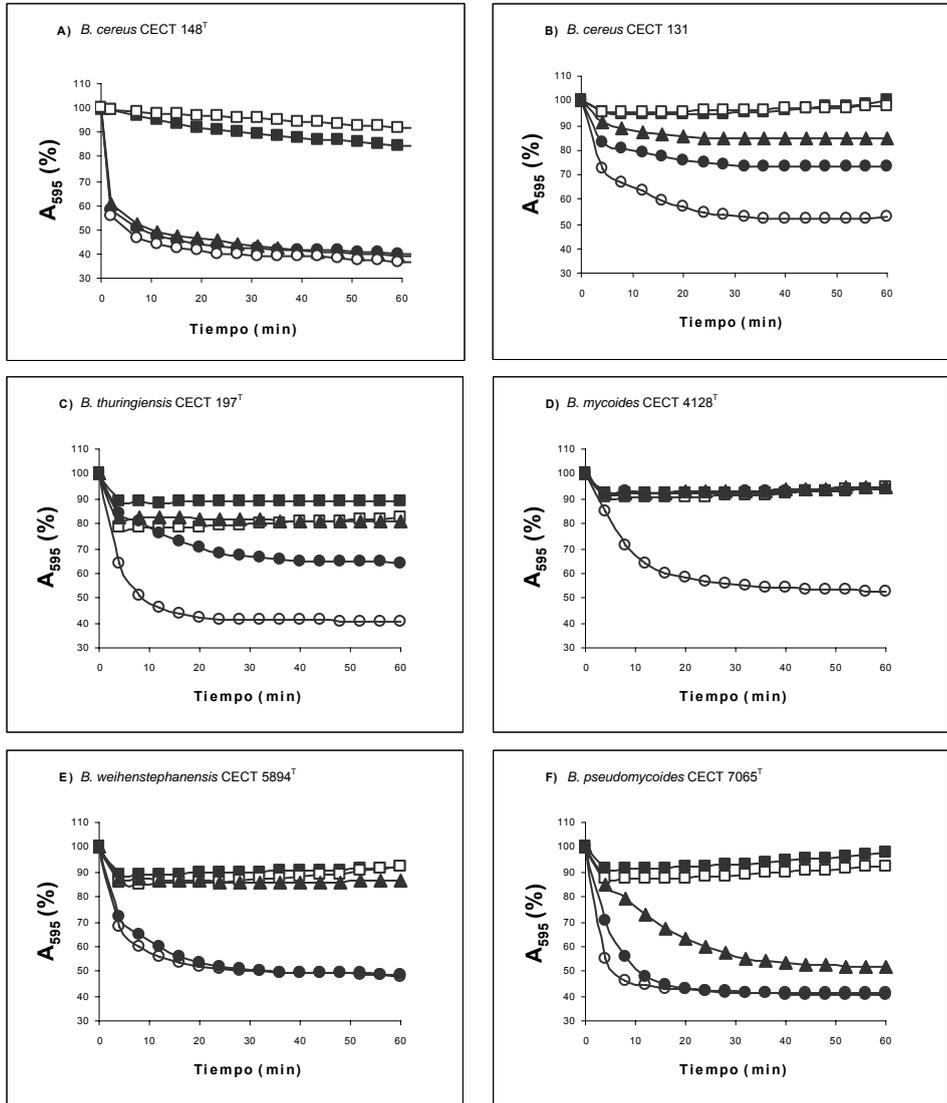


Figura 10.- Cinética de germinación en las cepas *B. cereus* CECT 148^T (A), *B. cereus* CECT 131 (B), *B. thuringiensis* CECT 197^T(C), *B. mycoides* CECT 4128^T (D), *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T (E) y *B. pseudomycooides* CECT 7065^T (F), para las condiciones ensayadas: ■) control (sin ningún tratamiento), □) activación térmica (30 min a 70 °C), ▲) act. térmica y germinación con 100 mM de L-alanina, ●) act. térmica y 25 mM L-alanina y 1 mM inosina, y ○) act. térmica y 0,5 mM L-alanina y 0,5 mM inosina.

5.2.- Aislamiento de DNA genómico

Con el fin de optimizar el aislamiento de DNA a partir de esporas, se empleó la cepa *B. cereus* CECT 148^T, de la que se prepararon suspensiones calibradas de esporas que se sometieron a diferentes combinaciones de tratamientos térmicos y de germinación previos al procedimiento de extracción por Qiagen. En cuanto a la germinación se ensayó la solución “c” seleccionada según los resultados del apartado anterior, y se combinó con 2 tratamientos térmicos: G-1) 70 °C durante 30 min, utilizado en el apartado de germinación, y G-2) 80 °C durante 10 min, tratamiento utilizado en métodos tradicionales para el recuento de esporulados. Como tratamientos térmicos se ensayaron los utilizados en la activación térmica de las esporas, 70 °C durante 30 min, (T-1) y 80 °C durante 10 min, (T-2) y tratamientos térmicos drásticos para la ruptura de cubiertas de las esporas, 100 °C durante 10 min (T-3) y 121 °C (1 atm.), 20 min (T-4). En paralelo se analizó una muestra control, sin ningún tipo de tratamiento previo al aislamiento del DNA, siguiendo el protocolo de Qiagen.

Para estimar con mayor precisión la cantidad de DNA obtenido a partir de las suspensiones de esporas se empleó el método espectrofluorimétrico comercial “Quant-iT PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit” (Molecular Probes), y Q-PCR con SYBR Green I, utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3.

En la Figura 11 se muestra el resultado del ensayo de amplificación por PCR convencional a partir del DNA obtenido con diferentes tratamientos térmicos. Como se observa, el producto de amplificación de 144 pb aparecía en todos los casos, aunque se aprecia una menor amplificación en el T-4, indicando probablemente daño físico por rotura del DNA como consecuencia del drástico tratamiento térmico.

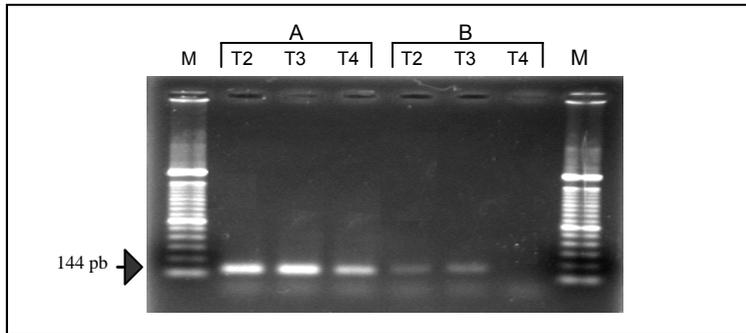


Figura 11.- Productos de la amplificación por PCR convencional, utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3, y como molde el DNA obtenido mediante extracción con Qiagen (A), y una dilución 10^{-3} del mismo (B), para los tratamientos ensayados: **T-2)** 80 °C, 10 min; **T-3)** 100 °C, 10 min y **T-4)** 121 °C (1 atm.), 20 min. M, marcador de pesos moleculares (escala de 100 pb).

En la Figura 12 se muestran los resultados de cuantificación obtenidos con los 2 métodos ensayados. Sorprendentemente, observamos un buen nivel de recuperación de DNA en la muestra control, es decir, a partir de suspensiones de esporas siguiendo el protocolo de extracción de Qiagen. Cabe destacar que este procedimiento incluye una incubación de 30 min a 37 °C con lisozima (descrita en la bibliografía como posible germinante) y 30 min a 70 °C con proteinasa K, combinando un tratamiento térmico con una lisis proteica. Ambos pasos favorecen, como se observa en la muestra control, la recuperación de DNA de esporas.

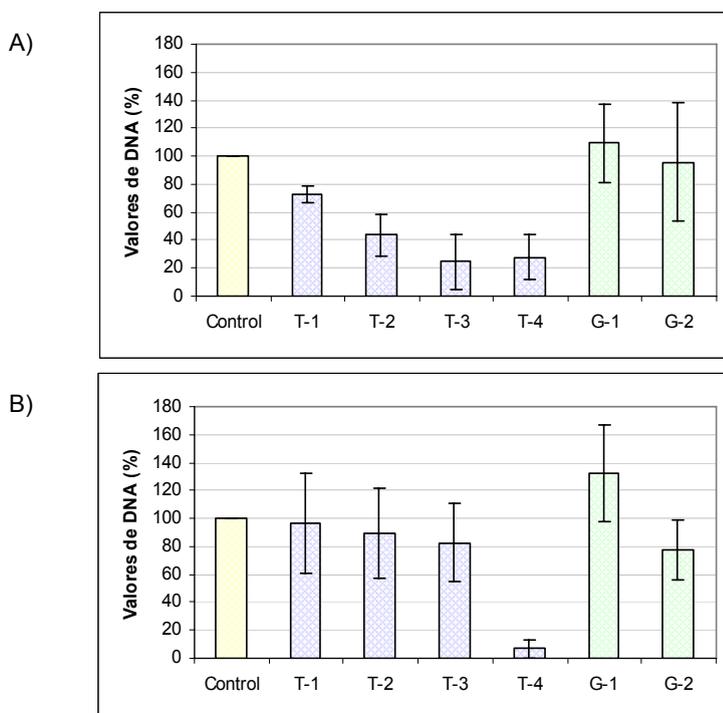


Figura 12.- Rendimiento de la extracción de DNA (%) respecto a la muestra control, estimado mediante “PicoGreen” (A) y SYBR Green Q-PCR utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3 (B) para los tratamientos ensayados: **Control**, sin tratamiento; **T-1)** tratamiento térmico, 70 °C, 30 min; **T-2)** 80 °C, 10 min; **T-3)** 100 °C, 10 min; **T-4)** 121 °C (1 atm.), 20 min, **G-1)** activación 70 °C, 30 min previo a la germinación y **G-2)** activación 80 °C, 10 min y germinación. Los resultados corresponden a los valores medios de tres ensayos independientes.

No obstante, al comparar los resultados obtenidos con los dos métodos de cuantificación del DNA, se observa que ambos coinciden en que de los tratamientos ensayados el de mayor rendimiento fue el G-1. El resto de tratamientos mostraron un rendimiento relativo similar, excepto en el caso de los T-3 y T-4, en que la diferencia entre ellos fue inferior al 5 % por “Picogreen” y fue de un 70 % por Q-PCR. Los resultados de la PCR convencional y Q-PCR para estos

tratamientos son coincidentes, y sugieren que la calidad del DNA para PCR en la muestras del tratamiento T-4 es peor que en el resto de muestras analizadas.

Los resultados de la cuantificación por Q-PCR se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA), para la comparación de medias entre los tratamientos. Para un nivel de confianza del 95 % se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos T-4, que resultó el menos eficiente, y G-1 que presentó mayor rendimiento en la recuperación de DNA (Figura 13). Aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de activación térmica T-1, T-2 y T-3, el T-1 presentó valores más elevados, con ambos métodos de cuantificación.

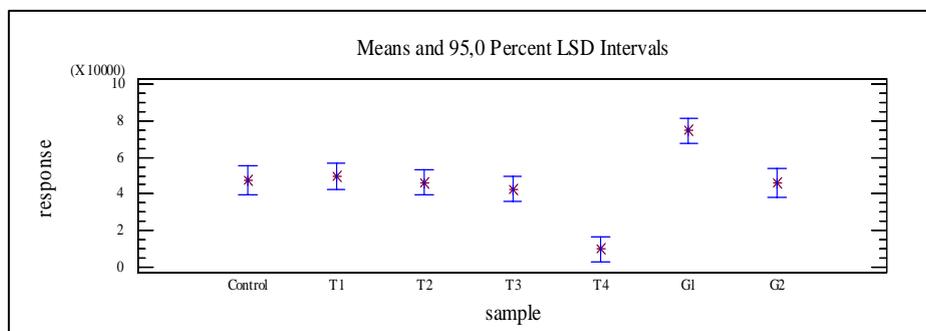
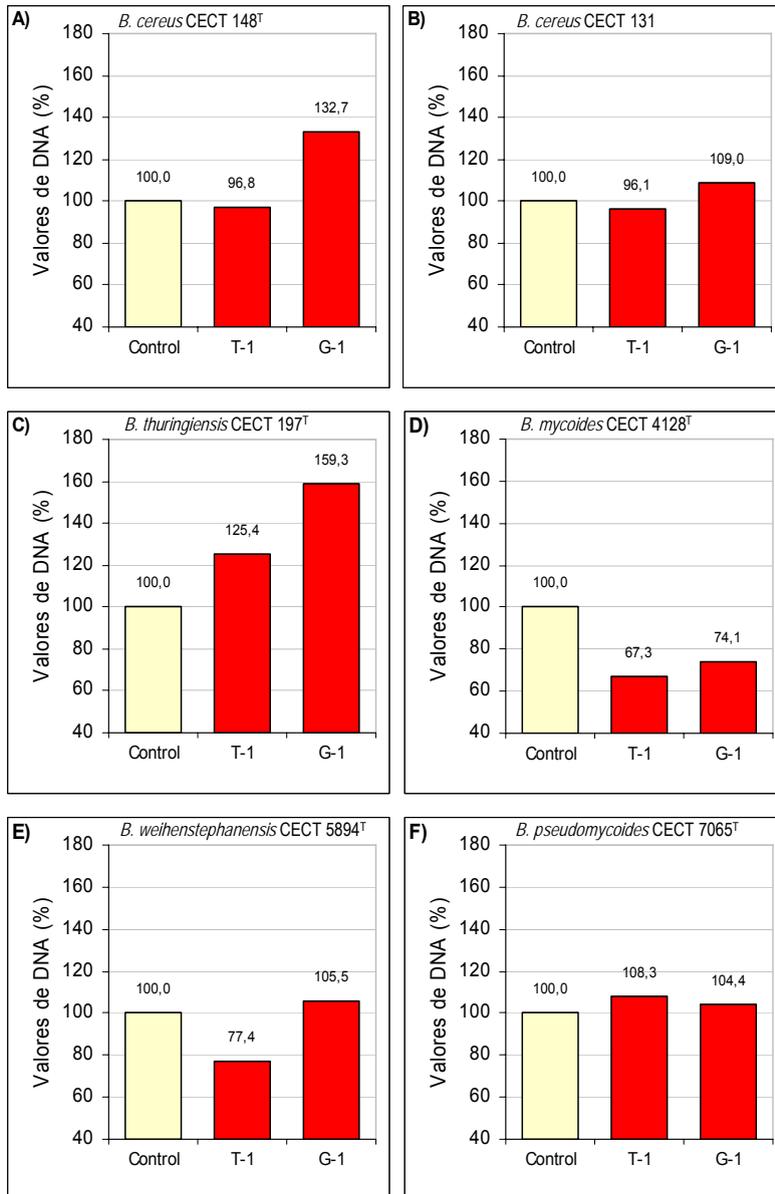


Figura 13.- Representación gráfica LSD (“Least Significant Difference”) del análisis de la varianza para los diferentes tratamientos analizados: **Control**, sin tratamiento; **T-1)** tratamiento térmico, 70 °C, 30 min; **T-2)** 80 °C, 10 min; **T-3)** 100 °C, 10 min; **T-4)** 121 °C (1 atm.), **G-1)** activación 70 °C, 30 min previo a la germinación y **G-2)** activación 80 °C 10 min y germinación.

Se ensayaron a continuación en las otras especies los tratamientos que habían presentado mayor rendimiento en la extracción de DNA en la cepa *B. cereus* CECT 148^T, T-1 (activación térmica) y G-1

(activación térmica más germinación), para evaluar su efectividad a nivel de “grupo *B. cereus*”. Los resultados aparecen en la Figura 14.



Leyenda en página siguiente.

Figura 14.- Rendimiento de los procedimientos ensayados en la extracción de DNA (%) respecto a la muestra control, estimado mediante SYBR Green Q-PCR para distintas especies del “grupo *B. cereus*”. **Control**, sin tratamiento; **T-1**) activación térmica, 70 °C, 30 min; **G-1**) activación 70 °C, 30 min y germinación con 0.5 mM de L-alanina y 0.5 mM inosina a 37 °C durante 30 min.

El tratamiento G-1 (activación térmica, 70 °C durante 30 min, y germinación con 0.5 mM de L-alanina y 0.5 mM inosina a 37 °C durante 30 min) fue el más eficiente en *B. thuringiensis* CECT 197^T, *B. cereus* CECT 148^T y *B. cereus* CECT 131, en este orden, y prácticamente igual que el control en *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T y *B. pseudomycooides* CECT 7065^T.

5.3.- Aplicación en alimentos inoculados artificialmente

Con el fin de establecer un procedimiento adaptado al análisis rutinario de alimentos y, dado que el método de Qiagen resultó eficaz para la extracción de DNA, incluso sin tratamiento previo adicional, se valoró la posibilidad de su utilización directamente. Para ello se prepararon diluciones decimales seriadas de esporas en SST y se extrajo el DNA tanto mediante Qiagen directamente, como aplicando previamente el tratamiento G-1. La cuantificación se realizó mediante SYBR Green Q-PCR. A continuación se analizaron muestras de huevo líquido y leche en polvo infantil contaminadas artificialmente en paralelo, a partir de suspensiones de esporas conteniendo entre 1 y 10⁵ esporas/ml. La extracción del DNA se realizó igualmente por el método de Qiagen, con y sin el tratamiento previo G-1.

En las Tablas 15 y 16 se muestran los valores medios de C_T obtenidos para dos ensayos independientes. Los resultados indican la detección de hasta 3-4 esporas por reacción. En el ensayo con SST se observó que la cuantificación por interpolación en la curva

patrón de DNA para los diferentes niveles ensayados, en general era superior al valor estimado por recuento en placa. Este resultado se explica porque el recuento en placa sólo cuantifica las esporas que han conseguido germinar y crecer, o por la infravaloración producida debido a la formación de agregados de esporas en el alimento.

Tabla 15.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR a partir de suspensiones de esporas, utilizando el método Qiagen para la extracción del DNA, con y sin el tratamiento previo G-1.

Approx. N° of spores	Qiagen			G-1 + Qiagen		
	Ratio ^a	C _T ± S.D. ^b	Cuantification ^c	Ratio	C _T ± S.D.	Cuantification
2,6 x 10 ⁴	4/4	21,85 ± 0,08	22257	4/4	21,67 ± 0,35	24933
2,6 x 10 ³	4/4	24,77 ± 0,08	3344	4/4	24,75 ± 0,16	3388
2,6 x 10 ²	4/4	28,89 ± 0,92	231	4/4	28,38 ± 0,35	321
26	4/4	31,39 ± 0,53	46	4/4	30,85 ± 0,59	65
3	4/4	32,05 ± 0,58	30	4/4	33,34 ± 1,25	13

^aPositive signals/ total reactions.

^bStandar Desviation.

^cCuantificación obtenida por interpolación en la recta patrón de DNA.

Tabla 16.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR a partir de alimentos inoculados con esporas, utilizando el método Qiagen para la extracción del DNA, con y sin el tratamiento previo G-1.

	Nº aprox. de esporas	Qiagen		G-1 + Qiagen	
		Ratio ^a	C _T ± DE ^b	Ratio	C _T ± DE
huevo líquido	2,9 x 10 ⁴	4/4	21,49 ± 0,20	4/4	30,92 ± 1,17
	2,9 x 10 ³	4/4	25,69 ± 0,11	4/4	27,96 ± 1,00
	2,9 x 10 ²	4/4	29,99 ± 1,14	4/4	26,92 ± 0,30
	29	4/4	31,45 ± 0,56	4/4	37,75 ± 0,63
	3	4/4	32,19 ± 0,53	4/4	30,43 ± 0,48
leche en polvo	3,4 x 10 ⁴	4/4	22,51 ± 0,17	4/4	23,58 ± 0,19
	3,4 x 10 ³	4/4	25,80 ± 0,26	4/4	26,14 ± 0,36
	3,4 x 10 ²	4/4	29,28 ± 0,28	4/4	29,52 ± 0,73
	34	4/4	32,56 ± 0,53	4/4	32,33 ± 0,54
	4	4/4	33,79 ± 0,63	4/4	33,96 ± 1,85

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bDesviación estándar.

La Tabla 17 muestra la comparación de los resultados de los análisis de regresión obtenidos de los ensayos con suspensiones de esporas y con esporas inoculadas en huevo líquido y leche en polvo infantil, en cuanto a la extracción de DNA a partir de las esporas, con Qiagen directamente o con el tratamiento previo G-1.

En el ensayo con suspensiones de esporas se observaron valores de pendiente similares con Qiagen y G1+Qiagen: -3,27 y -3,12, respectivamente, y próximos al óptimo teórico -3,32. Estos valores muestran buena correlación con los del recuento en placa y, como se observa por los valores de *E*, una elevada eficacia en la

amplificación, siendo ligeramente mejor en el caso de la extracción directamente con Qiagen. En los ensayos con alimentos inoculados, huevo líquido y leche en polvo infantil, se observaron valores más próximos al óptimo teórico con el método de Qiagen (-3,42 y -3,36, respectivamente) que empleando el tratamiento G-1 previamente. En todos los casos se obtuvo una $R^2 = 0,99$, lo que indica una buena linealidad de amplificación para el intervalo en estudio, excepto en el ensayo con huevo líquido utilizando el tratamiento previo G-1, en el que los valores de R^2 (0,26) y s (-1,95) indican que no hay correspondencia entre el número de esporas inoculado y el valor de C_T , en el intervalo de concentraciones ensayadas.

Tabla 17.- Resultados de los análisis de regresión correspondientes a los ensayos con suspensiones de esporas, esporas inoculadas en huevo líquido y en leche en polvo infantil recogidos en las Tablas 15 y 16.

Ensayo	Qiagen			G-1 + Qiagen		
	s^a	E^b	R^2	s	E	R^2
Susp. esporas	-3,27	1,02	0,992	-3,12	1,09	0,995
Leche en polvo	-3,36	0,98	0,999	-2,96	1,17	0,997

^a s , pendiente obtenida en el intervalo de 10^4 a 10^7 esporas por reacción.

^b E , eficiencia de amplificación ($E = 10^{-1/s} - 1$).

El método Qiagen para la extracción de DNA ha funcionado satisfactoriamente sin necesidad de tratamiento previo en los alimentos analizados, huevo líquido y leche en polvo infantil, para los niveles de contaminación ensayados. Probablemente esto se debe a que incluye una incubación de 30 min a 37 °C en presencia de lisozima que facilita la ruptura de la pared celular y permite iniciar la germinación.

6.- PCR cuantitativa a tiempo real con transcripción inversa

6.1.- Aislamiento de RNA total

De los tres métodos comerciales ensayados para la recuperación del RNA a partir de células de *B. cereus* CECT 148^T, el denominado “Total Quick RNA Cells & Tissues” (Talent) recuperó mayor proporción de RNA de pequeño tamaño (RNA mensajero) y menor DNA genómico, como se observa en la Figura 15. A continuación, y tras comprobar la presencia de DNA, mediante amplificación por PCR convencional, se procedió a realizar un tratamiento con DNasa I (Takara).

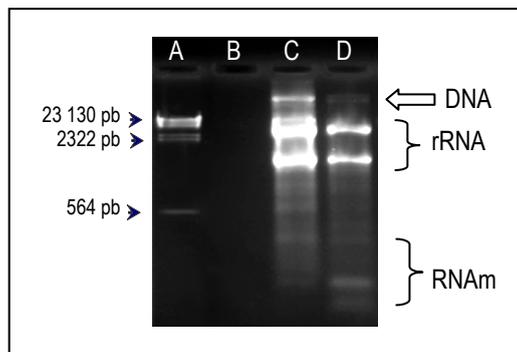


Figura 15.- Electroforesis de RNA total aislado con tres métodos comerciales: A) Marcador de peso molecular, DNA del fago lambda digerido con *HindIII* (Gibco); B) “UltraClean[®] Microbial RNA Kit” (Mo Bio, Laboratories); C) “RNeasy[®] Mini kit” (Qiagen); D) “Total Quick RNA Cells & Tissues kit” (Talent).

6.2.- Optimización del tratamiento con DNasa I

Con el fin de establecer un procedimiento para la eliminación del DNA residual de las muestras de RNA, se ensayaron los

tratamientos descritos en el apartado 9.1 de Material y Métodos (pág. 65), y a continuación se sometieron a análisis por PCR convencional y Q-PCR para evaluar la eficacia de eliminación del DNA. Con el tratamiento “b” (0,5 U/0,5 µg de RNA, 30 min a 37 °C), se obtuvo amplificación por Q-PCR por lo que fue descartado. Con los tratamientos “a”, “c” y “d” (0,5 U /0,5 µg de RNA, 60 min, a 37 °C; 1 U/0,5 µg de RNA, 30 min a 37 °C y 2 U/0,5 µg de RNA, 30 min a 37 °C, respectivamente), no se obtuvo amplificación. Se seleccionó el tratamiento “a”, ya que aseguraba la ausencia de DNA utilizando una menor concentración de DNasa I.

6.3.- Q-RT-PCR: Sistema SYBR Green

Tal y como se ha especificado en el apartado 9.2 de Material y Métodos (pág. 65), para desarrollar el sistema de Q-RT-PCR en modo “one-step”, en primer lugar se emplearon las condiciones optimizadas para la Q-PCR (SYBR Green MasterMix y 300 nM de cada cebador), incorporando 6 U de “MultiScribe® Reverse Transcriptase enzyme” (Applied Biosystems) para un volumen final de 25 µl, y como molde 20 ng de RNA previamente sometidos al tratamiento con DNasa I. El análisis de la curva de disociación mostró la presencia de un pico ($T_m = 82,0$ °C) que no correspondía con lo esperado según lo obtenido por Q-PCR, por lo que fue secuenciado. La secuencia obtenida se analizó con la herramienta informática BLAST del NCBI. Dicha secuencia presentó un alto grado de similitud con la secuencia del gen de RNAr 16S de diferentes cepas de *B. cereus*. Se comprobó con el programa Primer Express, que la longitud total de la secuencia del amplificado era de 90 pb y que presentaba una $T_m = 81$ ° C. Además, el análisis de la secuencia reveló las coincidencias con los 5 primeros nucleótidos del extremo 3' del cebador PCER-R3 y de los 6 primeros nucleótidos del extremo 3' del cebador PECER-F (Figura 16). Ello permitía la hibridación del

cebador reverse en el RNA ribosómico 16S y del directo en el cDNA, llevando a la amplificación del fragmento inespecífico. Esta situación podría explicarse debido a la mayor proporción de RNA ribosómico frente al RNA mensajero y a las condiciones poco restrictivas de la reacción: una temperatura para la transcripción inversa de 48 °C y una alta concentración de MgCl₂ (MasterMix).

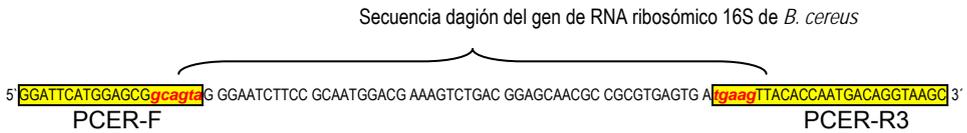


Figura 16.- Secuencia del producto de amplificación de $T_m = 82$ °C obtenido por Q-RT-PCR. Se indican los nucleótidos que coinciden con los cebadores PCER-F y PCER-R, específicos de *B. cereus* y dirigidos al gen *pc-plc*.

Para evitar esta amplificación inespecífica se procedió a una optimización en RT-PCR y Q-RT-PCR, ensayándose diferentes concentraciones de MgCl₂. El análisis de la curva de disociación permitió establecer las condiciones más favorables (2,5 mM MgCl₂) para obtener mayor especificidad de amplificación para el producto deseado ($T_m = 79,8$ °C) y menor formación de dímeros de cebadores (Figura 17). Una vez fijada la concentración de MgCl₂, se realizó de nuevo la titulación de los cebadores confirmándose que 300 nM era la óptima, presentando el valor de C_T mas bajo para el nivel de DNA molde utilizado, lo que indica mayor eficiencia en la amplificación.

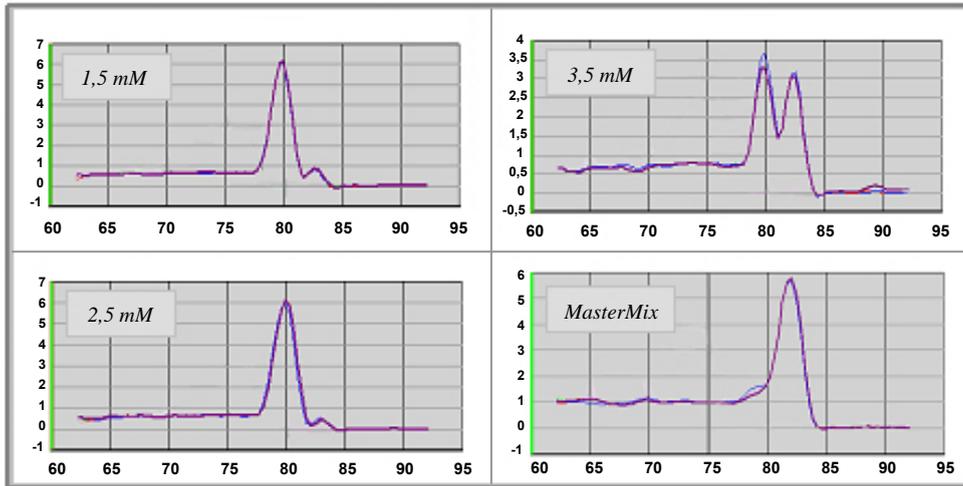


Figura 17.- Optimización de la reacción de Q-RT-PCR en modo SYBR Green, curvas de disociación de los amplificadores obtenidos a diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (representación grafica de la derivada de la ΔRn frente a la temperatura en $^{\circ}C$).

6.4.- Q-RT-PCR: Sistema TaqMan

Dado que, incluso tras la optimización de las concentraciones de $MgCl_2$ y cebadores en el análisis de disociación, aparecía el pico de T_m de la amplificación inespecífica, se optó por el sistema TaqMan utilizándose la sonda MGB previamente diseñada para este gen. De este modo se pretendía aumentar la especificidad y evitar interferencias en la cuantificación final debidas a la fluorescencia emitida por amplificaciones inespecíficas. La titulación de la sonda para ser utilizada en Q-RT-PCR mostró que los valores de C_T más bajos se obtenían con la concentración de 50 mM y la concentración de cebadores de 300 nM.

La recta patrón de cuantificación se obtuvo representando gráficamente la media de los valores de C_T correspondientes a dos ensayos independientes, frente a la cantidad de células utilizadas en

cada reacción de Q-RT-PCR, estimada por recuento en placa (Figura 18). Los valores cubrían un rango de 5 unidades logarítmicas ($2,9 \times 10^5$; $2,9 \times 10^4$; $2,9 \times 10^3$; 298 y 30 ufc por reacción). También se estimó la cantidad de RNA total a partir de la cuantificación espectrofluorimétrica con “Ribogreen” de la muestra más concentrada (Tabla 18).

El análisis de regresión lineal de los datos de la recta patrón para la Q-RT-PCR ofrece un valor $s = -3,66$ cercano al valor óptimo, que corresponde a una eficiencia $E = 0,88$ y un valor de $R^2 = 0,99$. Estos resultados indican que la Q-RT-PCR desarrollada muestra una buena linealidad de amplificación para 5 órdenes de magnitud, obteniéndose un nivel de detección de aproximadamente 30 células viables de *B. cereus* por reacción (Figura 18 y Tabla 18).

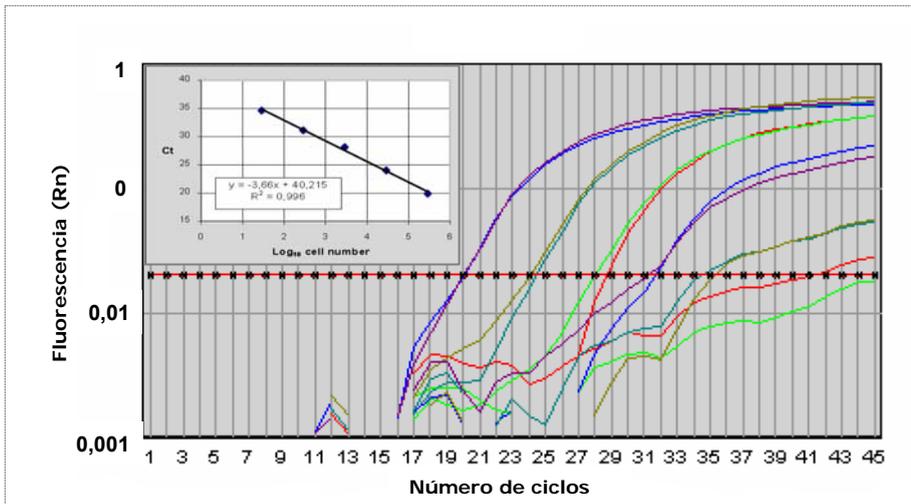


Figura 18.- Curvas de amplificación obtenidas mediante TaqMan Q-RT-PCR para las diferentes concentraciones de células ensayadas (ufc/reacción). De izquierda a derecha: $2,98 \times 10^5$; $2,98 \times 10^4$; $2,98 \times 10^3$; $2,98 \times 10^2$; $2,98 \times 10$. En el gráfico insertado se muestra el análisis de regresión lineal entre el número de células (expresado en \log_{10}) y el C_T (media de dos replicados).

Tabla 18.- Curva patrón para cuantificación de células viables de *B. cereus* mediante TaqMan Q-RT-PCR. Se indica el número de células por reacción y la cantidad de RNA total correspondiente, estimada por cuantificación espectrofluorimétrica con Ribogreen a partir de la muestra más concentrada.

RNA total (pg/reacción)	Nº de células (ufc/reacción)	Ratio ^a	Intervalo de confianza al 95 % ^b		Valores C _T Media ± DE ^c
			Inferior	superior	
3,9 x 10 ⁴	2,98 x 10 ⁵	4/4	297012	299146	19,89 ± 0,19
3,9 x 10 ³	2,98 x 10 ⁴	4/4	29470	30147	24,01 ± 0,36
390	2,98 x 10 ³	4/4	2875	3088	28,13 ± 0,37
39	298	4/4	265	332	31,11 ± 0,43
3,9	30	4/4	20	41	34,63 ± 0,57

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bIntervalo de confianza al 95 % obtenidos obtenido mediante Simulación Montecarlo.

