

146
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"PATOGENESIS DE BACILLUS CEREUS EN
PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS"**

**TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN**



TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

**QUE PRESENTA:
SOCORRO ARACELI URIOSTEGUI TOSCANO
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
1. GENERALIDADES.....	4
1.1 Morfología y taxonomía.....	5
1.2 Nutrición.....	11
1.3 Fisiología.....	16
1.3.1 Espora.....	16
1.3.1.1 Mecanismo de esporulación, estructura y composición química.....	17
1.3.1.2 Composición antigénica de la espora....	25
1.3.1.3 Resistencia de las esporas.....	29
1.3.1.4 Inhibición de la esporulación.....	33
1.3.2 Germinación.....	37
1.3.2.1 Inhibición de la germinación.....	39
1.3.3 Sistema de transporte de electrones.....	43
1.3.4 Propiedades bioquímicas.....	45
2. PATOGENESIS.....	53
2.1 Toxinas producidas por <i>R. CEREVISIAE</i>	53
2.1.1 Toxina letal.....	55
2.1.1.1 Propiedades y características.....	55
2.1.1.2 Producción de la toxina letal.....	60
2.1.1.3 Modo de acción de los productos letales..	62
2.1.2 Hemolisinas.....	64
2.1.2.1 Propiedades y características de las hemolisinas.....	65
2.1.2.2 Producción de las hemolisinas.....	68
2.1.2.3 Modo de acción de las hemolisinas.....	71
2.1.3 Fosfolipasa-C.....	75
2.1.3.1 Propiedades y características de la fos- folipasa-C.....	75
2.1.4 Toxina necrótica.....	80
2.1.4.1 Propiedades y características de la to- xina necrótica.....	83
2.1.4.2 Producción de la toxina necrótica.....	86
2.1.4.3 Modo de acción de la toxina necrótica..	89
2.1.5 Toxina emética.....	91
2.1.5.1 Propiedades y características.....	91
2.1.5.2 Producción de la toxina.....	93

2.2	Padecimientos causados por <i>B. cereus</i>	95
2.2.1	Intoxicación alimentaria.....	95
2.2.2	Diversas enfermedades debidas a <i>B. cereus</i>	99
2.2.2.1	Panofthalmitis.....	103
2.2.2.2	Endoftalmitis.....	111
2.2.2.3	Endocarditis.....	117
2.2.2.4	Osteomielitis.....	118
2.2.2.5	Septicemia.....	120
2.2.2.6	Infecciones pulmonares.....	123
2.2.2.7	Infección similar a la gangrena gaseosa.....	124
2.2.2.8	Meningitis.....	126
3.	DIAGNOSTICO	127
3.1	Aislamiento e identificación de <i>B. cereus</i>	127
3.2	Identificación inmunológica.....	132
3.2.1	Localización de antígenos de <i>B. cereus</i> por la técnica de anticuerpos marcados con fluoresceína.....	132
3.2.2	Localización de antígenos de <i>B. cereus</i> por la técnica de anticuerpos marcados con ferri- tina.....	137
3.2.3	Inmunolectroforesis.....	138
4.	TRATAMIENTO.....	140
5.	DISCUSION.....	151
6.	CONCLUSIONES.....	163
7.	APENDICE.....	165
8.	BIBLIOGRAFIA.....	170

INTRODUCCION

Durante mucho tiempo se consideró a Bacillus cereus sólo como un contaminante de los medios de cultivo en los laboratorios clínicos, pero a partir de las últimas dos décadas se ha creado un interés predominante con respecto a la intoxicación alimentaria. Sin embargo, en los últimos diez años se han reportado muchos casos clínicos en los cuales este microorganismo se ha asociado con condiciones clínicas no relacionadas a los alimentos como son la panoftalmítis, endocarditis, neumonía, etc.

Para poder estudiar el mecanismo de patogenicidad de este microorganismo, es necesario conocer sus características taxonómicas, sus condiciones de crecimiento y necesidades nutricionales, así como su fisiología. Estos aspectos que se tratarán en el primer capítulo de este trabajo, permitirán comprender después su papel patógeno.

La patogénesis de la infección por este microorganismo está relacionada íntimamente a su producción de toxinas como la necrótica, emética, letal, etc.

Se ha postulado que la combinación de enzimas específicas elaboradas por B. cereus contribuye a su virulencia en los ojos, aunque existen también algunos casos de infecciones pleuropulmonares, osteomielitis, endocarditis y septicemia en donde se encuentra implicado este microorganismo.

Teniendo en cuenta que este microorganismo se considera oportunista, cabe señalar que los serios padecimientos mencionados se presentan principalmente en pacientes

inmunocomprometidos, así como en personas que presentan factores predisponentes como son: el abuso del alcohol, narcótico-dependencia, talasemia, cáncer, insuficiencia renal, etc.

Se sabe que la infección se disemina por vía hematógena al administrar medicamentos o drogas por vía intravenosa, o bien, se adquiere por traumas directos, cirugía, etc.

Aprovechando la composición antigénica de la espora y la producción de toxinas, se han utilizado para su identificación en el laboratorio técnicas inmunológicas como la inmunolectroforesis y la inmunofluorescencia. Aunque sembrar en medios de cultivo para observar sus características macroscópicas y al tenerlo aislado realizar las pruebas bioquímicas que lo caracterizan, no dejan de ser las pruebas de rutina para su diagnóstico.

E. cereus, en virtud de que produce beta lactamasas, usualmente resiste a estos antibióticos presentando problemas en el tratamiento, debiéndose recurrir a otros a los que sí sea sensible, como clindamicina, aminoglicósidos, tetraciclinas y cloranfenicol.

De este modo se puede justificar su importancia actual dentro de la clínica y demostrar su interés por considerarlo un microorganismo oportunista o patógeno según las condiciones del paciente.

OBJETIVOS

- 1) Estudiar las características taxonómicas del microorganismo, sus condiciones de crecimiento, necesidades nutricionales y fisiología para comprender su mecanismo de patogenicidad.
- 2) Conocer la influencia que tienen las toxinas producidas por este microorganismo en su patogénesis.
- 3) Resaltar la importancia que tiene actualmente B. cereus como microorganismo patógeno en pacientes inmunocomprometidos o bajo ciertos factores predisponentes.
- 4) Describir las características de las infecciones que provoca B. cereus en el hombre.
- 5) Concientizar al personal encargado de la salud pública, de que B. cereus siempre que se aisle e identifique en el laboratorio, deberá reportarse como tal.

1. GENERALIDADES

Es común encontrar a Bacillus cereus en suelo, agua, polvo, aire y muchos alimentos tanto manufacturados como no procesados. Esto implica que resulta fácil de adquirir una infección por este microorganismo (41).

Para poder estudiar su mecanismo de patogénesis es necesario tener un amplio conocimiento acerca de sus características taxonómicas, sus condiciones de crecimiento y necesidades nutricionales, así como su fisiología. Este ordenamiento de los aspectos que se tratarán en el presente capítulo, dará una idea clara del comportamiento del microorganismo y, de esta forma, permitirá comprender después su papel patógeno.

La composición de bases del ADN de B. cereus muestra la relación taxonómica que puede tener este microorganismo con las otras especies del género Bacillus (59).

Sus necesidades nutricionales no son complejas, no requiere de vitaminas, pero sí de uno o varios aminoácidos.

Usualmente fermenta la glucosa produciendo ácido sin gas. En cambio, en la arabinosa, xilosa, manitol, indol, sorbitol, no producen fermentación.

Metaboliza compuestos aromáticos e hidroxiaromáticos que han empezado a surgir recientemente.

Puede crecer satisfactoriamente en agar nutritivo.

Su ciclo de vida presenta dos estadios: esporulación y germinación.

1.1 Morfología y taxonomía

Bacillus cereus es un bacilo cilíndrico, que mide de 1.0 a 1.2 micras de ancho y de longitud de 3.0 a 5.0 micras, se encuentra aislado o formando cadenas cortas y largas que en ocasiones forman embrollos. La reacción que presenta con tinción de Gram es positiva. Presenta movilidad por medio de flagelos peritricos (39,59).

Cuando se tiñe ligeramente se observa el protoplasma granular o espumoso.

No presenta cápsula.

Este microorganismo es un bacilo formador de esporas con pared delgada de forma elipsoidal y situadas en su parte central sin deformar al esporangio. Miden de 1.0 a 1.5 micras y no toman una tinción ordinaria (39,56,59).

Bacillus cereus pertenece a la sección 13 del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey 9ª. edición, la cual corresponde a los cocos y bacilos formadores de endosporas.

Orden: Eubacteriales
Familia I: Bacillaceae
Género I : Bacillus
Especie: Bacillus cereus

De acuerdo al tipo de spora, el género Bacillus se clasifica en tres grupos:

Grupo I.- Bacilos formadores de esporas elipsoidales o cilíndricas, las cuales son centrales o terminales y no deforman al esporangio. Esporas con pared delgada.

Grupo II.- Esporas elipsoidales, raramente cilíndricas, centrales o terminales con deformación del esporangio, esporas con pared gruesa.

Grupo III.- Esporas esféricas, que deforman al esporangio (59).

La familia Bacillaceae se distingue por su única característica taxonómica que es la formación de endosporas, pero ésta es raramente confiable (59).

El género Bacillus distingue de otras bacterias formadoras de endosporas, en que forma catalasa, ya sea en forma aeróbica o facultativa (59).

Los primeros estudios sobre la taxonomía de las bacterias aerobias formadoras de endosporas se hicieron coleccionando cepas del género Bacillus disponibles en ese tiempo. Al aplicar un restringido número de pruebas se encontró que las especies entonces reconocidas podrían distribuirse en veinticinco especies, las cuales demostraban que el género presentaba una clasificación lógica.