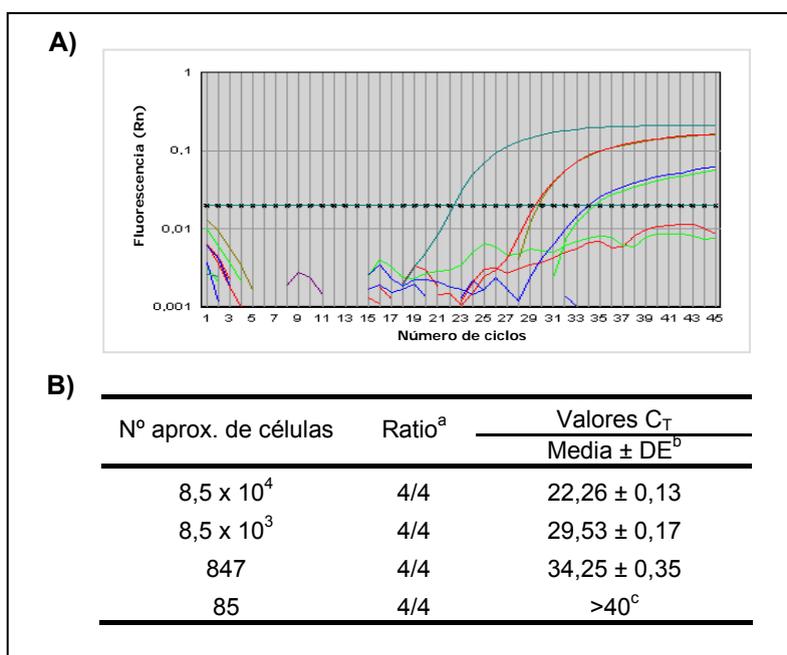
^cMedia de dos determinaciones ± desviación estándar.

6.5.- Aplicación en huevo líquido inoculado artificialmente

Con el fin de comprobar la aplicabilidad en alimentos del sistema de Q-RT-PCR en la detección de formas viables de *B. cereus*, se ensayó en huevo líquido inoculado artificialmente. El RNA obtenido a partir de alícuotas de 1 ml del alimento inoculado fue cuantificado espectrofluorimétricamente con “Ribogreen” y sometido al tratamiento con DNasa establecido en este estudio. En las muestras donde no era posible obtener una cuantificación espectrofotométrica para ajustar el tratamiento a 5 U/0,5 µg de RNA (lo que indicaba una concentración de RNA por debajo de las ensayadas), se estableció como tratamiento estándar la utilización de 0,25 U de DNasa I para asegurar la eliminación de trazas de DNA.

En la Figura 19 se presenta una tabla con los valores medios de C_T correspondientes a dos replicados, en dos ensayos independientes,

cubriendo un rango de 4 unidades logarítmicas. Los valores medios de los C_T obtenidos mostraron correspondencia con los resultados del recuento en placa. Se obtuvo una linealidad aceptable entre los valores medios de C_T y los valores del recuento en placa ($R^2 = 0,98$). Sin embargo el nivel de detección en este caso, está en 847 células viables por reacción, lo que corresponde a $1,1 \times 10^4$ ufc/ml de la muestra en origen. Ello supone una disminución en el nivel de sensibilidad de la Q-RT-PCR al ser aplicada en el alimento.



^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bValores de C_T , media \pm desviación estándar.

^c $C_T \geq 40$, resultado negativo.

Figura 19.- A) Curvas de amplificación obtenidas por TaqMan Q-RT-PCR para $8,5 \times 10^4$; $8,5 \times 10^3$; $8,5 \times 10^2$ y $8,5 \times 10$ ufc/reacción de *B. cereus* inoculadas en huevo líquido. B) Valores de C_T correspondientes a 4 repeticiones (dos replicados en ensayos independientes), media \pm desviación estándar.

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

1.- Caracterización fenotípica

La morfología colonial típica de *B. cereus* en agar PEMBA se observa en la Figura 3 y corresponde a colonias de 2 a 5 mm de diámetro, planas o ligeramente convexas, de borde ondulado o irregular, en forma circular o elipsoide, de color azulado por el pH básico debido a la no asimilación del manitol, y con halo de precipitación debido a la capacidad lecitinasas. En la misma figura también se muestra la respuesta a las pruebas de confirmación de los aislados con morfología típica como son: la fermentación de la glucosa, la producción de butanodiol y la asimilación de nitratos, o bien la β -hemólisis. Los resultados de la caracterización fenotípica quedan recogidos en la Tabla 5.

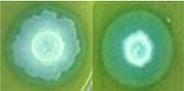
Aspecto típico de <i>B. cereus</i> en agar selectivo (PEMBA)		Respuestas a las pruebas de confirmación		
 <p>Morfología colonial, no asimilación del manitol, actividad lecitinasas</p>				
		+ -		
		Voges-Proskauer		
		Nitratos		
		+ -		
		β -hemólisis		

Figura 3.- Aspecto típico de las colonias de *B. cereus* en agar selectivo PEMBA y respuestas a las pruebas de confirmación empleadas según la Norma ISO 7932, A) 1993/Cor.1:1997 y B) 2004.

Las cepas de referencia de las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis*, presentaron la morfología típica descrita para *B. cereus* en agar PEMBA. Las cepas de referencia de *B. mycoides* y *B. pseudomycoides* presentaron crecimiento rizoidal. Las cepas de referencia de otras especies del género *Bacillus* presentaron aspecto colonial bien diferenciable del “grupo *B. cereus*” (color amarillo, sin halo de precipitación). De las ambientales, las cepas B72 y B74 presentaron crecimiento rizoidal y sólo una, la cepa B44, mostró un aspecto colonial no típico de “grupo *B. cereus*”.

De las pruebas confirmatorias, en las cepas de referencia, la mayor variación en el resultado esperado se observó en la prueba de fermentación de la glucosa que resultó negativa para las cepas *B. cereus* CECT 131 y CECT 4014, y *B. thuringiensis* CECT 4495, CECT 4496 y CECT 4497. Todas las cepas fueron positivas para el Voges-Proskauer, la β -hemólisis y la prueba de asimilación de nitratos, excepto *B. mycoides* CECT 4128^T que presentó resultado negativo en la asimilación de nitratos. En el caso de las cepas ambientales, las cepas B40 y B45 fueron negativas para la asimilación de la glucosa, la cepa B72 resultó negativa en la prueba del Voges-Proskauer, y las cepas B66 y B70 resultaron negativas para la asimilación de nitratos.

A continuación, todas ellas fueron sometidas a identificación por API[®] 50CH y 20E. Los perfiles obtenidos se analizaron y los resultados aparecen en la Tabla 5. La adscripción a especie, grupo o género se realizó según los siguientes criterios:

- Si el porcentaje de identificación (% ID) era $\geq 80,0$ y presentaba un único taxón significativo, se aceptó la identificación a nivel de especie o biotipo de API. Si el resultado de identificación correspondía a biotipo *B. cereus* 1 o *B. cereus* 2, y dado que los

perfiles de API no permiten identificar *B. thuringiensis*, su diferenciación se realizó en base a la presencia de cristal parasporal.

- Si el resultado presentaba varios taxones significativos, independientemente del valor del % ID, y todos ellos correspondían a especies del “grupo *B. cereus*”, se consideró identificación a nivel de grupo. Dentro de las adscritas a “grupo *B. cereus*” si presentaba crecimiento rizoidal se consideró perteneciente a la especie *B. mycoides*.

- Si los taxones significativos incluían especies no pertenecientes al “grupo *B. cereus*” se consideró la identificación a nivel de género.

De las 13 cepas de referencia de la especie *B. cereus*, 3 fueron identificadas correctamente como pertenecientes a dicha especie. De las 8 cepas de referencia de *B. thuringiensis*, la cepa CECT 4495 presentó el perfil de *B. cereus* biotipo 1 y las cepas CECT 197^T y CECT 4454 el perfil de “grupo *B. cereus*”, pero todas ellas presentaron cristal parasporal, lo que confirmó su pertenencia a la especie *B. thuringiensis*. La cepa de referencia de *B. weihenstephanensis* fue identificada según API como *B. mycoides* con un 90 %, pero según el esquema propuesto quedaría identificada a nivel de “grupo *B. cereus*” debido a que no presenta crecimiento rizoidal. De las 6 cepas de referencia de *B. mycoides* 4 presentaron el perfil de API de la especie, con ID > 80 %, las otras 2 (CECT 4123 y CECT 4125) presentaban el perfil de “grupo *B. cereus*” con morfología rizoidal, lo que sugería también su pertenencia a la especie de *B. mycoides*. La cepa de referencia de *B. pseudomycoides* mostró un perfil de “grupo *B. cereus*”, pero por su crecimiento rizoidal fue asignada a *B. mycoides*.

Finalmente, en el conjunto de cepas de referencia del “grupo *B. cereus*”, y tomando como criterio la presencia de cristal paraesporal y el crecimiento rizoidal antes mencionados, un total de 13 cepas fueron identificadas en este trabajo a nivel de especie. De ellas, sólo 3 correspondían a la especie *B. cereus*, 3 a *B. thuringiensis* y 7 a *B. mycoides* (incluyendo a *B. pseudomycoides*, especie muy próxima a *B. mycoides*). El resto de cepas de referencia quedaron identificadas a nivel de “grupo *B. cereus*” y una a nivel de género *Bacillus* (CECT 40).

Aplicando los mismos criterios para las cepas de origen ambiental, sólo 3 (B40, B47 y B77) se identificaron como pertenecientes a la especie *B. cereus* por el perfil de API; 2 (B40 y B48) a la especie *B. thuringiensis* por la presencia del cristal parasporal, 2 (B72 y B74) a *B. mycoides* por el crecimiento rizoidal y el resto quedaron identificadas a nivel de género o grupo (ver Tabla 5).

El resultado de la identificación en las especies del “género *Bacillus*” no pertenecientes al “grupo *B. cereus*” según el sistema API fue más satisfactorio: 11 de las 16 especies fueron identificadas a nivel de especie; 4 cepas fueron identificadas a nivel de “grupo *B. subtilis*”; la cepa de referencia de *B. sphaericus*, como *Bacillus* non-reactive (no asimila ninguno de los sustratos de la tira API 50CH) y *B. lentus* CECT 18^T fue identificada a nivel de género.

La figura 4 muestra el dendrograma del agrupamiento UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean”), obtenido a partir de la matriz de similitud calculada con el coeficiente de Jaccard, sobre los perfiles fenotípicos de API. Al 58 % se forman 3 fenones que contienen el total de cepas ensayadas excepto las cepas tipo de las especies *B. lentus*, *B. firmus* y *B. sphaericus*. El fenon I contiene 29 cepas de referencia y 30 aislados de alimentos

del “grupo *B. cereus*”. Dentro de éste se observa un subgrupo de cepas que se diferencia del resto en la no asimilación del almidón y del glicógeno, junto a la no asimilación del gluconato e incluye a la cepa de referencia *B. cereus* CECT 4387 y a 7 aislados identificados como *B. cereus* biotipo 2, “grupo *B. cereus*” y género *Bacillus*. El fenon II comprende cepas tipo de diferentes especies, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lichenimormis*, *B. circulans* y aislados procedentes del INRA de las especies *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *P. polimyxa*. El fenon III comprende a la cepa tipo de *B. pumilus* y a 5 aislados ambientales de esta especie.

Tabla 5.- Resultados de la caracterización fenotípica en las cepas analizadas.

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	MC ⁽²⁾				Pruebas de confirmación ⁽³⁾				API 50CH/20E ⁽⁴⁾				Interpretación ⁽⁵⁾ Identificación	
			RF	VP	Nit	β -H	RF	VP	Nit	β -H	Comentario de API y 1 ^{er} Taxón significativo	% ID	T*	Nota		
a) Cepas de referencia "grupo <i>B. cereus</i> "	<i>B. cereus</i>															
		CECT 131	III	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 1	55,7	0,93	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 148 ^T	III	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 1	94,0	0,81	◇	<i>B. cereus</i> 1
		CECT 193	V	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 1	83,9	0,69	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 495	III	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	41,3	0,7	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 496	III	+	+	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 1	66,3	0,88	◇✱	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 4014	III	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	82,5	0,65	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 4094	III	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 1	98,4	0,74	◇	<i>B. cereus</i> 1
		CECT 4387	III	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 2	97,1	0,93	◇	<i>B. cereus</i> 2
		CECT 4989	III	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 1	61,7	0,62	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 5144	III	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	96,3	0,69	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 5148	V	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	94,9	0,63	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 5314	III	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	93,3	0,93	◇	Grupo <i>B. cereus</i>
		CECT 40	IV	+	+	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 2	81,3	0,8	◇✱✱	<i>Bacillus</i> sp.
<i>B. thuringiensis</i>	CECT 197 ^T	V	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	89,9	0,92	◇	<i>B. thuringiensis</i> ⁽⁷⁾	
	CECT 996	III	+	+	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 1	93,8	0,81	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
<i>B. t. subsp. kurstaki</i>	CECT 4454	V	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	64,1	0,85	◇	<i>B. thuringiensis</i> ⁽⁷⁾	
<i>B. t. subsp. aizawai</i>	CECT 4494	V	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	74,6	0,79	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
<i>B. t. subsp. kurstaki</i>	CECT 4495	V	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID.	B. cereus 1	93,1	0,62	◇	<i>B. thuringiensis</i> ⁽⁷⁾	
<i>B. t. subsp. thuringiensis</i>	CECT 4496	V	+	+	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	B. cereus 1	95,2	0,85	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
<i>B. t. subsp. kurstaki</i>	CECT 4497	V	+	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 1	69,5	0,81	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
<i>B. t. subsp. israelensis</i>	CECT 7034	V	+	+	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	B. cereus 2	77,5	0,95	◇	Grupo <i>B. cereus</i>	
<i>Bacillus mycooides</i>	CECT 4123	I	- ^a	+	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	<i>B. mycooides</i>	48,6	0,77	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾	
	CECT 4124	I	- ^a	+	+	+	+	+	+	Buena ID.	<i>B. mycooides</i>	92,1	0,85	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾	
	CECT 4125	I	- ^a	+	+	+	+	+	D	Muy buena ID. en el género	<i>B. cereus</i> 2	85,7	0,96	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾	
	CECT 4126	I	- ^a	+	+	+	+	+	+	ID. aceptable	<i>B. mycooides</i>	84,5	0,81	◇	<i>B. mycooides</i> ⁽⁸⁾	

Tabla 5.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	MC ⁽²⁾	Pruebas de confirmación ⁽³⁾				API 50CH/20E ⁽⁴⁾			Interpretación ⁽⁵⁾	
				RF	VP	Nit	β-H	Comentario de API y 1 ^{er} Taxón significativo	% ID	T*	Nota	Identificación
	CECT 4127	I	- ^a	+	+	+	+	ID. aceptable	84,5	0,81		B. mycooides ^(R)
	CECT 4128T	I	- ^a	+	+	-	+	Muy buena ID. en el género	53,6	0,72	◇	B. mycooides ^(R)
B. weihenstephanensis	CECT 5694T	I	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	90,4	0,83	◇	Grupo B. cereus
B. pseudomycooides	CECT 7065T	I	- ^a	ND	ND	ND	+	Excelente ID. en el género	80,9	0,86	◇	B. mycooides ^(R)
b) Cepas ambientales "grupo B. cereus"												
B. cereus/ /B. thuringiensis	INRA P21S	III	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género.	48,5	0,81	◇	Grupo B. cereus
	INRA TZ415	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	64,9	0,61	◇	Grupo B. cereus
	INRA P2101	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	82,5	0,82	◇	Grupo B. cereus
	B40	V	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	56,4	0,91	◇	B. thuringiensis ^(T)
	B41	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	78,0	0,97	◇	Grupo B. cereus
	B42	V	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	69,5	0,81	◇	Grupo B. cereus
	B43	V	+	D	+	+	+	Muy buena ID. en el género	63,1	0,77	◇	Grupo B. cereus
	B45	III	+	D	+	+	+	Muy buena ID. en el género	90,8	0,77	◇	Grupo B. cereus
	B46	VI	+	D	+	+	+	Muy buena ID.	99,9	0,5	◇	B. cereus 1
	B47	III	+	+	+	+	D	Buena ID.	90,8	0,76	◇	B. cereus 1
	B48	V	+	+	+	+	D	Muy buena ID. en el género	86,5	0,67	◇	B. thuringiensis ^(T)
	B49	V	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	60,5	0,78	◇	Grupo B. cereus
	B50	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	48,8	0,88	◇	Grupo B. cereus
	B54	III	+	D	+	+	+	Baja discriminación	60,1	0,84	◇×	Bacillus sp.
	B55	III	+	+	+	+	+	Baja discriminación	60,1	0,84	◇×	Bacillus sp.
	B60	VI	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	62,8	0,66	◇	Grupo B. cereus
	B62	III	+	ND	ND	+	+	Muy buena ID. en el género	59,4	0,9	◇	Grupo B. cereus
	B63	V	+	+	+	+	+	Buena ID. en el género	56,8	0,85	◇	Grupo B. cereus
	B64	VI	+	ND	ND	+	+	Excelente ID. en el género	89,4	0,93	◇●	Bacillus sp.
	B65	IV	+	ND	ND	+	+	Muy buena ID. en el género	62,2	0,68	◇	Grupo B. cereus
	B67	III	+	+	+	+	+	Muy buena ID. en el género	74,0	0,74	◇	Grupo B. cereus
	B68	IV	+	ND	ND	+	+	Muy buena ID. en el género	55,4	0,87	◇	Grupo B. cereus
	B70	V	+	+	-	+	+	Muy buena ID. en el género	52,9	0,58	◇	Grupo B. cereus
	B73	V	+	+	+	+	+	Excelente ID. en el género	53,8	0,81	◇	Grupo B. cereus

Tabla 5.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Pruebas de confirmación ⁽³⁾				API 50CH/20E ⁽⁴⁾				Interpretación ⁽⁵⁾		
			MC ⁽²⁾	RF	VP	Nit	β -H	Comentario de API y 1 ^{er} Taxón significativo	% ID	T*		Nota	
B. mycooides/ /B.pseudomycooides/ /B.weihenstephanensis	B77	III	+ _b,c	ND	ND	ND	+	Buena ID.	B. cereus 2	98,7	0,79	◇	B. cereus 2
	B44	II	-	D	+	+	+	Muy buena ID. en el género	B. mycooides	89,3	0,8	◇	Grupo B. cereus
	B66	II	-	+	+	-	+	Muy buena ID. en el género	B. mycooides	94,9	0,74	◇	Grupo B. cereus
	B69	I	-	+	+	D	+	Excelente ID. en el género	B. mycooides	84,2	0,98	◇	Grupo B. cereus
	B72	II	-	+	-	+	+	Muy buena ID. en el género	B. cereus 2	78,7	0,62	◇	B. mycooides ^(R)
	B74	II	-	+	+	+	D	Excelente ID. en el género	B. mycooides	57,6	0,78	◇	B. mycooides ^(R)
	c) Otras especies del "género Bacillus"												
Bacillus circulans	CECT 10 ^T		-	-	+	+	-	Muy buena ID.	B. circulans	99,7	0,7		B. circulans
	INRA P1198		-	+	+	+	+	Excelente ID.	B. pumilus	99,9	0,93		B. pumilus
Bacillus firmus	CECT 14 ^T		-	-	-	+	-	Muy buena ID.	B. firmus	99,8	0,97		B. firmus
Bacillus lentus	CECT 18 ^T		-	-	-	-	-	Baja discriminación	B. lentus	70,2	0,72		Bacillus sp.
Bacillus licheniformis	CECT 20 ^T		-	-	+	+	-	Muy buena ID.	B. licheniformis	99,9	0,68		B. licheniformis
	INRA B2186		-	-	+	+	D	Excelente ID.	B. licheniformis	99,9	0,76		B. licheniformis
Bacillus megaterium	CECT 4313 ^T		-	-	-	-	-	Excelente ID.	B. megaterium	99,9	0,97		B. megaterium
Paenibacillus polymyxa	INRA Z1186		-	-	+	+	-	Muy buena ID.	B. subtilis*	99,8	0,64		Grupo B. subtilis
Bacillus pumilus	CECT 29 ^T		-	-	+	+	-	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,59		B. pumilus
	INRA Z2166		-	-	+	+	D	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,54		B. pumilus
	B51		ND	ND	ND	ND	ND	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,72		B. pumilus
	B52		ND	ND	ND	ND	ND	Muy buena ID.	B. pumilus	99,9	0,87		B. pumilus
	B53		ND	ND	ND	ND	ND	Excelente ID.	B. pumilus	99,9	0,75		B. pumilus
Bacillus sphaericus	CECT 33 ^T		-	-	-	-	-	Excelente ID.	B. non-reactive	94,5	0,93		B. non reactive
Bacillus subtilis	CECT 39 ^T		-	-	+	+	D	Buena ID.	B. subtilis*	94,2	0,84		Grupo B. subtilis
	INRA K21101		-	ND	ND	ND	-	Muy buena ID.	B. subtilis*	99,8	0,91		Grupo B. subtilis
d) Especies de otros géneros													
Escherichia coli	CECT 515 ^{NT}		-	ND	ND	ND	ND						
Listeria monocytogenes	CECT 4031 ^T		-	ND	ND	ND	ND						
Salmonella choleraesuis	CECT 915 ^T		-	ND	ND	ND	ND						
Staphylococcus aureus	CECT 86 ^T		-	ND	ND	ND	ND						

Tabla 5.- (Continuación).

^T, cepa tipo. CECT, Colección Española de Cultivos Tipo. INRA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Francia.

⁽¹⁾GT, genotipado, identificación derivada del genotipado con ISR y RAPDs (Ocio *et al.*, 2002 y Martínez-Blanch *et al.*, 2003): grupo I y II) *B. mycoides* / *B. pseudomycoides* / *B. weihenstephanensis*, grupo III y IV) *B. cereus* y grupo V y IV) *Bacillus cereus* / *B. thuringiensis*.

⁽²⁾MC, morfología colonial típica de *B. cereus*, sobre agar PEMBA, “+” si mostraba el total de características típicas o “-” si presentaba alguna de las características siguientes: a) crecimiento rizoidal, b) asimilación del manitol (colonia color amarillento) y c) lecitinasa negativa. ND, no determinado. D, débil.

⁽³⁾Pruebas de confirmación: RF, rojo fenol; VP, Voges-Proskauer modificado; Nit, nitratos y β -H, hemólisis β .

⁽⁴⁾ID, Identificación. % ID, proximidad relativa a los diferentes taxones de la base de datos (porcentajes de positividad). T*, índice de Tipicidad, proximidad al perfil más típico en cada taxón (0-1). Nota: \diamond) posibilidad de *B. thuringiensis*, \bullet) posibilidad de *B. megaterium*, \times) la prueba 27 (celobiosa) determina que sea *Brevibacillus laterosporus* y \otimes) especie altamente patógena. *No es posible discriminar entre *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

⁽⁵⁾Interpretación según este trabajo del resultado de API, se consideró identificación a nivel de “grupo *B. cereus*” cuando aparecía más de un taxón significativo correspondiente a las especies del “grupo *B. cereus*”. Se consideró identificación a nivel género *Bacillus* cuando aparecían otras especies. ^(T)Identificación como *B. thuringiensis*, presencia del cristal parasporal (δ -toxina). ^(R)Identificación como *B. mycoides*, crecimiento rizoidal.

2.- Detección de genes de virulencia por PCR convencional

Con el fin de seleccionar la diana para el diseño de cebadores se investigó la presencia de genes de virulencia en las cepas en estudio mediante PCR convencional con cebadores específicos. Los resultados de la amplificación se muestran en la Figura 5 y la Tabla 8, e indican que de las 59 cepas del “grupo *B. cereus*” analizadas 44 (75 %) poseen el gen *entFM* (enterotoxina FM), 45 (76 %) el gen *sph* (esfingomielinasa), 56 (95 %) el gen *pc-plc* (fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina) y que el gen *clo* (cereolisina O) está presente en todas ellas pero también en otras especies del género *Bacillus*, tales como *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. firmus*.

Estos resultados confirman que el gen *pc-plc* es adecuado como diana para el diseño de los cebadores para Q-PCR, por su presencia mayoritaria en las cepas del “grupo *B. cereus*” y su ausencia en las cepas de otras especies estudiadas. Además, se trata de un gen de copia única como demuestran los genomas del “grupo *B. cereus*” accesibles en bases de datos públicas.

En cuanto al resto de los factores de virulencia ensayados por su relación con intoxicaciones alimentarias (Tabla 8), el gen *hbl* (hemolisina BL) está presente en 48 (81 %) de las cepas del “grupo *B. cereus*”, el gen *nhe* (enterotoxina no hemolítica) en 45 (76 %), el gen *ces* (cereúlida sintetasa) en 2 (3 %) y el gen *cytK* (citotoxina) en 33 (56 %), aunque también se encontró en cepas de otras especies del género *Bacillus*, tales como *B. pumilus* y *B. subtilis*.

Considerando los 8 genes estudiados se distinguen hasta 26 perfiles toxigénicos (Tabla 8). De ellos, 22 (perfiles A-V) corresponden a las 59 cepas del “grupo *B. cereus*” y 4 (perfiles W-Z) a las 16 cepas de otras especies del género *Bacillus* ensayadas, siendo el perfil Z

ausencia de amplificación para todos los genes. El 66 % de las cepas del “grupo *B. cereus*” presentaron de 6 a 7 factores de virulencia, el 29 % de las cepas de 5 a 3 genes y el 5 % sólo dos. Se observó la existencia de perfiles toxigénicos similares para las diferentes especies del “grupo *B. cereus*”. Los perfiles más frecuentes fueron el “D” con 13/59 cepas (*hbl, nhe, cytK, pc-plc, sph, clo, entFM*), el “L” con 9/59 (*hbl, nhe, pc-plc, sph, clo, entFM*) y el “A” con 8/59 (*hbl, cytK, pc-plc, sph, clo, entFM*). Las cepas *B. mycoides* CECT 4125 y *B. pseudomycoides* CECT 7065^T que presentaron el perfil “U” fueron las únicas cepas del “grupo *B. cereus*” que no poseían ninguno de los genes de toxinas relacionadas con toxiinfecciones alimentarias (*hbl, nhe, cytK* o *ces*) (ver Figura 6).

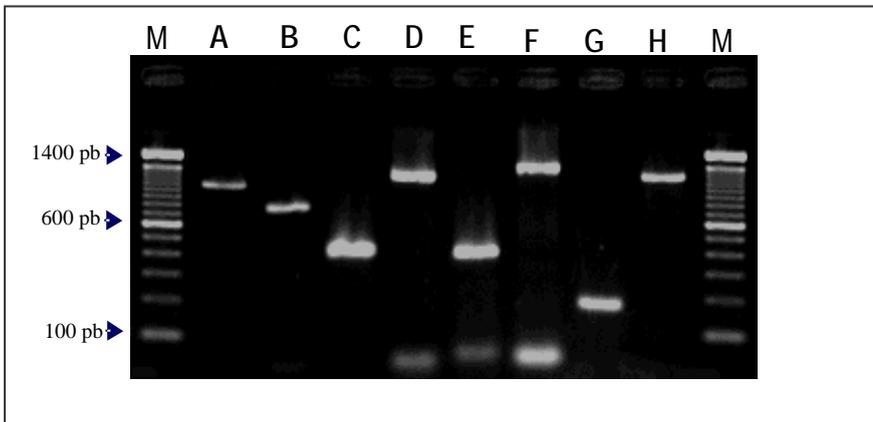


Figura. 5.- Productos de amplificación por PCR correspondientes a los distintos cebadores específicos de genes de virulencia ensayados: **A)** HD2 F/HA4 R, 1091 pb, (gen *hblA-D*), **B)** NA2 F/NB1 R, 766 pb, (gen *nheA-B*) **C)** CK F2/CK R5, 421 pb, (gen *cytK*), **D)** CesF1/CesR2, 1271 pb, (gen *ces*) **E)** Pf/Pr, 411 pb (gen *pc-plc*), **F)** Pf/Cr, 1461 pb, (gen *pc-plc* y *sph*), **G)** BC-1/BC-2, 185 pb (gen *clo*) y **H)** EntA/EntB, 1269 pb (gen *entFM*). M, marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, Invitrogen).

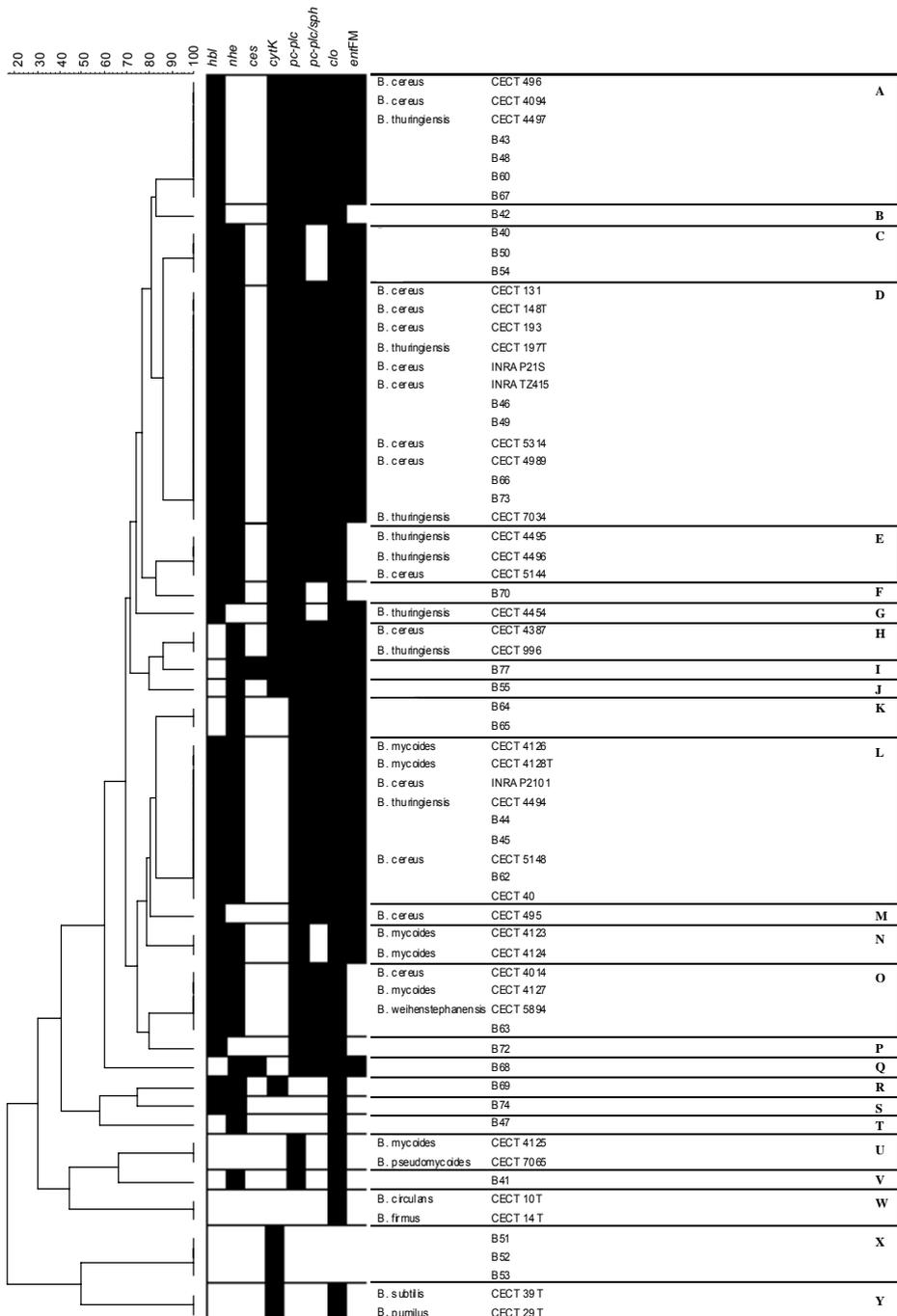


Figura 6.- Dendrograma UPGMA, obtenido utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, donde se muestra el agrupamiento de las cepas en estudio en función de los perfiles de factores de virulencia.

3- Especificidad de los oligonucleótidos diseñados para PCR cuantitativa

Se diseñaron un total de 5 oligonucleótidos (uno directo y 3 reversos, y una sonda TaqMan MGB) para Q-PCR (Tabla 6). La sonda lleva incorporado el fluoróforo FAM (6-carboxi-fluoresceína) en el extremo 5', un silenciador no fluorescente ("Dark Quencher") en el extremo 3', que permite una monitorización más precisa de las variaciones de fluorescencia, y un péptido MGB ("Minor Groove Binder") que aumenta la temperatura de hibridación sin aumentar el tamaño de la sonda y sirve de anclaje uniéndose al surco menor del DNA.

Tabla 6.- Oligonucleótidos diseñados en este estudio para su utilización en PCR cuantitativa.

Nombre	Posición ^a	Secuencia (5'-3')	T (°C) ^b
PCER F	838	GGA TTC ATG GAG CGG CAG TA	60
BCER-MGB	862	CGA AAC AAG ATT ACI CT	70
PCER R1	888	TCT TAC GAA CCA ATC T TT CGT ATT ATC ATT	60
PCER R2	905	GAT ACA GCT GCT CTT ACG AAC CAA	60
PCER R3	956	GCT TAC CTG TCA TTG GTG TAA CTT CA	60

^aPosición en la secuencia del gen *pc-plc* (nº de acceso M24149, NCBI), correspondiente a la cepa *B. cereus* GP-4.

^bTemperatura de hibridación.

La especificidad de los cebadores diseñados se ensayó mediante PCR convencional. La combinación PCER-F y PCER-R1 mostró que en algunas cepas se obtenía un producto de amplificación de tamaño mucho mayor al esperado (900 pb), por lo que fue descartada. Con la combinación PCER-F y PCER-R2 se obtuvo el amplificado en todas las cepas del "grupo *B. cereus*" excepto en *B. mycoides* CECT 4124. Con la combinación PCER-F y PCER-R3, el total de cepas del

“grupo *B. cereus*” presentaron amplificado mientras que no aparecía en otras especies.

Además, se realizó un análisis pormenorizado de las zonas diana de los cebadores a partir de las secuencias obtenidas en este estudio. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y revelan un menor número de desapareamientos en la secuencia de los cebadores PCER-F y PCER-R3, por lo que fueron seleccionados para Q-PCR.

Tabla 7.- Homología de los cebadores diseñados con las secuencias diana en diferentes cepas del “grupo *B. cereus*”, a partir de los amplificados obtenidos con los cebadores Pf/Cr y Pf/PCER-R3.

Especie	Cepa	Cebadores			
		F	R1	R2	R3
<i>B. cereus</i>	CECT 193 y B68	-	1	2	-
	CECT 495 y CECT 496	1	1	2	1
<i>B. thuringiensis</i>	CECT 197 ^T , CECT 4494, CECT 4495	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i>	CECT 4123, CECT 4127 y CECT 4128 ^T	-	2	2	1
	CECT 4125	-	2	2	ND ^a
	CECT4124 y B74	2	6	3	1
	B69	1	1	1	1
<i>B. weihenstephanensis</i>	CECT 5894 ^T	-	2	2	1
<i>B. pseudomycooides</i>	CECT 7065 ^T	-	2	1	ND

⁽¹⁾Combinación de cebadores: F (PCER-F); R1 (PCER-R1); R2 (PCER-R2); R3 (PCER-R3).

^aND, no determinado.

Tabla 8- Caracterización genotípica de las cepas utilizadas en el estudio (perfiles RAPDs y genes de virulencia) y resultados de la amplificación por PCR con los cebadores diseñados.

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Genes de virulencia ⁽²⁾										Perfil ⁽³⁾			Especificidad ⁽⁴⁾		
			hbl	nhe	ces	cytK	pc-plc	pc-plc/sph	clo	entFM	R1	R2	R3					
a) Cepas de referencia "grupo <i>B. cereus</i> " <i>Bacillus cereus</i>	CECT 131	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 148 ^T	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 193	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 495	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 496	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4014	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	CECT 4094	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4387	III	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4989	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 5144	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	CECT 5148	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 5314	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 40	IV	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 197 ^T	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 996	III	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CECT 4454	V	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4494	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4495	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4496	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	CECT 4497	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 7034	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4123	I	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4124	I	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4125	I	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 4126	I	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 8.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Genes de virulencia ⁽²⁾										Perfil ⁽³⁾	Especificidad ⁽⁴⁾				
			hbl	nhe	ces	cyiK	pc-plc	pc-plc/sph	clo	entFM	R1	R2		R3				
Bacillus weihenstephanensi	CECT 4127	I	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
	CECT 4128 ^T	I	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CECT 5894 ^T	I	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	CECT 7065 ^T	I	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+	+
b) Cepas ambientales "grupo B. cereus"⁽¹⁾																		
B. cereus/B.thuringiensis	INRA P21S	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	INRA TZ415	III	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	INRA P2101	III	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B40	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B41	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	B42	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	B43	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B45	III	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B46	VI	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B47	III	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+	+
	B48	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B49	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B50	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B54	III	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B55	III	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B60	VI	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B62	III	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B63	V	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B64	VI	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B65	IV	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B67	III	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B68	IV	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B70	V	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B73	V	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabla 8.- (Continuación).

Especie	Cepa	GT ⁽¹⁾	Genes de virulencia ⁽²⁾										Perfil ⁽³⁾	Especificidad ⁽⁴⁾		
			hbl	nhe	ces	cyfK	pc-plc	pc-plc/sph	clo	entFM	R1	R2		R3		
<i>B. mycoides</i> /B.w./B.pm.	B77	III	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B44	II	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B66	II	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B69	I	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+
	B72	II	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
	B74	II	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+
c) Otras especies del "género <i>Bacillus</i> "																
<i>Bacillus circulans</i>	CECT 10 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	INRA P1198		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus firmus</i>	CECT 14 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus lentus</i>	CECT 18 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	CECT20 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	INRA B2186		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	CECT 4313 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	INRA Z1186		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	CECT 29 ^T		-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	-
	INRA Z2166		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	B51		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	B52		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	B53		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	CECT 33 ^T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 39 ^T		-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	-
	INRA K21101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
d) Especies de otros géneros																
<i>Escherichia coli</i>	CECT 515 ^{nr}		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4031 ^T		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CECT 915 ^T		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 86 ^T		ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-	-

Tabla 8.- (Continuación).

^T, cepa tipo. CECT, Colección Española de Cultivos Tipo. INRA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Francia.

⁽¹⁾GT, genotipado, identificación derivada del genotipado con ISR y RAPDs (Ocio *et al.*, 2002 y Martínez-Blanch *et al.*, 2003): grupo I y II) *B. mycooides*/*B. pseudomycooides*/*B. weihenstephanensis*, grupo III y IV) *B. cereus* y grupo V y IV) *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* .

⁽²⁾Amplificación correspondiente a los cebadores (pb): *hbl* (HD2 F/HA4 R, 1091); *nhe* (NA2 F/NB1 R, 766); *ces* (CesF1/CesR2, 1271); *cytK* (CK F2/CK R5, 421); *pc-plc* (Pf/Pr, 411); *pc-plc* y *sph* (Pf/Cr, 1461); *clo*, (BC-1/BC-2, 185) y *entFM* (EntA/EntB, 1269).

⁽³⁾Perfil toxigénico según agrupamiento UPGMA (Figura 4) resultado de las diferentes combinaciones de la presencia de los diferentes factores de virulencia ensayados.

⁽⁴⁾Especificidad de los cebadores ensayados por PCR convencional: R1) PCER-F y PCER-R1, R2) PCER-F y PCER-R2 y R3) PCER-F y PCER-R3.

^aAmplificación inespecífica de un fragmento de 900 pb.

4.- PCR cuantitativa a Tiempo Real

4.1.- Puesta a punto de la Q-PCR: Sistema SYBR Green

Con el fin de optimizar la reacción de Q-PCR se compararon los valores de C_T obtenidos con las diferentes concentraciones de cebadores ensayadas para 1 ng de DNA molde por reacción (Figura 7), y se comprobó la ausencia de formación de dímeros de cebadores y de amplificaciones inespecíficas mediante el análisis de la curva de disociación. La concentración de 300 nM para cada cebador correspondía al valor de C_T más bajo, por lo que fue seleccionada.

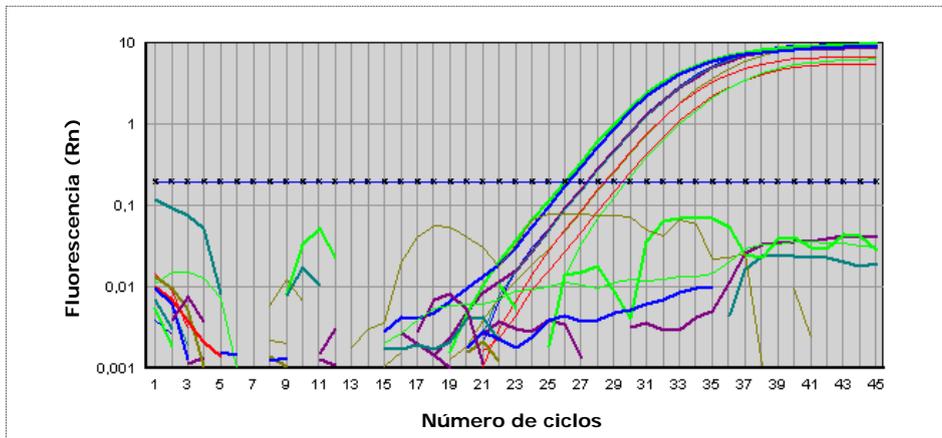


Figura. 7.- Curvas de amplificación obtenidas mediante SYBR Green Q-PCR, utilizando 1 ng de DNA molde, correspondientes a las distintas concentraciones de cebadores ensayadas. De izquierda a derecha, PCER-F/PCER-R3 (C_T correspondiente): 300 nM (26,1); 50 nM/300 nM (27,3); 300 nM/50 nM (28,4) y 50 nM (29,6).

Los ensayos de especificidad se realizaron mediante Q-PCR utilizando como molde 10 ng de DNA y 300 nM de los cebadores PCER-F/PCER-R3. De las 59 cepas del “grupo *B. cereus*” ensaya-

das, el 93 % presentaron valores de C_T de 19.5 ± 1.5 , lo que confirma la validez de los cebadores para la detección de cepas de *B. cereus*. Las cepas de referencia *B. mycooides* CECT 4124, CECT 4125 y CECT 7065^T, y la cepa B74 mostraron valores de C_T fuera del intervalo establecido (30,6, 23,5, 30,0 y 29,6, respectivamente). El análisis de sus secuencias mostró diferencias en la diana de los cebadores, lo que explica los valores más altos de C_T debido a la menor eficacia en la hibridación. Las cepas de otras especies, así como los controles negativos sin DNA molde, presentaron valores de $C_T \geq 40$, por lo que se estableció este C_T como resultado negativo para la presencia de *B. cereus*. Los resultados del análisis de la curva de disociación de los productos de PCR presentaron valores de T_m entre 77,7 °C y 79,2 °C (Figura 8), lo que confirma la amplificación del fragmento esperado, pero indica ligeras variaciones en la secuencia del amplificado entre cepas. Estos resultados ponen de manifiesto que existe una elevada diversidad en la secuencia del gen *pc-plc*.

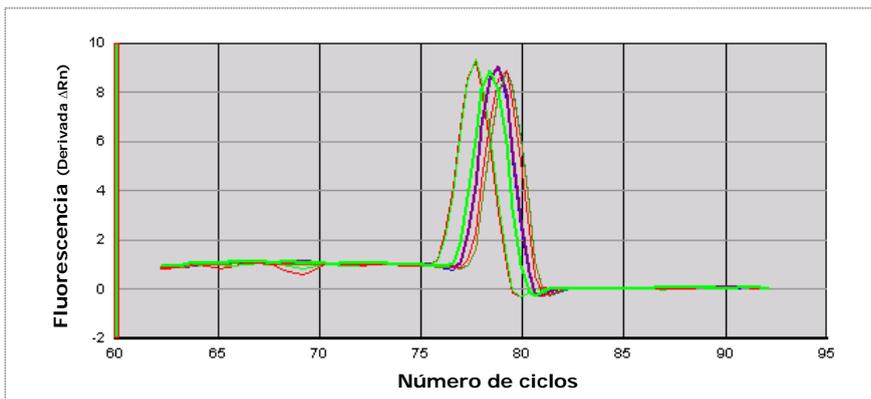


Figura 8.- Análisis de las curvas de disociación (representación gráfica de la derivada de la ΔR_n frente a la temperatura en °C) de los amplificados obtenidos para las cepas de *B. cereus* (T_m): CECT 148^T (78,8 °C), CECT 131 (78,6 °C), CECT 495 (77,7 °C), CECT 4014 (79,2 °C) y CECT 5148 (78,4 °C), que muestra el rango de T_m de las especies del “grupo *B. cereus*”.

4.2.- Puesta a punto de la Q-PCR: Sistema TaqMan

Se ensayaron diferentes concentraciones de la sonda TaqMan BCER-MGB (50,100, 200 y 300 nM) en presencia de 300 nM de los cebadores PCER-F y PCER-R3, concentración óptima en modo SYBR Green, y 1 ng de DNA molde por reacción. El C_T más bajo con una menor concentración de sonda, correspondió a 200 nM, por lo que fue seleccionada como concentración óptima.

A continuación se realizaron los ensayos de especificidad utilizando dichas concentraciones de sonda y cebadores, y 10 ng de DNA molde. El 85 % de las cepas del “grupo *B. cereus*” ensayadas, presentaron un valor de C_T de $21,9 \pm 2$. En el caso de las cepas de referencia *B. mycoides* CECT 4124, CECT 4125 y *B. pseudomycooides* CECT 7065^T y la cepa B74, los valores de C_T fueron de 30,7, 36,9, 28,6 y 30,6, respectivamente, algo mayores que la media como ya se observó en el ensayo con SYBR Green, probablemente debido a diferencias en la secuencia de los cebadores. Sin embargo, no se obtuvo señal de fluorescencia en las cepas de referencia *B. thuringiensis* CECT 4494, CECT 4495 y CECT 7034 y los aislados ambientales B63 y B73 (8 %). En las cepas *B. thuringiensis* CECT 4494 y CECT 4495 se secuenció el amplificado de 1461 pb delimitado por los cebadores Pf/Cr (Tabla 2), que contiene las dianas de los cebadores y la sonda de Q-PCR, y se observó la existencia de, al menos, dos desapareamientos en la secuencia diana de la sonda, lo que explica este resultado. Las cepas de otras especies del género y de otros géneros presentaron valores de $C_T \geq 40,0$ al igual que los controles negativos sin DNA molde, estableciéndose este C_T como resultado negativo para la presencia de miembros del “grupo *B. cereus*”.

4.3.-Recta patrón de cuantificación: SYBR Green y TaqMan

Los resultados de las rectas patrón de cuantificación obtenidas realizadas a partir de DNA purificado, se muestran en la Tabla 9, donde se recoge la media de los valores de C_T para 7 unidades logarítmicas analizadas, cubriendo un rango entre $1,8 \times 10^6$ y 2 equivalentes genómicos por reacción. Las rectas patrón de células se muestran en la Tabla 10, y corresponden a 6 unidades logarítmicas en el caso del sistema SYBR Green para el rango entre $4,4 \times 10^5$ y 5 células por reacción, y de 7 unidades logarítmicas en el sistema TaqMan entre $3,9 \times 10^6$ y 4 células por reacción. Los resultados de cada sistema de Q-PCR de forma independiente, SYBR Green y TaqMan, corresponden a un total de nueve reacciones analizadas en tres ensayos independientes (tres replicados por reacción).

La concentración de DNA o de células se calculó por espectrofluorometría o recuento en placa, respectivamente. Dado que se realizan diluciones decimales seriadas para conseguir los distintos niveles de genomas/células y que se analiza una alícuota de cada una de ellas, se calcularon los niveles de confianza al 95 % mediante Simulación Montecarlo (10^6 repeticiones).

En la Figura 9 se muestran las rectas patrón de cuantificación obtenidas mediante la representación de la media de los valores de C_T , frente a la cantidad de equivalentes genómicos o células utilizadas en cada reacción de Q-PCR para los sistemas SYBR Green y TaqMan.

Tabla 9.- Valores de C_T obtenidos para la construcción de las rectas patrón de cuantificación a partir de diluciones de DNA, utilizando los sistemas SYBR Green y TaqMan.

Equivalentes genómicos ^a	Intervalo de confianza al 95 % ^b		Sistema SYBR Green		Sistema TaqMan	
	inferior	Superior	Ratio ^c	$C_T \pm DE^d$	Ratio	$C_T \pm DE$
$1,8 \times 10^6$	-	-	9/9	$16,82 \pm 0,26$	9/9	$17,97 \pm 0,13$
$1,8 \times 10^5$	184344	186026	9/9	$20,27 \pm 0,27$	9/9	$21,99 \pm 0,22$
$1,8 \times 10^4$	18253	18786	9/9	$23,95 \pm 0,38$	9/9	$25,35 \pm 0,15$
$1,8 \times 10^3$	1768	1937	9/9	$27,51 \pm 0,36$	9/9	$29,25 \pm 0,36$
$1,8 \times 10^2$	159	212	9/9	$30,74 \pm 1,00$	9/9	$32,12 \pm 0,29$
18	11	27	9/9	$34,59 \pm 1,00$	9/9	$35,75 \pm 0,84$
2	0	5	4/9	$36,77 \pm 0,47$	6/9	$38,79 \pm 0,58$

^aCalculados asumiendo que 10 ng de DNA equivalen a $1,8 \times 10^6$ veces el genoma de *B. cereus* y que el gen *pc-plc* es de copia única.

^bIntervalos de confianza al 95 % obtenidos por Simulación Montecarlo.

^cReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^dDesviación estándar.

Tabla 10.- Valores de C_T obtenidos para la construcción de las rectas patrón de cuantificación a partir de suspensiones calibradas de células, utilizando los sistemas SYBR Green y TaqMan.

N° aprox. de células ^a	Intervalo de confianza al 95 % ^b		Sistema SYBR Green		N° aprox. de células	Intervalo de confianza al 95 %		Sistema TaqMan	
	Inferior	superior	Ratio ^c	$C_T \pm DE^d$		Inferior	superior	Ratio	$C_T \pm DE$
$4,4 \times 10^5$	443135	445750	9/9	$18,23 \pm 0,33$	$3,9 \times 10^6$	-	-	9/9	$17,33 \pm 0,16$
$4,4 \times 10^4$	44032	44858	9/9	$22,32 \pm 0,53$	$3,9 \times 10^5$	396266	398733	9/9	$20,44 \pm 0,08$
$4,4 \times 10^3$	4314	4575	9/9	$27,55 \pm 0,50$	$3,9 \times 10^4$	39361	40141	9/9	$24,49 \pm 0,18$
$4,4 \times 10^2$	404	486	9/9	$29,77 \pm 0,41$	$3,9 \times 10^3$	3852	4099	9/9	$28,34 \pm 0,23$
44	32	58	9/9	$32,74 \pm 0,71$	$3,9 \times 10^2$	359	437	9/9	$31,71 \pm 0,32$
5	1	9	9/9	$35,49 \pm 0,88$	39	28	53	9/9	$33,96 \pm 0,33$
					4	1	8	9/9	$35,30 \pm 0,46$

^aNúmero de células cula por recuento en placa.

^bIntervalos de confianza al 95 % obtenidos por Simulación Montecarlo.

^cReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^dDesviación estándar.

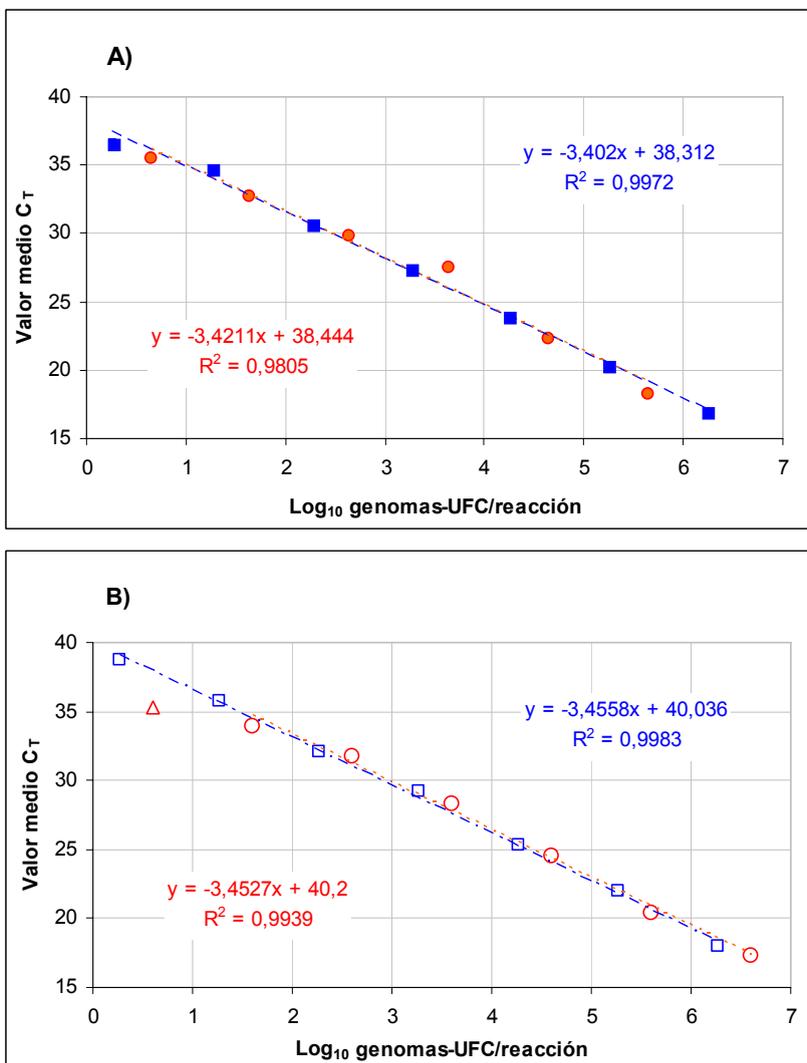


Figura. 9.- Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón, a partir de DNA (■, □) y de células (●, ○) mediante el sistema SYBR Green (A) y TaqMan (B). Δ Valor de C_T no utilizado en el análisis.

El análisis de regresión lineal de los datos obtenidos para las rectas patrón de DNA y células, muestra valores de R^2 cercanos a 1 (0,997 y 0,981 en los ensayos de SYBR Green Q-PCR, y 0,998 y 0,994 en los ensayos TaqMan Q-PCR, respectivamente). Estos resultados indican que las reacciones de amplificación ofrecen una buena linealidad en el intervalo de 10^6 a 1 genomas/células por reacción. Sólo en el ensayo TaqMan con células, el intervalo analizado fue entre 10^6 a 10^1 células por reacción, pues como se observa en la Tabla 10 y en la Figura 9B, el valor medio de C_T obtenido para el nivel de 4 células (35,3) no mantiene la relación lineal respecto del anterior (34,0), por lo que no se tuvo en cuenta para el análisis.

Los valores de las pendientes (s) para las rectas de DNA y células fueron de -3,40 y -3,42 en los ensayos con SYBR Green, y de -3,46 y -3,45 en los ensayos con la sonda TaqMan, valores muy próximos al óptimo teórico de -3,32 (Higuchi *et al.* 1993). La eficiencia de la reacción de PCR (E) fue calculada según describen Knutsson *et al.* (2002) aplicando la fórmula, $E = 10^{-1/s} - 1$. Para las rectas de DNA y células por SYBR Green se obtuvieron eficiencias de 0,97 y 0,96, y en TaqMan Q-PCR de 0,94 y 0,95, respectivamente, valores que demuestran una elevada eficiencia de amplificación y una buena optimización de las condiciones de PCR.

El límite de cuantificación se estableció considerando: i) las concentraciones en las que se mantiene la linealidad de la recta patrón, ii) que el total de replicados analizados fueran positivos y iii) que la desviación estándar fuera inferior a 1. En el caso de DNA correspondió a 18 equivalentes genómicos por reacción tanto para SYBR Green como TaqMan, y en el caso de células a 44 y 39 ufc por reacción, respectivamente. Además, se comprobó que no existía solapamiento entre los intervalos de confianza al 95 % para los valores establecidos como límite de cuantificación, como se observa

en la Tabla 11. Por ejemplo, en el caso del DNA, al valor de detección de 18 genomas /reacción, se asocia el intervalo entre 11 y 27, que se solapa con el intervalo de 4-16 del valor justo inferior de la recta patrón (9), pero no con el intervalo del valor superior (90), el cual comprende entre 74 y 112.

Tabla 11.- Valores obtenidos para establecer el límite de cuantificación utilizando los intervalos al 95 % obtenidos por Simulación Montecarlo.

Recta Patrón DNA		SYBR Green Recta Patrón Células		TaqMan Recta Patrón Células	
Genomas/reacción	Intervalo 95 %	Células/reacción	Intervalo 95 %	Células/reacción	Intervalo 95 %
90	74-112	220	194-252	195	171-226
18 ^a	11-27	44 ^a	32-58	39 ^a	28-53
9	4-16	22	14-32	20	12-29
2	0-5	5	1-9	4	1-8

^aValor establecido como límite de cuantificación.

En cuanto a los niveles de sensibilidad, en los ensayos con SYBR Green y TaqMan fueron de 5 y 4 células en el 100 % de los replicados, y 2 equivalentes genómicos en el 45 % y en el 67 % de los replicados, respectivamente. En base a estos resultados, la detección por Q-PCR es diez veces más sensible que por PCR convencional.

Los resultados de ambos sistemas SYBR Green y TaqMan, muestran una buena correlación entre las cantidades de DNA molde o células y los valores de C_T obtenidos después de la amplificación. El sistema TaqMan Q-PCR presentó valores más bajos de desviación estándar (DE), lo que indica una mayor precisión en la cuantificación. Así mismo, ambos sistemas han mostrado resultados similares en cuanto a sensibilidad y cuantificación. Sin embargo,

debido a la alta diversidad encontrada en la secuencia del gen *pc-p/c*, y con el fin de que el sistema de Q-PCR permita la detección del mayor número posible de especies del “grupo *B. cereus*”, seleccionamos el sistema SYBR Green para los ensayos en alimentos inoculados artificialmente.

4.4.- Aplicación en alimentos

4.4.1.- Ensayos en alimentos contaminados artificialmente: huevo líquido y leche en polvo infantil.

Huevo líquido

En la Tabla 12 quedan recogidos los resultados de cuantificación obtenidos respecto a la recta patrón de DNA y a la recta de células para las muestras de huevo líquido analizadas. Los valores obtenidos a partir de ambas rectas fueron muy similares a los obtenidos en el recuento en placa. Para analizar el grado de coincidencia entre la cuantificación por Q-PCR frente al método de recuento en placa se calculó la exactitud relativa ($ER (\%) = (\text{valor del recuento} / \text{valor Q-PCR}) \times 100$), expresada en porcentaje (ISO 14160:2003). Una ER del 100 % entre los valores del método alternativo (Q-PCR) frente al método de referencia (recuento en placa) indica una total coincidencia. Los valores de exactitud relativa obtenidos para la recta de cuantificación de DNA mostraban valores entre 86 % y 113 %, y en el caso de la recta de células entre 90 % y 116 %, en ambos casos para un intervalo entre 10^1 a 10^5 células o genomas por reacción. Estos valores se consideran aceptables para cuantificación por Q-PCR, y por tanto ambas aproximaciones son adecuadas para estimar la cantidad de *B. cereus* presente en huevo líquido.

El análisis de regresión de los valores de C_T frente al logaritmo decimal de la concentración de células reveló un valor de pendiente de -3,40, correspondiendo a una eficiencia de la reacción de PCR de 0,96 y una R^2 de 0,999. Estos valores muestran una eficiencia igual a la obtenida en ausencia de la matriz alimentaria, llegándose a detectar 4 células en el 89 % de los replicados (8 de 9 reacciones, Tabla 12). No obstante, la desviación estándar de los valores de C_T correspondientes a este nivel de células era superior a 1 (Tabla 12). Este resultado confirma que el límite de cuantificación de la reacción de Q-PCR en el alimento también es de un orden logarítmico (40 células en este caso, 50 células en el ensayo sin matriz alimentaria).

Tabla 12.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR en huevo líquido contaminado artificialmente.

Nº aprox. de células	Ratio ^a	Valores C_T	Recta de DNA		Recta de células	
		Media \pm DE ^b	cuantificación	ER ^c (%)	cuantificación	ER (%)
4×10^5	9/9	19,34 \pm 0,48	$3,9 \times 10^5$	96,92	$3,8 \times 10^5$	95,96
4×10^4	9/9	22,70 \pm 0,26	$4,0 \times 10^4$	99,72	$4,0 \times 10^4$	99,99
4×10^3	9/9	26,13 \pm 0,23	$3,9 \times 10^3$	97,84	$4,0 \times 10^3$	99,40
4×10^2	9/9	29,32 \pm 0,28	$4,5 \times 10^2$	112,94	$4,6 \times 10^2$	116,12
40	9/9	33,12 \pm 0,52	36	86,27	36	89,98
4	8/9	36,26 \pm 1,45	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bDesviación estándar.

^cExactitud relativa, ER (%) = (valor del recuento/valor Q-PCR) x 100.

^dValores por debajo del límite de cuantificación establecido para la reacción.

Leche en polvo infantil

Los resultados de Q-PCR obtenidos a partir de las muestras de leche en polvo infantil inoculadas con diferentes concentraciones de células se presentan en la Tabla 13. Los niveles de células obtenidos a partir de ambas rectas fueron muy similares entre ellos y, aunque

se aproximaban a los del recuento en placa, los valores de exactitud relativa diferían entre un 59 % y un 12 % del valor óptimo teórico del 100 %. Estos resultados indican que en la leche en polvo infantil existe interferencia en la cuantificación debida a la matriz, a diferencia del ensayo en huevo líquido.

En el análisis de regresión se obtuvo un valor de pendiente de -3,61 correspondiente a una eficiencia de la reacción de PCR (E) de 0,89 y una R^2 de 0,989. En este caso se llegaron a detectar 2 células en el 100 % de los replicados, aunque se observó una elevada desviación estándar entre los valores de C_T correspondientes a esta concentración. Al igual que en el ensayo en huevo líquido no se consideró para cuantificación y, de nuevo, confirma el límite de cuantificación establecido, siendo en este caso 16 células (Tabla 13). No obstante, el valor de la pendiente ligeramente inferior indica la interferencia de la matriz en la cuantificación.

Tabla 13.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR en leche en polvo infantil contaminada artificialmente.

Nº aprox. de células	Ratio ^a	Valores C_T Media \pm DE ^b	Recta de DNA		Recta de células	
			cuantificación	ER ^c (%)	cuantificación	ER (%)
$1,5 \times 10^6$	4/4	$16,62 \pm 0,36$	$2,4 \times 10^6$	153,95	$2,4 \times 10^6$	155,01
$1,5 \times 10^5$	4/4	$20,00 \pm 0,68$	$2,4 \times 10^5$	155,73	$2,5 \times 10^5$	158,82
$1,5 \times 10^4$	4/4	$23,89 \pm 0,80$	$1,7 \times 10^4$	111,74	$1,8 \times 10^4$	115,64
$1,5 \times 10^3$	4/4	$28,65 \pm 0,75$	$6,9 \times 10^2$	44,64	$7,3 \times 10^2$	47,04
155	4/4	$31,77 \pm 0,63$	84	54,03	90	57,61
16	4/4	$33,80 \pm 0,97$	23	137,22	23	147,43
2	4/4	$34,56 \pm 1,53$	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bDesviación estándar.

^cExactitud relativa, ER (%) = (valor del recuento/valor Q-PCR) x100.

^dValores por debajo del límite de cuantificación establecido para la reacción.

4.4.2.-Análisis de alimentos con contaminación natural

El sistema de PCR desarrollado se aplicó en alimentos con contaminación natural que se analizaron, bien directamente o tras un enriquecimiento, por PCR convencional y Q-PCR. En la Tabla 14 se muestran los resultados de la detección por PCR convencional, Q-PCR SYBR Green, recuento en placa y/o aislamiento e identificación.

Tabla 14.- Detección de *B. cereus* en alimentos con contaminación natural, directamente o con enriquecimiento, por PCR convencional, Q-PCR y métodos tradicionales.

Alimento	PCR convencional ^a	SYBR Green Q-PCR (genomas/g) ^b	Métodos tradicionales	Identificación API
I.- Sin enriquecimiento				
Papilla 8 cereales	++	209	30 ufc/g	<i>B. cereus</i> 1
Crema de Arroz	+++	3,5 x 10 ³	210 ufc/g	<i>B. cereus</i> 1
Harina de trigo	+	+ ^c	< 10 ufc/g	-
II.- Con enriquecimiento				
Arroz con leche	++++	ND ^d	Presencia	<i>B. cereus</i> 2
Arroz con leche	++++	ND	Presencia	"grupo <i>B. cereus</i> "
Arroz con leche	++++	Aprox. 10 ⁷	Presencia	"grupo <i>B. cereus</i> "
Canela en polvo	+++	Aprox. 10 ⁴	Presencia	<i>B. cereus</i> 2

^aIntensidad del producto de amplificación detectado por electroforesis en gel de agarosa.

^bCuantificación a partir de la recta patrón de DNA.

^cFuera del rango de cuantificación.

^dNo determinado.

Todas las muestras analizadas fueron positivas por PCR convencional y en todos los casos se confirmó la presencia de *B. cereus* mediante aislamiento e identificación de colonia, excepto en la harina de trigo. Cabe destacar que, en este caso, por PCR convencional se obtuvo una banda de amplificación muy débil, y por Q-PCR un C_T fuera del rango de cuantificación, lo que explicaría su

presencia en un nivel por debajo del límite de detección por recuento en placa.

En la muestra “Papilla de 8 cereales” y “Crema de arroz” los valores de cuantificación de SYBR Green fueron un orden logarítmico superior que los obtenidos por recuento en placa. Cabe señalar que son alimentos con espesantes y compuestos bacteriostáticos que reducen la a_w del medio y pueden incluso impedir el crecimiento bacteriano o la germinación de esporas, lo que explicaría esta diferencia.

5.- Ensayos con suspensiones de esporas de *B. cereus*

5.1.- Tratamientos con diferentes germinantes

El estudio del proceso de germinación en las especies del “grupo *B. cereus*” se abordó a partir del protocolo descrito en la bibliografía para cepas de *B. cereus* por Clements y Moir (1998), que consistía en una activación térmica (70 °C, 30 min) seguida de una incubación a 37 °C durante 30 min con soluciones de germinación de diferente concentración de L-alanina. En la Figura 10 se muestra el comportamiento de las seis especies estudiadas monitorizado por la disminución de la refringencia de las esporas como indicador del inicio del proceso de germinación, frente a las diferentes soluciones de germinadores seleccionadas y descritas por otros autores: a) 100 mM de L-alanina (Collado *et al.*, 2006), b) 25 mM L-alanina y 1 mM inosina (De Vries *et al.*, 2004) y c) 0,5 mM de L-alanina y 0,5 mM de inosina (De Vries *et al.*, 2005). Se puede observar que las diferentes cepas han mostrado comportamientos particulares de germinación.

La cepa *B. cereus* CECT 148^T se caracterizó por una germinación rápida alcanzando una reducción de absorbancia hasta un valor del 45 % en los primeros 10 min con cualquiera de las soluciones de germinadores empleadas. Sin embargo, la cepa *B. cereus* CECT 131 mostró una germinación más lenta y diferentes respuestas a los tratamientos empleados, resultando la combinación “c” la más eficaz. La solución de germinación “a” no tuvo efecto en la cepa *B. thuringiensis* CECT 197^T, ni en *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T. En esta última especie, las combinaciones “b” y “c” mostraron ser las más eficaces. En *B. thuringiensis* CECT 197^T, la combinación “c” mostró la mayor eficacia. *B. mycoides* CECT 4128^T únicamente presentó germinación con la combinación “c”. En *B. pseudomycoides* CECT 7065^T, la influencia de las 3 soluciones en la germinación fue diferente, produciéndose un mayor efecto con la solución “c”.

La mejor combinación para el conjunto de cepas ensayadas resultó ser la solución “c” que produjo la mayor reducción de absorbancia en un tiempo menor.