Los estudios recientes que se han hecho sobre la composición de bases de ADN y su reasociación, mostraron la gran variedad de especies que hay dentro de este género, así se sugirió la necesidad de dividirlo, pero las pruebas que se han hecho para ello no han tenido éxito. A pesar de los poderosos instrumentos moleculares ahora disponibles, la clasificación de las cepas que

representan a los diferentes grupos del género no es útil porque sus características son muy irregulares; ésto es un obstáculo para poder lograr una nueva taxonomía, la cual debe tomar en cuenta no solo la composición de bases del ADN y la homología del ADN, sino también la hibridización de ADN-rARN, lo cual indica las relaciones filogenéticas con otros géneros (59).

De acuerdo a los estudios taxonómicos numéricos que se han realizado, se sugiere que el género Bacillus se puede dividir en otros cinco o seis géneros, es decir, son tan variadas las características que presentan cada una de las especies de Bacillus, que no es posible que todas ellas formen parte del mismo género, sino que sería mejor distribuir las en varios, donde sus características fueran más afines (59).

Se ha logrado la clasificación de algunas especies dentro del género, basada en los estudios de reasociación ADN/ADN (59).

Las relaciones taxonómicas que guardan las bacterias formadoras de endosporas son generalmente inciertas. La evidencia de rARN muestra que Bacillus y Clostridium pertenecen a una rama mayor de procariotes la cual también contiene géneros tales como Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Eubacterium, Acetobacterium, Sarcina y probablemente los micoplasmas. Bacillus y Clostridium son muy distintos tanto genotípicamente como genómicamente.

Sporosarcina y Planococcus están estrechamente relacionados con Bacillus en cuanto al rARN 16S (59).

Los formadores de endosporas son una rama diferente de bacterias, pero ésta también contiene géneros que no forman endosporas. Es evidente que las agrupaciones genéricas comunes

ponen mucho énfasis en la esporulación y la forma de la célula; si ésto no se tomara en cuenta, las semejanzas entre algunas especies en un género, tales como Bacillus, Sporosarcina y Planococcus, o Bacillus, Sporolactobacillus y Lactobacillus serían muy fuertes. Dependiendo de la formación de esporas, es probable que en el futuro, las especies del género Bacillus se agrupen en otros géneros (59).

Composición de la pared celular.- Los ácidos teicoico y teicurónico de la pared celular se han detectado en algunas especies de Bacillus. Sus implicaciones taxonómicas aún no se han establecido, como tampoco en el caso de los polisacáridos encontrados en la pared celular de las bacterias del género (1, 59).

Cápsulas.- Algunas especies de Bacillus producen cápsula de carbohidratos; las estructuras de levanas y dextranas son comunes.

La producción de estas estructuras y su naturaleza química no son de gran utilidad taxonómica (59).

Flagelos.- La mayor parte de las especies de Bacillus son móviles por medio de flagelos peritricos, la flagelación no es un carácter de uso taxonómico en este género, aunque se ha hecho uso de esta característica por la falta de movilidad de algunas especies. Bacillus cereus es normalmente móvil, pero algunas veces se han encontrado cepas no móviles, por ejemplo, Logan y Berkeley encontraron 5 inmóviles de 149 estudiadas (59).

Esporas.- La forma de la espora, su posición en el esporangio y la medida relativa de este último, son

características de uso taxonómico.

Las esporas de Bacillus muestran una ultraestructura más compleja que la vista en las secciones de una célula vegetativa. El protoplasto de la espora (centro de la espora) está rodeado por la pared de la célula germinativa, la corteza y después la envoltura de la espora. Dependiendo de las especies podría estar presenta un exosporo (59).

De acuerdo a la organización y al número de copas que rodean al protoplasto es como pueden diferenciarse las especies de Bacillus. Las implicaciones taxonómicas de estas diferencias de la ultraestructura no son muy claras (2,59).

Las cepas de Bacillus no forman endosporas bajo todas las condiciones de cultivo. Esto es más importante desde un punto de vista taxonómico y especialmente en la identificación de algunas bacterias aisladas, ya que cepas de Bacillus no esporulados, podrían identificarse como miembros de otro género.

La manera por la cual se abre la envoltura es una característica de la cepa y generalmente no está influenciada fuertemente por factores ambientales, se puede abrir en forma polar o ecuatorial, por desdoblamiento a lo largo del eje celular, por expansión de la bacteria quedando las dos mitades de la envoltura de la espora en ambos extremos de la célula germinativa, o por lisis de la envoltura. B. cereus y B. megaterium lisan frecuentemente sus envolturas (59).

El modo de abrir la envoltura es un carácter de valor taxonómico que no está bien establecido.

Genética.-

a) Se ha revisado recientemente el uso de bacteriófagos para tipificar a Bacillus cereus.

b) Estudio de la composición de bases del ADN

Las especies pertenecientes a un género no deberían diferir en la composición de su ADN más de 10 a 15 por ciento. El porcentaje molar de G+C del ADN de cepas del género Bacillus difiere por más del 30 por ciento, indicando que es heterogéneo. El valor más bajo reportado (31.7% molar de G+C) es para una cepa de Bacillus cereus, considerando el valor más alto de 69 por ciento molar que fue encontrado para B. thermocatenuatus.

Las cepas que pertenecen a una especie única no deberían diferir en la composición de bases de su ADN más que en dos por ciento.

c) Estudio en la reasociación de ADN

Estudios del ADN homólogo han contribuido a un concepto más satisfactorio de qué es una especie bacteriana y la técnica de reasociación de ADN podría ser la base para el reconocimiento de cepas de igual especie. En base a esta técnica se han hecho progresos en la taxonomía del género Bacillus.

Aunque estudios de reasociación de ADN han mostrado la falta de relación genética entre ciertas especies de Bacillus, se ha visto que Bacillus anthracis, B. cereus y B. thuringiensis tienen una alta homología de ADN entre sí, por lo cual se podría considerar como miembros de una sola especie (59).

d) Estudio de la hibridización de ADN-rARN.- Catalogación de oligonucleótidos comparativos de rARN-ADN.

El amplio rango de la composición de bases del ADN que es de

30 a 70 por ciento molar de G+C, sugiere que las especies comprendidas dentro del género Bacillus deberían clasificarse dentro de varios géneros. En base a los estudios de ADN-ADN homólogos se encontró que solamente unas especies de Bacillus mantenían una estrecha relación genética, y que si este género se llegara a separar en otros, no debería hacerse tomando en cuenta solamente los valores homólogos del ADN de sus especies.

Se encontró que especies representativas de otros géneros, cuyos ADN son homólogos con especies del género Bacillus, estaban cercanamente relacionados al aplicar estudios filogenéticos que se basan en moléculas de rARN.

e) Electroforesis de enzimas

Las diferentes zonas electroforéticas que representan las enzimas que se obtienen de extractos de cepas de Bacillus, constituyen una técnica útil para el estudio de las relaciones taxonómicas dentro del género.

Por ejemplo, cepas representantes de B. alvei, B. amyloliquefaciens, B. cereus y B. subtilis exhibieron modelos de migración de once enzimas diferentes (59).

1.2 Nutrición

Bacillus cereus es aerobio, sin embargo puede desarrollar bajo condiciones anaerobias en presencia de glucosa o nitritos. La temperatura, que es otro factor muy importante en el crecimiento de este microorganismo, fluctúa entre los 10 y 48 °C, con una óptima entre los 28 y 35 °C.

El pH al cual puede desarrollar este microorganismo es de 5.2 (28,78).

Sus necesidades nutricionales no son complejas, no requiere de vitaminas, pero sí de uno o varios aminoácidos. Esto lo comprobaron Knight y Proom mediante un estudio comparativo que realizaron sobre la nutrición y fisiología de las especies mesofílicas del género Bacillus, a continuación se presentarán varios aspectos de este estudio (35).

Los microorganismos con los que trabajaron los obtuvieron de cepas pertenecientes a una colección de laboratorio y también de una muestra de suelo, a partir de la cual se siguió todo un proceso de aislamiento de cepas de Bacillus.

Una vez identificadas cada una de las especies, éstas se sometieron al estudio de sus principales requerimientos nutricionales, los examinados fueron:

i) Fuentes de nitrógeno.- Ión amonio, ciertas mezclas de aminoácidos e hidrolizado de caseína. De esta forma se pudo observar la facilidad para utilizar, o bien el ión amonio, o el hidrolizado de caseína. En algunos casos éste último se substituyó por una mezcla de aminoácidos conocidos.

ii) Metabolitos esenciales.- Principalmente del grupo de las vitaminas B: aneurina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, ácido fólico o riboflavina.

iii) Fuentes de carbono.- Glucosa al 3%, que se adicionó a todos los medios de cultivo como única fuente de carbono.

iv) Sales y trazas de elementos.- Este tipo de requerimientos nutricionales no se analizó. Las sales más comunes y trazas

conocidas de varios elementos estuvieron presentes en los medios de cultivo manteniéndose a una concentración constante (24).

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo (cuya composición y preparación se pueden ver en el Anexo):

- a) Medio basal de amonio
- b) Medio basal de caseína
- c) Medio 7 AA
- d) Medio 14 AA

Todas las cepas del género Bacillus se sembraron en los medios de cultivo antes mencionados. Se obtuvieron diferentes resultados de cada cepa de acuerdo a la especie de la cual se tratara (35).

Al referirse a Bacillus cereus, se trabajó con trece cepas, de las cuales once se aislaron del suelo y dos se obtuvieron de la colección del laboratorio.