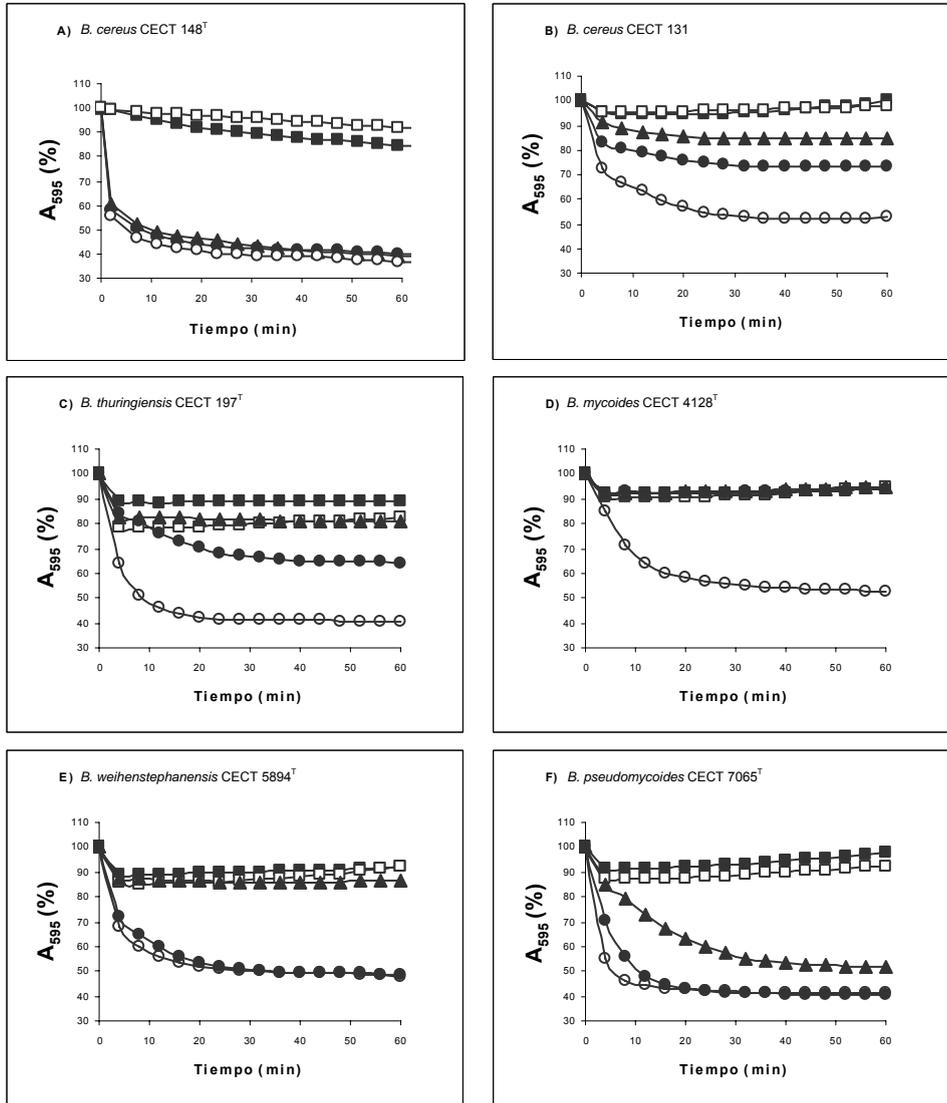


Figura 10.- Cinética de germinación en las cepas *B. cereus* CECT 148^T (A), *B. cereus* CECT 131 (B), *B. thuringiensis* CECT 197^T(C), *B. mycoides* CECT 4128^T (D), *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T (E) y *B. pseudomycooides* CECT 7065^T (F), para las condiciones ensayadas: ■) control (sin ningún tratamiento), □) activación térmica (30 min a 70 °C), ▲) act. térmica y germinación con 100 mM de L-alanina, ●) act. térmica y 25 mM L-alanina y 1 mM inosina, y ○) act. térmica y 0,5 mM L-alanina y 0,5 mM inosina.

5.2.- Aislamiento de DNA genómico

Con el fin de optimizar el aislamiento de DNA a partir de esporas, se empleó la cepa *B. cereus* CECT 148^T, de la que se prepararon suspensiones calibradas de esporas que se sometieron a diferentes combinaciones de tratamientos térmicos y de germinación previos al procedimiento de extracción por Qiagen. En cuanto a la germinación se ensayó la solución “c” seleccionada según los resultados del apartado anterior, y se combinó con 2 tratamientos térmicos: G-1) 70 °C durante 30 min, utilizado en el apartado de germinación, y G-2) 80 °C durante 10 min, tratamiento utilizado en métodos tradicionales para el recuento de esporulados. Como tratamientos térmicos se ensayaron los utilizados en la activación térmica de las esporas, 70 °C durante 30 min, (T-1) y 80 °C durante 10 min, (T-2) y tratamientos térmicos drásticos para la ruptura de cubiertas de las esporas, 100 °C durante 10 min (T-3) y 121 °C (1 atm.), 20 min (T-4). En paralelo se analizó una muestra control, sin ningún tipo de tratamiento previo al aislamiento del DNA, siguiendo el protocolo de Qiagen.

Para estimar con mayor precisión la cantidad de DNA obtenido a partir de las suspensiones de esporas se empleó el método espectrofluorimétrico comercial “Quant-iT PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit” (Molecular Probes), y Q-PCR con SYBR Green I, utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3.

En la Figura 11 se muestra el resultado del ensayo de amplificación por PCR convencional a partir del DNA obtenido con diferentes tratamientos térmicos. Como se observa, el producto de amplificación de 144 pb aparecía en todos los casos, aunque se aprecia una menor amplificación en el T-4, indicando probablemente daño físico por rotura del DNA como consecuencia del drástico tratamiento térmico.

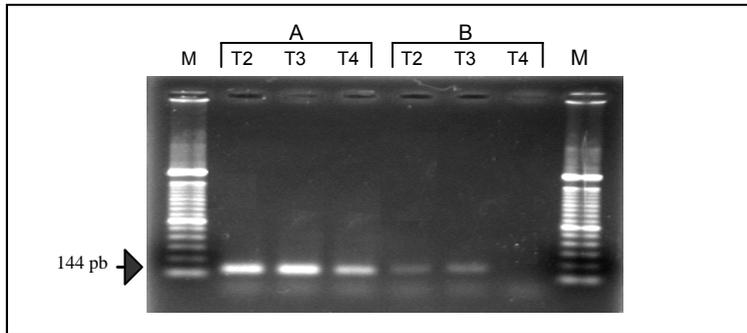


Figura 11.- Productos de la amplificación por PCR convencional, utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3, y como molde el DNA obtenido mediante extracción con Qiagen (A), y una dilución 10^{-3} del mismo (B), para los tratamientos ensayados: **T-2)** 80 °C, 10 min; **T-3)** 100 °C, 10 min y **T-4)** 121 °C (1 atm.), 20 min. M, marcador de pesos moleculares (escala de 100 pb).

En la Figura 12 se muestran los resultados de cuantificación obtenidos con los 2 métodos ensayados. Sorprendentemente, observamos un buen nivel de recuperación de DNA en la muestra control, es decir, a partir de suspensiones de esporas siguiendo el protocolo de extracción de Qiagen. Cabe destacar que este procedimiento incluye una incubación de 30 min a 37 °C con lisozima (descrita en la bibliografía como posible germinante) y 30 min a 70 °C con proteinasa K, combinando un tratamiento térmico con una lisis proteica. Ambos pasos favorecen, como se observa en la muestra control, la recuperación de DNA de esporas.

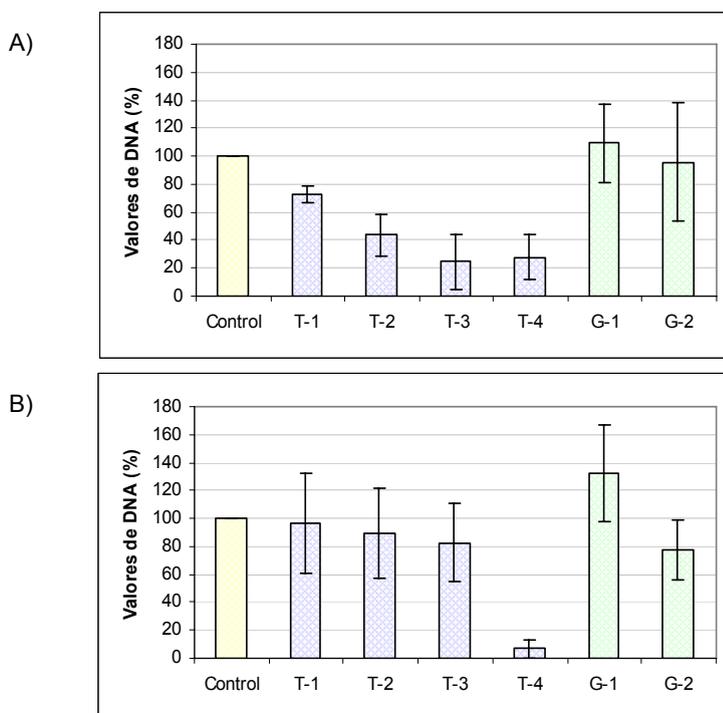


Figura 12.- Rendimiento de la extracción de DNA (%) respecto a la muestra control, estimado mediante “PicoGreen” (A) y SYBR Green Q-PCR utilizando los cebadores PCER-F/PCER-R3 (B) para los tratamientos ensayados: **Control**, sin tratamiento; **T-1)** tratamiento térmico, 70 °C, 30 min; **T-2)** 80 °C, 10 min; **T-3)** 100 °C, 10 min; **T-4)** 121 °C (1 atm.), 20 min, **G-1)** activación 70 °C, 30 min previo a la germinación y **G-2)** activación 80 °C, 10 min y germinación. Los resultados corresponden a los valores medios de tres ensayos independientes.

No obstante, al comparar los resultados obtenidos con los dos métodos de cuantificación del DNA, se observa que ambos coinciden en que de los tratamientos ensayados el de mayor rendimiento fue el G-1. El resto de tratamientos mostraron un rendimiento relativo similar, excepto en el caso de los T-3 y T-4, en que la diferencia entre ellos fue inferior al 5 % por “Picogreen” y fue de un 70 % por Q-PCR. Los resultados de la PCR convencional y Q-PCR para estos

tratamientos son coincidentes, y sugieren que la calidad del DNA para PCR en la muestras del tratamiento T-4 es peor que en el resto de muestras analizadas.

Los resultados de la cuantificación por Q-PCR se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA), para la comparación de medias entre los tratamientos. Para un nivel de confianza del 95 % se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos T-4, que resultó el menos eficiente, y G-1 que presentó mayor rendimiento en la recuperación de DNA (Figura 13). Aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de activación térmica T-1, T-2 y T-3, el T-1 presentó valores más elevados, con ambos métodos de cuantificación.

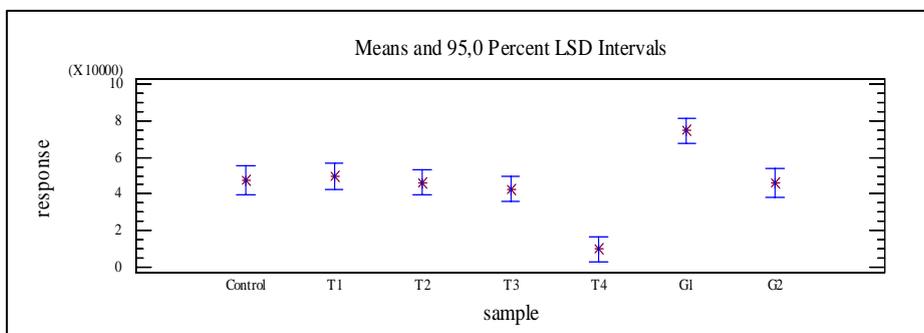
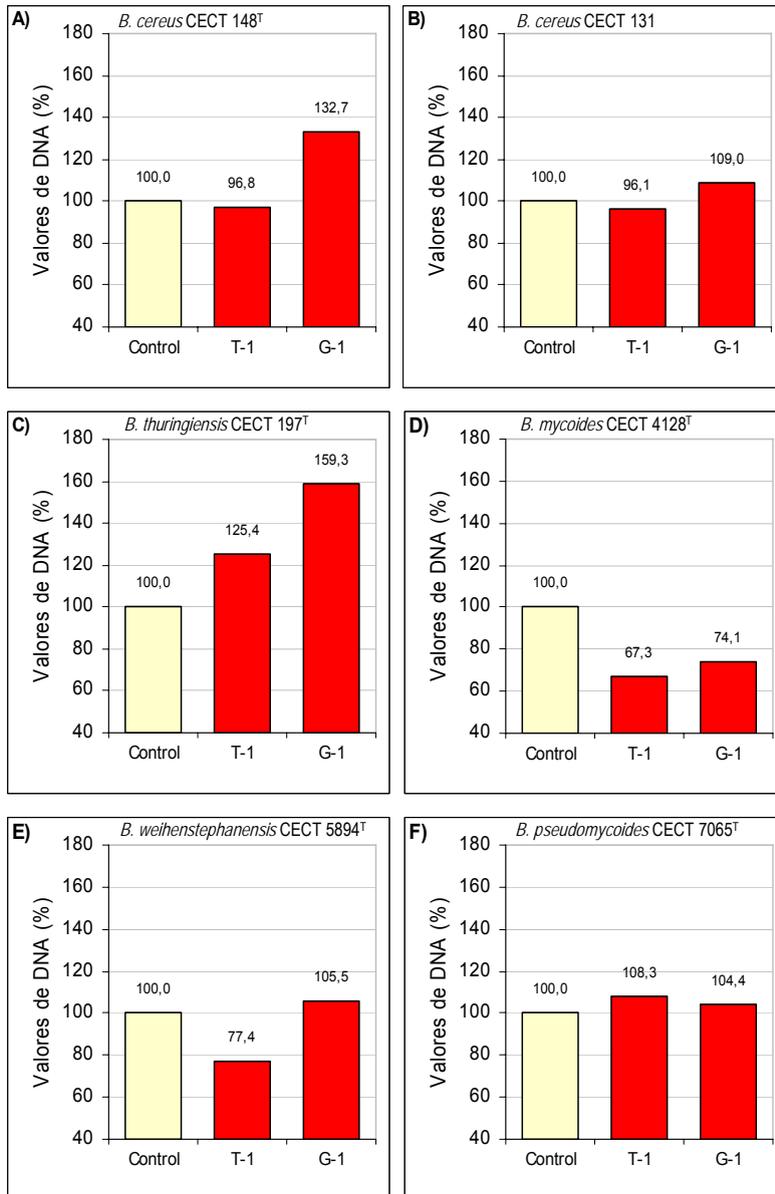


Figura 13.- Representación gráfica LSD (“Least Significant Difference”) del análisis de la varianza para los diferentes tratamientos analizados: **Control**, sin tratamiento; **T-1)** tratamiento térmico, 70 °C, 30 min; **T-2)** 80 °C, 10 min; **T-3)** 100 °C, 10 min; **T-4)** 121 °C (1 atm.), **G-1)** activación 70 °C, 30 min previo a la germinación y **G-2)** activación 80 °C 10 min y germinación.

Se ensayaron a continuación en las otras especies los tratamientos que habían presentado mayor rendimiento en la extracción de DNA en la cepa *B. cereus* CECT 148^T, T-1 (activación térmica) y G-1

(activación térmica más germinación), para evaluar su efectividad a nivel de “grupo *B. cereus*”. Los resultados aparecen en la Figura 14.



Leyenda en página siguiente.

Figura 14.- Rendimiento de los procedimientos ensayados en la extracción de DNA (%) respecto a la muestra control, estimado mediante SYBR Green Q-PCR para distintas especies del “grupo *B. cereus*”. **Control**, sin tratamiento; **T-1**) activación térmica, 70 °C, 30 min; **G-1**) activación 70 °C, 30 min y germinación con 0.5 mM de L-alanina y 0.5 mM inosina a 37 °C durante 30 min.

El tratamiento G-1 (activación térmica, 70 °C durante 30 min, y germinación con 0.5 mM de L-alanina y 0.5 mM inosina a 37 °C durante 30 min) fue el más eficiente en *B. thuringiensis* CECT 197^T, *B. cereus* CECT 148^T y *B. cereus* CECT 131, en este orden, y prácticamente igual que el control en *B. weihenstephanensis* CECT 5894^T y *B. pseudomycooides* CECT 7065^T.

5.3.- Aplicación en alimentos inoculados artificialmente

Con el fin de establecer un procedimiento adaptado al análisis rutinario de alimentos y, dado que el método de Qiagen resultó eficaz para la extracción de DNA, incluso sin tratamiento previo adicional, se valoró la posibilidad de su utilización directamente. Para ello se prepararon diluciones decimales seriadas de esporas en SST y se extrajo el DNA tanto mediante Qiagen directamente, como aplicando previamente el tratamiento G-1. La cuantificación se realizó mediante SYBR Green Q-PCR. A continuación se analizaron muestras de huevo líquido y leche en polvo infantil contaminadas artificialmente en paralelo, a partir de suspensiones de esporas conteniendo entre 1 y 10⁵ esporas/ml. La extracción del DNA se realizó igualmente por el método de Qiagen, con y sin el tratamiento previo G-1.

En las Tablas 15 y 16 se muestran los valores medios de C_T obtenidos para dos ensayos independientes. Los resultados indican la detección de hasta 3-4 esporas por reacción. En el ensayo con SST se observó que la cuantificación por interpolación en la curva

patrón de DNA para los diferentes niveles ensayados, en general era superior al valor estimado por recuento en placa. Este resultado se explica porque el recuento en placa sólo cuantifica las esporas que han conseguido germinar y crecer, o por la infravaloración producida debido a la formación de agregados de esporas en el alimento.

Tabla 15.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR a partir de suspensiones de esporas, utilizando el método Qiagen para la extracción del DNA, con y sin el tratamiento previo G-1.

Approx. N° of spores	Qiagen			G-1 + Qiagen		
	Ratio ^a	C _T ± S.D. ^b	Cuantification ^c	Ratio	C _T ± S.D.	Cuantification
2,6 x 10 ⁴	4/4	21,85 ± 0,08	22257	4/4	21,67 ± 0,35	24933
2,6 x 10 ³	4/4	24,77 ± 0,08	3344	4/4	24,75 ± 0,16	3388
2,6 x 10 ²	4/4	28,89 ± 0,92	231	4/4	28,38 ± 0,35	321
26	4/4	31,39 ± 0,53	46	4/4	30,85 ± 0,59	65
3	4/4	32,05 ± 0,58	30	4/4	33,34 ± 1,25	13

^aPositive signals/ total reactions.

^bStandar Desviation.

^cCuantificación obtenida por interpolación en la recta patrón de DNA.

Tabla 16.- Cuantificación de *B. cereus* por SYBR Green Q-PCR a partir de alimentos inoculados con esporas, utilizando el método Qiagen para la extracción del DNA, con y sin el tratamiento previo G-1.

	Nº aprox. de esporas	Qiagen		G-1 + Qiagen	
		Ratio ^a	C _T ± DE ^b	Ratio	C _T ± DE
huevo líquido	2,9 x 10 ⁴	4/4	21,49 ± 0,20	4/4	30,92 ± 1,17
	2,9 x 10 ³	4/4	25,69 ± 0,11	4/4	27,96 ± 1,00
	2,9 x 10 ²	4/4	29,99 ± 1,14	4/4	26,92 ± 0,30
	29	4/4	31,45 ± 0,56	4/4	37,75 ± 0,63
	3	4/4	32,19 ± 0,53	4/4	30,43 ± 0,48
leche en polvo	3,4 x 10 ⁴	4/4	22,51 ± 0,17	4/4	23,58 ± 0,19
	3,4 x 10 ³	4/4	25,80 ± 0,26	4/4	26,14 ± 0,36
	3,4 x 10 ²	4/4	29,28 ± 0,28	4/4	29,52 ± 0,73
	34	4/4	32,56 ± 0,53	4/4	32,33 ± 0,54
	4	4/4	33,79 ± 0,63	4/4	33,96 ± 1,85

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bDesviación estándar.

La Tabla 17 muestra la comparación de los resultados de los análisis de regresión obtenidos de los ensayos con suspensiones de esporas y con esporas inoculadas en huevo líquido y leche en polvo infantil, en cuanto a la extracción de DNA a partir de las esporas, con Qiagen directamente o con el tratamiento previo G-1.

En el ensayo con suspensiones de esporas se observaron valores de pendiente similares con Qiagen y G1+Qiagen: -3,27 y -3,12, respectivamente, y próximos al óptimo teórico -3,32. Estos valores muestran buena correlación con los del recuento en placa y, como se observa por los valores de *E*, una elevada eficacia en la

amplificación, siendo ligeramente mejor en el caso de la extracción directamente con Qiagen. En los ensayos con alimentos inoculados, huevo líquido y leche en polvo infantil, se observaron valores más próximos al óptimo teórico con el método de Qiagen (-3,42 y -3,36, respectivamente) que empleando el tratamiento G-1 previamente. En todos los casos se obtuvo una $R^2 = 0,99$, lo que indica una buena linealidad de amplificación para el intervalo en estudio, excepto en el ensayo con huevo líquido utilizando el tratamiento previo G-1, en el que los valores de R^2 (0,26) y s (-1,95) indican que no hay correspondencia entre el número de esporas inoculado y el valor de C_T , en el intervalo de concentraciones ensayadas.

Tabla 17.- Resultados de los análisis de regresión correspondientes a los ensayos con suspensiones de esporas, esporas inoculadas en huevo líquido y en leche en polvo infantil recogidos en las Tablas 15 y 16.

Ensayo	Qiagen			G-1 + Qiagen		
	s^a	E^b	R^2	s	E	R^2
Susp. esporas	-3,27	1,02	0,992	-3,12	1,09	0,995
Leche en polvo	-3,36	0,98	0,999	-2,96	1,17	0,997

^a s , pendiente obtenida en el intervalo de 10^4 a 10^7 esporas por reacción.

^b E , eficiencia de amplificación ($E = 10^{-1/s} - 1$).

El método Qiagen para la extracción de DNA ha funcionado satisfactoriamente sin necesidad de tratamiento previo en los alimentos analizados, huevo líquido y leche en polvo infantil, para los niveles de contaminación ensayados. Probablemente esto se debe a que incluye una incubación de 30 min a 37 °C en presencia de lisozima que facilita la ruptura de la pared celular y permite iniciar la germinación.

6.- PCR cuantitativa a tiempo real con transcripción inversa

6.1.- Aislamiento de RNA total

De los tres métodos comerciales ensayados para la recuperación del RNA a partir de células de *B. cereus* CECT 148^T, el denominado “Total Quick RNA Cells & Tissues” (Talent) recuperó mayor proporción de RNA de pequeño tamaño (RNA mensajero) y menor DNA genómico, como se observa en la Figura 15. A continuación, y tras comprobar la presencia de DNA, mediante amplificación por PCR convencional, se procedió a realizar un tratamiento con DNasa I (Takara).

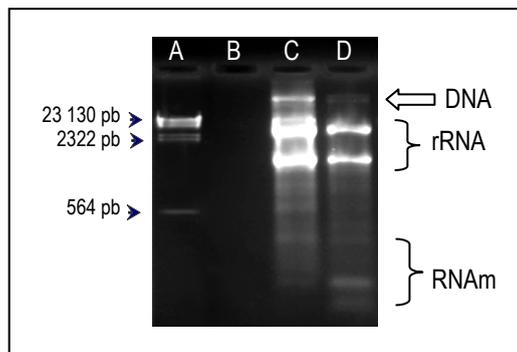


Figura 15.- Electroforesis de RNA total aislado con tres métodos comerciales: A) Marcador de peso molecular, DNA del fago lambda digerido con *HindIII* (Gibco); B) “UltraClean[®] Microbial RNA Kit” (Mo Bio, Laboratories); C) “RNeasy[®] Mini kit” (Qiagen); D) “Total Quick RNA Cells & Tissues kit” (Talent).

6.2.- Optimización del tratamiento con DNasa I

Con el fin de establecer un procedimiento para la eliminación del DNA residual de las muestras de RNA, se ensayaron los

tratamientos descritos en el apartado 9.1 de Material y Métodos (pág. 65), y a continuación se sometieron a análisis por PCR convencional y Q-PCR para evaluar la eficacia de eliminación del DNA. Con el tratamiento “b” (0,5 U/0,5 µg de RNA, 30 min a 37 °C), se obtuvo amplificación por Q-PCR por lo que fue descartado. Con los tratamientos “a”, “c” y “d” (0,5 U /0,5 µg de RNA, 60 min, a 37 °C; 1 U/0,5 µg de RNA, 30 min a 37 °C y 2 U/0,5 µg de RNA, 30 min a 37 °C, respectivamente), no se obtuvo amplificación. Se seleccionó el tratamiento “a”, ya que aseguraba la ausencia de DNA utilizando una menor concentración de DNasa I.

6.3.- Q-RT-PCR: Sistema SYBR Green

Tal y como se ha especificado en el apartado 9.2 de Material y Métodos (pág. 65), para desarrollar el sistema de Q-RT-PCR en modo “one-step”, en primer lugar se emplearon las condiciones optimizadas para la Q-PCR (SYBR Green MasterMix y 300 nM de cada cebador), incorporando 6 U de “MultiScribe® Reverse Transcriptase enzyme” (Applied Biosystems) para un volumen final de 25 µl, y como molde 20 ng de RNA previamente sometidos al tratamiento con DNasa I. El análisis de la curva de disociación mostró la presencia de un pico ($T_m = 82,0$ °C) que no correspondía con lo esperado según lo obtenido por Q-PCR, por lo que fue secuenciado. La secuencia obtenida se analizó con la herramienta informática BLAST del NCBI. Dicha secuencia presentó un alto grado de similitud con la secuencia del gen de RNAr 16S de diferentes cepas de *B. cereus*. Se comprobó con el programa Primer Express, que la longitud total de la secuencia del amplificado era de 90 pb y que presentaba una $T_m = 81$ ° C. Además, el análisis de la secuencia reveló las coincidencias con los 5 primeros nucleótidos del extremo 3' del cebador PCER-R3 y de los 6 primeros nucleótidos del extremo 3' del cebador PECER-F (Figura 16). Ello permitía la hibridación del

cebador reverse en el RNA ribosómico 16S y del directo en el cDNA, llevando a la amplificación del fragmento inespecífico. Esta situación podría explicarse debido a la mayor proporción de RNA ribosómico frente al RNA mensajero y a las condiciones poco restrictivas de la reacción: una temperatura para la transcripción inversa de 48 °C y una alta concentración de MgCl₂ (MasterMix).

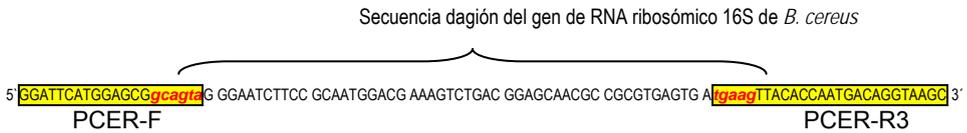


Figura 16.- Secuencia del producto de amplificación de $T_m = 82$ °C obtenido por Q-RT-PCR. Se indican los nucleótidos que coinciden con los cebadores PCER-F y PCER-R, específicos de *B. cereus* y dirigidos al gen *pc-plc*.

Para evitar esta amplificación inespecífica se procedió a una optimización en RT-PCR y Q-RT-PCR, ensayándose diferentes concentraciones de MgCl₂. El análisis de la curva de disociación permitió establecer las condiciones más favorables (2,5 mM MgCl₂) para obtener mayor especificidad de amplificación para el producto deseado ($T_m = 79,8$ °C) y menor formación de dímeros de cebadores (Figura 17). Una vez fijada la concentración de MgCl₂, se realizó de nuevo la titulación de los cebadores confirmándose que 300 nM era la óptima, presentando el valor de C_T mas bajo para el nivel de DNA molde utilizado, lo que indica mayor eficiencia en la amplificación.

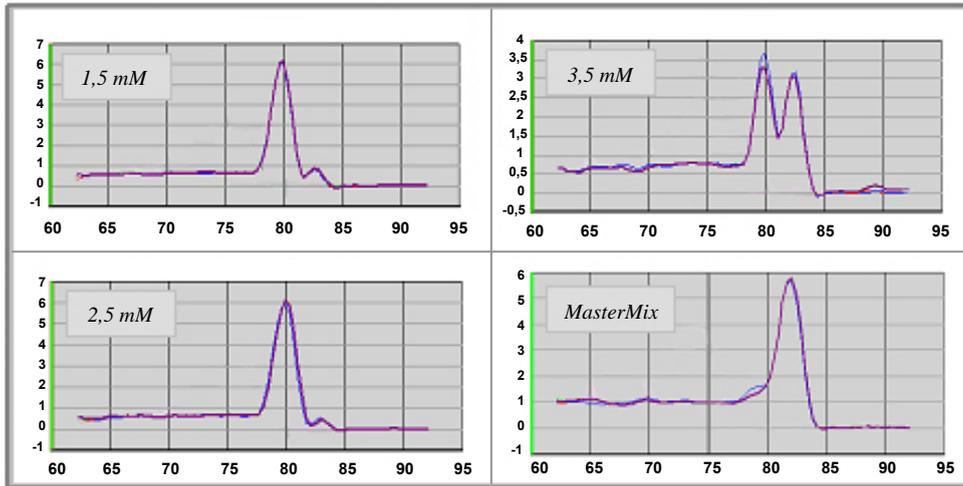


Figura 17.- Optimización de la reacción de Q-RT-PCR en modo SYBR Green, curvas de disociación de los amplificadores obtenidos a diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (representación grafica de la derivada de la ΔRn frente a la temperatura en $^{\circ}C$).

6.4.- Q-RT-PCR: Sistema TaqMan

Dado que, incluso tras la optimización de las concentraciones de $MgCl_2$ y cebadores en el análisis de disociación, aparecía el pico de T_m de la amplificación inespecífica, se optó por el sistema TaqMan utilizándose la sonda MGB previamente diseñada para este gen. De este modo se pretendía aumentar la especificidad y evitar interferencias en la cuantificación final debidas a la fluorescencia emitida por amplificaciones inespecíficas. La titulación de la sonda para ser utilizada en Q-RT-PCR mostró que los valores de C_T más bajos se obtenían con la concentración de 50 mM y la concentración de cebadores de 300 nM.

La recta patrón de cuantificación se obtuvo representando gráficamente la media de los valores de C_T correspondientes a dos ensayos independientes, frente a la cantidad de células utilizadas en

cada reacción de Q-RT-PCR, estimada por recuento en placa (Figura 18). Los valores cubrían un rango de 5 unidades logarítmicas ($2,9 \times 10^5$; $2,9 \times 10^4$; $2,9 \times 10^3$; 298 y 30 ufc por reacción). También se estimó la cantidad de RNA total a partir de la cuantificación espectrofluorimétrica con “Ribogreen” de la muestra más concentrada (Tabla 18).

El análisis de regresión lineal de los datos de la recta patrón para la Q-RT-PCR ofrece un valor $s = -3,66$ cercano al valor óptimo, que corresponde a una eficiencia $E = 0,88$ y un valor de $R^2 = 0,99$. Estos resultados indican que la Q-RT-PCR desarrollada muestra una buena linealidad de amplificación para 5 órdenes de magnitud, obteniéndose un nivel de detección de aproximadamente 30 células viables de *B. cereus* por reacción (Figura 18 y Tabla 18).

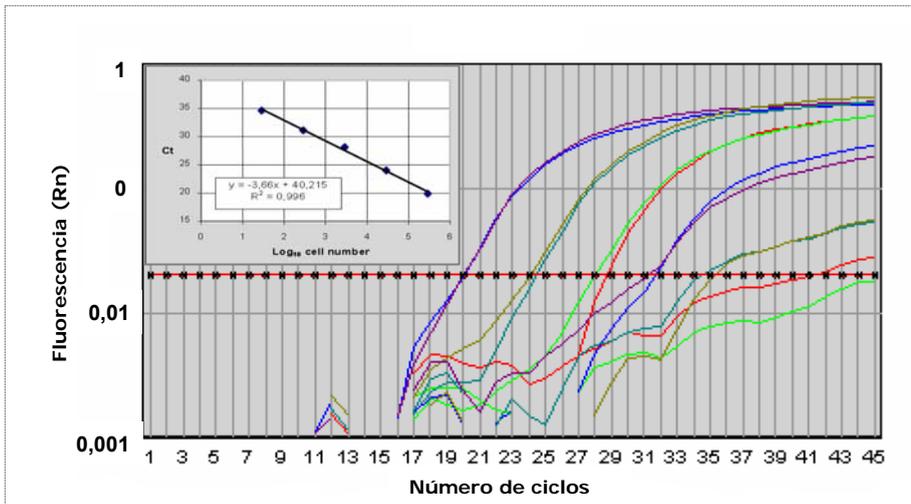


Figura 18.- Curvas de amplificación obtenidas mediante TaqMan Q-RT-PCR para las diferentes concentraciones de células ensayadas (ufc/reacción). De izquierda a derecha: $2,98 \times 10^5$; $2,98 \times 10^4$; $2,98 \times 10^3$; $2,98 \times 10^2$; $2,98 \times 10$. En el gráfico insertado se muestra el análisis de regresión lineal entre el número de células (expresado en \log_{10}) y el C_T (media de dos replicados).

Tabla 18.- Curva patrón para cuantificación de células viables de *B. cereus* mediante TaqMan Q-RT-PCR. Se indica el número de células por reacción y la cantidad de RNA total correspondiente, estimada por cuantificación espectrofluorimétrica con Ribogreen a partir de la muestra más concentrada.

RNA total (pg/reacción)	Nº de células (ufc/reacción)	Ratio ^a	Intervalo de confianza al 95 % ^b		Valores C _T Media ± DE ^c
			Inferior	superior	
3,9 x 10 ⁴	2,98 x 10 ⁵	4/4	297012	299146	19,89 ± 0,19
3,9 x 10 ³	2,98 x 10 ⁴	4/4	29470	30147	24,01 ± 0,36
390	2,98 x 10 ³	4/4	2875	3088	28,13 ± 0,37
39	298	4/4	265	332	31,11 ± 0,43
3,9	30	4/4	20	41	34,63 ± 0,57

^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bIntervalo de confianza al 95 % obtenidos obtenido mediante Simulación Montecarlo.

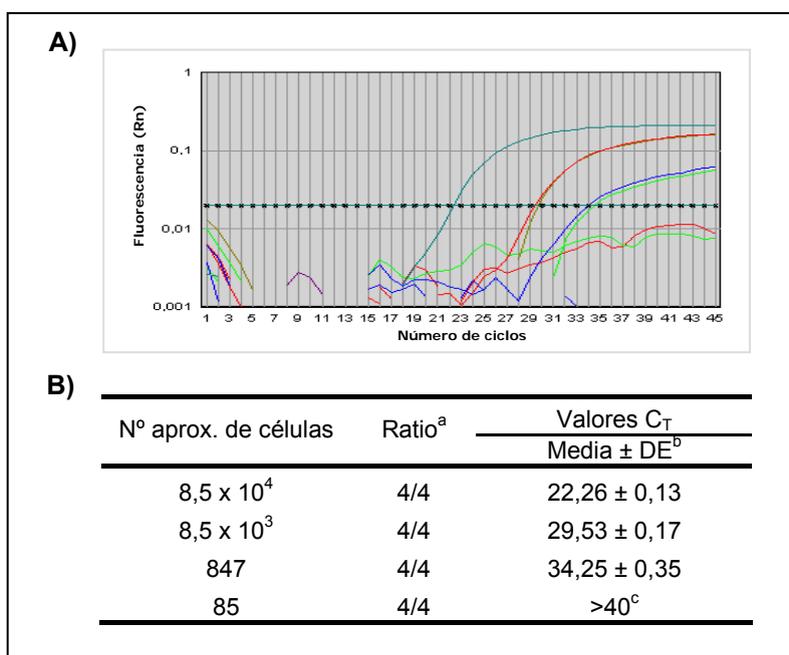
^cMedia de dos determinaciones ± desviación estándar.