Ninguna utilizó amonio como única fuente de nitrógeno. Todas crecieron en el medio de hidrolizado de caseína, el cual pudo reemplazarse por cierta mezcla de aminoácidos, donde desarrollaron varias cepas. No hubo evidencia de algún otro requerimiento nutricional. Tres cepas crecieron en el medio 7 AA y ocho cepas crecieron en el medio 14 AA.

Los requerimientos de las cepas para un aminoácido en especial dentro de estas mezclas no se analizaron, sólo se observó la capacidad para crecer en éstas, sin embargo, se estableció que ni una sola de las cepas examinadas requirió ninguna de las vitaminas del grupo B como metabolitos esenciales (52).

Después de muchos años, White continuó trabajando sobre la

nutrición de B. cereus, su objetivo principal era encontrar los mínimos requerimientos de aminoácidos, es decir, a partir de una mezcla de ellos, determinar cuál o cuáles eran los más importantes para el crecimiento de este microorganismo (79).

Para este trabajo, White utilizó las cepas 6349, 7464 y 9373 de la Colección de la Industria Bacteriana Nacional (NCIB). Se basó en un medio de cultivo al cual llamó medio A (Ver Anexo).

Si al medio de cultivo anterior le agregaba glicerol, le llamaba medio A₁, y si le agregaba glucosa, le llamaba medio A₂.

Para llevar a cabo las pruebas de los requerimientos nutricionales, le adicionó al medio A algunos factores nutricionales como vitaminas, purinas, sales y aminoácidos (Ver Anexo).

En la determinación de los requerimientos individuales de aminoácidos, el medio A se enriqueció con ellos (Ver Anexo).

Cada una de las cepas se sembró en los medios antes mencionados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó, como anteriormente ya lo habían especificado Knight y Proom, que Bacillus cereus requiere de aminoácidos y no de vitaminas para su crecimiento. Pero además, White, alcanzando su objetivo, confirmó que este microorganismo requiere un mínimo de dos aminoácidos, glicina y metionina, como factores de crecimiento; después de haberlo determinado, se intento desarrollar subcepas de B. cereus independientemente de aminoácidos (79).

Para llevar a cabo este experimento, los microorganismos de las cepas 6349 y 9373 que se encontraban en un medio de agar

nutritivo inclinado, se resembraron en el medio A_2 no enriquecido con aminoácidos contenido en cajas de Petri incubándose a $37^\circ C$ hasta aparecer un desarrollo confluyente (5 días). Luego, un inóculo del microorganismo de este medio se suspendió en agua estéril hasta dar una ligera turbidez, volviendo a sembrarse en el medio A_2 sólido, al cabo de ocho resiembras seriadas en este mismo medio se observó que los microorganismos de ambas cepas desarrollaban a los dos días. Cuando, a partir de este medio sólido A_2 no enriquecido con aminoácidos se tomó un inóculo y se resembró en un medio líquido A_2 , se obtuvo muy poco crecimiento. Sin embargo, después de tres resiembras seriadas en este mismo medio, el crecimiento fue abundante.

Todavía se desconocen los mecanismos bioquímicos y genéticos que desarrollaron las dos cepas de *E. cereus* para que fueran capaces de crecer en un medio no enriquecido con aminoácidos. Esta característica apareció gradualmente durante resiembras seriadas en el medio sólido y en el líquido. Probablemente están implicados varios procesos mutacionales, pero las mutaciones no son las que provocan el desarrollo de nuevas regiones del genoma capaces de inducir la formación de las nuevas enzimas específicas necesarias para la síntesis de los aminoácidos. Presumiblemente estas regiones se encontraban presentes en el genoma de las cepas silvestres (exigentes), pero las enzimas no se manifestaron hasta que algunos mecanismos de control se alteraron por las mutaciones (79).

1.3 Fisiología

1.3.1 Espora

Bajo condiciones limitadas de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo, Bacillus cereus tiene la capacidad de producir endosporas, que normalmente no se expresan durante el crecimiento de la célula vegetativa, esto constituye un complejo proceso de diferenciación, el cual se inicia al final del crecimiento exponencial y al principio de la fase estacionaria. El proceso induce la síntesis dentro de las células vegetativas, de un nuevo tipo de célula completamente diferente en estructura, composición química y propiedades fisiológicas respecto de la célula madre. Después de separarse de ésta, la endospora entra normalmente a un largo período de latencia sin presentar un metabolismo detectable y por muchos años puede conservar la capacidad potencial de germinar. A este estado de latencia total se la conoce como criptobiosis (62,80).

Las esporas bacterianas son mucho más resistentes a las condiciones desfavorables que las células vegetativas. Por esto mismo es que su actividad metabólica no es como la de las esporas de los hongos, las cuales están adaptadas para diseminación, las esporas bacterianas están adaptadas particularmente para la subsistencia prolongada bajo condiciones adversas (16,80).

En el caso de la especie en estudio, la espora es un poco más pequeña que el diámetro de la célula que la produce.

Las endosporas son altamente resistentes al calor, radiación ultravioleta y iónica y muchas sustancias químicas tóxicas. Su resistencia al calor es aprovechable en el aislamiento de

bacterias formadoras de esporas. Además son impermeables, son células altamente refractables, que no toman la tinción ordinaria (16).

1.3.1.1 Mecanismo de esporulación, estructura y composición química

La esporulación se produce más fácilmente en las células vegetativas bien nutridas, aunque las condiciones de crecimiento empeoran gradualmente por acumulación de productos secundarios, depleción de nutrientes o alguna otra influencia no habitual. Se ha observado que las cepas de *B. cereus* forman endosporas más fácilmente cuando células sanas enfrentan la inanición en presencia de oxígeno (28,80).

Se ha observado que todo el proceso de esporulación se lleva a cabo en 14 horas y se divide en seis etapas morfológicas (16).

Al final del crecimiento exponencial, cada célula contiene dos cuerpos nucleares, los cuales se unen para formar un filamento de cromatina axial (16, 80) se supone que la pérdida de cationes en el interior de la célula produce este arreglo cromatínico (12,80). Este es el primer paso definitivo del inicio de la esporulación. En esta primera etapa también se desarrolla un mesosoma esporal, éste se asocia subsecuentemente a la porción del filamento axial que posteriormente pertenecerá a la unidad citoplasmática esporal (80). El mesosoma comprende a las dos unidades de membrana concéntricas (62).

Después, en la etapa dos, al producirse un pliegue en la

parte interna de la membrana citoplasmática, se lleva a cabo la formación de un septo transverso cerca de un polo de la célula, el cual separa al material nuclear en dos compartimientos, llamándoseles célula madre y unidad citoplasmática esporal (12). Existen unas vesículas en el área producida por el pliegue de la membrana, y éstas comprenden a los mesosomas periesporales de la célula. Las vesículas están delimitadas por una doble membrana y en muchos casos se presentan en el área del septum de la espora en el centro de la célula (24,28,62).

La etapa tres de la esporulación se caracteriza por el movimiento simultáneo de las vesículas hacia el polo de la célula y por la proliferación del septum de la espora en la misma dirección (24,28).

Por migración de sus zonas periféricas de adherencia, hacia el polo de la célula, el septum introduce al cromosoma dentro del citoplasma de la célula madre, donde la membrana de ésta crece alrededor de aquél, formándose así una forespora, como consecuencia de este proceso se presenta la formación de una doble membrana de la forespora, la cual rodea completamente a la cromatina de la espora.

En efecto, la forespora es un protoplasto rodeado por dos grupos concéntricos de unidades de membrana: su propia membrana límite y la membrana de la célula madre, la cual ha crecido a su alrededor. En este estado los procesos de desarrollo son irreversibles. Por medio del microscopio de contraste de fases, la forespora aparece como una mancha, un área no refractible, libre de inclusiones granulosas. A partir de este momento las vesículas empiezan a desaparecer rápidamente (12,54).

Por lo que respecta a la etapa cuatro, el material nuclear se distribuye perfectamente por toda la forespora, así empieza a aparecer el material cortical entre los componentes de la membrana de la forespora. El final de esta etapa se identifica por el primer estado de desarrollo de la corteza, la cual es una capa densa que se desarrolla entre las dos membranas que rodean a la forespora. Inmediatamente después se desarrollará una capa electrónicamente más densa, que es la cubierta o envoltura de la espora. Esta se forma en el exterior de ambas membranas de la forespora rodeando la corteza. Al final se forma una capa delgada llamada exosporio, que constituye en la parte exterior, la cubierta de la espora (24,54,62).

En la etapa cinco, la membrana interna del septum de la espora inicial, es ahora la que limita al centro de la espora y se pueden observar algunas invaginaciones extendiéndose dentro del citoplasma de la espora (24,54,80). La capa electrónicamente menos densa, que es la corteza, puede verse en posición adyacente a la capa cortical más densa. La unidad de membrana exterior de la forespora no puede identificarse después de esta etapa. Por lo que respecta a la envoltura, consiste de dos capas densas, la externa está bien definida, mientras que la interna lo está pobremente. El material citoplasmático procedente del inicio de la formación de la espora, ahora se encuentra entre el exosporio y la parte externa de la envoltura de la espora (24,30).

El final del proceso de esporulación se presenta en la etapa seis, donde se lleva a cabo la lisis del esporangio con la liberación de la espora. Este proceso es muy lento (28,54,62,80).