6.5.- Aplicación en huevo líquido inoculado artificialmente

Con el fin de comprobar la aplicabilidad en alimentos del sistema de Q-RT-PCR en la detección de formas viables de *B. cereus*, se ensayó en huevo líquido inoculado artificialmente. El RNA obtenido a partir de alícuotas de 1 ml del alimento inoculado fue cuantificado espectrofluorimétricamente con “Ribogreen” y sometido al tratamiento con DNasa establecido en este estudio. En las muestras donde no era posible obtener una cuantificación espectrofotométrica para ajustar el tratamiento a 5 U/0,5 µg de RNA (lo que indicaba una concentración de RNA por debajo de las ensayadas), se estableció como tratamiento estándar la utilización de 0,25 U de DNasa I para asegurar la eliminación de trazas de DNA.

En la Figura 19 se presenta una tabla con los valores medios de C_T correspondientes a dos replicados, en dos ensayos independientes,

cubriendo un rango de 4 unidades logarítmicas. Los valores medios de los C_T obtenidos mostraron correspondencia con los resultados del recuento en placa. Se obtuvo una linealidad aceptable entre los valores medios de C_T y los valores del recuento en placa ($R^2 = 0,98$). Sin embargo el nivel de detección en este caso, está en 847 células viables por reacción, lo que corresponde a $1,1 \times 10^4$ ufc/ml de la muestra en origen. Ello supone una disminución en el nivel de sensibilidad de la Q-RT-PCR al ser aplicada en el alimento.



^aReacciones positivas frente al total de reacciones realizadas.

^bValores de C_T , media \pm desviación estándar.

^c $C_T \geq 40$, resultado negativo.

Figura 19.- A) Curvas de amplificación obtenidas por TaqMan Q-RT-PCR para $8,5 \times 10^4$; $8,5 \times 10^3$; $8,5 \times 10^2$ y $8,5 \times 10$ ufc/reacción de *B. cereus* inoculadas en huevo líquido. B) Valores de C_T correspondientes a 4 repeticiones (dos replicados en ensayos independientes), media \pm desviación estándar.

V.- DISCUSIÓN

VI.- DISCUSIÓN

La detección e identificación de microorganismos patógenos en alimentos constituyen un objetivo de interés permanente dentro de la microbiología de los alimentos. En el caso de las bacterias, los métodos microbiológicos clásicos se basan en el aislamiento a partir de los alimentos hasta obtener un cultivo puro, y en la posterior identificación mediante pruebas morfológicas, bioquímicas, serológicas, etc. Ello requiere tanto la utilización de numerosos medios de cultivo con la consiguiente inversión en tiempo y personal dedicado a ello, como el uso de diferentes metodologías. Además, en ocasiones, la identificación requiere de la realización de pruebas adicionales que no siempre proporcionan un resultado concluyente. Como principal alternativa a los métodos basados en el cultivo están las técnicas moleculares, entre las que destaca la PCR que presenta como principales ventajas la rapidez y la precisión en la detección de microorganismos (Steffan y Atlas, 1991; Olsen *et al.*, 1995; Hill, 1996; Mackay, 2004). Los últimos avances tecnológicos han llevado al desarrollo de equipos de PCR a tiempo real que permiten la detección cuantitativa y automatizada de la diana elegida. La PCR a tiempo real (Q-PCR) presenta mayor sensibilidad y menor tiempo de detección que la PCR convencional, y además permite la cuantificación del microorganismo de forma automatizada, evitando las contaminaciones post-PCR. Dada la importancia de *B. cereus* como contaminante de alimentos y como responsable de toxiinfecciones alimentarias, y debido a su compleja posición taxonómica que dificulta en gran medida su identificación mediante los métodos basados en el cultivo, en este trabajo se ha desarrollado un procedimiento para su detección e identificación rápida y cuantitativa a partir de alimentos mediante la tecnología de PCR a tiempo real como alternativa a los métodos tradicionales.

1.- Diversidad fenotípica

En primer lugar se ha abordado la problemática de la identificación de *B. cereus* y el conjunto de especies relacionadas, utilizando métodos tradicionales basados en el cultivo. Para ello se ha empleado una colección de cepas de referencia del “grupo *B. cereus*” y de otras especies próximas, así como aislados de alimentos caracterizados genotípicamente (mediante ISR-PCR y RAPDs) en nuestro laboratorio y adscritos a dicho grupo. Se comenzó con la caracterización e identificación fenotípica utilizando las pruebas bioquímicas habituales en el análisis microbiológico de alimentos.

El agar PEMBA, utilizado de forma generalizada y recomendado en las normas internacionales como medio selectivo para *B. cereus*, ha demostrado su eficacia en la diferenciación de la mayoría de cepas pertenecientes al “grupo *B. cereus*” del resto de especies de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. En cuanto a las pruebas de confirmación consideradas en la normativa anterior (ISO 7932:1993 /Cor.1:1997), la β -hemólisis, proporciona mayor número de cepas positivas pertenecientes al “grupo *B. cereus*” comparado con la fermentación de la glucosa, producción de butanodiol y la asimilación de nitratos. Este resultado apoya su inclusión en la normativa ISO vigente. Como excepción, la cepa B44 mostró un fenotipo atípico, siendo negativa para la actividad lecitinasa y para la asimilación del manitol. La ausencia o disminución de la actividad lecitinasa se asocia a posibles mutaciones en el gen del factor de regulación pleiotrópico PlcR o en la secuencia de unión para PlcR en los genes que son controlados a nivel de la transcripción (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). En este sentido, Slanti *et al.* (2004) describieron la presencia de distintas mutaciones en el factor de regulación PlcR en algunas cepas pertenecientes al “grupo *B.*

cereus”, que ocasionaban fenotipos lecitinasa negativo e incluso no hemolíticos. La no asimilación del manitol es poco frecuente, y, según el sistema de identificación de API (Biomerieux), se presenta en un porcentaje del 1 % en las cepas con un perfil de *B. cereus* biotipo 1.

La identificación a nivel de especie se realiza habitualmente utilizando sistemas multiprueba miniaturizados. Uno de los más empleados, el sistema API, no permite la diferenciación entre todas las especies del “grupo *B. cereus*” debido al elevado número de caracteres que comparten. En este estudio, el 3 % de los aislados de alimentos y la cepa CECT 40, identificados con técnicas moleculares como “grupo *B. cereus*”, fueron identificados por API únicamente hasta nivel de género *Bacillus*. Este hecho ha sido constatado por otros autores en la identificación de cepas aisladas de puré de calabacín (Guinebretière *et al.*, 2001), de arroz (Sarrías *et al.*, 2002) y de envases de papel y cartón (Priha *et al.*, 2004). Concretamente Guinebretière *et al.* (2001) comprobaron que en un 23 % de los casos había discrepancias entre el sistema API y los métodos moleculares (secuenciación de RNAr 16S). El propio manual API especifica que se debe asumir un error del 13 %, que incluye tanto cepas no identificadas (8 %) como cepas erróneamente identificadas (4 %) (sobre un total de 863 cepas estudiadas).

No obstante, el análisis de agrupamiento de los perfiles bioquímicos obtenidos mediante el sistema de API para las cepas en estudio, ha permitido distinguir un subgrupo de cepas dentro del Fenon I, que se agrupan al 73 % de similitud y que comparten la incapacidad de hidrolizar el almidón y de fermentar la salicina. Este patrón fenotípico había sido descrito previamente y, además, relacionado con la capacidad de producir la toxina emética (Logan *et al.*, 1979, Agata *et al.*, 1996, Te Giffel *et al.*, 1997, Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Cabe

destacar que dicho grupo incluye la cepa de referencia de *B. cereus* CECT 4387 y los aislados identificados sólo a nivel de género *Bacillus*, indicando que este tipo de aislados son de difícil identificación mediante pruebas bioquímicas.

2.- Perfiles genéticos de virulencia

Una vez terminada la identificación fenotípica se analizó mediante PCR la presencia de genes relacionados con la virulencia en *B. cereus* con el fin de seleccionar la diana para Q-PCR. De los diferentes genes de virulencia estudiados, como *pc-plc*, *sph*, *clo* o *entFM*, el gen *pc-plc* se encontró en mayor porcentaje en las cepas del “grupo *B. cereus*” (95 %) y no aparecía en cepas de otras especies. La presencia del gen *pc-plc* en un alto porcentaje de cepas coincide con los estudios de Schraft y Griffiths (1995), Guttman y Ellar (2000), Radhika *et al.* (2002) y Hendriksen *et al.* (2006). Los genes *sph* y *entFM* se presentaron en menor porcentaje (76 y 74 %, respectivamente). En el caso del gen *sph*, existen estudios donde se describe una alta prevalencia (Hsieh *et al.* 1999; Ghelardi *et al.*, 2002; Zahner *et al.*, 2005). Por otro lado, el gen *entFM* descrito principalmente en cepas de *B. thuringiensis* (Asano *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1999; Ghelardi *et al.*, 2002), en nuestro estudio ha sido detectado, además, en cepas de *B. cereus* y *B. mycoides*. El gen *clo* ha aparecido en todas las cepas del “grupo *B. cereus*” y también se ha encontrado en otras especies del género *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. pumilus*). La presencia de genes de las toxinas de *B. cereus* como HBL, NHE, EntFM, PI-PLC y SPH en otras especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. pasteurii* y *B. smithii*, *B. circulans*, *B. megaterium* y *B. sphaericus*) ha sido descrita en estudios basados en la PCR (Mäntynen y Lindström, 1998; McKillip, 2000; Rowan *et al.*, 2001,

2003; Gore *et al.*, 2003; Phelps *et al.*, 2003; From *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2005; Sergeev *et al.*, 2006). Sin embargo, la presencia del gen *clo* en otras especies del género *Bacillus*, así como la presencia del gen *cytK* en cepas de *B. pumilus* y *B. subtilis*, no se había descrito hasta ahora. De los diferentes genes de virulencia específicamente relacionados con casos de toxiinfecciones alimentarias, *hbl* y *nhe*, se han encontrado en el 81 % y 76 % de las cepas, respectivamente. Entre las cepas positivas se encontraban representantes de todas las especies analizadas, excepto *B. pseudomycooides*, lo que indica su amplia distribución a nivel de grupo. Hasta el momento, la distribución de *nhe* se consideraba más extendida que la de *hbl*: para *nhe* entre un 92 y 100 % y para *hbl* entre un 34 a 84 % de los aislados de *B. cereus* (ver revisión, Schoeni y Wong, 2005). En cuanto al gen *cytK* el 56 % de las cepas del “grupo *B. cereus*” ensayadas han resultado positivas, dato que se aproxima al porcentaje del 45 % obtenido por Fagerlund *et al.* (2004) en cepas aisladas de alimentos y de casos de toxiinfecciones alimentarias. Guinebretière *et al.* (2002) encontraron un porcentaje mayor, entre el 70 % y el 73 %, destacando la asociación *hbl/nhe/cytK* en las cepas procedentes de toxiinfecciones. Sin embargo, también existen estudios que describen la ausencia o una baja incidencia del gen *cytK* en cepas aisladas de toxiinfecciones (Lund *et al.*, 2000; Ghelardi *et al.*, 2002). Es posible que la no concordancia con nuestros resultados para *hbl*, *nhe* o *cytK* se deba precisamente a la utilización de los cebadores degenerados diseñados recientemente considerando la alta diversidad genética de estos genes, junto a otros factores tales como el diferente origen del aislamiento. Así mismo, nuestros resultados por PCR con cebadores para el gen *ces*, relacionado con el síndrome emético, muestran una baja presencia en las cepas analizadas en este estudio (4 %). Este resultado concuerda con estudios previamente publicados y basados en la caracterización

por bioensayos o por técnicas de cromatografía de cepas procedentes de suelo, vegetales, industrias de productos lácteos y granjas (Yang *et al.*, 2005; Taylor, 2005; Altayar y Sutherland, 2006; Svensson *et al.*, 2006; Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Svensson *et al.* (2006) describieron que en un 3 % de muestras de vegetales como lechuga, zanahoria y patata, se encontraron cepas eméticas pero el porcentaje aumentaba hasta el 16 % si se consideraban únicamente las muestras de patata. Estos autores sugirieron que ciertos tipos de alimentos ofrecerían una ventaja selectiva para las cepas eméticas. En apoyo de esta hipótesis, Ueda y Kuwabara (1993) encontraron mayores porcentajes (44 %) en cepas aisladas de arrozales y de la zona de procesado del arroz, mostrando una fuerte influencia debido al alimento en estudio. La cepa B77 de nuestro estudio, fue el único aislado de alimento que mostró un perfil bioquímico característico de cepas eméticas junto a un resultado positivo para la PCR del gen *ces*. Fue aislada de aros de cebolla, alimento muy en contacto con el suelo, al igual que la patata y el arroz. Puede por tanto ser un vehículo de cepas eméticas, siendo necesaria su investigación y comprobación en futuros estudios. Entre los alimentos de los que se han aislado cepas de *B. cereus* eméticos, se encuentran los preparados infantiles y los alimentos a base de leche en polvo. Ehling-Schulz *et al.* (2006) encontraron que la incidencia de cepas eméticas, identificadas como positivas por PCR, fue del 11 % en el propio alimento y del 1 % en los depósitos de almacenamiento de leche.

Todas la cepas ensayadas del “grupo *B. cereus*” en este estudio poseen algún factor de virulencia. De los 8 genes ensayados, el 66 % de las cepas del estudio han presentado de 6 a 7 factores de virulencia. El 29 % de las cepas poseen de 5 a 3 genes y el 5 % sólo dos. Las cepas de referencia *B. mycoides* CECT 4125 y *B. pseudomycoides* CECT 7065^T no poseen ninguno de los genes

relacionados con toxiinfecciones alimentarias (*hbl*, *nhe*, *cytK* y *ces*). Además, como resultado de este estudio se ha evidenciado la existencia de perfiles toxigénicos similares para especies distintas pero pertenecientes al “grupo *B. cereus*”. Estos resultados han sido previamente descritos en *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides* (Hsieh *et al.*, 1999; Hansen y Hendriksen, 2001), así como en *B. weihenstephanensis* y *B. pseudomycoides* (Hendriksen *et al.*, 2006; Ehling-Schulz, *et al.* 2006a), demostrando la necesidad de disponer de un método de detección no sólo a nivel de especie sino para el conjunto de cepas toxigénicas en el “grupo *B. cereus*”.

3.- Desarrollo de la PCR cuantitativa

El gen *pc-plc* fue seleccionado como diana para el diseño de cebadores para Q-PCR debido a que se encontró en un mayor porcentaje en las cepas del “grupo *B. cereus*” (95 %) y a que no aparecía en cepas de otras especies. Se diseñaron 5 oligonucleótidos, un cebador directo (PCER-F), tres cebadores reversos (PCER-R1, PCER-R2 y PCER-R3) y una sonda TaqMan MGB, basándose en zonas previamente descritas y establecidas como específicas para *B. cereus* por Kim *et al.* (2000). Los ensayos de especificidad por PCR convencional mostraron que los cebadores diseñados podían ser utilizados para la detección del conjunto de especies del “grupo *B. cereus*”. Por otro lado, el análisis pormenorizado de las secuencias del gen *pc-plc* reveló valores altos de similitud entre cepas de diferentes especies, así como la presencia de múltiples diferencias entre cepas de la misma especie. En concreto, los cebadores PCER-F y PCER-R3 presentaban un 100 % de especificidad para la totalidad de cepas en estudio del “grupo *B. cereus*” y mostraron un menor número de desapareamientos, por lo que fueron seleccionados para Q-PCR. Con el sistema SYBR

Green presentaron una especificidad del 93 % debido a la desviación en valores de C_T de algunas cepas y apoyado por un amplio rango de T_m para las cepas del “grupo *B. cereus*”. Con el sistema TaqMan, la especificidad fue del 85 %, lo que indica que en la región interna del gen *pc-plc* amplificada existe una gran variabilidad.

Estos resultados coinciden con otros estudios donde se ha puesto de manifiesto la existencia de hasta 9 perfiles de RFLPs para este gen en 28 cepas de la especie *B. cereus* (Shangkuan *et al.*, 2000). También se ha descrito en *B. cereus* una elevada variabilidad intraespecífica para otros genes de virulencia, como *hbl* y *nhe*. Guinebretière *et al.* (2002) en un estudio de los genes que componen los operones *hbl* y *nhe* (*hblC*, *hblD*, *hblA*, *hblB*, *nheA*, *nheB* y *nheC*) en cepas procedentes de toxiinfecciones y en cepas de alimentos, demostraron que existía variabilidad en la secuencia de estos genes, impidiendo su detección por PCR, mientras que demostraron su presencia por hibridación en Southern-blot. La alta variabilidad descrita en estos genes de virulencia podría estar relacionada con la existencia en *B. cereus* y *B. anthracis* de una DNA polimerasa IV, enzima productora de mutaciones, cuya transcripción se encuentra bajo el control del factor de regulación PlcR (Ivanova *et al.*, 2003).

El gen seleccionado como diana para el desarrollo de la Q-PCR se encuentra en una sola copia por genoma, lo que facilita una mejor aproximación a la cuantificación. En estudios previos se han utilizado procedimientos de Q-PCR dirigiendo los cebadores a genes de copia múltiple en el genoma, asumiendo el consiguiente error en la cuantificación debido al número variable de operones para distintas especies del “grupo *B. cereus*”. Así, por ejemplo, en el ensayo de Q-PCR para el “grupo *B. cereus*” basado en el sistema SYBR Green desarrollado por Priha *et al.* (2004), además de dirigir los cebadores a la región de los genes del RNA ribosómico (entre 8 y 12 copias por

genoma), la eficiencia de la cuantificación se podría ver afectada si coexistieran en la muestra cepas de las especies *B. licheniformis*, *B. pumilus* o *B. subtilis* debido a amplificaciones inespecíficas. El sistema TaqMan desarrollado por De Clerk *et al.* (2004) para el “grupo *B. cereus*” utilizando los genes del RNAr, fallaba en la detección de las especies *B. mycoides* y *B. weihenstephanensis*. Otro de los genes de copia múltiple utilizado en *B. cereus* es el gen *clo* (Fukushima *et al.*, 2003), el cual, además, no es específico para el “grupo *B. cereus*”, como se ha demostrado en el presente estudio. Fykse *et al.*, (2003) desarrollaron también, basándose en los mismos cebadores dirigidos al gen *clo*, un sistema de SYBR Green Q-PCR para *B. cereus*, observando los mismos inconvenientes mencionados anteriormente. En el reciente estudio de Fricker *et al.* (2007) para la detección de cepas de *B. cereus* eméticas por Q-PCR, el gen diana se encuentra en un plásmido contenido en número de 1 a 3 copias por célula, y presenta el inconveniente de no detectar aquellas cepas que pueden causar toxiinfección del tipo diarreico.

En este estudio, para el desarrollo de los procedimientos de Q-PCR, SYBR Green y TaqMan, se utilizaron tanto rectas patrón construidas a partir de soluciones de DNA cuantificado como suspensiones celulares calibradas. En ambos casos, el análisis de regresión mostró valores de R^2 cercanos a 1 para el intervalo de 10^6 a 10^1 genomas/células por reacción. También presentaron eficiencias entre 0,97 y 0,94, respectivamente, valores que demuestran una buena correlación entre las cantidades de DNA molde o células y los valores de C_T obtenidos después de la amplificación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para rectas patrón de DNA y células en ensayos con sonda TaqMan desarrollados para otros patógenos como *Sta. aureus* (Goto *et al.*, 2007) y *V. parahaemolyticus* (Rizvi *et al.* (2006).

El nivel de sensibilidad estimado para la detección de *B. cereus* por Q-PCR en los ensayos con SYBR Green y TaqMan correspondió a 5 y 4 células por reacción, respectivamente. Aunque el nivel de sensibilidad teórico para Q-PCR es de un genoma/reacción (Mckillip y Drake, 2004), la desviación estándar (SD) o la ratio de señal en el total de los replicados indican que, a tales niveles, la cuantificación no es muy precisa. Así, Priha *et al.* (2004) consiguen detectar por Q-PCR hasta 1 célula de *B. cereus* pero de forma poco reproducible. Del mismo modo, en ensayos de Q-PCR para otros patógenos de alimentos, como *L. monocytogenes*, se estima que la probabilidad de detección de 1 célula es del 55 % para un total de 9 reacciones (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2003), del 38 % para 10 fg de DNA de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Tasara *et al.*, 2005), o del 42 % y 16 % para la detección de una célula de *S. enteritidis* utilizando una Q-PCR dirigida al gen *Prot6e* o al gen *InvA* respectivamente (Malorny *et al.*, 2007a). En nuestro estudio, la detección de 2 equivalentes genómicos por Q-PCR ha sido posible por SYBR Green en el 45 %, y por TaqMan en el 67 % de las reacciones.

Límite de cuantificación es el valor a partir del cual la cuantificación no se ve afectada por la probabilidad de obtener resultados que comprometan el valor obtenido. Precisamente en el rango de 10 a 1 células es donde se prevé una distribución aleatoria de partículas por estar en concentraciones bajas (Tasara *et al.*, 2005) y, por tanto, los valores de desviación estándar o los intervalos de confianza correspondientes no permiten la misma precisión que a niveles superiores. A este respecto, el límite de cuantificación de la Q-PCR se ha establecido en 18 equivalentes genómicos por reacción tanto para SYBR Green como para TaqMan, y en 44 y 39 células por reacción, respectivamente. Estos valores concuerdan con los 10^1 genoma/reacción establecidos para otros patógenos,

como *St. aureus* (Berrada *et al.*, 2006) o *L. monocytogenes* (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2003, 2004a). Cabe señalar que en estudios en los que se ha conseguido llegar hasta 10^0 genomas/reacción en *Campylobacter jejuni* o *Clostridium tyrobutiricum*, se han utilizado otras aproximaciones estadísticas para establecer los límites de cuantificación (Debretsion *et al.*, 2007, López-Enríquez *et al.*, 2007).

Comparando los dos sistemas de Q-PCR, los resultados obtenidos en este estudio muestran una elevada equivalencia entre el sistema SYBR Green y el TaqMan. Estos resultados coinciden con estudios recientes para la detección de *St. aureus* (Horsmon *et al.*, 2006) y *E. sakazakii* (Liu *et al.*, 2006), mientras que discrepan con los resultados de un estudio similar en el que se obtiene una mayor sensibilidad con el sistema TaqMan desarrollado para *St. aureus* en queso (Hein *et al.*, 2001b). En cambio, Alarcón *et al.* (2006) encuentran más sensible el sistema de SYBR Green desarrollado para *St. aureus* que el sistema TaqMan. En este caso podría deberse a la optimización de la reacción puesto que el SYBR Green emite más fluorescencia por amplificado que las sondas TaqMan, por lo que el nivel umbral de fluorescencia se alcanza mucho antes obteniendo valores de C_T menores. Así mismo, el sistema SYBR Green desarrollado por Fricker *et al.* (2007) para cepas eméticas de *B. cereus* resultó 10 veces más sensible que el sistema TaqMan, lo que podría explicarse por la influencia de utilizar diferentes oligonucleótidos para cada sistema.

En general, e independientemente del sistema empleado, nuestros valores son similares o incluso mejores que los previamente publicados para *B. cereus* u otros patógenos de alimentos: 2 equivalentes genómicos/reacción frente a 100 y 10 por TaqMan y SYBR Green (Fricker *et al.*, 2007) o aprox. 2000 equivalentes

genómicos por SYBR Green (Fykse *et al.*, 2003) en *B. cereus*; 10 por TaqMan para *Sta. aureus* (Berrada *et al.*, 2006) y *S. enteritidis* (Seo *et al.*, 2006) o un equivalente genómico por reacción por TaqMan para otros patógenos (Rodríguez-Lázaro, 2004).

4.- Obtención de DNA a partir de esporas

Los microorganismos esporulados, como es el caso de *B. cereus*, presentan una dificultad añadida para su detección, ya que pueden estar presentes en alimentos tanto en forma vegetativa como esporulada. Para la liberación del DNA a partir de las esporas se han empleado tratamientos térmicos y tratamientos con germinadores previos a la obtención de DNA por un método comercial. La cepa tipo utilizada en este estudio ha mostrado una gran facilidad de germinación, incluso con las tres combinaciones de germinadores, utilizadas (100 mM L-alanina, 25 mM L-alanina/1mM inosina y 0,5 mM L-alanina/inosina). Contiene 7 operones involucrados en la germinación incluyendo los operones presuntamente relacionados con la germinación con inosina (*gerI*) y con L-alanina (*gerA*) (Hornstra *et al.*, 2005). Sin embargo, otras cepas como *B. cereus* CECT 131, poseen un número menor de operones (4) y precisan del aminoácido inosina para que transcurra la germinación (Hornstra *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en el presente estudio para esta cepa concuerdan con lo publicado y presentan el máximo nivel de germinación en presencia de inosina.

En los ensayos de germinación se incluyeron las diferentes especies del grupo *B. cereus* observándose una gran variabilidad de respuesta ante las condiciones de germinación empleadas. Sin embargo, en presencia de cantidades traza de los germinadores L-alanina e inosina, se obtuvieron los mejores resultados de

germinación para las distintas especies del “grupo *B. cereus*” ensayadas. Esta combinación había sido previamente utilizada con éxito para una colección de cepas de *B. cereus* (De Vries, 2006).

En lo que se refiere a la recuperación de DNA, a partir de suspensiones de 10^8 esporas/ml, el tratamiento incorporado y optimizado en este estudio muestra ser en general superior que el sistema comercial (Qiagen), aunque con mejor o peor resultado dependiendo de la cepa estudiada. Sin embargo, el sistema comercial por sí solo ha funcionado satisfactoriamente en el caso de la cepa CECT 148^T y a niveles bajos, (10^4 esporas/ml e inferiores). Esto puede ser debido a que incluye un tratamiento previo con lisozima, cuyo empleo como germinador ha sido descrito en diferentes especies del género *Bacillus* (Setlow, 2003). Produce daños en las cubiertas de la spora por permeabilización, y desencadena el proceso de germinación (Beharavan *et al.*, 2000). Así mismo, nuestros resultados muestran que cualquier tratamiento térmico previo a la obtención del DNA reduce el rendimiento en la extracción a partir de esporas, aunque de forma menos drástica en los tratamientos más suaves. A este respecto existen resultados contradictorios entre los trabajos publicados en la bibliografía. Ellerbrok *et al.* (2002), aplicando en *B. anthracis* un paso de calentamiento a 95 °C durante 10 min en la mezcla de reacción para Q-PCR, observaron una reducción de hasta el 40 % en la detección. Sin embargo, Makino y Cheun (2003) demostraron que, calentando a 95-100 °C durante 15 min con posterior centrifugación, conseguían la misma sensibilidad que con el método comercial de “DNeasy tissue kit” (Qiagen), detectando hasta 10 esporas de *B. anthracis* por Q-PCR. Como alternativa al tratamiento térmico, Priha *et al.* (2004) incluyeron un tratamiento de ruptura mecánica previo a la utilización del método comercial “DNeasy tissue kit” (Qiagen) en diversas especies del “grupo *B. cereus*”, consiguiendo la ruptura de la spora

sin dañar el DNA de las células vegetativas. Estos datos podrían indicar una gran dependencia de los resultados debida a la cepa utilizada, lo que no es de extrañar ya que para la especie *B. cereus* se ha observado una gran diversidad en cuanto a termoresistencia: el tiempo de reducción decimal a 95 °C (valor D: tiempo necesario para conseguir una reducción de un orden logarítmico) para una colección de cepas de *B. cereus* fue de aproximadamente 5 min en más del 50 % de las cepas, incluyendo la cepa tipo de *B. cereus*, y de aproximadamente 10, 20, 40 e incluso 80 min en las cepas restantes, (De Vries, 2006). Los resultados obtenidos en las 6 especies ensayadas en nuestro estudio reflejan esta misma tendencia dentro de las diferentes especies del “grupo *B. cereus*”.

Los resultados de cuantificación obtenidos en este estudio mediante Q-PCR y SYBR Green a partir de suspensiones de esporas calibradas demuestran que en la cepa *B. cereus* CECT 148^T no es necesario realizar un tratamiento previo a la extracción de DNA si se utiliza el método “DNeasy tissue kit” (Qiagen), en un rango entre 10^4 y 10^0 esporas/reacción. El análisis de regresión de la curva patrón reveló valores de R^2 y E muy próximos a 1, demostrando que es posible la cuantificación aunque los valores de Q-PCR fueron ligeramente superiores al recuento en placa. Tratándose de esporas, este hecho puede deberse bien a que no todas las esporas germinan dando lugar a la correspondiente colonia, o bien a que las esporas de *B. cereus* presentan una gran hidrofobicidad pudiendo formar agregados que llevarían a una subestimación de los niveles en el recuento en placa.

5.- Desarrollo de la PCR cuantitativa con transcripción inversa

Uno de los inconvenientes de la PCR, donde se utiliza DNA como molécula diana, es que no discrimina entre células vivas y muertas. Para abordar este problema y asegurar la detección de formas viables de "*B. cereus*", se desarrolló un procedimiento de PCR a tiempo real con transcripción inversa (Q-RT-PCR), empleando como diana el RNA mensajero del gen *pc-plc*. Se hizo uso de los cebadores seleccionados PCER-F y PCER-R3 y la sonda TaqMan MGB. Se realizó en modo "one-step", es decir, que la transcripción inversa y la amplificación tienen lugar en el mismo tubo. El cebador PCER-R3 actúa durante la transcripción uniéndose a la cadena codificante y genera copias de DNA gracias al enzima transcriptasa inversa, y estas copias de DNA serán el molde para la reacción de amplificación. Esto implica una menor manipulación del RNA y una mayor rapidez, pero presenta el problema de no poder optimizar cada proceso por separado. El éxito en la cuantificación de RNA depende de la completa eliminación del DNA del microorganismo para que sólo se amplifique el DNA copia generado a partir del RNA. Por ello, es de crucial importancia ajustar el tratamiento con DNAsas para que elimine el DNA, sin dañar el RNA (Bustin, 2002; Matthews *et al.*, 2002).

La utilización de RNA mensajero como indicador de viabilidad es una de las opciones más aceptadas, debido a su menor tiempo de vida útil comparado con otros RNAs como los ribosómicos que son estables al menos durante 48 h después de la muerte celular (McKillip *et al.*, 1998). En *B. cereus*, el gen *pc-plc* es controlado junto a otros genes de factores de virulencia (*hbl*, *nhe*, *pi-plc*, *sph*, *clo*, *hlyIV* y una proteasa del tipo neutro) por el factor pleiotrópico PlcR, presentando la máxima actividad toxigénica al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria (Agaisse *et al.*, 1999;

Okstad *et al.*, 1999; Slamti y Lereclus, 2002). Por ello, considerando que podría variar el número de copias de RNA para este gen según el estado fisiológico de las células, para estandarizar el procedimiento y con fines comparativos, se recogió el RNA de células en fase exponencial y se expresaron los resultados como una aproximación al número de células correspondiente al recuento en placa. El análisis de regresión en el intervalo entre 39 ng y 3,9 pg de RNA total, mostró unos resultados satisfactorios con $E = 0,88$ y una $R^2 > 0,99$, estableciéndose el nivel de detección en aproximadamente 30 ufc/reacción. Son escasos los estudios publicados a este respecto a efectos comparativos. Hasta el momento, y según nuestros datos se trata del único estudio que aborda la cuantificación de células viables de *B. cereus*. Existen referencias para otras especies, tales como *S. enterica* (Fey *et al.*, 2004), en donde mediante Q-RT-PCR obtuvieron un nivel de detección de 10^0 ufc en muestras de agua, utilizando el gen RNAr 16S y el gen de virulencia *InvA*, y determinando además el número de copias de transcritos por célula. González-Escalona *et al.* (2006) utilizaron la Q-RT-PCR para la detección y cuantificación de células de *V. cholerae* en estado viable no cultivable, detectando de 1 a 1000 células dependiendo del gen diana utilizado. Otras técnicas alternativas para la detección de RNA, como el NASBA, presentan el mismo inconveniente en cuanto al nivel de expresión particular del gen diana (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2006).

6.- Aplicación de la PCR cuantitativa en alimentos

Para comprobar la eficacia de los procedimientos de Q-PCR desarrollados tanto frente a células vegetativas como a esporas, se seleccionaron alimentos donde es frecuente encontrar *B. cereus* o las especies del “grupo *B. cereus*”. Las esporas de estos

microorganismos son ubicuas, resisten los tratamientos térmicos de pasteurización y pueden permanecer en las instalaciones de la industria alimentaria formando biopelículas que pueden constituir la fuente de contaminación de esta bacteria. También pueden germinar y crecer durante el almacenamiento a bajas temperaturas en alimentos pasteurizados y posteriormente refrigerados como la leche y el huevo líquido. En el caso de la leche en polvo, su presencia puede ser debida a contaminaciones posteriores o a una supervivencia al tratamiento de desecación. Multitud de alimentos cuyos ingredientes corresponden a huevo líquido u ovoproductos, así como el propio huevo líquido comercial, se encuentran implicados en toxiinfecciones causadas por *B. cereus*, lo que subraya la importancia del control de este microorganismo, al menos en este tipo de alimentos, aunque no exista legislación aplicable. Así mismo, la presencia de *B. cereus* en productos como leche en polvo o formulaciones infantiles constituye un factor de riesgo importante para la salud teniendo en cuenta el sector de población al que están dirigidos, principalmente, lactantes y niños de corta edad. Por todo ello se seleccionaron el huevo líquido y la leche en polvo infantil como alimentos modelo, puesto que para poder establecer procedimientos de control se requiere de métodos rápidos de detección y cuantificación que permitan conocer la incidencia real de *B. cereus* en este tipo de alimentos.

El procedimiento de Q-PCR SYBR Green desarrollado en nuestro estudio fue seleccionado para la aplicación en alimentos por presentar mayor especificidad, con el fin de asegurar la detección del mayor número posible de miembros del “grupo *B. cereus*”. Además, esta aproximación representa un menor coste económico, lo que supone una ventaja en el análisis rutinario de un elevado número de muestras. Por otro lado, gracias al análisis de disociación sería posible apreciar la diversidad de cepas presentes en el alimento.