ETAPA

TIEMPO (MINS)

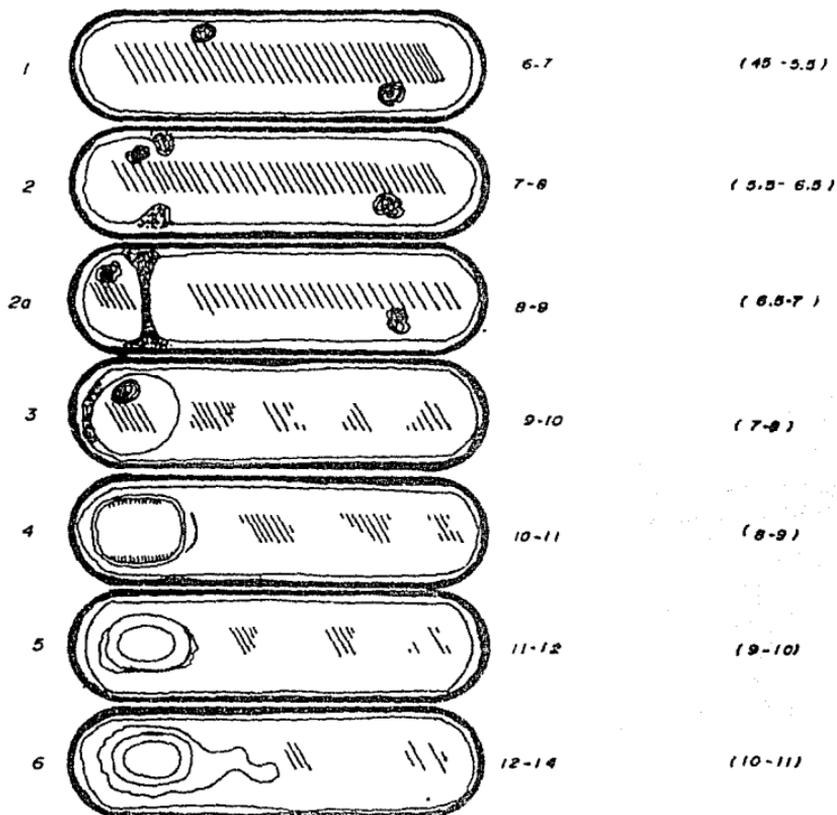


Fig. 1 Diagrama de representación de los cambios morfológicos de la esporulación de *Bacillus cereus*, así como el tiempo de duración de cada uno de ellos (12,54).

Tabla no. 1
Composición elemental de las
esporas de B. cereus (56)

ELEMENTOS	COMPOSICION	
	% peso seco	mmol/kg
Elementos principales		
Carbono	40.1	33 389
Oxígeno	37.7	23 564
Nitrógeno	10.7	7 639
Hidrógeno	6.5	64 486
Elementos minerales		
Calcio	2.5	624
Fósforo	1.05	339
Potasio	0.86	220
Sulfuro	0.58	181
Manganeso	0.56	102
Magnesio	0.39	160
Sodio	0.15	65
Zinc	0.10	15
Hierro	0.08	14
Cobre	0.01	2
Silice	Trazas	-

Corteza

La corteza de la espora contiene muchas capas de peptidoglicano con cantidades elevadas de ácido α - ϵ -diaminopimélico, muchas se encuentran unidas entrecruzadamente, más que las de la célula vegetativa. El peptidoglicano contiene tres dímeros de N-acetilglucosamina y ácido murámico los cuales se diferencian con respecto a las sustituciones en el ácido láctico y ácido murámico, estas diferentes sustituciones son: una subunidad lactámico-murámico, sin estar unido ningún aminoácido; una subunidad de alanina, llevando solamente un residuo de L-alanil; y una subunidad tetrapeptídica, llevando la secuencia L-ala-D-glu-meso-DAP-D-ala. Estas subunidades representan aproximadamente 55, 15 y 30 por ciento respectivamente del total (2,12,16,28,62).

Envoltura o cubierta

Esta capa se encuentra bajo el exosporio, representa del 30 al 60 por ciento del peso seco de la espora, está compuesta de proteínas, conteniendo el 80 por ciento del total de la espora. Esta estructura le brinda su apariencia, generalmente está compuesta de tres capas que se sobreponen (2,62).

La capa externa se constituye de un material fibroso, producto de la unión de fracciones laminares, cada una de las cuales se forma por fibras yuxtapuestas ordenadas linealmente. Se compone de polipéptidos homogéneos a los que se les incrustan restos de cisteína en diferentes posiciones.

La composición de la capa intermedia se parece a la de la

externa, pero su estructura es diferente, pues no tiene fracciones laminares y presenta orificios, la diferencia de esta conformación se debe a la diferente cantidad de cisteína.

La capa interna es homogénea y muy delgada, a veces no está presente, pero cuando lo está se pueden confundir con las estructuras de la corteza (28).

La incorporación de la cisteína a los polipeptidos depende de la estructura que se vaya a formar, cuando se trata de la capa externa y la capa intermedia sí hay incorporación de cisteína, cuando se forma la interna no la hay (2,12).

Exosporio

Es una membrana delgada y flexible, se forma a partir del extremo no polar de la pre-espora y poco a poco va rodeando a la espora sin asociarse a las membranas esporales ni a las membranas de la célula madre (2).

Esta estructura es difícil de distinguir en un microscopio de luz o en uno de contraste de fases, pero en el electrónico se ha podido observar más detalladamente (28).

El exosporio está constituido por dos capas, las cuales lo hacen ver como un doble exosporio, una de ellas es la capa superficial (a) con proyecciones (b) que surgen a partir de una cubierta intermediaria (c) de forma irregular; la otra es la capa basal fundamental (d). Esta está constituida por una membrana basal que presenta una periodicidad hexagonal y comprende cuatro paquetes laminares (a). Sus dimensiones aproximadas son (28):

- a= 310 Å
b= 250 Å
c= 60 Å
d= 190 Å
e= 45 Å

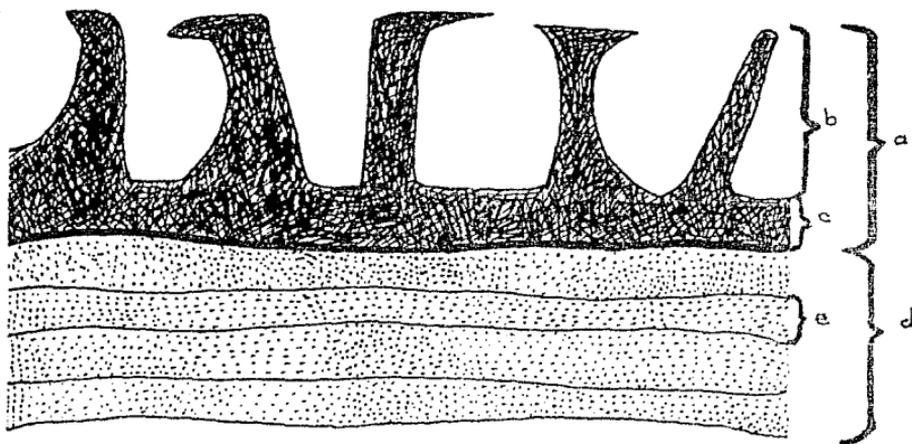


Fig. 2 Diagrama de la fina estructura del exosporio (28).

La composición química del exosporio es cualitativamente similar a la de la pared celular de la célula vegetativa (24).

Tabla no. 2

Composición química del exosporio de
B. cereus (12)

COMPONENTES	CANTIDAD (mcg/ml)
15 aminoácidos	373
Glucosamina	113
Carbohidratos	104
Lípidos	174
Acidos teicoicos	20
Acidos orgánicos	21
Acido dipicolínico	2
Acidos nucleicos	12
No hidrolizables	180
Recuperación total	987

1.3.1.2 Composición antigénica de la espora

Los antígenos de la espora poseen la más alta especificidad de la especie (43,63).

Los aglutinógenos se consideran componentes superficiales de

la célula, pero los antígenos precipitantes extraídos químicamente (casi haptenos de polisacáridos en la forma extraída) podrían ser componentes de la superficie o componentes internos de la espora (43).

Con el microscopio de contraste de fases, se pueden ver las reacciones antígeno-anticuerpo específicas alrededor de las esporas suspendidas en su suero. Por medio de las preparaciones hechas con tinta India, se observó una capa de material viscoso rodeando a las esporas de varias cepas de B. cereus, esta capa es el exosporio, al cual se asocian los antígenos responsables de la reacción de aglutinación con los anticuerpos específicos, existen autores que le llaman reacción específica del exosporio (43).

El suero antiespora no siempre reacciona con las células vegetativas.

Se probaron esporas de B. cereus en diferentes grados de germinación, contra sueros de esporas y de células vegetativas de esta misma especie, observándose decremento de los aglutinógenos de la espora y apareciendo antígenos bacilares (43).

Con los métodos de difusión en gel e inmunolectroforesis se muestran los cambios antigénicos durante la esporulación de Bacillus cereus, pero los patrones de comportamiento son muy complicados. Se ve claramente la desaparición de antígenos bacilares y la aparición simultánea de los de la espora, cuando se prueban tres sueros diferentes, el de las células vegetativas, el de las células esporulando y el de la espora madura durante diferentes estadios de la formación de la espora madura (63).

El antígeno de la espora aparece primero en forma accesible, pero se torna intratable conforme la espora asume su estado maduro.

Está bien establecido que las endosporas bacterianas poseen antígenos que no están presentes en la fase de crecimiento vegetativo; los aglutinógenos y precipitógenos estables al calor, se han demostrado como antígenos específicos de la espora (93).

Según los estudios realizados por Baillie y Norris se muestra un complejo sistema de antígenos en *B. cereus*. Algunos de estos se sintetizan solamente en ciertos estados del crecimiento, mientras que otros aparecen en todos los estados (43).