La presencia de inhibidores de la PCR en alimentos ha sido constatada desde sus inicios (Rossen *et al.*, 1992; Wilson, 1997) y constituye uno de los principales inconvenientes en su aplicación para la detección de microorganismos patógenos. Como solución se ha propuesto la utilización de un control de amplificación (Malorny *et al.*, 2003a, 2003b; Hoorfar *et al.*, 2004a, 2004b) (IAC, Internal Amplification Control). Se trata de llevar a cabo una reacción de PCR en formato dúplex de modo que simultáneamente se amplifiquen la diana del patógeno investigado, si está presente en la muestra, y el DNA control. La ausencia de amplificación de éste último indicaría la presencia de inhibidores de la reacción y, por tanto, de posibles falsos negativos. Como alternativa, en este estudio se ha utilizado un control externo de amplificación, EAC, para cada matriz alimentaria analizada. Consiste en utilizar como molde DNA purificado del patógeno junto a DNA extraído del alimento, y realizar la amplificación, en tubo independiente pero simultáneamente a las muestras problema. Sólo si se obtiene amplificación en el EAC se asume que no existen inhibidores de la reacción. Cabe destacar que en este trabajo, utilizando el método de extracción de Qiagen, no se han observado problemas de inhibición de la PCR. Los ensayos de Q-PCR realizados en huevo líquido inoculado artificialmente mostraron una buena correspondencia entre los valores interpolados en las curvas de DNA o células y los recuentos en placa. Además, la estimación de la exactitud relativa presentó una variación del 16 %, valor que coincide con los publicados por otros autores para la detección de patógenos en alimentos por Q-PCR (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004b, 2005a). Estos resultados nos confirman que con el procedimiento de extracción de DNA aplicado (DNeasy tissue kit, Qiagen), no hay interferencia del huevo líquido en el ensayo por PCR, por lo que sería un método adecuado para la detección rápida

y sensible de *B. cereus* en este alimento. La equivalencia entre los resultados derivados de ambas curvas nos lleva a proponer la curva de DNA para cuantificación en su aplicación para el análisis rutinario de alimentos, por su mayor facilidad de estandarización.

La cuantificación de *B. cereus* en la otra matriz alimentaria analizada en este estudio, leche en polvo infantil, a partir de ambas rectas patrón, presentó valores dentro del mismo orden logarítmico que el recuento en placa, igual que en el caso del huevo líquido, pero con una mayor variación de la exactitud relativa. En los alimentos con contaminación natural ensayados, la cuantificación fue un orden logarítmico superior a lo obtenido por recuento en placa, lo que demuestra la necesidad de optimizar el proceso en cada matriz alimentaria para validar el sistema con el método tradicional. En el caso de la leche en polvo podría deberse a la presencia de sustancias bacteriostáticas o bactericidas que podrían impedir el crecimiento. En los otros alimentos analizados podría deberse a la presencia de xantano u otros espesantes que influirían en la viabilidad de los microorganismos presentes, o a la presencia de esporas que, tras los procesos de liofilización, o pulverización hubieran quedado en estado latente incapaces de germinar en el medio de cultivo utilizado para el recuento.

Los valores de sensibilidad obtenidos en este estudio aplicando la Q-PCR para la detección de *B. cereus* en alimentos, son de 3 o 4 células o esporas por reacción, que corresponden a 60-80 células/ml de huevo líquido o leche reconstituida. Estos valores se encuentran en el mismo rango que los publicados para otros patógenos de alimentos, en donde varían entre 1 y 10 ufc/reacción (Alarcón *et al.*, 2006; Hein *et al.*, 2001b; Campbell y Wright, 2003; Vishnubhatla *et al.*, 2001; Bosshard *et al.*, 2006; Mckillip y Drake, 2004). Dependiendo del alimento o del procedimiento aplicado,

corresponden a valores entre 10 y 10^3 ufc/g o ml (Wolffs *et al.*, 2006; Rudi *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003; Rossmanith *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 1999; ver Anexo IV). No obstante, y dado que para PCR se emplean volúmenes de muestra muy pequeños, la posibilidad de que al menos una célula esté presente en la mezcla de reacción es muy baja. Por ello, en algunos casos se utiliza la PCR combinada con la técnica del Número Más Probable, con el fin de aumentar el número de replicados y por tanto la probabilidad de detección a niveles bajos (Maurer, 2006).

Los niveles de detección más bajos corresponden a estudios en los que se ha realizado un enriquecimiento previo y se han alcanzado sensibilidades de 1 ufc/600g de *S. enteritidis* en huevo (Seo *et al.*, 2004), 4-2 ufc/25 g en *Salmonella* sp. en pollo (Liming *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2006), 1 ufc/g en *E. sakazakii* en leche infantil en polvo (Derzelle y Dilasser, 2006) o 3 ufc/g para *L. monocytogenes* en carne y longaniza (Wang *et al.*, 2004). En el “grupo *B. cereus*”, De Clerk *et al.* (2004), aplicando un paso de enriquecimiento, consiguieron una sensibilidad de 1 ufc/g en gelatina. Esta estrategia, aunque no permite cuantificar, sí asegura la ausencia del microorganismo en el alimento analizado y reduce la posible interferencia de inhibidores de la PCR por el incremento del número del microorganismo diana. En este caso, la Q-PCR aporta la rapidez del ensayo y la confirmación del patógeno en cuestión en la misma reacción. Representa por tanto, una alternativa muy conveniente cuando se requiera la ausencia de contaminación en el alimento como es el caso de galletas simples, rellenas o recubiertas (RD 1142/82, BOE 4/6/82). En este estudio, el enriquecimiento previo en TSPB facilitó la detección por Q-PCR de *B. cereus* en alguno de los alimentos de contaminación natural analizados.

7.- Detección de esporas en alimentos

La detección de esporas de *B. cereus* en el propio alimento se abordó partiendo de huevo líquido y leche en polvo inoculados artificialmente. Los mejores resultados para la extracción de DNA a partir de esporas se obtuvieron con el método comercial, sin variaciones, posiblemente debido a una menor manipulación de la muestra del alimento. Con el método DNeasy tissue kit, de Qiagen, se ha conseguido detectar unas pocas esporas/reacción (3 esporas en el huevo líquido y 4 en la leche en polvo) en el propio alimento, correspondiendo a 60 esporas/ml de huevo líquido o 600 esporas/g de leche en polvo infantil. Estos resultados mejoran los límites de detección de esporulados por Q-PCR obtenidos en otros estudios hasta la fecha. Así, Rueckert *et al.* (2006) consiguieron límites de detección de hasta 640 esporas/ml de leche en polvo reconstituida por Q-PCR SYBR Green para especies de esporulados termofílicos; De la Cruz *et al.* (2006) detectaron 10^4 esporas/ml de *Clostridium perfringens* en homogenizados de agua, carne picada y heces. López-Enríquez *et al.* (2007), han conseguido mejores resultados utilizando mayor cantidad de alimento en la obtención del DNA, llegando a detectar 25 esporas de *C. tyrobutyricum* en 25 ml de leche UHT o cruda. En el caso de *B. cereus*, Priha *et al.* (2004) ensayaron su detección en envases de papel y cartón inoculados artificialmente y detectaron 5 veces menos de lo esperado por recuento en placa. También probaron tratamientos previos de germinación (15 min a 80 °C y germinación 10 mM L-alanina durante 1 h) sin demasiado éxito, lo que demuestra la dificultad de la obtención del DNA de esporas en función de la matriz en cuestión.

8.- Aplicación de la PCR cuantitativa con transcripción inversa en alimentos

El procedimiento de Q-RT-PCR desarrollado para la detección de formas viables fue aplicado en huevo líquido inoculado artificialmente. El nivel de detección referido a RNAm correspondió a 847 células de *B. cereus*, siendo un orden de magnitud inferior al resultado obtenido sin la matriz del alimento. A este respecto, existen en la bibliografía pocos estudios sobre detección cuantitativa de formas viables de patógenos en alimentos, y tanto las aproximaciones seguidas como los resultados obtenidos son muy dispares. Por ello resulta difícil comparar con los resultados de este estudio. Entre los trabajos publicados están los de Fey *et al.*, (2004) donde aplicaron la RT-Q-PCR a la detección de *Salmonella* en muestras de agua obteniendo niveles de detección de hasta unas pocas células. En el estudio realizado por González-Escalona *et al.* (2006) consiguieron detectar señal en 0,01 fg debido a que utilizaron una Q-RT-PCR en dos etapas, con cebadores aleatorios en la transcripción y, específicos posteriormente en la amplificación. En general, se considera la Q-RT-PCR en dos etapas más sensible que en una sola, (Bustin *et al.*, 2000), esto podría explicar el menor nivel encontrado en el presente trabajo, además de la posible influencia del propio alimento. Siguiendo otras estrategias, como por ejemplo, utilizando EMA-PCR en la cuantificación de coliformes en canales de cerdo y ternera, Guy *et al.* (2006) encontraron límites de detección de aproximadamente 10^2 ufc/cm² incluyendo un pretratamiento de fotoactivación, lo que no asegura una buena estandarización del procedimiento. Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004c), utilizando Q-NASBA en leche y agua detectaron hasta unas pocas células de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, mostrando que esta aproximación sí es aplicable, aunque el coste es muy elevado como procedimiento de rutina.

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

1. Los resultados derivados de la identificación y caracterización fenotípica y genotípica han permitido clarificar la situación taxonómica de los aislados y su inclusión en el grupo *B. cereus*, lo que es fundamental para evaluar la especificidad de un sistema de detección por Q-PCR.
2. El perfil toxigénico de las cepas estudiadas, tras su identificación, ha revelado la presencia del gen *pc-plc* en el 95 % de las cepas del grupo *B. cereus* analizadas y su ausencia en cepas de otras especies del género. Este gen es responsable de la actividad lecitinasa característica del “grupo *B. cereus*” y su presencia está relacionada con su potencial toxigénico, por lo que se ha seleccionado como diana para el diseño de cebadores específicos.
3. El análisis de regresión lineal de los datos obtenidos por Q-PCR para las rectas de DNA y células, muestra valores de R^2 cercanos a 1 para el intervalo de 10^6 a 1 genomas/células por reacción. Para las rectas de DNA y células se obtuvieron eficiencias entre 0,97 y 0,95, valores que demuestran una buena correlación entre las cantidades de DNA molde o células y los valores de C_T obtenidos después de la amplificación, así como una buena optimización de las condiciones de PCR.
4. Los dos sistemas desarrollados empleados para la cuantificación del DNA, SYBR Green y TaqMan, ofrecen niveles similares de cuantificación y sensibilidad. No obstante, para asegurar la detección amplia de los miembros del “grupo

B. cereus”, se propone el sistema de SYBR Green Q-PCR, aproximación de menor coste económico, lo que representa una ventaja en el análisis rutinario de un elevado número de muestras.

5. El procedimiento de SYBR Green Q-PCR desarrollado permite la detección cuantitativa rápida e inequívoca de cepas toxigénicas del “grupo *B. cereus*” de forma automatizada, mejorando los niveles de sensibilidad previamente descritos.
6. El método de Qiagen empleado para la extracción de DNA ha funcionado satisfactoriamente, sin necesidad de tratamientos previos, en los alimentos analizados, huevo líquido y leche en polvo infantil, para los niveles de contaminación ensayados, tanto con células vegetativas como con esporas. Probablemente esto se debe a que incluye una incubación de 30 min a 37 °C en presencia de lisozima que facilita la ruptura de la pared celular y permite iniciar la germinación.
7. El procedimiento de Q-RT-PCR desarrollado en este estudio, utilizando el sistema TaqMan MGB ha demostrado ser una buena aproximación para estimar la cantidad de células viables de *B. cereus*, tomando como base los valores de C_T y el análisis de regresión lineal obtenidos. Su aplicación en alimentos ha sido validada para la detección de células viables de *B. cereus* en huevo líquido contaminado artificialmente, matriz alimentaria en la que es frecuente encontrar a este microorganismo que representa un posible riesgo para la salud del consumidor.

VII.- APÉNDICE

VII.-APENDICE

1.-Medios de cultivo y reactivos

Agua de peptona tamponada (APT)

Peptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L

pH= 7,2. Esterilización: 121°C, 20 min.

Caldo glucosa rojo fenol

Peptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Dextrosa	5 g/L
Rojo fenol	0,018 g/L

pH= 7,0. Esterilización: 121°C, 20 min.

Caldo nitrato

Extracto de carne	3 g/L
Peptona	5 g/L
KNO ₃ (libre de nitritos)	1 g/L

pH= 7,0. Esterilización: 121°C, 20 min.

Reactivos Nit1 y Nit 2 (Biomerieux) y zinc en polvo.

Caldo triptona soja polimixina B (TSPB)

Triptona	17 g/L
Peptona de soja	3 g/L
NaCl	5 g/L
K ₂ HPO ₄	2,5 g/L
Dextrosa	2,5 g/L

pH= 7,3. Esterilización: 121°C, 20 min. A continuación, a cada tubo con 15 ml de caldo, se le añade 0,1 ml de polimixina B al 0,15% (p/v).

Medio CCY

A.- Tampón del medio 20X

KH ₂ PO ₄	0,26 M
K ₂ HPO ₄	0,52 M

Esterilización: 121°C, 20 min.

B.- Fuente de carbono: solución 100X

L-glutamina	200 mg
Caseína hidrolizada	10 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	4 g
Glicerina	6 ml
Agua destilada	100 ml

Esterilización: 121°C, 20 min.

C.- Solución de sales 1000X

ZnCl ₂	0,05 M
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 M
MnCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 M
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,05 M

Esterilización: filtración 0,2 µm.

Medio Voges-Proskauer modificado

Peptona	7 g/L
K ₂ HPO ₄	5 g/L
Glucosa	5 g/L

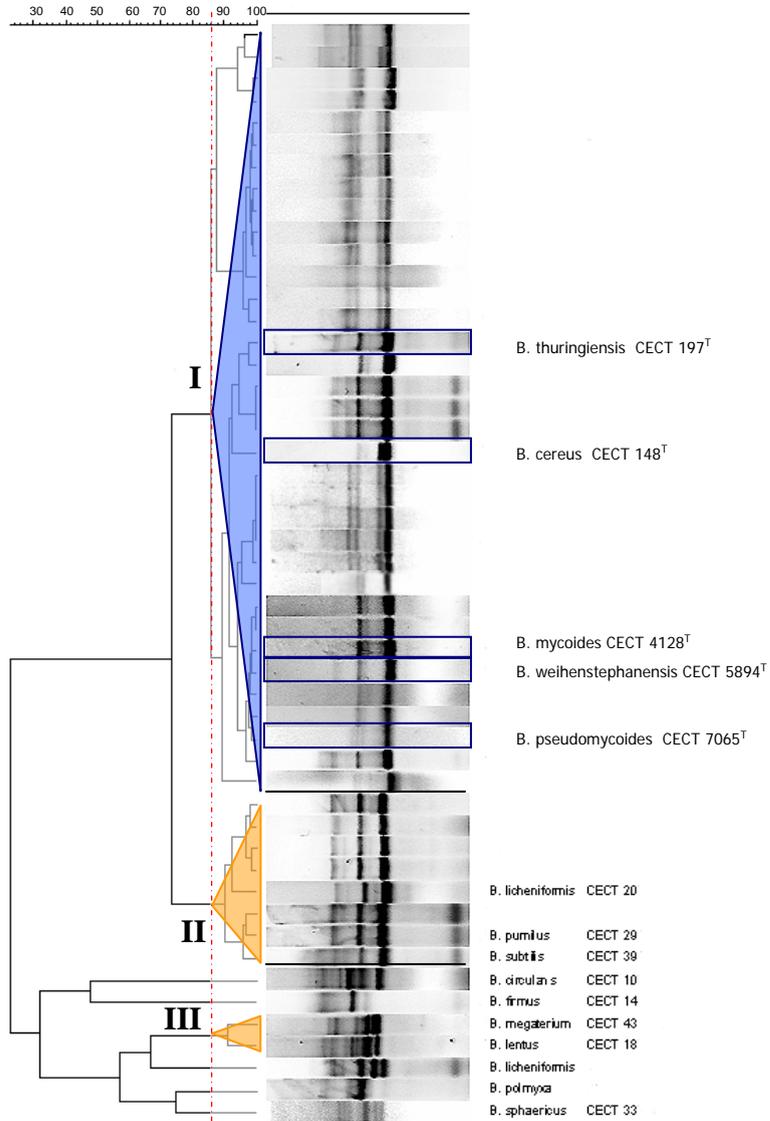
pH= 6,5. Esterilización: 121°C, 20 min.

Reactivos para la prueba de VP

- a) KOH al 40% (p/v) en agua.
- b) alfa-naftol al 5% (p/v) en etanol.

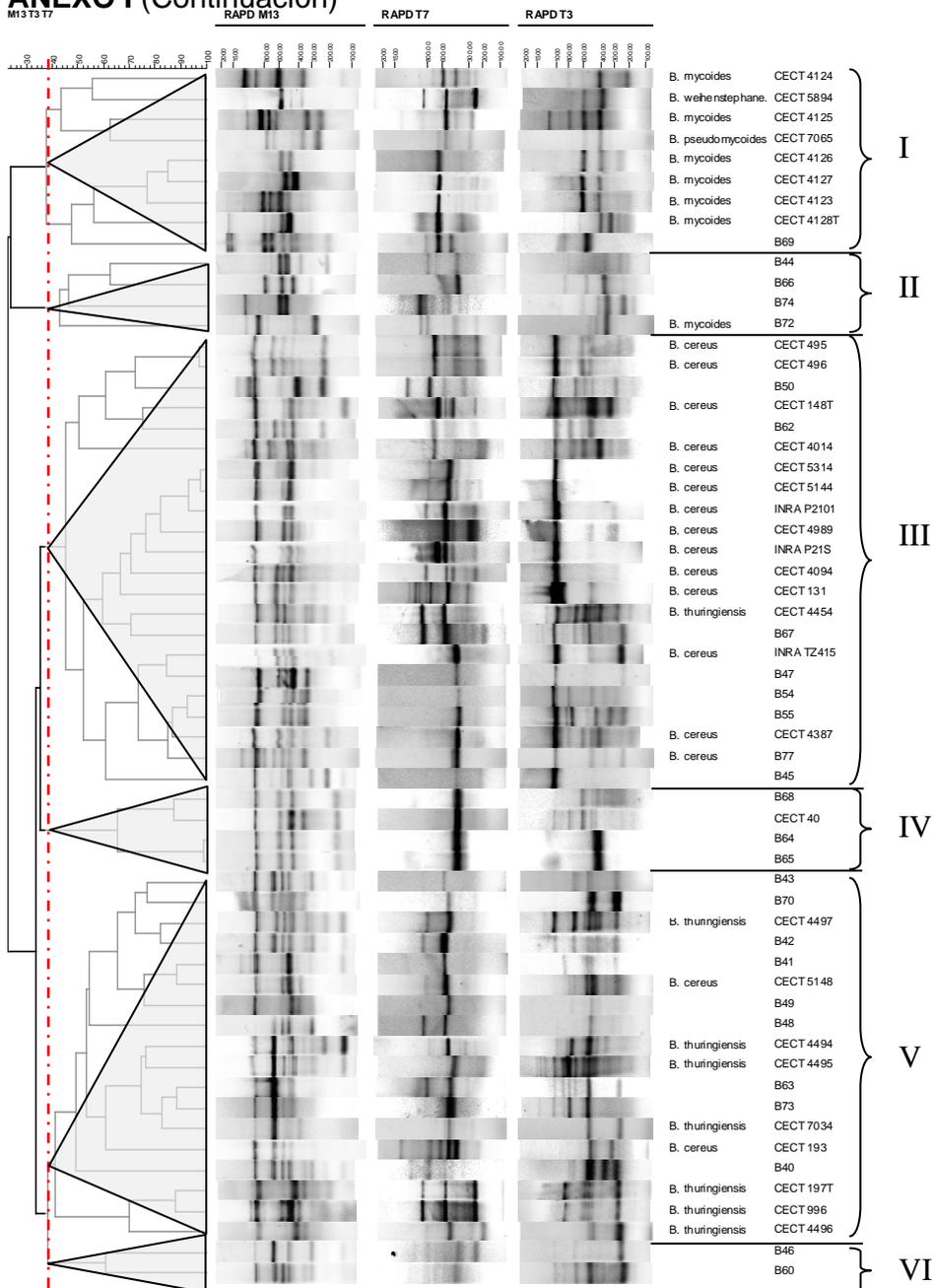
VIII. ANEXOS

ANEXO I



Dendrograma obtenido mediante agrupamiento UPGMA sobre los valores de similitud calculados con el coeficiente de Pearson a partir de los perfiles electroforéticos ISR de las cepas de referencia y aislados ambientales utilizados en el estudio. Cluster I: “grupo *B. cereus*”.

ANEXO I (Continuación)



Agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente de Pearson, para los perfiles electroforéticos de los RAPDs M13, T7 y T3 de las cepas de referencia y aislados ambientales del “grupo *B. cereus*”.

ANEXO II

BROTOS DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Brotos de enfermedades transmitidas por alimentos
Número de brotos notificados según agente causal y año
España. 1994-2003

Agente causal	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	1994-2003
Bacterias											
<i>Bacillus cereus</i>	1	5	4	5	4	6	0	7	12	12	56
<i>Brucella</i>	6	16	9	4	10	4	16	5	7	7	84
<i>Campylobacter</i>	2	1	0	5	1	6	5	8	4	4	36
<i>Clostridium botulinum</i>	5	5	5	7	9	5	1	4	3	1	45
<i>Clostridium</i> (otros)	13	17	11	17	22	19	19	15	17	16	166
<i>E. coli</i> (enterohemorrágico)	0	0	0	0	1	2	1	0	0	2	6
<i>Salmonella</i>											
- <i>Salmonella</i> sp.	214	263	249	215	261	230	248	249	228	302	2459
- <i>S. enteritidis</i>	141	153	188	214	272	281	280	310	318	411	2568
- <i>S. tiphimurium</i>	11	5	9	9	8	5	9	10	7	15	88
- <i>S. typhi</i> y <i>paratyphi</i>	2	2	1	4	3	0	1	1	0	1	15
- Otro serotipo	11	10	9	3	10	9	8	7	5	4	76
<i>Shigella</i>	6	1	0	1	3	3	0	1	1	3	19
<i>Staphylococcus aureus</i>	39	24	40	39	36	21	22	27	31	22	301
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	5	6	6	2	3	4	2	2	4	35
Otras bacterias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Parásitos											
<i>Trichinella</i>	4	6	3	2	2	2	3	6	1	3	32
Virus											
Virus hepatitis A	0	1	0	1	10	3	6	0	2	0	23
Norovirus	0	0	0	0	0	4	1	9	20	22	56
Otros virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
Sustancias tóxicas											
Animales tóxicos	16	17	10	9	9	15	15	10	10	13	124
Plantas tóxicas	0	4	7	4	7	7	2	6	14	6	57
Sustancias químicas	15	12	5	2	2	7	4	2	2	0	51
Otras sustancias tóxicas	26	19	11	7	19	16	8	17	10	3	136
Desconocido	456	338	320	317	251	279	307	293	277	364	3202
Total	969	904	837	671	942	927	960	969	971	1221	9641

Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Elaboración: Centro Nacional de Epidemiología

(<http://www.isciii.es/htdocs/pdf/Informedebrotosalimentarios.pdf>)

ANEXO II (Continuación)



Brotos de enfermedad por *Bacillus cereus* notificados al Centro Nacional de Epidemiología.

1. Sistema de Brotes

El Sistema de Brotes recoge todos los brotes epidémicos de cualquier etiología notificados por los epidemiólogos de las diferentes Comunidades Autónomas.

En los últimos 5 años disponibles (2001-2005) se han notificado a este sistema 21 brotes confirmados causados por *Bacillus cereus*. El número total de enfermos fue de 660 con una media de 31 enfermos por brote. Durante este periodo de estudio sólo se notificaron 3 hospitalizaciones y ninguna defunción.

No existe una estacionalidad en la aparición de los brotes aunque el mayor número se produjo en el mes de noviembre (5 brotes) y ninguno durante los meses de diciembre, enero y febrero.

La mayoría de los brotes son de tipo comunitario (17/21) destacando cómo ámbito el restaurante con 8 brotes seguido del colegio con 3.

El tipo de alimento asociado a los brotes es muy variado no predominando un tipo de alimento.

Las características de estos brotes se muestran en la tabla 1 y 2.

ANEXO II (Continuación)

**Tabla 1. Brotes de transmisión alimentaria por *Bacillus cereus*.
España. 2001-2005.**

Años	Casos*	Inicio Síntomas	Ámbito	Alimento
2001	6	22/04/2001	Restaurante	Desconocido
2002	17	31/03/2002	Restaurante	Cereales
	60	24/11/2002	Restaurante	Setas
	12	17/10/2002	Restaurante	Carne
	2	22/10/2002	Tienda	Pastel
	57	24/03/2002	Geriátrico	Huevo/ovoproducto
	2(2)	02/11/2002	Hogar	Queso
	87	21/11/2002	Colegio	Desconocido
2003	31	17/11/2003	Colegio	Pasta
	46	22/06/2003	Restaurante	Pollo
	4	28/09/2003	Hogar	Desconocido
	24(1)	20/08/2003	Geriátrico	Mayonesa
	20	02/07/2003	Campamento	Desconocido
	3	06/11/2003	Restaurante	Hortaliza fresca
2004	4	02/05/2004	Hogar	Pollo
	3	11/04/2004	Restaurante	Otro
	232	12/03/2004	Colegio	Huevo/ovoproducto
	5	27/06/2004	Colectivo sin especificar	Desconocido
	36	27/04/2004	Colectivo sin especificar	Desconocido
	3	08/09/2004	Hogar	Cereales
2005	6	09/08/2005	Restaurante	Desconocido

Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII

* Entre paréntesis número de hospitalizaciones.

**Tabla 2. Brotes de transmisión alimentaria.
(Excluye brotes hídricos) España. 2001-2005.**

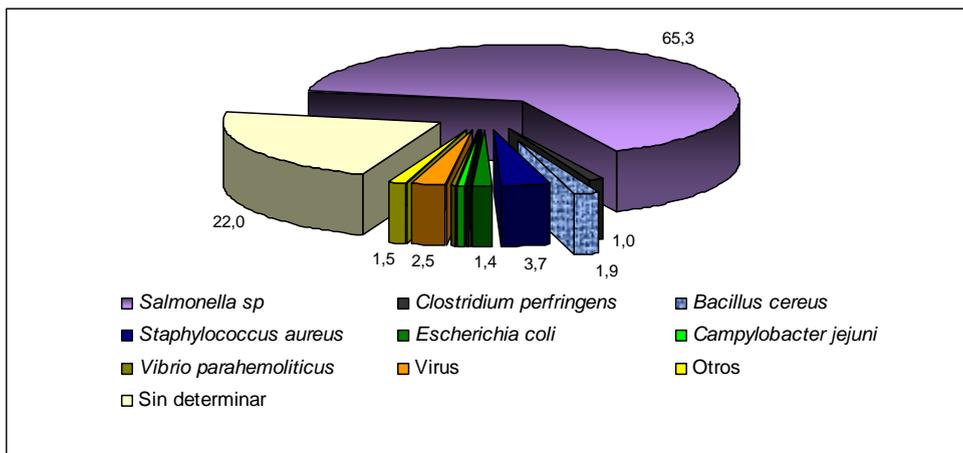
Años	Nº Brotes	Nº Brotes <i>B. cereus</i>	%
2001	989	1	0,10
2002	971	7	0,70
2003	1221	6	0,49
2004	1123	6	0,53
2005	956	1	0,10

Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII

ANEXO II (Continuación)

Análisis de los datos facilitados por la Red Valenciana de Vigilancia en Salud Pública. Sistema Básico. Brotes Epidémicos (Orden del 4 de marzo de 1997, de la Consejería de Sanidad [97/X6736])

Brotes de tox infecciones alimentarias en la Comunidad Valenciana según el agente causal para el periodo 1999-2005 (en porcentaje).



Brotes de transmisión alimentaria por *B. cereus*. Comunidad Valenciana, 1999-2005.

Año	Enfermos	Ámbito	Factores	Alimento
1999	66*	Restaurante	10	Otros
	3	Restaurante oriental	1,2,8,10	Otros
2000	42	Residencia 3ª Edad	1,2,5,7,8,10	Salsas / Huevo crudo
2001	11	Bar	1,2,6,7,8,9,10	Desconocidos
2002	67*	Colegio	1,2,3,4,5,8	Carnes
	2	Restaurante oriental	2,3,4,8	Desconocidos
	93*	Ctro. Psiquiatrico	1,2,8	Carnes
2003	31*	Colegio	1,4,8,9,10	Otros
2004	5	Restaurante oriental		Desconocidos
	4	Comidas preparadas	7	Carnes
2005	2*	Restaurante oriental	1,2,3,4,5,7	Otros
	4*	Restaurante	2,7,9,10	Salsas / Huevo crudo

*Casos confirmados. 1=Conservación del alimento a temperatura ambiente. 2=Refrigeración insuficiente de los alimentos. 3=Preparación de alimentos con gran antelación al consumo. 4=Grandes cantidades de alimentos. 5=Cocción insuficiente alimentos o escaso recalentamiento de estos. 6=Utilización de restos de alimentos en preparación de nuevos platos. 7=Contaminación cruzada. 8=Prácticas de manipulación incorrectas. 9=limpieza o desinfección inadecuada de utensilios cocina. 10=Inadecuadas condiciones del local.

ANEXO III

La legislación española contempla el control de la presencia de *B. cereus* en los siguientes niveles dependiendo del alimento:

1.- En caldos, consomés, sopas y cremas si llevan productos vegetales desecados se exige $<10^2$ ufc de *B. cereus* por g o ml (se considera aceptable, sí sólo 2 de las 5 unidades que componen la muestra presentan un valor de entre 10^2 y 10^3 ufc/g o ml) (RD 2452/98-BOE 24/11/98, RD 2180 BOE 13/9/75).

2.- En cereales y copos expandidos, salsas de mesa (en el caso de tomate frito) y en té y derivados, existen reglamentaciones técnico-sanitarias donde se exigen niveles inferiores a 10^1 ufc/g (BOE 8/9/87; RD 858/84, BOE 10/5/84 y RD 1354/83, BOE 27/5/83).

3.- En la Reglamentación Técnico Sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio de galletas (RD 1142/82, BOE 4/6/82), se exige la ausencia de *B. cereus* por gramo de alimento, tanto en galletas simples como en rellenas o recubiertas. No es admisible la presencia de este microorganismo nunca si se controlan las materias primas y si las prácticas de elaboración y manipulación son correctas.

4.- En la Reglamentación (CE) N 1441/2007 sobre preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados, destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses, se exigen niveles de *B. cereus* $<5 \times 10^1$ ufc/g (se considera aceptable, si sólo 1 de las 5 unidades que componen la muestra presentan un valor de entre 5×10^1 y 5×10^2 ufc/g).

5.- Además, en el caso de especias y condimentos, aunque no existe una legislación específica para *B. cereus*, se ha considerado el

seguimiento y análisis por el riesgo que implica su presencia (Recomendación Comisión UE, 2004/24/CE, D.O.U.E. 10/1/04).