Se analizaron extractos de células de *B. cereus* provenientes de diferentes estados de la formación de la espora por inmunoelectroforesis con sueros preparados, detectándose en extractos de células vegetativas jóvenes siete antígenos resistentes a 80°C durante 10 min y cuando menos, ocho antígenos termolábiles adicionales. Durante la formación de la espora desaparecieron muchos de estos últimos detectándose algunos menos. Las esporas maduras presentaron cuatro de los mismos antígenos resistentes al calor presentes en células vegetativas jóvenes y cinco antígenos adicionales también resistentes al calor y solamente tres antígenos termolábiles (63).

Norris revisó en 1962 las recientes investigaciones de los antígenos de la espora y los problemas encontrados en su uso.

Defalle en 1902, reconoció que si las esporas se usaban como antígenos, podrían pasar a la vida vegetativa al inocularlas en los animales de experimentación e inducían en el suero

anticuerpos, tanto en contra de antígenos de las células vegetativas como de antígenos en contra de las esporas, esto fue confirmado por Teale y Back en 1919.

Otro problema fue que los tiempos de incubación prolongados, de las esporas con sus anticuerpos en la prueba de aglutinación normal, podrían promover también la germinación.

Debido a la superficie hidrofóbica de las esporas, éstas tienden a aglutinarse.

Para separar las suspensiones de esporas de la contaminación de desechos con células vegetativas se han usado dos métodos principales: el primero es hacer crecer los microorganismos en medios para producir la esporulación completa; el segundo es la remoción de los desechos por autólisis utilizando tiorersalato.

Poniendo en autoclave las suspensiones de esporas, también pueden usarse como antígenos que son resistentes al calor y completamente independientes de los antígenos de las células vegetativas. El tratamiento de las esporas con KOH también se ha utilizado, pero esto altera sus propiedades serológicas.

A pesar de esto, se pueden usar los antígenos de las esporas con mucho éxito en investigaciones serológicas.

Los antígenos H se han usado en estudios serológicos de las especies de Bacillus más extensamente que los otros antígenos, esto es porque dichos antígenos proporcionan la más alta especificidad de cepa; en cambio, los antígenos de la spora confieren la más alta especificidad de especie. También, por los problemas que se encontraron con los antígenos de la spora, se ha promovido el uso de antígenos H.

Taylor y Gilbert (1975) y Gilbert y Parry (1977) usaron exitosamente estos antígenos, mismos que se usan en el Food Hygiene Laboratory para las investigaciones de intoxicación alimentaria.

Los antígenos O se han usado poco en la identificación de cepas de B. cereus (4,43).

1.3.1.3 Resistencia de las esporas

La resistencia al calor de las esporas de B. cereus varía directamente con el contenido de ácido dipicolínico (DPA) y la aparición de dicha resistencia durante la esporulación, coincide con la síntesis de ácido dipicolínico (9).

Con respecto a un estudio realizado sobre la resistencia al calor de las esporas de B. cereus, probando los efectos en presencia de varios metales divalentes como estroncio, bario, níquel, zinc, cobalto y magnesio, se obtuvieron los siguientes resultados:

Las esporas producidas en presencia de niveles de calcio adecuados, presentaron una resistencia normal al calor y sintetizaron niveles aproximadamente normales de DPA.

A bajas concentraciones de estroncio (0.1 mM) se estimuló la síntesis de niveles intermedios de DPA presentando las esporas una resistencia mayor al calor. En presencia de altos niveles de estroncio, se impidió la producción de esporas. Se debe hacer notar que las esporas que contenían calcio o estroncio, eran idénticas en tamaño y refractibilidad.

Las soluciones de cloruro de bario y cloruro de zinc, a una

concentración de 0.1 mM, no indujeron resistencia al calor ni síntesis de ácido dipicolínico sobre las esporas producidas. Sin embargo, sí se comprobó que la solución de cloruro de bario a una concentración 1.0 mM estimuló la resistencia al calor pero no la síntesis de DPA (34).

El manganeso induce una rápida estimulación de la germinación, por lo tanto, no confiere resistencia al calor ni síntesis de DPA (34).

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que:

i) El calcio o su contraparte química más cercana, el estroncio, se requiere específicamente para la síntesis o acumulación de DPA.

ii) Los niveles altos de calcio y DPA son necesarios para la resistencia óptima al calor; en este microorganismo están presentes en cantidades equivalentes.

iii) El requerimiento de calcio no puede ser substituido por ningún otro metal divalente (34).

B. cereus produce endosporas varias veces más resistentes a la radiación U V que sus correspondientes células vegetativas. Esta resistencia se desarrolla casi al mismo tiempo en que se forma la corteza (24).

La presencia de grandes cantidades de ácido dipicolínico (arriba del 15% del peso seco) en las esporas, ha llevado a considerar que juega un papel importante en la espora. Las poderosas propiedades quelantes del DPA y la presencia de cantidades molares, aproximadamente iguales de Ca^{2+} y DPA, se combina en algún complejo molecular (36).

De acuerdo al análisis de los espectros de absorción de luz U V, se sugiere que el DPA está presente como alguna forma de quelato de Ca^{2+} en la espora intacta. Pero el DPA no forma simplemente complejos quelante con Ca^{2+} , sino también con Mn^{2+} y K^{1+} , aunque en porcentajes mucho más bajos, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla no.3

	%	Atm (mmol/100 g)
DPA	6.94	41.5
Ca	5.0	125.0
Mn	0.32	5.8
Mg	0.33	14.0
K	0.05	1.3

Se hizo una comparación de la resistencia de ciertas esporas con diferentes concentraciones de DPA, frente a la incidencia de radiaciones gamma y de luz U V, observándose que las esporas con pequeño contenido de DPA (0.45% del peso seco) fueron las más sensibles a la radiación U V; por el contrario, las esporas con un nivel de 6.0% de peso seco de DPA fueron las más resistentes.

Se postuló entonces, que el DPA podría conferir protección por:

- i) Una observación específica de fotones en el rango U V, donde éste absorbe fuertemente.
- ii) La creación de una espora seca esencialmente en el interior,

por deposición de quelatos de DPA.

iii) La estabilización de biopolímeros de la espora por un enlace divalente.

El mecanismo podría ser esencialmente importante en la protección frente a la radiación U V, tomando como base que el DPA se concentra en la corteza, donde podría formar una capa protectora para las regiones internas de la espora, las cuales contienen al ADN (24).

La muerte causada por la luz U V se relaciona con la presencia de fotoproductos de timina en la espora, como son:

a) Diferentes dímeros de citosina-timina y timina-ciclobutirato timina.

b) Otros similares a los fotoproductos obtenidos por irradiación del ADN (47, 58).

Existe una relación indirectamente proporcional entre el contenido de DPA y la formación de los fotoproductos de la espora. Esto es porque al incidir los rayos de luz U V sobre la espora, si ésta no cuenta con la protección del DPA, se forman los fotoproductos y la espora es dañada, pero a medida que van aumentando los niveles de DPA en la espora, los daños sobre ésta por los rayos U V disminuyen, a la par que la formación de fotoproductos (34).

Es pertinente mencionar aquí que, según los estudios realizados por Germaine y Murrell, muestran una conclusión opuesta, ya que indican que el DPA de B. cereus actúa como un sensibilizador a la luz U V dañando a la espora más bien que protegiéndola. Esto se puede explicar en base a la diferente

distribución del DPA dentro de la espora que varía de cepa a cepa. El efecto sensibilizador del DPA se puede deber a la proximidad de este compuesto con el ADN en las cepas estudiadas, por lo cual, la energía depositada por la radiación U V en el DPA, podría ser transferida al ADN en virtud de su cercanía. Entonces, el efecto de protección del DPA se podría manifestar si se localiza en la espora en sitios como la corteza (se ha mostrado que así es), y que no tienen un contacto directo con el ADN, pero protegerían parcialmente al ADN de la radiación U V.

Considerando la susceptibilidad de las esporas a las radiaciones gamma, el contenido de DPA no parece influir en la supervivencia de las esporas de B. cereus frente a las radiaciones gamma. No se sabe si este compuesto tenga algún atributo químico que pueda tener una acción protectora o sensibilizadora de la radiación gamma sobre el ADN (34).

1.3.1.4 Inhibición de la esporulación

El ácido α -picolínico inhibe la esporulación sin innibir el crecimiento o germinación. Se ha observado que en cultivos donde se inhibe la esporulación, la turbidez y el pH son bajos.

Se suponía que el efecto del ácido α -picolínico se podría deber a la competencia con el ácido nicotínico o a la quelación con algunos metales esenciales para la esporulación, pero no para el crecimiento.

Pero en base a que el ácido isonicotínico no inhibe la esporulación y que el ácido nicotínico no pueda hacer reversible la inhibición de la esporulación por el ácido α -picolínico

sugirió que el efecto de éste no se podría deber a la competencia con el ácido nicotínico en el metabolismo de la célula. Entonces se estudio la capacidad del ácido α -picolínico para quelar metales y así se postulo que este compuesto interfiere, por quelación, con algunos metales esenciales, con la formación de un sistema enzimático adaptativamente formado entre la fase de crecimiento logarítmica y su fase restante (24).

De todos los ácidos mono y dicarboxílicos de piridina probados, solamente el ácido α -picolínico posee la capacidad de inhibir la esporulación, los demás no tienen un efecto detectable, ni siquiera a altas concentraciones, pues al introducir un segundo grupo carboxilo en el anillo del ácido α -picolínico se reduciría la capacidad quelante considerablemente.

El efecto del ácido α -picolínico podría ser reversible por el incremento de la concentración de Zn, Co y Ni. Sin embargo, en los mismos niveles, estos iones metálicos inhibieron la germinación de las esporas en ausencia del ácido α -picolínico (24,34).

Es evidente que el ácido α -picolínico junto con cantidades incrementadas de cada uno de los iones metálicos (en forma individual) inhiben la esporulación, sin embargo, los efectos inhibitorios disminuyeron por la quelación de los iones metálicos juntos.

Cuando la inhibición de la esporulación se hizo reversible, el pH del cultivo aumentó notablemente (24).

El EDTA también inhibe la esporulación (24). Mientras que el efecto inhibitorio del EDTA podría ser reversible adicionando

solamente el doble de la cantidad de minerales que normalmente se encuentran en el medio. Para que el efecto inhibitorio del ácido α -picolínico sea reversible, es necesario adicionar hasta cuatro veces más la cantidad normal de los minerales.

La capacidad del fosfato para hacer reversible la inhibición de la esporulación por el ácido α -picolínico podría deberse también a la competencia entre los dos por los metales esenciales para la esporulación, pues el metal quelado con ácido α -picolínico es una forma inasimilable. Diferentes compuestos podrían variar en sus capacidades para quelar con un metal dado. También el mismo compuesto podría variar su capacidad para quelar con diferentes metales (34).

De acuerdo a resultados obtenidos, indican que el metal involucrado podría ser Zn, Co, Ni o algunas otras trazas de metales quelantes menos fuertes con ácido α -picolínico que estos tres.

Por otro lado, el efecto del extracto de levadura es interesante, pues al incrementar su concentración en el medio de cultivo, la inhibición del ácido α -picolínico puede ser reversible. La capacidad del extracto de levadura para hacer reversible la inhibición puede que no se deba a su contenido mineral. Una explicación de este fenómeno es que el ácido α -picolínico causa un bloqueo metabólico en los cambios bioquímicos que ocurren durante la esporulación por quelación con algunos metales esenciales. El extracto de levadura podría regresar la inhibición proporcionando algunos intermediarios orgánicos más allá del bloqueo metabólico y de esta forma permitir la secuencia

interrumpida de cambios bioquímicos para proceder al complemento.

Un estudio cuantitativo de la demanda de oxígeno de un cultivo activo de R. cereus en varios estadios durante el crecimiento vegetativo y la esporulación, revelan muchos cambios interesantes.

Inicialmente hay un incremento en el consumo de oxígeno por mililitro del cultivo debido a un incremento en la población celular. Más tarde hay un rápido decremento en el consumo de oxígeno del cultivo mientras la población celular permanece constante.

Inmediatamente después, la demanda de oxígeno del cultivo aumenta ligeramente a un valor más alto, mientras no hay un incremento en la población celular. Después de permanecer por un corto tiempo a este nivel alto, el consumo de oxígeno decrece gradualmente conforme la esporulación va terminando.

Concomitantemente con estos cambios en la demanda de oxígeno del cultivo, hubo cambios significantes en los valores del pH del cultivo.

Inicialmente el pH del medio decrece gradualmente y luego se incrementa rápidamente alcanzando un valor más alto que el del inicio del medio. El valle en la curva del pH ocurrió al mismo tiempo en que ocurrió el de la demanda de oxígeno y corresponde con el máximo crecimiento y disminución de la glucosa del medio. La glucosa que se adhiere al medio de cultivo en este punto retarda considerablemente la esporulación.

El ácido α -picolinico inhibe la esporulación solamente cuando se adiciona antes de que el pH del cultivo empiece a aumentar, no teniendo efecto si se agrega después de que el pH del cultivo

haya empezado a incrementarse. El pH de un cultivo inhibido permanece en un nivel bajo alcanzado durante el crecimiento vegetativo y al ser reversible la inhibición alcanza el nivel normal.

Se concluye que hay un cambio en el patrón enzimático de las células durante la transición del crecimiento vegetativo a la esporulación de *B. cereus* (24).

1.3.2 Germinación

Es el proceso por el cual una espora se convierte en célula vegetativa, perdiendo irreversiblemente sus propiedades. Este proceso es mucho más rápido que la esporulación (dura aproximadamente 90 min). Durante la germinación pueden distinguirse tres estados: activación, germinación propiamente dicha y crecimiento (7,16,36,62,80).

- Activación. Recientemente formadas las endosporas, pueden permanecer largo tiempo latentes hasta que se encuentren en condiciones óptimas para la germinación.

Aunque algunas esporas bacterianas germinan espontáneamente en un medio favorable, otras se mantienen latentes, a menos que sean activadas por un agente traumático, como el calor, disminución de pH o un compuesto -SH. La activación perjudica la impermeabilidad de la envoltura (24).

Quizá el mecanismo más general para activar a las esporas es el choque por calor, al ser expuestas durante varias horas a una temperatura elevada, pero que sea subletal (65°C).

La activación por calor no se acompaña de ningún cambio detectable en la apariencia de las esporas, simplemente les permite germinar subsecuentemente cuando se encuentren en un lugar favorable para este proceso. Además, la activación por calor es reversible, si las esporas se exponen a bajas temperaturas por algunos días, se inducirá la declinación de la germinación. Se presenta una activación mucho más lenta durante el almacenamiento de las esporas, a una temperatura baja (5°C) o bajo condiciones de desecación, esta activación es irreversible (16,62).

- Germinación. Esta tiene lugar cuando las esporas activadas se ponen bajo condiciones favorables. Este proceso es muy rápido y se expresa por una pérdida de refractibilidad, una pérdida de resistencia al calor y otros agentes deteriorantes y la manifestación de la actividad metabólica (36).

Para su germinación, *B. cereus* responde a varios metabolitos o iones inorgánicos, los cuales penetran a través de la envoltura dañada. La germinación también puede inducirse por análogos no metabolizables, los cuales sugieren una acción alostérica en la membrana de la espora, resultando una activación de la enzima lítica de la espora y la liberación de dipicolinato de calcio.

El resultado de la hidrólisis del peptidoglicano cortical da lugar a la germinación en minutos: se libera arriba del 30% del peso seco de la célula y también fragmentos de peptidoglicano y dipicolinato de calcio. Con el abatimiento de la barrera cortical, la célula rápidamente absorbe agua, acompañada por K^{1+}

y Hg^{2+} , y entonces pierde su refractibilidad, su resistencia al calor y a la tinción. La energía almacenada en el ácido fosfoglicérico se convierte en ATP en 5 min y la proteína almacenada se hidroliza en 10 min, proporcionando aminoácidos y además energía (16,62).

- Crecimiento. En un medio nutritivo, la germinación induce a una maduración de la célula y a un envejecimiento inmediato. Sin embargo, durante la inanición, con la presencia de un inhibidor de la síntesis de proteína, la célula se rehidrata, pero no puede convertirse en célula vegetativa.

En la postgerminación hay una recuperación gradual del crecimiento vegetativo. La síntesis de proteínas se incrementa progresivamente, como su maquinaria reducida se extiende con la síntesis de proteínas y síntesis de ARN, la pared de la célula se vuelve más gruesa, y después, alrededor de una hora, empieza la síntesis del ADN y la célula duplica su volumen inicial (16).

1.3.2.1 Inhibición de la germinación

El fosfato promueve la germinación de las esporas, sin embargo, a altas concentraciones, tanto el fosfato como el cloruro, inhiben la germinación.

La oxina, en una concentración de 2×10^{-3} M (pH 7.5) inhibe completamente la germinación de las esporas de Bacillus cereus.

Los iones de fierro, cobre, cromo y mercurio inhiben la germinación de las esporas de B. cereus. De estos metales, el fierro es el inhibidor más débil, presenta poca capacidad para

suprimir el crecimiento mientras se suprime la respiración de las esporas germinadas, lo cual se debe probablemente a la presencia de fosfato, el más fuerte promotor de la germinación.

La inhibición de la germinación por iones de metales pesados y la capacidad del glutatión, tioglicolato o agentes secuestrantes de metales para hacer reversible la inhibición, sugiere la posibilidad de que los grupos -SH están involucrados en el proceso de la germinación (24).

El arsenito, arsenato o monoyodoacetato inhiben completamente la respiración y crecimiento de las esporas germinadas. El cianuro y borato inhiben parcialmente ambos procesos.

Los iones de fierro, cobre, cromo o mercurio inhiben fuertemente la respiración u oxidación de la glucosa de las esporas germinadas (24).

Dentro de las proteínas de la clara de huevo activadas biológicamente, el quelante, la ovotransferrina es probablemente una de las más importantes, porque depoja a los microorganismos del Fe^{3+} , una propiedad que se acentúa por la naturaleza alcalina (pH 9-10) de la clara de huevo. De esta forma sobreviene la inhibición de la bacteria y el crecimiento por saturación de la ovotransferrina (67).

A través de la quelación del Fe por la ovotransferrina, la clara de huevo influye en el engrosamiento o hinchazón de las esporas germinadas y evita el crecimiento de las células vegetativas normales.

La clara de huevo, en virtud de su contenido de ovotransferrina es esencialmente un medio deficiente de fierro, esta condición se acentúa por su alta alcalinidad, por lo tanto,

para que B. cereus pueda crecer en este medio, tiene que competir con esta proteína por el hierro presente.

Se sugiere que los compuestos microbiológicos transportadores de hierro juegan un papel importante en la reversibilidad de la acción bacteriostática de ovotransferrina y que la síntesis de estos compuestos se ve afectada por las altas temperaturas de crecimiento (67).

En la clara de huevo, el volumen de las esporas continúa incrementándose, pero es muy poca o nula la formación de células vegetativas. Las que llegan a formarse aparecen estructuralmente débiles y su tamaño y forma son muy irregulares. De esta forma se observa que el crecimiento continúa, pero el sobrecrecimiento se inhibe.