ANEXO IV

Recopilación de ensayos de Q-PCR aplicados a alimentos

Microorganismo	Diana	Matriz	Sensibilidad	Referencia
SYBR Green				
<i>B. cereus</i>	<i>ces</i>	pasta y arroz	10 ¹ ufc/g y 10 ^{0**}	Fricker <i>et al.</i> , 2007
<i>C. jejuni</i>		Pollo y agua	10 ufc/reacción**	Cheng y Griffiths, 2003
<i>E. sakazakii*</i>	ITS	formulación infantil	> 1,1x10 ¹ ufc/100q**	Liu <i>et al.</i> , 2006
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	carne y longaniza	3 ufc/g**	Wang <i>et al.</i> , 2004
<i>Sta. Aureus</i>	<i>nuc</i>	Queso	1,5-6,4x10 ² ufc/2g	Hein <i>et al.</i> , 2001b
<i>Sta. Aureus</i>	<i>nuc</i>	carne picada	10 ³ ufc/ml	Alarcón <i>et al.</i> , 2006
<i>S. enteritidis</i>	<i>sefA</i>	Pollo	10 ³ ufc/ml**	De Medici <i>et al.</i> , 2003
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	Pollo	6 ufc/ml**	Eyigor y Carli, 2003
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	longaniza y carne	3 ufc/g**	wang <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	leche, agua, pienso	<10 ufc/ml**	Nam <i>et al.</i> , 2005
<i>Salmonella</i> sp.	<i>invA</i>	leche ternera y alfalfa	1.5 ufc/25g	Mercanoglu y Griffiths, 2005
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	Agua	2 ufc/reacción	Wolffs <i>et al.</i> , 2006
<i>V. vulnificus</i>	<i>Vvh</i>	marisco y agua	10 ⁰ ufc/ml**	Paniker <i>et al.</i> , 2004
<i>Y. enterocolitica</i>	16S DNAr	Carne	4.2 10 ³ ufc/ml	Wolffs <i>et al.</i> , 2004
Sondas de hidrólisis TaqMan				
<i>B. cereus*</i>	<i>ces</i>	pasta y arroz	10 ³ ufc/g y 10 ^{0**}	Fricker <i>et al.</i> , 2007
<i>C. jejuni</i>	381121-381206	Culture	1 ufc/reacción	Nogva <i>et al.</i> , 2000a
<i>C. jejuni</i>	<i>gyrA</i>	Pollo	-	Padungtod <i>et al.</i> , 2002
<i>C. jejuni</i>	ORF-C	pescado, carne cruda y leche	12 ufc/reacción	Sails <i>et al.</i> , 2003
<i>C. jejuni</i>	VS1	pollo, leche y agua	1 ufc/reacción	Yang <i>et al.</i> , 2003
<i>C. jejuni</i>			-	Josefsen <i>et al.</i> , 2004
<i>C. jejuni</i>		Pollo	2-25 ufc/reacción	Rudi <i>et al.</i> , 2004
<i>C. jejuni</i>		Pollo	-	Krause <i>et al.</i> , 2006
<i>C. jejuni</i>	VS1	Pollo	-	Debretson <i>et al.</i> , 2007
<i>E. sakazakii*</i>	ITS	formulacion infantil	> 1,1x10 ¹ ufc/100q**	Liu <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i>	<i>fliC-H21</i>	Ternera	1 ufc/25g**	Auvray <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i>	<i>stxA</i>	carne picada	10 ufc/25g**	Stefan <i>et al.</i> , 2007

Microorganismo	Diana	Matriz	Sensibilidad	Referencia
<i>E. coli</i> 0157	<i>stx1, stx2</i> y <i>eae</i>	ternera y heces	1 ufc/g**	Sharma <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> 0157	<i>stx1, stx2</i> y <i>eae</i>	Agua	10 ufc/g**	Ibekwe <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> 0157	<i>stx1, stx2</i> y <i>eae</i>	ternera y heces	1-10 ufc/g**	Sharma, 2002
<i>E. coli</i> 0157	<i>stx1, stx2</i>	pan, ternera, ensalada y salsas	5340 ufc/g	Heller <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i> 0157		carne ternera triturada	-	O'Hanlon <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i> 0157		Ternera	1 ufc/g**	Holicka <i>et al.</i> , 2006
Grupo <i>B. cereus</i>	16S DNAr	Gelatina	1 ufc/muestra**	De Clerk <i>et al.</i> , 2004
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Hly</i>	agua, leche desnatada y leche entera	6 ufc/reacción	Nogva <i>et al.</i> , 2000b
<i>L. monocytogenes</i>	<i>lap</i>	Leche	6 ufc/reacción	Hein <i>et al.</i> , 2001 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	Calabaza	9 ufc/reacción	Hough <i>et al.</i> , 2002
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	longaniza, cerdo, salmón ahumado.	-	Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2004a
<i>L. monocytogenes</i> *	<i>hlyA</i>	Salmón	10 ufc/g	Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2005b
<i>L. monocytogenes</i> *	<i>prfA</i>	Leche, salmón, paté, queso	9-1 ufc/reacción	Rossmannith <i>et al.</i> , 2006
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> *	<i>IS900</i>	agua y leche	10 ² ufc/20ml	Rodríguez- <i>et al.</i> , 2005a
<i>Sta. aureus</i>	<i>nuc</i>	Queso	1,5-6,4 x10 ² ufc/2g	Hein <i>et al.</i> , 2001b
<i>Sta. aureus</i>	<i>nuc</i>	carne picada	10 ³ ufc/ml	Alarcón <i>et al.</i> , 2006
<i>Sta. aureus</i>	<i>nuc</i>	leche de oveja y vaca	-	Hein <i>et al.</i> , 2005
<i>Sta. aureus</i>	<i>Sa0836</i>	Leche	10 ufc/ml	Goto <i>et al.</i> , 2007
<i>S. enteritidis</i>	<i>sefA</i>	Huevos	1 ufc/600g**	Seo <i>et al.</i> , 2004
<i>S. enteritidis</i> *	<i>prot6e</i>	Helado	10 ³ ufc/ml	Seo <i>et al.</i> , 2006
<i>S. enteritidis</i> *		pollo y huevo	3 ufc/50 ml** y 3 ufc/10ml**	Malorny <i>et al.</i> , 2007
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	Pollo	2 ufc/reacción	Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>Salmonella</i> spp.		carne y gambas	3 ufc/reacción	Kimura <i>et al.</i> , 1999
<i>Salmonella</i> spp.		Carne		Kawasaki <i>et al.</i> , 2001
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	carne picada, pollo, salmon. leche cruda	0-10 ufc/25g**	Hein <i>et al.</i> , 2006
<i>Salmonella</i> spp.*	<i>ttrRSBCA</i>	carne y pollo	*	Josefsen <i>et al.</i> , 2007
<i>V. cholerae</i>	<i>hlyA</i>	Ostras	6-8 ufc/g**	Lyon, 2001
<i>V. cholerae</i> *	<i>stxA</i>	ostras.	0,8 ufc/reacción, 10 ufc/reacción	Blackstone <i>et al.</i> , 2007
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>gyrB</i>	Marisco	6-8 ufc/reacción	Cai <i>et al.</i> , 2006
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tlh, ORF8</i>	Ostras	-	Rizvi <i>et al.</i> , 2006
<i>V. vulnificus</i>	<i>VVAP</i>	Ostras	10 ² ufc/g	Campbell y Wright, 2003

Microorganismo	Diana	Matriz	Sensibilidad	Referencia
<i>V. vulnificus</i>	<i>vvhA</i>	Ostras	1 ufc/g**	Paniker <i>et al.</i> , 2006
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>yst</i>	Cerdo	10 ³ ufc/g	Vishnubhatla <i>et al.</i> , 2000
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ail</i>	Cerdo	1 ufc/g**	Jourdan <i>et al.</i> , 2000
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>ail</i>	Cerdo	0,4 ufc/g**	Boyapalle <i>et al.</i> , 2001
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>yst</i>	carne y tofu	10 ³ ufc/g	Vishnubhatla <i>et al.</i> , 2001
<i>Y. enterocolitica</i>		Cerdo	1-10 ufc/ml**	Wu <i>et al.</i> , 2004

Sondas de hibridación FRET

<i>C. perfringens</i>	<i>plc, cpe</i>	agua, carne picada	-	Dela Cruz <i>et al.</i> , 2006
<i>E. sakazakii</i> *	ISR	formulación infantil en polvo	0,01 ufc/g**	Derzelle y Dilasser, 2006
<i>E. coli</i> (EHEC)	<i>eae</i>	carne, leche y heces de vaca	10 ¹ ufc/25 y 350q**	Ellingson <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly, iap</i>	leche desnatada	10 ³ -10 ⁴ ufc/ml	koo y Jaykus, 2003
<i>L. monocytogenes</i>		Ensaladas		Berrada <i>et al.</i> , 2006
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> *	F57	Leche	10-100 ufc/ml	Tasara <i>et al.</i> , 2005
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> *	F57	leche y heces ganado	100 ufc/ml y 100 ufc/200mq	Bosshard <i>et al.</i> , 2006
<i>Sta. Aureus</i>		comida restaurantes		Berrada <i>et al.</i> , 2006
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	Pollo	3 ufc/ml**	Eyigor y Carli, 2003
<i>Salmonella</i> spp.	<i>SipB, SipC</i>	ready to eat	1 ufc/ml**	Ellingson <i>et al.</i> , 2003
<i>Salmonella</i> spp.		leche cruda	10 ¹ ufc/ml	Van Kessel <i>et al.</i> , 2003
<i>Salmonella</i> spp.*	<i>invA</i>	leche y carne	5 ufc/25g** 10 ³ cfu/ml	Perelle <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmonella</i> spp.*	<i>invA</i>	pollo, cerdo, lechuga...	1 ufc	Bohaychuk <i>et al.</i> , 2007

Sondas de hibridación en bucle

<i>E. coli</i> 0157	<i>stII</i>	Leche	10 ³ ufc/ml	Mckillip y Drake, 2000
<i>E. coli</i> 0157	<i>rfbE</i>	leche cruda y zumo de manzana	1 ufc/ml**	Fortin <i>et al.</i> , 2001
<i>Salmonella</i> spp.		pollo	5-500 ufc/ml	Uyttendaele <i>et al.</i> , 2003
<i>Salmonella</i> sp.		frutas y verduras	4 ufc/25g**	Liming <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmonella</i> sp.		Pollo	2 ufc/25g**	Patel <i>et al.</i> , 2006

*Incluye control interno de amplificación (IAC).

**Q-PCR tras enriquecimiento.

Recopilación actualizada a partir de Rodríguez- (2004).

ANEXO V

Dendograma UPGMA, obtenido utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, donde se muestra el agrupamiento de los perfiles fenotípicos de API para las cepas en estudio.



IX.-BIBLIOGRAFÍA

IX.- BIBLIOGRAFÍA

A

- Abriouel,H., Ben Omar,N., Lucas,R., Martínez-Cañamero,M., Ortega,E., y Gálvez,A. (2007). Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from Poto Poto and Dégué, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. *J.Food Prot.*, **70**, 1165-1173.
- Afonina,I.A., Reed,M.W., Lusby,E., Shishkina,I.G., y Belousov,Y.S. (2002). Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridisation-triggered fluorescence. *BioTechniques*, **32**, 940-949.
- Agaisse,H., Gominet,M., Okstad,O.A., Kolstø,A.-B., y Lereclus,D. (1999). PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol.Microbiol.*, **32**, 1043-1053.
- Agata,N., Mori,M., Ohta,M., Suwan,S., y Ohtani,I. (1995a). A novel dodecadeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol.Lett.*, **121**, 31-34.
- Agata,N., Ohta,M., Arakawa,Y., y Mori,M. (1995b). The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiol.*, **141**, 983-988.
- Agata,N., Ohta,M., y Mori,M. (1996). Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr.Microbiol.*, **33**, 67-69.
- Alarcón,B., Garcia-Cañas,V., Cifuentes,A., Gonzalez,R., y Aznar,R. (2004). Simultaneous and sensitive detection of three foodborne pathogens by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *J.Agr.Food Chem.*, **52**, 7180-7186.
- Alarcón,B., Vicedo,B., y Aznar,R. (2006). PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J.Appl.Microbiol.*, **100**, 352-364.
- Altayar,M. y Sutherland,A.D. (2006). *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J.Appl.Microbiol.*, **100**, 7-14.
- Andersson,A., Rønner,U., y Granum,P.E. (1995). What problems does the food industry have with the sporeforming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int.J.Food Microbiol.*, **141**, 145-156.

- Andersson,A., Granum,P.E., y Rönner,U. (1998). The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int.J.Food Microbiol.*, **39**, 93-99.
- Andersson,A., Svensson,B., Christiansson,A., y Rönner,U. (1999). Comparison between automatic ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus cereus* isolates from the dairy industry. *Int.J.Food Microbiol.*, **47**, 147-151.
- Anonymous (1997). ISO 7932:1993/Cor 1:1997 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* -- Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- Anonymous (2003). ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- Anonymous (2004). ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* -- Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- Anonymous (2006a). ISO 20837:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- Requirements for sample preparation for qualitative detection. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- Anonymous (2006b). ISO 20838:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- Requirements for amplification and detection for qualitative methods. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- Anonymous (2006c). ISO 21871:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* -- Most probable number technique and detection method. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- Asano,S.I., Nukumizu,Y., Bando,H., Iizuka,T., y Yamamoto,T. (1997). Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **63**, 1054-1057.
- Ash,C., Farrow,A.E., Wallbanks,S., y Collins,M.D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA. *Lett.Appl.Microbiol.*, **13**, 202-206.

Ash,C., Priest,F.G., y Collins,M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacili (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**, 253-260.

Auvray,F., Lecureuil,C., Taché,J., Leclerc,V., Deperrpos,V., y Lombard,B. (2007). Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Lett.Appl.Microbiol.*, **45**, 646-651.

B

Baida,G.E. y Kuzmin,N.P. (1997). Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochim.Biophys.Acta*, **1284**, 122-124.

Baida,G.E., Budarina,Z.I., Kuzmin,N.P., y Solonin,A.S. (1999). Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol.Lett.*, **180**, 7-14.

Barlass,P.J., Houston,C.W., Clements,M.O., y Moir,A. (2002). Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and inosine: the roles of *gerL* and *gerQ* operons. *Microbiology*, **148**, 2089-2095.

Becker,A., Reith,A., Napiwotzki,J., y Kadenbach,B. (1996). A quantitative method of determining initial amount of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal.Biochem*, **237**, 204-207.

Beecher,D.J. y Lee Wong,A.C. (1994). Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl.Environ.Microbiol.*, **60**, 1646-1651.

Beecher,D.J., Schoeni,J.L., y Lee Wong,A.C. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect.Immun.*, **63**, 4423-4428.

Beecher,D.J. y Wong,A.C.L. (1997). Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. *Microbiology*, **146**, 1371-1380.

Beecher,D.J., Olsen,T.W., Somers,E.B., y Wong,A.C.L. (2000). Evidence for contribution of Tripartite Hemolysin BL, Phosphatidylcholine-Preferring Phospholipase C, and Collagenase to Virulence of *Bacillus cereus* Endophthalmitis. *Infect.Immun.*, **68**, 5269-5276.

Beharavan,J., Chirakkal,H., Masson,A., y Moir,A. (2000). Mutations in the *gerP* locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect access of germinants to their targets in spores. *J.Bacteriol.*, **182**, 1987-1994.

- Bengtsson,M., Karlsson,H.J., Westman,G., y Kubista,M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, **31**, DOI: 10.1093/nar/gng045.
- Berliner,E. (1915). Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Zeitschrift für angewandte Entomologie Berlin*, **2**, 29-56.
- Bernard,P.S., Ajioka,R.S., Kushner,J.P., y Wittwer,C.T. (1998). Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Clin.Chem.*, **53**, 1055-1061.
- Bernard,P.S. y Wittwer,C.T. (2000). Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin.Chem.*, **46**, 147-148.
- Berrada,H., Soriano,J.M., Picó,Y., y Mañes,J. (2005). Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *Int.J.Food Microbiol.*, **107**, 202-206.
- Berrada,H., Soriano,J.M., Mañes,J., y Picó,Y. (2006). Real-time quantitative PCR of *Staphylococcus aureus* and application in restaurant meals. *Journal of Food Protection*, **69**, 106-111.
- Bickley,J. y Hopkins,D. (1999). *Inhibitors and enhancers of PCR*, Redwood Books Ltd., Wiltshire,UK.
- Blackstone,G.M., Nordstrom,J.L., Bowen,M.D., Meyer,R.F., Imbro,P., y DePaola,A. (2007). Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of mobile bay. *J.Microbiol.Meth.*, **68**, 254-259.
- Blackwood,K.S., Turenne,C.Y., Harmsen,D., y Kabani,A.M. (2004). Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. *J.Clin.Microbiol.*, **42**, 1626-1630.
- Bohaychuk,V.M., Gensler,G.E., McFall,M.E., King,R.K., y Renter,D.G. (2007). A Real-Time assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J.Food Prot.*, **70**, 1080-1087.
- Borin,S., Daffonchio,D., y Sorlini,C. (1997). Single strand conformation polymorphism analysis of PCR-tDNA fingerprinting to address the identification of *Bacillus* species. *FEMS Microbiol.Lett.*, **157**, 87-93.
- Bosshard,C., Stephan,R., y Tasara,T. (2006). Application of an F57 Sequence-Based Real-Time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J.Food Prot.*, **69**, 1662-1667.

- Boxman,I.L.A., Tilburg,J.J.H.C., Te Loeke,N.A.J.M., Vennema,H., De Boer,E., y Koopman,R.P. (2007). An efficient and rapid method for recovery of Norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *J.Food Prot.*, **70**, 504-508.
- Boyapalle,S., Wesley,I.V., Hurd,H.S., y Reddy,P.G. (2001). Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products. *J.Fo*, **64**, 1352-1361.
- Bustin,S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.*, **25**, 169-193.
- Bustin,S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J.Mol.Endocrinol.*, **29**, 23-39.
- Bustin,S.A. y Mueller, R. (2005). Real-Time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin.Science*, **109**, 365-379.

C

- Cai,T., Jiang,L., Yang,Ch., y Huang,K. (2006). Amplification of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China. *FEMS Inmunol.Med.Microbiol.*, **46**, 180-186.
- Campbell,M.S. y Wright,A.C. (2003). Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 7137-7144.
- Carlson,C.R., Gronstad,A., y Kolstø,A.-B. (1992). Physical maps of the genomes of three *Bacillus cereus* strains. *J.Bacteriol.*, **174**, 3750-3756.
- Carlson,C.R. y Kolstø,A.-B. (1994). A small (2.4 Mb) *Bacillus cereus* chromosome corresponds to a conserved region of a larger (5.3 Mb) *Bacillus cereus* chromosome. *Mol.Microbiol.*, **13**, 161-169.
- Carlson,C.R., Caugant,D.A., y Kolstø,A.-B. (1994). Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl.Environ. Microbiol.*, **60**, 1719-1725.
- Carlson,C.R., Johansen,T., y Kolstø,A.-B. (1996). The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579. *FEMS Microbiol.Lett.*, **141**, 163-167.
- Chang,Y.-H., Shangkuan,Y.H., Lin,H.C., y Liu,H.-W. (2003). PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 4502-4510.

- Chen,M.L. y Tsen,H.Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J.Appl.Microbiol.*, **92**, 912-919.
- Chen,S., Yee,A., Griffiths,M., Larkin,C., Yamashiro,C.T., Behari,R., Paszko-Kolva,C., Rahn,K., y De Grandis,S.A. (1997). The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int.J.Food Microbiol.*, **35**, 239-250.
- Cheng,Z. y Griffiths,M.W. (2003). Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rise water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, **66**, 1343-1352.
- Cherif,A., Borin,S., Rizzi,A., Ouzari,H., Boudabous,A., y Daffonchio,D. (2003a). *Bacillus anthracis* diverges from related clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes. *Appl.Envirn.Microbiol.*, **69**, 33-40.
- Cherif,A., Brusetti,L., Borin,S., Rizzi,A., Boudabous,A., Khyami-Horani,H., y Daffonchio,D. (2003b). Genetic relationship in the "*Bacillus cereus* group" by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis* -specific rep-PCR fragment. *J.Appl.Microbiol.*, **94**, 1108-1119.
- Choma,C., Guinebretière,M.H., Carlin,F., Schmitt,P., Velge,P., Granum,P.E., y Nguyen-The,C. (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in comercial cooked chilled foods containing vegetables. *J.Appl.Microbiol.*, **88**, 617-625.
- Choma,C. y Granum,P.E. (2002). The enterotoxin T (BceT) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol.Lett.*, **217**, 115-119.
- Churruca,E., Girbau,C., Martínez,I., Mateo,E., Alonso,R., y Fernández-Astorga,A. (2007). Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken meat samples by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacons. *Int.J.Food Microbiol.*, **117**, 85-90.
- Claus,D. y Berkeley,R.C.W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (ed. by P.H.A.Sneath et al.), pp. 1105-1139. Williams y Wilkins, Baltimore, MD.
- Clements,M.O. y Moir,A. (1998). Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *J.Bacteriol.*, **180**, 6729-6735.
- Cohn,F. (1872). Untersuchungen über bacterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, **1**, 127-224.

Compton,J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, **350**, 91-92.

Cools,I., Uyttendaele,M., D'Haese,E., Nelis,H.J., y Debevere,J. (2006). Development of a real-time NASBA assay for the detection of *Campylobacter jejuni* cells. *J.Microbiol.Meth.*, **66**, 313-320.

Cooper,R.M. y McKillip,J.L. (2006). Enterotoxigenic *Bacillus* spp. DNA fingerprint revealed in naturally contaminated nonfat dry milk powder using rep-PCR. *J.Basic Microbiol.*, **5**, 358-364.

Costafreda,M.I., Bosch,A., y Pintó,R.M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR assay for quantification of Hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl.Environ.Microbiol.*, **72**, 3846-3855.

D

D'Souza,D.H. y Jaykus,L.A. (2003). Nucleic acid sequence based amplification for the rapid and sensitive detection of *Salmonella enterica* from foods. *J.Appl.Microbiol.*, **95**, 1343-1350.

Daffonchio,D., Borin,S., Frova,G., Manachini,P.L., y Sorlini,C. (1998). PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **48**, 107-116.

Daffonchio,D., Cherif,A., y Borin,S. (2000). Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the "*Bacillus cereus* group". *Appl.Environ.Microbiol.*, **66**, 5460-5468.

Daffonchio,D., Cherif,A., Brusetti,L., Rizzi,A., Mora,D., Boudabous,A., y Borin,S. (2003). Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 5128-5137.

Daffonchio,D., Raddadi,N., Merabishvili,M., Cherif,A., Carmagnola,L., Brusetti,L., Rizzi,A., Chanishvili,N., Sharp,R., y Borin,S. (2006). Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **72**, 1295-1301.

Damgaard,P.H., Granum,P.E., Bresciani,J., Torregrossa,M.V., Eilenberg,J., y Valentino,L. (1997). Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Inmunol.Med.Microbiol.*, **18**, 47-53.

- De Clerck,E., Van Mol,K., Jannes,G., Rossau,R., y De Vos,P. (2004). Desing of a 5´exonuclease-based real-time PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus licheniformis*, members of the "B. cereus group" and *B. fumarioli* in gelatine. *Lett.Appl.Microbiol.*, **39**, 109-115.
- De Medici,D., Croci,L., Delibato,E., Di Pasquale,S., Filetici,E., y Toti,L. (2003). Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 3456-3461.
- De Vos,P. (2002). Nucleic acid analysis and SDS-PAGE of whole-cell proteins in *Bacillus* taxonomy. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives (ed. by R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, y P. De Vos), pp. 141-159. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- De Vries,Y.P. (2006). *Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination., Wageningen University, the Netherlands.
- Deane,E.E., Kelly,S.P., Collins,P.M., y Woo,N.Y.S. (2003). Larval development of silver sea bream (*sparus sarba*): ontogeny of RNA-DNA ratio, GH, IGF-I, and Na⁺-K⁺-ATPase. *Mar.Biotechnol.*, **5**, 79-91.
- Debretson,A., Habtemariam,T., Wison,S., Nganwa,D., y Yehualaeshet,T. (2007). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol.Cel.Probes*, **21**, 177-181.
- De la Cruz,W.P., Gozum,M.M.A., Lineberry,S.F., Stassen,S.D., Daughtry,M., Stassen,N.A., Jones,M.S., y Johnson,O.L. (2006). Rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* by real-time fluorescence resonance energy transfer PCR. *J.Food Prot.*, **69**, 1347-1353.
- Derzelle,S. y Dilasser,F. (2006). A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae. *BMC Microbiol.*, **6**, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/100>.
- Desroche,N., Beltramo,C., y Guzzo,J. (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J.Microbiol.Meth.*, **60**, 325-333.
- Dierick,K., Van Coillie,E., Swiecicka,I., Meyfroid,G., Devlieger,H., Meulemans,A., Hoedemaekers,G., Fourie,L., Heyndrickx,M., y Mahillon,J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J.Clin.Microbiol.*, **43**, 4277-4279.
- Dietrich,R., Moravek,M., Bürk,C., y Granum,P.E. (2005). Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the

Bacillus cereus nonhemolytic enterotoxin complex. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8214-8220.

Drobniewski, F.A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**, 324-338.

Dubois, E., Hennechart, C., Merle, G., Burger, C., Hmila, N., Ruelle, S., Perelle, S., y Ferré, V. (2007). Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances. *Int. J. Food Microbiol.*, **117**, 141-149.

Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day, T., y Notermans, S. (1994). Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 99-109.

Dufrenne, J., Bijwaard, M., te Giffel, M.C., Beumer, R.R., y Notermans, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, **27**, 175-183.

E

Edwards, K. J., y Logan, J. M. J. (2004). Mutation detection by Real-Time PCR. Real-Time an essential guide (ed. by K. Edwards, J. Logan, y N. Saunders), pp. 185-210. Horizon Bioscience, London.

Ehling-Schulz, M., Fricker, M., y Scherer, S. (2004). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.*, **48**, 479-487.

Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretière, M.H., Lindbäck, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Märtlbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., y Scherer, S. (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, **151**, 183-197.

Ehling-Schulz, M., Guinebretière, M.H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M., y Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **260**, 232-240.

Ellerbrok, H., Nattermann, H., Özel, M., Beutin, L., Appel, B., y Pauli, G. (2002). Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.*, **214**, 51-59.

Ellingson, J.L.E., Anderson, J.L., Carlson, S.A., y Sharma, V.K. (2003). Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Molecular and cellular probes*, **18**, 51-57.

Ellingson, J.L.E., Koziczowski, J.J., Anderson, J.L., Carlson, S.A., y Sharma, V.K. (2005). Rapid PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in bovine food products and feces. *Mol.Cel.Probes*, **19**, 213-217.

Eyigor, A. y Carli, K.T. (2003). Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Dis.*, **47**, 380-386.

F

Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P., y Granum, P.E. (2004). Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, **150**, 2689-2697.

Farrar, W.E. y Reboli, A.C. (1991). The genus *Bacillus*-Medical. The Prokaryotes (ed. by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, y K.-H. Schleifer), pp. 1746-1768. Springer-Verlag, Barcelona.

Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Höfle, M.G., y Guzmán, C.A. (2004). Establishment of a real-time pcr-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 3618-3623.

Flekna, G., Štefanic, P., Wagner, M., Smulders, F.J.M., Možina, S.S., y Hein, I. (2007). Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/rea-time PCR. *Res.Microbiol.*, **158**, 405-412.

Flügge, C. (1886). Die Mikroorganismen. F.C.W.Vogel, Leipzig.

Fortin, N.Y., Mulchandani, A., y Chen, W. (2001) Use of Real-Time Polymerasa Chain Reaction and Molecular Beacons for the Detection of *Escherichia coli* 0157:H7. *Anal.Biochem.*, **289**, 281-288.

Fox, G.E., Pechman, K.R., y Woese, C.R. (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *Intl.J.System.Bacteriol.*, **27**, 44-57.

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Bach, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsén, K.R., Chen, K.N., y Woese, C.R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*, **209**, 457-463.

Frankland, G.C. y Frankland, P.F. (1887). Studies on some new microorganisms obtained from air. *Royal Society London, Philosophical Transactions, Series B, Biological Sciences*, **178**, 257-287.

- Fricke, M., Messelhäuber, U., Busch, U., Scherer, S., y Ehling-Schulz, M. (2007). Diagnostic Real-Time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1892-1898.
- Fritze, D. (2002). *Bacillus* identification-traditional approaches. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives (ed. by R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, y De Vos), pp. 100-122. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, **94**, 1245-1248.
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazábal, V., y Granum, P.E. (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1178-1183.
- Fukushima, H., Tsunomori, Y., y Seki, R. (2003). Duplex real-time Sybr Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5134-5146.
- Fykse, E.M., Olsen, J.S., y Skogan, G. (2003). Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.*, **55**, 1-10.
- Fykse, E.M., Skogan, G., Davies, W., Olsen, J.S., y Blatny, J.M. (2007). Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1457-1466.

G

- García-Armesto, M.R. y Sutherland, A.D. (1997). Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *J. Dairy Res.*, **64**, 261-270.
- Gaviria, A.M., Granum, P.E., y Priest, F.G. (2000). Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **190**, 151-155.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., y Senesi, S. (2002). Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.*, **208**, 129-134.
- Gilmore, M.S., Cruz-Rodz, A.L., Leimeister-Wächter, M., Kreft, J., y Goebel, W. (1989). A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelase genes: Nucleotide sequence and genetic linkage. *J. Bacteriol.*, **171**, 744-753.

- González-Escalona, N., Fey, A., Höfle, M.G., Espejo, R.T., y Guzmán, C.A. (2006). Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environ.Microbiol.*, **8**, 658-666.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C., y Pang, H.-N. (1973). *The Genus Bacillus*, Agriculture Handbook edn, Washington, D.C.
- Gore, H.M., Wakeman, C.A., Hull, R.M., y McKillip, J.L. (2003). Real-time molecular beacon NASBA reveals *hblC* expression from *Bacillus* spp. in milk. *Biochem.Biophysical Res.Comunications*, **311**, 386-390.
- Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., y Hara-Kudo, Y. (2007). Real-Time PCR method for quantification of *staphylococcus aureus* in Milk. *J.Food Prot.*, **70**, 90-96.
- Grant, M.A., Hu, J., y Jinneman, K.C. (2006). Multiplex real-time PCR detection of heat-labile and heat-stable toxin genes in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J.Food Prot.*, **69**, 412-416.
- Granum, P.E. (1997). *Bacillus cereus*. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers (ed. by M. P. Doyle, L. R. Beuchat, y T. J. Montville), pp. 327-336. ASM Press, Washington D.C.
- Granum, P.E. (2002). *Bacillus cereus* and food poisoning. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives (ed. by R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, y P. De Vos), pp. 141-159. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Guinebretière, M.H., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F., y Nguyen-The, C. (2001). Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Appl.Environ.Microbiol.*, **67**, 4520-4530.
- Guinebretière, M.H., Broussolle, V., y Nguyen-The, C. (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J.Clin.Microbiol.*, **40**, 3053-3056.
- Guttman, D.M. y Ellar, D.J. (2000). Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiol.Lett.*, **188**, 7-13.
- Guy, R.A., Kapoor, A., Holicka, J., Shepherd, D., y Horgen, P.A. (2006). A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughterhouses. *J.Food Prot.*, **69**, 1265-1272.

H

- Hansen, B.M. y Hendriksen, N.B. (2001). Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 185-189.
- Hansen, B.M., Leser, T.D., y Hendriksen, N.B. (2001). Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**, 209-213.
- Hansen, B.M., Leser, T.D., y Hendriksen, N.B. (2002). Corrigendum to "Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells" [FEMS Microbiol. Lett. 202 (2001). 209-213]. *FEMS Microbiol. Lett.*, **209**, 139.
- Hansen, B.M., Høiby, P.E., Jensen, G.B., y Hendriksen, N.B. (2003). The *Bacillus cereus bceT* enterotoxin sequence reappraised. *FEMS Microbiol. Lett.*, **223**, 21-24.
- Hägglom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M.A., y Salkinoja-Salonen, M.S. (2002). Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2479-2483.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., y Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, **6**, 986-994.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E., y Wagner, M. (2001a). Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res. Microbiol.*, **152**, 37-46.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., y Wagner, M. (2001b). Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3122-3126.
- Hein, I., Jorgensen, H.J., Loncarevic, S., y Wagner, M. (2005). Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. *Res. Microbiol.*, **156**, 554-563.
- Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M., y Wagner, M. (2006). Real-Time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to conventional PCR system suggested by food-PCR project. *J. Microbiol. Meth.*, **66**, 538-547.

- Helgason,E., Caugant,D.A., Olsen,I., y Kolstø,A.-B. (2000a). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B.thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J.Clin.Microbiol.*, **38**, 1615-1622.
- Helgason,E., Okstad,O.A., Caugant,D.A., Johansen,H.A., Fouet,A., Mock,M., Hegna,I., y Kolstø,A.-B. (2000b). *Bacillus anthracis* , *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* one species on the basis of genetic evidence. *Appl.Environ.Microbiol.*, **66**, 2627-2630.
- Helgason,E., Tourasse,J.N., Meisal,R., Caugant,D.A., y Kolstø,A.-B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 191-201.
- Heller,L.C., Davis,C.R., Peak,K.K., Wingfield,D., Cannons,A.C., Amuso,P.T., y Cattani,J. (2003). Comparison of methods for DNA isolation from samples for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 1844-1846.
- Hendriksen,N.B., Hansen,B.M., y Johansen,J.E. (2006). Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie van Leeuwenhoek*, **89**, 239-249.
- Hernández,E., Ramiisse,F., Ducoureau,J.-P., Cruel,T., y Cavallo,J.-D. (1998). *Bacillus thuringiensis* subsp. *Konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J.Clin.Microbiol.*, **36**, 2138-2139.
- Heyndrickx,M. y Scheldeman,P. (2002). Bacilli asociated with spoilage in dairy products and other food. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives (ed. by R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, y De Vos), pp. 64-82. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., y Watson,R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BIO/TECHNOLOGY*, **11**, 1026-1030.
- Hill,K.K., Ticknor,L.O., Okinaka,R.T., Asay,M., Blair,H., Bliss,K.A., Laker,M., Pardington,P.E., Richardson,A.P., Tonks,M., Beecher,D.J., Kemp,J.D., Kolstø,A.-B., Lee Wong,A.C., Kleim,P., y Jackson,P.J. (2004). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 1068-1080.
- Hill,W.E. (1996). The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.*, **36**, 123-173.
- Hilliard,N.J., Schelonka,R.L., y Waites,K.B. (2003). *Bacillus cereus* bacteremia in preterm neonate. *J.Clin.Microbiol.*, **41**, 3441-3444.

- Hoffmaster,A.R., Ravel,J., Rasko,D.A., Chapman,G.D., Chute,M.D., Marston,C.K., De,B.K., Sacchi,C.T., Fitzgerald,C., Mayer,L.W., Maiden,M.C.J., Priest,F.G., Barker,M., Jiang,L., Cer,R.Z., Rilstone,J., Peterson,S.N., Weyant,R.S., Galloway,D.R., Read,T.D., Popovic,T., y Fraser,C.M. (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *PNAS*, **101**, 8449-8454.
- Hoffmaster,A.R., Hill,K.K., Gee,J.E., Marston,C.K., De,B.K., Popovic,T., Sue,D., Wilkins,P.P., Avashia,s.B., Drumgoole,R., Helma,C.H., Ticknor,L.O., Okinaka,R.T., y Jackson,P.J. (2006). Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *J.Clin.Microbiol.*, **44**, 3352-3360.
- Holicka,J., Guy,R.A., Kapoor,A., Shepherd,D., y Horgen,P.A. (2006). A rapid (one day), sensitive real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Can.J.Microbiol.*, **52**, 992-998.
- Holland,P.M., Abramson,R.D., Watson,R., y Gelfand,D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilising the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **88**, 7276-7280.
- Hoorfar,J., Malorny,B., Abdulmawjood,A., Cook,N., Wagner,M., y Fach,P. (2004a). Practical considerations in design of Internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J.Clin.Microbiol.*, **42**, 1863-1868.
- Hoorfar,J., Wolffs,P., y Rådström,P. (2004b). Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *APMIS*, **112**, 808-812.
- Hornstra,L.M., De Vries,Y.P., De Vos,W.M., Abee,T., y Wells-Bennik,M.H.J. (2005). *gerR*, a novel *ger* operon involved in L-alanine- and innoseine-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl.Environ.Microbiol.*, **71**, 774-781.
- Horsmon,J.R., Cao,Ch.J., Khan,a.S., Gostomski,M.V., Valdes,J.J., y O'Connell,K.P. (2006). Real-time fluorogenic PCR assays for the detection of *entA*, the gene encoding staphylococcal enterotoxin A. *Biotech.Lett.*, **28**, 823-829.
- Hough,A.J., Harbison,S.A., Savill,M.G., Melton,L.D., y Fletcher,G. (2002). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J.Food Prot.*, **65**, 1329-1332.
- Hsieh,Y.M., Sheu,S.J., Chen,Y.L., y Tsen,H.Y. (1999). Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and

B. cereus strains from foods and food-borne outbreaks. *J.Appl.Microbiol.*, **87**, 481-490.

Huang,Q., Hu,Q., y Li,Q. (2007). Identification of 8 foodborne pathogens by multicolor combinational probe coding technology in a single real-time PCR. *Clin.Chem.*, **53**, 1741-1748.

Hughes,S., Bartholomew,B., Hardy,J.C., y Kramer,J.M. (1988). Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *FEMS Microbiol.Lett.*, **52**, 7-12.

I

Ibekwe,A.M., Watt,P.M., Grieve,C.M., Sharma,V.K., y Lyons,S.R. (2002). Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Appl.Environ.Microbiol.*, **68**, 4853-4862.

Ishiguro,T., Saitoh,J., Yawata,H., Yamagishi,H., Iwasaki,S., y Mitoma,Y. (1995). Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal.Biochem*, **229**, 207-213.

Ivanova,N., Sorokin,A., Anderson,L., Galleron,N., Candelon,B., Kapatral,V., Bhattacharyya,A., Reznik,G., Mikhailova,N., Lapidus,a., Chu,L., Mazur,M., Goltsman,E., Larsen,N., D'Souza,M., Walunas,T., Grechkin,Y., Pusch,G., Haselkorn,R., Fonstein,M., Ehrlich,S.D., Overbeek,R., y Kyrpides,N. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, **423**, 87-91.

J

Jackson,S.G., Goodbrand,R.B., Ahmed,R., y Kasatiya,S. (1995). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett.Appl.Microbiol.*, **21**, 103-105.

Jensen,G.B., Hansen,B.M., Ellenberg,J., y Mahillon,J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ.Microbiol.*, **6**, 631-640.

Jensen,G.B., Fisker,N., Sparsø,T., y Andrup,L. (2005). The possibility of discriminating within the *Bacillus cereus* group using *gyrB* sequencing and PCR-RFLP. *Int.J.Food Microbiol.*, **104**, 113-120.

Jofré,A., Martín,B., Garriga,M., Hugas,M., Pla,M., Rodríguez-Lázaro,D., y Aymerich,T. (2005). Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiol.*, **22**, 109-115.

Josefsen,M.H., Cook,N., D'Agostino,M., Hansen,F., Wagner,M., Demnerova,K., Heuvelink,A.E., Tassios,P.T., Lindmark,H., Kmet,V., Barbanera,M., Fach,P., Loncarevic,S., y Hoorfar,J. (2004). Validation of a PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters* in a multicenter collaborative trial. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 4379-4383.

Josefsen,M.H., Krause,M., Hansen,F., y Hoorfar,J. (2007). Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. *Appl.Environ.Microbiol.*, **73**, 3040-3048.

Josephson,K.L., Gerha,C.P., y Pepper,I.L. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl.Environ.Microbiol.*, **59**, 3513-3515.

Joung,K.-B. y Coté,J.-C. (2002). A single phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* strains and bacilli species from 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism is congruent with two independent phylogenetic analyses. *J.Appl.Microbiol.*, **93**, 1075-1082.

Jourdan,A.D., Johnson,S.C., y Wesley,I.V. (2000). Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the ail gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **66**, 3750-3755.

K

Kawasaki,S., Kimura,B., y Fujii,T. (2001). Comparison of TaqMan *Salmonella* amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of *Salmonella* in meat samples. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **42**, 33-39.

Kay,S. y Van den Eede,G. (2001). The limits of GMO detection. *Nature biotech.*, **19**, 405.

Keim,P., Kalif,A., Schupp,J., Hill,K., Travis,S.E., Richmond,K., Adair,D.M., Hugh-Jones,M., Kuske,C.R., y Jackson,P. (1997). Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J.Bacteriol.*, **179**, 818-824.

Kim,Y.-R., Czajka,J., y Batt,C.A. (2000). Development of a fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in nonfat dry milk. *Appl.Environ.Microbiol.*, **66**, 1453-1459.

Kim,K., Seo,J., Wheeler,K., Park,C., Kim,D., Park,S., Kim,W., Chung,S.-I. y Leighton,T. (2005). Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, **43**, 301-310.

- Kimura,B., Kawasaki,J., Fujii,T., Kusunoki,J., Itoh,T., y Flood,S.J. (1999). Evaluation of TaqMAN PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. *J.Food Prot.*, **62**, 329-335.
- Klein,P.G. y Juneja,V.K. (1997). Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl.Environ.Microbiol.*, **63**, 4441-4448.
- Kleppe,K., Ohtsuka,E., Kleppe,R., Molineux,I., y Khorana,H.G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polimerasas. *J.Mol.Biol.*, **56**, 341-361.
- Knutsson,R., Löfström,C., Grage,H., Hoorfar,J., y Rådström,P. (2002). Modeling of 5´nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *J.Clin.Microbiol.*, **40**, 52-60.
- Ko,K.S., Kim,J.M., Kim,J.W., Jung,B.Y., Kim,W., Kim,I.J., y Kook,Y.H. (2003). Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. *J.Clin.Microbiol.*, **41**, 2908-2914.
- Koo,K. y Jaykus,L.-A. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* from a model food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric fluorogenic probe set. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 1082-1088.
- Kostrikis,L.G., Tyagi,S., Mhlanga,M.M., Ho,D.D., y Kramer,F.R. (1998). Spectral genotyping of human alleles. *Science*, **279**, 1228-1229.
- Kotiranta,A., Lounatmaa,K., y Haapasalo,M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, **2**, 189-198.
- Kramer,J.M. y Gilbert,R.J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Foodborne bacterial pathogens (ed. by M. P. Doyle), pp. 21-70. Marcel Dekker, New York.
- Krause,M., Josefsen,M.H., Lund,M., Jacobsen,N.R., Brorsen,L., Moos,M., Stockmarr,A., y Hoorfar,J. (2006). Comparative, collaborative, and on-site validation of a TaqMan PCR method as a tool for certified production of fresh, *Campylobacter*-free chickens. *Appl.Environ.Microbiol.*, **72**, 5463-5468.
- Kutyavin,I.V., Afonina,I.A., Mills,A., Gorn,V.V., Lukhtanov,E.A., Belousov,E.S., Singer,M.J., Walburger,D.K., Lokhov,E.A., Gall,A.A., Dempcy,R., Reed,M.W., Meyer,R.B., y Hedgpeth,J. (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 655-661.

L

- La Duc, M.T., Satomi, M., Agata, N., y Venkateswaran, K. (2004). *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *J.Microbiol.Meth.*, **56**, 383-394.
- Le Pecq, J.B. y Paoletti, C. (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal.Biochem*, **17**, 100-107.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüb, B.M., Kaplan, T., Wiebner-Gunkel, E., Stewart, G.S.A.B., y Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **48**, 1373-1382.
- Lee, A.M., Squirrel, D.J., Leslie, D.L., y Brown, T. (2004). Homogenous fluorescent chemistries for Real-Time PCR. Real-Time an essential guide (ed. by K. Edwards, J. Logan, y N. Saunders), pp. 31-70. Horizon Bioscience, London.
- Liming, S.H. y Bhagwat, A.A. (2004). Application of a molecular beacon - real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *Int.J.Food Microbiol.*, **95**, 177-187.
- Lindbäck, T. y Granum, P.E. (2005). Detection and purification of *Bacillus cereus* endotoxins. Food-Borne Patogens: Methods and Protocols (ed. by C. C. Adley), pp. 15-26. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Lindsay, D., Oosthuizen, M.C., Brözel, V.S., y Von Holy, A. (2002). Adaptation of neutrophilic dairy-associated *Bacillus cereus* isolate to alkaline pH. *J.Appl.Microbiol.*, **92**, 81-89.
- Lindsay, D., Brözel, V.S., y Von Holy, A. (2006). Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. *J.Food Prot.*, **69**, 1168-1172.
- Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., y Huang, X. (2006). Real time PCR using TaqMan and SYBR green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J.Microbiol.Meth.*, **65**, 21-31.
- Livak, K.J., Flood, S.A., Marmaro, J., Giusti, W., y Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridisation. *PCR Meth.Appl.*, **4**, 357-362.
- Logan, N.A., Capel, B.J., Melling, J., y Berkeley, R.C.W. (1979). Distinction between emetic and other strains of *Bacillus cereus* using the API system and numerical methods. *FEMS Microbiol.Lett.*, **5**, 373-375.

- Logan, N.A. y Berkeley, R.C.W. (1981). Classification and identification of members of the genus *Bacillus*. The aerobic endospore-forming bacteria (ed. by R. C. W. Berkeley y M. Goodfellow), pp. 105-140. Academic Press, London.
- López-Enríquez, L., Rodríguez-Lázaro, D., y Hernández, M. (2007). Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in Milk by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3747-3751.
- Lövenklev, M., Holst, E., Borch, E., y Rådström, P. (2004). Relative neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum* type B, determined using quantitative reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2919-2927.
- Lövgren, A., Carlson, C.R., Kang, D., Eskils, K., y Kolstø, A.-B. (2002). Physical mapping of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *alesti* chromosomes. *Curr. Microbiol.*, **44**, 81-87.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lübmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatidis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., y Schleifer, K.-H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1363-1371.
- Lund, T. y Granum, P.E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.*, **141**, 151-156.
- Lund, T., De Buyser, M.L., y Granum, P.E. (2000). A new enterotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.*, **38**, 254-261.
- Lyon, W.J. (2001). TaqMan PCR detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4685-4693.

M

- Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.*, **10**, 190-212.
- Mahler, H., Pasi, A., y Kramer, J.M. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England J. Med.*, **336**, 1031-1035.
- Makino, S. y Cheun, H. (2003). Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J. Microbiol. Meth.*, **53**, 141-147.

- Malorny,B., Hoorfar,J.,Bunge,C., y Helmuth,R. (2003a). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 290-296.
- Malorny,B., Tassios,P.T., Rådström,P., Cook,N., Wagner,M., y Hoorfar,J. (2003b). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int.J.Food Microbiol.*, **83**, 39-48.
- Malorny,B., Bunge,C., y Helmuth,R. (2007a). A real-time PCR for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *J.Microbiol.Meth.*, **70**, 245-251.
- Malorny,B., Made,D., Teufel,P., Berghof-Jager,C., Huber,I., Anderson,A., y Helmith,P. (2007b). Multicenter validation study of two blockcycler and one capillary-based real-time PCR methods for the detection of *Salmonella* in milk. *Int.J.Food Microbiol.*, **117**, 211-218.
- Manzano,M., Cocolin,L., Cantoni,C., y Comi,G. (2003a). *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int.J.Food Microbiol.*, **81**, 249-254.
- Manzano,M., Giusto,C., Lacumin,L., Cantoni,C., y Comi,G. (2003b). A molecular method to detect *Bacillus cereus* from a coffee concentrate sample used in industrial preparations. *J.Appl.Microbiol.*, **95**, 1361-1366.
- Martínez-Blanch,J.F., Ocio,M.J., Pinto,B., Garay,E., y Aznar,R. Detection of toxigenic members of the *Bacillus cereus* group by quantitative Real-Time PCR. 2003. Unpublished Work
- Masters,C.I., Shallcross,J.A., y Mackey,B.M. (1994). Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J.Appl.Bacteriol.*, **77** , 73-79.
- Matthews,J., Chung,M., y Matyas,J. (2002). Persistent DNA contamination in competitive RT-PCR using cRNA internal standards: identity, quantity, and control. *BioT*, **32**, 1412-1417.
- Mauer,J.J. (2006). The mythology of PCR: a warning to the wise. PCR methods in foods (ed. by J. J. Mauer), pp. 27-40. Springer, New York, NY.
- Mäntynen,V. y Lindström,K. (1998). A rapid PCR-based DNA test for enterotoxin *Bacillus cereus*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **64**, 1634-1639.
- McIngvale,S.C., Elhanafi,D., y Drake,M.A. (2002). Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **68**, 799-806.

- McKillip, J.L., Jaykus, L.-A., y Drake, M.A. (1998). rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4264-4268.
- McKillip, J.L. (2000). Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**, 393-399.
- McKillip, J.L. y Drake, M. (2000). Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J. Food Prot.*, **63**, 855-859.
- McKillip, J.L. y Drake, M.A. (2004). Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J. Food Prot.*, **67**, 823-832.
- Meer, R.R., Bakker, J., Bodyfelt, F.W., y Griffiths, M.W. (1991). Psychotropic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *J. Food Prot.*, **54**, 969-979.
- Mercanoglu, B. y Griffiths, M.W. (2005). Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef, and alfalfa sprouts. *J. Food Prot.*, **68**, 557-561.
- Moir, A. (2003). Bacterial spore germination and protein mobility. *TRENDS Microbiol.*, **11**, 452-454.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., y Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, **24**, 954-962.

N

- Nadal, A., Coll, A., Cook, N., y Pla, M. (2007). A molecular beacon-based real time NASBA assay for detection of *Listeria monocytogenes* in food products: role of target mRNA secondary structure on NASBA design. *J. Microbiol. Meth.*, **68**, 623-632.
- Nakamura, L.K. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 1031-1035.
- Nakano, S., Maeshima, H., Matsumura, A., Ohno, K., Ueda, S., Kuwabara, Y., y Yamada, T. (2004). A PCR assay based on a sequence-characterized amplified region marker for detection of emetic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, **67**, 1694-1701.
- Nam, H.-M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., y Oliver, S.P. (2005). Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **102**, 161-171.

- Nazarenko,I., Bhatnagar,S.K., y Hohman,R.J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2516-2521.
- Nielsen,P., Rainey,F., Outtrup,H., Priest,F.G., y Fritze,D. (1994). Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol.Lett.*, **117**, 61-66.
- Nilsson,J., Svensson,B., Ekelund,K., y Christiansson,A. (1998). A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Lett.Appl.Microbiol.*, **27**, 168-172.
- Nogva,H.K., Bergh,A., Holck,A., y Rudi,K. (2000a). Application of the 5'-nuclease PCR assay in evolution and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **66**, 4029-4036.
- Nogva,H.K., Rudi,K., Naterstad,K., Holck,A., y Lillehaug,D. (2000b). Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl.Environ.Microbiol.*, **66**, 4266-4271.
- Nogva,H.K., Dromtorp,S.M., Nissen,H., y Rudi,K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques*, **34**, 804-813.
- Norton,D.M. y Batt,C.A. (1999). Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Appl.Environ.Microbiol.*, **65**, 2122-2127.

O

- O'Hanlon,K.A., Catarama,T.M.G., Duffy,G., Blair,I.S., y McDowell,D.A. (2004). Rapid detection and quantification of *E.coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J.Appl.Microbiol.*, **96**, 1013-1023.
- Ocio,M.J., Estrada,E., Pinto,B., y Aznar,R. Identification of *Bacillus cereus* group isolates by ISR amplification. 2002. Unpublished Work
- Ogura,M. y Mitsuhashi,M. (1994). Screening method for a large quantity of polymerase chain reaction products by measuring YOYO-1 fluorescence on 96-well polypropylene plates. *Anal.Biochem*, **218**, 458-459.
- Okinaka,R., Pearson,T., y Keim,P. (2006). Anthrax, but not *Bacillus anthracis*? *PloS Pathogens*, **2**, www.plospathogens.org.

- Okstad,O.A., Gominet,M., Purnelle,B., Rose,M., Lereclus,D., y Kolstø,A.-B. (1999). Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. *Microbiol.*, **145**, 3129-3138.
- Olsen,J.E., Aabo,S., Hill,W., Notermans,S., Wernars,K., Granum,P.E., Popovic,T., Rasmussen,H.N., y Olsvik,Ø. (1995). Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int.J.Food Microbiol.*, **28**, 1-78.
- Ouoba,L.I.I., Diawara,B., Amoa-Awua,W.K., Traoré,A.S., y Møller,P.L. (2004). Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *Int.J.Food Microbiol.*, **90**, 197-205.

P

- Padungtod,P., Hanson,R., Wilson,D.L., Bell,J., Linz,J.E., y Kaneene,J.B. (2002). Identification of *Campylobacter jejuni* isolates from cloacal and carcass swabs of chickens in Thailand by a 5' nuclease fluorogenic polymerase chain reaction assay. *J.Food Prot.*, **65**, 1712-1217.
- Paniker,G., Myers,M.L., y Bej,A.K. (2004). Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 498-507.
- Paniker,G. y Bej,A.K. (2006). Real-Time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **71**, 5702-5709.
- Parkhill,J. y Berry,C. (2003). Genomics: Relative pathogenic values. *Nature*, **423**, 23-25.
- Pashionikar,S.U., Cashdollar,J., y Fout,G.S. (2004). Development of homologous viral internal control for use in RT-PCR assay of waterborne enteric viruses. *J.Virol.Meth.*, **121**, 39-48.
- Patel,J.R., Bhagwat,A.A., Sanglay,G.C., y Solomon,M.B. (2006). Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Food Microbiol.*, **23**, 39-46.
- Peng,J.-S., Tasai,W.C., y Chuo,C.C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *Int.J.Food Microbiol.*, **65**, 105-111.
- Peng,J.-S., Tsai,W.-C., y Chou,C.-C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int.J.Food Microbiol.*, **77**, 11-18.

- Perelle,S., Dilasser,F., Malorny,B., Grout,J., Hoorfar,J., y Fach,P. (2004). Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Mol.Cel.Probes*, **18**, 409-420.
- Perry,L., Heard,P., Kane,M., Kim,H., Savikhin,S., Domínguez,W., y Applegate,B. (2007). Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. *J.Rapid Meth.Aut.Mic.*, **15**, 176-198.
- Phelps,R.J. y McKillip,J.L. (2002). Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *Appl.Environ.Microbiol.*, **68**, 3147-3151.
- Pirttijärvi,T.S., Andersson,M.A., Scoging,A.C., y Salkinoja-Salonen,M. (1999). Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst.Appl.Microbiol.*, **22**, 133-144.
- Pitcher,D.G., Saunders,N.A., y Owen,R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett.Appl.Microbiol.*, **8**, 151-156.
- Priest,F.G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics (ed. by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, y R. Losick), pp. 3-16. American society for microbiology, Washington, D.C.
- Priest,F.G., Barker,M., Baillie,L.W., Holmes,E.C., y Maiden,M.C.J. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J.Bacteriol.*, **186**, 7959-7970.
- Priha,O., Hallamaa,K., Saarela,M., y Raaska,L. (2004). Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR. *J.Ind.Microbiol.Biot.*, **31**, 161-169.
- Prüß,B.M., Dietrich,R., Nibler,B., Märtlbauer,E., y Scherer,S. (1999). The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl.Environ.Microbiol.*, **65**, 5436-5442.

R

- Radhika,B., Padmapriya,B.P., Chandrashekar,A., Keshava,N., y Varadaraj,M.C. (2002). Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. *Int.J.Food Microbiol.*, **74**, 131-138.
- Raeuori,M., Kiutamo,T., y Niskanen,A. (1977). Comparative studies of *Bacillus cereus* strains isolated from various foods and food poisoning outbreaks. *Acta.Vet.Scand.*, **18**, 397-407.

- Rasko,D.A., Ravel,J., Okstad,O.A., Helgason,E., Cer,R.Z., Jiang,L., Shores,K.A., Fouts,E., Tourasse,N.J., Angiuoli,S.V., Kolonay,J., Nelson,W.C., Kolstø,A.-B., Fraser,C.M., y Read,T.D. (2004). The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 977-988.
- Rasko,D.A., Altherr,M.R., Han,C., y Ravel,J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol.Rev.*, **29**, 303-329.
- Read,T.D., Peterson,S.N., Tourasse,N., Baillie,L.W., Paulsen,I.T., Nelson,K.E., Tettelin,H., Fouts,D.,E., Eisen,J.A., Gill,S.R., Holtzapple,E.K., Okstad,O.A., Helgason,E., Rilstone,J., Wu,M., Kolonay,J.F., Beanan,M.J., Dodson,R.J., Brinkac,L.M., Gwinn,M., y *et al.* (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* , **423**, 81-86.
- Ririe,K.M., Rasmussen,R.P., y Wittwer,C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal.Biochem*, **245**, 154-160.
- Rizvi,A.V., Panicker,G., Myers,M.L., y Bej,A.K. (2006). Detection of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 serovar in Gulf of Mexico water and shellfish using real-time PCR with Taqman fluorescent probes. *FEMS Microbiol.Lett.*, **262**, 185-192.
- Rodríguez-Lázaro,D., Hernandez,M., Scotti,M., Esteve,T., Boland-Vazquez,J.A., y Pla,M. (2003). Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor Technology. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 1366-1377.
- Rodríguez-Lázaro,D., Hernandez,M., y Pla,M. (2004a). Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *FEMS Microbiol.Lett.*, **233**, 257-267.
- Rodríguez-Lázaro,D., Jofre,A., Aymerich,T., Hugas,M., y Pla,M. (2004b). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 6299-6301.
- Rodríguez-Lázaro,D., Lloyd,J., Herrewegh,A., Ikononopoulos,J., D'Agostino,M., Pla,M., y Cook,N. (2004c). A molecular beacon-based real-time NASBA assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *FEMS Microbiol.Lett.*, **237**, 119-126.
- Rodríguez-Lázaro,D. (2004). Development of molecular-based techniques for the detection, identification and quantification of food-borne pathogens., Dept. Chemical and Agricultural Engineering and Food Technology, University of Girona.

- Rodríguez-Lázaro,D., D'Agostino,M., Herrick,J.B., Pla,M., Cook,N., y Ikonomopoulos,J. (2005a). Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in water and milk. *Int.J.Food Microbiol.*, **101**, 93-104.
- Rodríguez-Lázaro,D., Jofre,A., Aymerich,T., Garriga,M., y Pla,M. (2005b). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in salmon products: evaluation of pre-real-time PCR strategies. *J.Food Prot.*, **68**, 1467-1471.
- Rodríguez-Lázaro,D., Hernandez,M., D'Agostino,M., y Cook,N. (2006). Application of nucleic acid sequence-based amplification for the detection of viable foodborne pathogens: progress and challenges. *J.Rapid Meth.Aut.Mic.*, **14**, 218-236.
- Rossen,L., Norskov,P., Holmstrom,K., y Rasmussen,O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int.J.Food Microbiol.*, **17**, 37-45.
- Rossmannith,P., Krassnig,M., Wagner,M., y Hein,I. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Res.Microbiol.*, **157**, 763-71.
- Rowan,N.J. y Anderson,J.G. (1997). Maltodextrin stimulates growth of *Bacillus cereus* and syntheses of diarrheal enterotoxin in infant milk formulae. *Appl.Environ.Microbiol.*, **63**, 1182-1184.
- Rowan,N.J., Deans,K., Anderson,J.G., Gemmell,C.G., Hunter,I.S., y Chaithong,T. (2001). Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl.Environ.Microbiol.*, **67**, 3873-3881.
- Rowan,N.J., Caldow,G., Gemmell,C.G., y Hunter,I.S. (2003). Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 2372-2376.
- Rönner,U., Husmark,U., y Henrikson,A. (1990). Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J.Appl.Bacteriol.*, **69**, 550-556.
- Rudi,K., Hoidal,H.K., Katla,T., Johansen,B.K., Nordal,J., y Jakobsen,K.S. (2004). Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl.Environ.Microbiol.*, **70**, 790-797.
- Rudi,K., Moen,B., Dromtorp,S.M., y Holck,A.L. (2005a). Use of monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl.Environ.Microbiol.*, **71**, 1018-1024.

- Rudi,K., Naterstad,K., Dromtorp,S.M., y Holo,H. (2005b). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Letts.Appl.Microbiol.*, **40**, 301-306.
- Rueckert,A., Ronimus,R.S., y Morgan,H.W. (2006). Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, *spo0A*, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. *Food Microbiol.*, **23**, 220-230.
- Ryan,P.A., Macmillan,J.M., y Zilinska,B.A. (1997). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J.Bacteriol.*, **179**, 2551-2556.

S

- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., y Arnheim,N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., y Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerasa. *Science*, **239**, 487-491.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., y Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sails,A.D., Fox,A.J., Bolton,F.J., Wareing,D.R.A., y Greenway,D.L.A. (2003). A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl.Environ.Microbiol.*, **69**, 1383-1390.
- Salmon,M.A., Vendrame,M., Kummert,J., y Lepoivre,P. (2002). Detection of apple chlorotic leaf spot virus using a 5' nuclease assay with a fluorescent 3' minor groove-DNA binding probe. *J.Virol.Meth.*, **104**, 99-106.
- Sarrías,J.A., Valero,M., y Salmerón,M.C. (2002). Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.*, **19**, 589-595.
- Schoeni,J.L. y Lee Wong,A.C. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J.Food Prot.*, **68**, 636-648.
- Schraft,H. y Griffiths,M.W. (1995). Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl.Environ.Microbiol.*, **61**, 98-102.
- Schraft,H., Steele,M., McNab,B., y Odumeru,J. (1996). Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from food. *Appl.Environ.Microbiol.*, **62**, 4229-4232.

- Seo,K.H., Valentin-Bon,I.E., Brackett,R.E., y Holt,P.S. (2004). Rapid, specific detection of *Salmonella enteritidis* in pooled eggs by real-time PCR. *J.Food Prot.*, **67**, 864-869.
- Seo,K.H., Valentin-Bon,I.E., y Brackett,R.E. (2006). Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in homemade ice cream associated with an outbreak: comparison of conventional and real-time PCR method. *J.Food Prot.*, **69**, 639-643.
- Sergeev,N., Distler,M., Vargas,M., Chizhikov,V., Herold,K.E., y Rasooly,A. (2006). Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *J.Microbiol.Meth.*, **65**, 488-502.
- Setlow,P. (2003). Spore germination. *Curr.Opin.Microbiol.*, **6**, 550-556.
- Shaheen,R., Andersson,M.A., Apetroaie,C., Schulz,A., Ehling-Schulz,M., Ollilainen,V.-M., y Salkinoja-Salonen,M.S. (2006). Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cerulide. *Int.J.Food Microbiol.*, **107**, 287-294.
- Shangkuan,Y.H. y Lin,H.C. (1998). Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. *J.Appl.Microbiol.*, **85**, 693-702.
- Shangkuan,Y.H., Yang,J.-F., Lin,H.-C., y Shaio,M.-F. (2000). Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J.Appl.Microbiol.*, **89**, 452-462.
- Sharma,V.K., Dean-Nystrom,E.A., y Casey,T.A. (1999). Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxinogenic *E. coli*. *Mol.Cel.Probes*, **13**, 291-302.
- Sharma,V.K. (2002). Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. *J.Food Prot.*, **65**, 1371-1380.
- Sheridan,G.E.C., Masters,C.I., Shallcross,J.A., y Mackey,B.M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl.Envirn.Microbiol.*, **64**, 1313-1318.
- Shin,N.-R., Shin,J.-H., Chun,J.H., Yeon,S.-Y., Kim,B.S., Oh,H.B., y Rhie,G. (2006). Determination of neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum* type A by qualitative RT-PCR. *Mol.Cells*, **22**, 336-342.
- Simpson,D.A.C., Feeney,S., Boyle,C., y Stitt,A.W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Mol.Vis.*, **6**, 178-183.

- Slamti,L. y Lereclus,D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.*, **21**, 4550-4559.
- Slamti,L., Perchat,S., Gominet,M., Vilas-Boas,G., Fouet,A., Mock,M., Sanchis,V., Chaufaux,J., Gohar,M., y Lereclus,D. (2004). Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J.Bacteriol.*, **186**, 3531-3538.
- Smith,N.R., Gordon,R.E., y Clark,F.E. (1952). *Aerobic sporeforming bacteria*, Agricultural Monograph 16 edn, Washington, D.C.
- Stefan,A., Scaramagli,S., Bergami,R., Mazzini,C., Bergami,R., Mazzini,C., Barbanera,M., Perelle,S., y Fach,P. (2007). Real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay methods for detecting Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in mincemeat samples. *Can.J.Microbiol.*, **53**, 337-342.
- Steffan,R.J. y Atlas,R.M. (1991). Polymerase chain reaction: application in environmental microbiology. *Annu.Rev.Microbiol.*, **45**, 137-161.
- Stenfors,L.P. y Granum,P.E. (2001). Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol.Lett.* , **197**, 223-228.
- Stenfors,L.P., Mayr,R., Scherer,S., y Granum,P.E. (2002). Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol.Lett.*, **215**, 47-51.
- Stephan,R. (1996). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genomic fingerprinting of *Bacillus cereus* isolates. *Int.J.Food Microbiol.*, **31**, 311-316.
- Stewart,G.S.A.B., Johnstone,K., Hagelberg,E., y Ellar,D.J. (1981). Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochem.J.*, **198**, 101-106.
- Svensson,B., Eneroth,A., Brendehaug,J., y Christiansson,A. (1999). Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *Int.Dairy J.*, **9**, 903-912.
- Svensson,B., Monthán,A., Shaheen,R., Andersson,M.A., Salkinoja-Salonen,M., y Christiansson,A. (2006). Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *Int.Dairy J.*, **16**, 740-749.

T

- Tan,W., Fang,X., Li,J., y Liu,X. (2000). Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies. *Chemistry*, **6**, 1107-1111.

- Tasara, T. y Stephan, R. (2005). Development of an F57 sequence-based real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5957-5959.
- Taylor, J.M.W., Sutherland, A.D., Aidoo, K.E., y Logan, N.A. (2005). Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **242**, 313-317.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Klijn, N., Wagendorp, A., y Rombouts, F.M. (1997). Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, **146**, 47-51.
- Te Giffel, M.C., Wagendorp, A., Herrewegh, A., y Driehuis, F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 625-630.
- Thaenthanee, S., Lee Wong, A.C., y Panbangred, W. (2005). Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, **105**, 203-212..
- Ticknor, L.O., Kolstø, A.-B., Hill, K.K., Keim, P., Laker, M.T., Tonks, M., y Jackson, P.J. (2001). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4863-4873.
- Torkar, K.G. y Mozina, S.S. (2000). Differentiation of *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products with biochemical, immunological, AP-PCR and PCR-RFLP methods. *Food Technol. Biotechnol.*, **38**, 135-142.
- Tsen, H.-Y., Chen, M.-L., Hsieh, H.-M., Sheu, S.-J., y Chen, Y.L. (2000). *Bacillus cereus* group strains, their hemolysin BL activity, and their detection in foods a 16S RNA and hemolysin BL gene-targeted multiplex polymerase chain reaction system. *J. Food Prot.*, **63**, 1496-1502.
- Tseng, S.Y., Macool, D., Elliott, V., Tice, G., Jackson, R., Barbour, M., y Amorese, D. (1997). An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella*. *Anal. Biochem*, **245**, 207-212.
- Turnbull, P.C.B., Jackson, P.J., Hill, K.K., Keim, P., Kolstø, A.-B., y Beecher, D.J. (2002). Longstanding taxonomic enigmas within the '*Bacillus cereus* group' are on the verge of being resolved by far-reaching molecular developments: forecast on the possible outcome by an *ad hoc* team. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives (ed. by R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, y De Vos), pp. 100-122. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.

Tyagi,S. y Kramer,F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation. *Nat.Biotech.*, **14**, 303-308.

Tyagi,S., Bratu,D.P., y Kramer,F.R. (1998). Multicolour molecular beacons for allele discrimination. *Nat.Biotech.*, **16**, 49-53.

U

Ueda,S. y Kumwabara,Y. (1993). An ecological study of *Bacillus cereus* in rice crop processing. *J.Antibact.Antifung.Agents*, **21**, 499-502.

Uyttendaele,M., Vanwildemeersch,K., y Debevere,J. (2003). Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett.Appl.Microbiol.*, **37**, 386-391.

V

Vaitilingom,M., Gendre,F., y Bringnon,P. (1998). Direct detection of viable bacteria, molds, and yeast by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Appl.Environ.Microbiol.*, **64**, 1157-1160.

Van Kessel,J.S., Karns,J.S., y Perdue,M.L. (2003). Using a portable real-time PCR assay to detect *Salmonella* in raw milk. *J.Food Prot.*, **66**, 1762-1767.

Van Netten,P., Van De Moosdijk,A., Van Hoensel,P., Mossel,D.A., y Perales,I. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J.Appl.Bacteriol.*, **69**, 73-79.

Vishnubhatla,A., Fung,D.Y., Oberst,R.D., Hays,M.P., Nagaraja,T.G., y Flood,S.J. (2000). Rapid 5' nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **66**, 4131-44135.

Vishnubhatla,A., Oberst,R.D., Fung,D.Y.C., Wonglumsom,W., Hays,M.P., y Nagaraja,T.G. (2001). Evaluation of a 5'-nuclease (TaqMan) assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples. *J.Food Prot.*, **64**, 355-360.

W

Wang,L., Li,Y., y Mustapha,A. (2007). Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex Real-Time PCR and Immunomagnetic separation. *J.Food Prot.*, **70**, 1366-1372.

- Wang,R.-F., Cao,W.-W., y Cerniglia,C.E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J.Appl.Microbiol.*, **83**, 727-736.
- Wang,S. y Levin,R.E. (2007). Thermal factors influencing detection of *Vibrio vulnificus* using real-time PCR. *J.Microbiol.Meth.*, **69**, 358-363.
- Wang,X., Jothikumar,N., y Griffiths,M.W. (2004). Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J.Food Prot.*, **67**, 189-192.
- Wilhelm,J. y Pingoud,A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem.*, **4**, 1120-1128.
- Wilkinson,K. D. (1930). *Bacillus coli* infections. *Can.Med.Assoc.J.*, **23**, 499-504.
- Wilson,I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl.Environ.Microbiol.*, **63**, 3741-3751.
- Wittwer,C.T., Herrmann,M.G., Moss,A.A., y Rasmussen,R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, **22**, 130-138.
- Wittwer,C.T., Herrmann,M.G., Gundry,C.N., y Elenitoba-Johnson,K.S. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, **4**, 430-442.
- Woese,C.R. y Fox,G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **74**, 5088-5090.
- Wolcott,M.J. (1991). DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. *J.Food Prot.*, **54**, 387-401.
- Wolffs,P.F., Knutsson,R., Norling,B., y Rådström,,P. (2004). Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time pcr. *J.Clin.Microbiol.*, **42**, 1042-1047.
- Wolffs,P.F., Norling,B., Hoorfar,J., Griffiths,M., y Radström,P. (2005). Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by using flotation prior to real-time PCR. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**[10], 5759-5764.
- Wolffs,P.F., Glencross,K., Thibaudeau,R., y Griffiths,M.W. (2006). Direct quantitation and detection of Salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and Real-Time PCR. *Appl.Environ.Microbiol.*, **72**, 3896-3900.

Wolff,P.F., Glencross,K., Norling,B., y Griffiths,M.W. (2007). Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. *Int.J.Food Microbiol.*, **117**, 50-54.

Wu,V.C., Fung,D.Y., y Oberst,R.D. (2004). Evaluation of a 5'-nuclease (TaqMan) assay with the thin agar layer oxyrase method for the detection of *Yersinia enterocolitica* in ground pork samples. *J.Food Prot.*, **67**, 271-277.

Y

Yamada,S., Ohashi,E., Agata,N., y Venkateswaran,K. (1999). Cloning y nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl.Environ.Microbiol.*, **65**, 1483-1490.

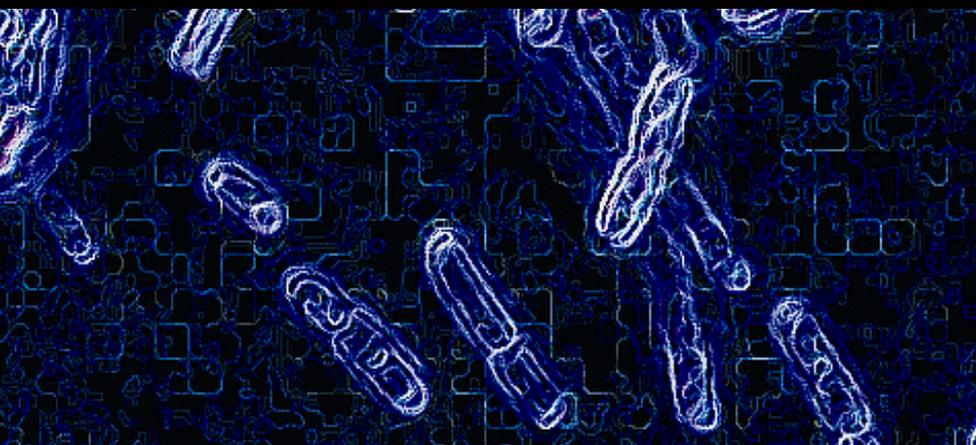
Yang,C., Jiang,Y., Huang,K., Zhu,C., y Yin,Y. (2003). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Inmunol.Med.Microbiol.*, **38**, 256-271.

Yang,I.-C., Shih,D.Y.Ch., Huang,T.-P., Huang,Y.-P., Wang,J.-Y., y Pan,T.-M. (2005). Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J.Food Prot.*, **68**, 2123-2130.

Z

Zahner,V., Cabral,D.A., Régua-Mangia,A.H., Rabinovitch,L., Moreau,G., y McIntosh,D. (2005). Distribution of genes encoding putative virulence factors and fragment length polymorphisms in the *vrrA* gene among brazilian isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl.Environ.Microbiol.*, **71**, 8107-8114.

Zhang,J. y Byrne,C.D. (1999). Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem.J.*, **337**, 231-241.



[ϕ^*] [$\phi \approx$]