Se ha mostrado que dentro de los tres estados de desarrollo principales de B. cereus: germinación, engrosamiento y sobrecrecimiento, sólo los dos últimos se ven afectados por la clara de huevo. Como consecuencia de la inhibición del sobrecrecimiento, la espora se incrementa en volumen.

Algunas veces se nota que ocurre un marcado engrosamiento cuando el sobrecrecimiento se inhibe por otros agentes quelantes tales como el picolinato de etilo y los polifosfatos.

En la misma forma que la saturación de la ovotransferrina con hierro muestra la inhibición del crecimiento bacteriano en clara de huevo, así el hierro muestra la inhibición del sobrecrecimiento vegetativo de las esporas de B. cereus, pero solamente cuando el pH de la clara de huevo se disminuye de 9.0 a 7.9. Parece ser que el pH alto de la clara de huevo y la

deficiencia de fierro son responsables de la inhibición del sobrecrecimiento (76).

Algunas células vegetativas que emergen de esporas en clara de huevo (pH 7.6) suplementada con L-alanina e inosina, parecen tener problemas tales como una división y crecimiento desigual, esto se supera adicionando fierro. Aunque el mecanismo exacto de inhibición se desconoce, el fierro parece estar involucrado en algunos de los estados del sobrecrecimiento (76).

Según experimentos realizados por Blocher y colaboradores, observaron que la germinación de las esporas, la cual se inducía por aminoácidos, se inhibía por sorbato. La inhibición ocurrió después de haber empezado a llevarse a cabo la germinación.

Smoot y Pierson caracterizaron la inhibición del sorbato de la germinación inducida por L-alanina y L-cisteína de las esporas de B. cereus como reversible, llevándose a cabo en los estados iniciales de la germinación, y como competitiva cuando había una disminución de la absorbancia o pérdida de la refractilidad. Sugirieron que el sorbato competía directamente con el germinante (substancia que induce la germinación) por un sitio de enlace en la germinación dirigida al sitio receptor o por un sitio activo con una enzima crucial de la germinación.

El mecanismo de la inhibición de la germinación de las esporas de B. cereus por sorbato fue investigada aislando las reacciones que dirigen a la germinación y las últimas que se llevan a cabo en ella, y también observando el efecto del sorbato sobre ellas (5).

1.3.3 Sistema de transporte de electrones

Durante la transición de una célula vegetativa a espora, hay un incremento significativo en los niveles de enzimas asociados con la producción de energía por medio del sistema de transporte de electrones. Los citocromos a, b y c se detectan en ambos tipos de células, manteniendo también el mismo orden, sin embargo, hay un incremento marcado en los niveles de citocromos al final del crecimiento vegetativo, es decir en el crecimiento estacionario, manteniéndose estos niveles durante la esporulación (37,54).

El segmento del citocromo b del sistema de transporte de electrones se requiere para la aerotaxis (migración de los electrones hacia el oxígeno) en adición al citocromo aa₃ (oxidasa terminal) (37). Esta citocromo oxidasa, en *B. cereus*, es la única de la fase exponencial temprana (37). La tensión de oxígeno y la naturaleza de la fuente de carbono en los medios de cultivo tienen efectos marcados en la expresión del sistema de citocromos de *B. cereus* (17,19).

Se han expresado altos niveles de citocromo b y 0 independientemente de las condiciones del cultivo. Esto se hace en base a un análisis de sus espectros, en donde se encuentra que sus longitudes de onda son 559 y 562 nm respectivamente.

Una baja de la tensión de oxígeno en el cultivo produjo una caída drástica en el contenido de los citocromos c y aa₃ (602 nm), encontrándose solo cantidades trazas. El citocromo b, con una longitud de 559 nm no se afecta significativamente por la tensión de oxígeno.

Los citocromos aa₃ (602 nm), b (562 nm) y d (632 nm) son

indiferentes del sustrato usado para reducirlo.

Las células que crecen bajo aeración vigorosa en medio de hidrolizado de caseína, contienen citocromos en las más altas concentraciones. Bajando la tensión de oxígeno del cultivo, disminuyen las concentraciones de los citocromos a_3 y c , mientras que las concentraciones de los citocromos b , 0 y d se incrementan significativamente (18).

Las esporas contienen una mayor cantidad de los componentes de la cadena respiratoria que las células vegetativas. Esto es porque para una esporulación normal se requiere un sistema de transporte de electrones funcional, mismo que no es necesario para la germinación.

Aparte de los citocromos a , b y c , de la flavoproteína asociada con la succinato deshidrogenasa y de la NADH deshidrogenasa, la quinona también es un componente de la cadena respiratoria (17,19).

Los electrones de la succinato deshidrogenasa pasan a un componente de la quinona, probablemente un derivado de la vitamina K, por medio de una flavina asociada a la succinato deshidrogenasa. Los electrones se mueven a través de una cadena de citocromos compuestos de citocromos b , c y $a + a$ para reducir después al 0 ; inclusive, los electrones de la NADH son llevados a través de un sistema de transporte similar, siendo intermediario una flavina asociada con la NADH-deshidrogenasa, los electrones también pueden pasar al 0 de la flavoproteína, pasando por la quinona y la cadena de citocromos.

El sistema funcional de electrones asociado con las esporas de B. cereus, contiene una flavoproteína oxidasa soluble;

las células vegetativas tienen un sistema de citocromos típico (37).

Aunque las esporas muestran poca o ninguna actividad respiratoria, se han demostrado enzimas de la espóra que acarrean a los electrones hacia el oxígeno (17,19).

1.3.4 Propiedades bioquímicas

Para la esporogénesis de *B. cereus*, se requiere la utilización de acetato por una vía de respiración terminal, presumiblemente una combinación de los ciclos del ácido tricarbóxico y del glioxalato.

La utilización de acetato es aparentemente inducida por la síntesis de las enzimas que faltan en el ciclo del ácido tricarbóxico, solamente después de que la glucosa se agota en el medio durante la transición del estado filamentososo de desarrollo, a la esporulación. Las células vegetativas que se obtienen de esporas no tienen una vía respiratoria terminal completa inicialmente, aunque desarrollan una vía operativa potencialmente antes de la esporogénesis. Esto se confirma en algunos estudios, donde se observa que las células vegetativas en el estado temprano, después del desarrollo postgerminativo, convierten muy poca glucosa en bióxido de carbono. Pero en el estado en donde las células definitivamente realizan la esporulación, oxidan a la glucosa al máximo.

Las células, en el estado más temprano, después del desarrollo postgerminativo, acumulan acetato en el medio mientras

que se encuentran solamente pequeñas cantidades suspendidas tratándose en el medio de células vegetativas más viejas.

B. cereus acumula ácido acético y ácido pirúvico durante el crecimiento en un medio de glucosa, extracto de levadura y sales con un pH bajo. Pero también se observa que el ácido acético desaparece del medio durante la esporulación con un incremento del pH. Se puede concluir que la acumulación de acetato durante el crecimiento y su utilización durante la esporulación, son responsables de los cambios de pH de estos cultivos.

Un sistema completo para la utilización de acetato no opera durante el desarrollo temprano de las células vegetativas de la espora.

La formación de esporas está íntimamente relacionada con los fenómenos metabólicos, y por eso es un sistema ideal para estudiar las actividades de las enzimas involucradas en la formación de nuevas estructuras. Recientes investigaciones han demostrado que B. cereus y probablemente otros bacilos, experimentan cambios metabólicos relacionados a cambios morfológicos durante el curso de la esporulación. Principalmente son importantes los cambios en el anabolismo y catabolismo del ácido glutámico y otros aminoácidos.

Se ha reportado que el ácido glutámico sirve como un donador de grupos amino en células que se encuentran esporulando; como un precursor de la biosíntesis del ácido dipicolínico y como un sustrato de carbón y nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos durante la transición de una célula vegetativa a una

espora.

Son varios los aminoácidos que mantienen el crecimiento y esporulación de B. cereus, pero en especial el ácido glutámico.

La presencia de GOT y GPT en extractos de células sugiere que el metabolismo del ácido glutámico podría llevarse a cabo por la vía de las transaminasas. Esto ya se ha demostrado experimentalmente.

GOT y GPT son importantes para convertir el glutamato en otros aminoácidos necesarios para la síntesis de la proteína de la espora.

Goldman y Blumenthal reportaron que la vía de Embden-Meyerhof es la principal ruta para el metabolismo de la glucosa en B. cereus; la vía de la hexosa monofosfato es activa durante la germinación de la espora y el ciclo del ácido tricarboxílico es operativo después del crecimiento logarítmico. La importancia del ciclo del ácido tricarboxílico en la esporulación, se reconoce en base a la observación de un incremento en la actividad enzimática al final del crecimiento por la condensación de enzimas, succínico deshidrogenasa y aconitasa. Es posible que la energía formada durante la oxidación de acetato a dióxido de carbono se almacene en alguna forma o se emplee para convertir acetato a intermediarios que, al final, se utilicen como una fuente de energía.

Las enzimas que intervienen en el ciclo del ácido tricarboxílico, se forman durante la transición del crecimiento vegetativo a la esporulación.

La síntesis neta de polímeros celulares se detiene al final del crecimiento exponencial, sin embargo, el ARN y las proteínas continúan transfiriéndose y se producen nuevos ARNm, proteínas y

sustratos. Estos procesos, que eventualmente resultan de la formación de esporas, requieren energía (ATP).

También se ha detectado la presencia de NADH oxidasa, NADH citocromo c reductasa y citocromo c succínico reductasa en células vegetativas.

La actividad de la enzima succínico oxidorreductasa es baja en células vegetativas y aumenta al final del crecimiento exponencial. Un segundo incremento en la actividad se observa en una célula en proceso de esporulación.

La actividad de la enzima citocromo c succínico oxidorreductasa se incrementa al final del crecimiento exponencial, pero no muestra un incremento secundario en la esporulación de la célula.

La actividad de la succinato oxidasa se mantiene a lo largo del ciclo. Los incrementos en la actividad de la succínico oxidorreductasa sin un cambio en la succínico oxidasa, pueden indicar que un aceptor de electrones terminal diferente está involucrado en la oxidación del succinato.

La NADH oxidorreductasa permanece igual a lo largo del crecimiento y en la fase estacionaria; la actividad de la enzima se incrementa después en las células que están esporulando. Los niveles de NADH citocromo c oxidorreductasa son bajos en las células vegetativas y células de la fase estacionaria y aumenta en las células que están esporulando. La NADH oxidasa ligada a la membrana sigue el mismo patrón que la reductasa.

Las actividades específicas de NADH y succinato oxidorreductasas son ligeramente más altas en las células

vegetativas que en las esporas.

Otra enzima importante es la peroxidasa y la detección de su actividad es difícil porque este microorganismo contiene una cantidad relativamente grande de catalasa, la cual, al igual que la peroxidasa, usa como sustrato peróxido de hidrógeno. La actividad de la peroxidasa se incrementa con el tiempo de cultivo, alcanzando su nivel máximo a las 18 h, después decrece gradualmente. En la fase estacionaria, cuando *B. cereus* produce endosporas, empieza la acumulación de ácido dipicolínico, éste se incrementa rápidamente después de 20 h de cultivo, justamente después de que el nivel máximo de la actividad de la peroxidasa se ha alcanzado (32).

La peroxidasa aparece prominentemente en el transverso de las membranas y en las envolturas de la forespora, cerca de uno de los polos de la célula (32).

Se presume que el incremento de la actividad de la peroxidasa en *B. cereus* puede correlacionarse con la esporulación, probablemente con la formación de la envoltura alrededor de la forespora en el estado III (7).

Existe también una actividad proteolítica asociada con las esporas de *B. cereus*. Esta es responsable del ataque de las cadenas de la ácido ribonucleico polimerasa. Se localiza posiblemente en la superficie de la spora. Las proteasas de la spora se sintetizan en las células vegetativas antes o durante la esporulación. Es bien sabido que durante la esporulación se sintetizan una gran variedad de enzimas proteolíticas intra y extracelulares.

Algo común a todas las proteasas intracelulares específicas

de la esporulación de *Bacillus sp.*, es que estas proteasas tienen un requerimiento absoluto de iones de Ca^{2+} , tanto para su estabilidad como para su actividad catalítica (7).

La proteasa responsable de la actividad proteolítica es sensible a la desnaturalización por calor (90 min a $65^{\circ}C$) usada para activar a las esporas, así, éstas al germinar, contienen una ARN-P intacta (7).

Por otra parte, para estudiar el mecanismo de la glucosa y la oxidación de la hexosa fosfato de las esporas de *B. cereus*, se utilizaron extractos de esporas libres de células, en los cuales se demostró la presencia de glucosa deshidrogenasa, un sistema para la oxidación de gluconato a 2-ceto-gluconato, 2-ceto-gluconato cinasa, 2-ceto-D-gluconato-6-fosfato reductasa, un sistema completo de hexosa monofosfato, 2-ceto-3-deoxi-D-gluconato-6-fosfato aldolasa, y un sistema para la formación de piruvato a partir de D-gliceraldehído-3-fosfato. D-ribosa-5-fosfato, cetopentofosfatos, sedoheptulosa-7-fosfato, D-fructosa-6-fosfato y D-glucosa-6-fosfato se identifican como productos de oxidación de D-gluconato-6-fosfato o D-ribosa-5-fosfato. Un estudio cinético de la formación de piruvato a partir de 2-ceto-D-gluconato-6-fosfato y D-gluconato-6-fosfato, sugirió que podía estar presente una vía metabólica alterna para el metabolismo de 2-ceto-D-gluconato-6-fosfato, sin involucrar al D-gluconato-6-fosfato como un intermediario.

La inosina es uno de los varios compuestos que conducen la germinación de *B. cereus*, Krask y Fulk reconocieron que las esporas contienen fosforilasa nucleósido de purina, lo que les

hace pensar que esta enzima participa en la germinación inducida por inosina (58,67).

Las fosforilasas nucleósidos de purina aisladas de esporas y células vegetativas de *B. cereus*, tienen propiedades físicas y catalíticas similares. Esto sugiere que la enzima de las esporas y de una célula vegetativa son proteínas idénticas. Se ha observado que el decremento en los niveles de la actividad enzimática de la célula vegetativa es paralelo en la espora. Esto hace pensar que para la síntesis de algunas enzimas, tanto la célula vegetativa como la espora usen los mismos genes estructurales, o copias idénticas de los genes.

La fosforilasa nucleósido de purina, es inducible por su sustrato que es la inosina.

En el caso de *B. cereus*, las esporas tratándose con calor germinan rápidamente en presencia de inosina más una sal sódica. Esta especie contiene dos enzimas que pudieran estar implicadas en la germinación estimulada por inosina: fosforilasa nucleósido de purina y una ribonucleosidasa de purina. Se piensa que la enzima formada se localiza dentro de la espora, dado que se libera en forma soluble por un rompimiento mecánico de la espora; la ribonucleasa permanece unida en la fracción insoluble (cubierta) de la espora, cuando ésta se rompe. La ribonucleasa es una enzima hidrolítica que rompe la inosina y adenosina, y se activa en la espora intacta sin germinar, mientras la fosforilasa nucleósido de purina se activa hasta que se rompe la espora.

Las esporas de 29 cepas mutantes de *B. cereus* con un 3% del nivel de la actividad de la fosforilasa nucleósido de purina de la espora de tipo silvestre, germinaron tan rápido y

completamente en respuesta a la inosina, como las esporas de tipo silvestre. Esto sugiere que la fosforilasa nucleósido de purina no es un factor limitante en la etapa de germinación inicial.

Es probable entonces, que la ribonucleasa sea el factor más importante para inducir el efecto de la inosina.

Tal vez la fosforilasa nucleósido de purina pudiera tener una función crítica en el último estado de la germinación, conduciendo al crecimiento.

La ribonucleasa de purina se encuentra solamente en las esporas, si bien las cepas mutantes de R. cereus en las que se encuentra deficiente esta enzima, germinan en respuesta a la inosina, esto podría proporcionar gran información sobre los procesos de la germinación (58).

2. PATOGENESIS

2.1 Toxinas producidas por B. cereus

Se conoce una gran cantidad de metabolitos extracelulares elaborados por B. cereus. La mayoría de estos metabolitos ya están bien estudiados y descritos en la actualidad, y se sabe que, dada la influencia que tienen en sus actividades patogénicas, se pueden considerar toxinas. Otros metabolitos, tales como la cereolisina y la fosfolipasa-C, aunque están bien caracterizados, aún no está claro el papel que tienen. Existen otros metabolitos que están pobremente definidos químicamente, pero en base a los trabajos experimentales realizados, hay evidencia de que son también responsables de la virulencia de Bacillus cereus, uno de estos ejemplos es la toxina letal.

Recientemente se ha propuesto la existencia de dos enterotoxinas distintas, en base a los dos tipos de intoxicación alimentaria producidas por B. cereus: la de tipo diarreico o necrótico y la de tipo emético (69).

Tabla no. 5

Algunos metabolitos extracelulares producidos por
E. cereus que se han reportado (69).

Antibióticos (péptido)	Hidrolasa
biocerina	20 B -ceterreductasa
cerina	Toxina letal
cerexinas A y B	Factor inductor del
tiocilinas I, II y III	fluido del asa
B-amilasa	Enzimas que coagulan la
B-glucanasa	leche (proteasas neutra-
B-lactamasas	les)
I penicilinasa	Nucleasas
II cefalosporinasas	ADNasa/ARNasa
Cereolisina (hemolisina I)	Pectinasas
Colagenasa	Fosfolipasas
Exo-enterotoxinas	Fosfatidasa
Gelatinasa	Proteasas
Hemolisinas	(incluyendo enzimas
cereolisina	caseolíticas y forma-
hemolisina II	doras de coágulo de
Histamina	la leche)
Acido pulcherriminico	Tromboplastina
Tiramina	Ureasa

2.1.1 Toxina letal

2.1.1.1 Propiedades y características

En 1949, Chu demostró por primera vez la actividad letal en un filtrado de células libres, y junto con McGaughey sugirió que la capacidad hemolítica, letal y de la fosfolipasa de los filtrados del cultivo de B. cereus, están en función de una misma identidad molecular, llamada fosfolipasa-C. Pero a partir de 1960, al iniciarse el gran interés en la actividad letal de B. cereus, se sugirieron varios experimentos cuyos resultados descartaron la idea de dicha entidad molecular.

Ottolenghi mostró que las acciones hemolítica y letal se inactivaron rápidamente a 56°C, mientras que la actividad de la fosfolipasa-C permaneció inalterada. Sin embargo, a 45°C se observó una inactivación diferencial entre las actividades hemolítica y letal.

Se ha mostrado que la adición de alcoholes de bajo peso molecular al medio de cultivo, inhibe la síntesis de fosfolipasa-C. Las concentraciones de metanol entre 2 y 4% inhiben la síntesis de la fosfolipasa-C, pero no inhiben apreciablemente la síntesis de la toxina letal y de la hemolisina. La inhibición completa y específica de la síntesis de la fosfolipasa-C en presencia de metanol, sugirió que la enzima era distinta de la toxina letal y de la hemolisina. Por medio de este experimento también se pudieron diferenciar cada uno de los metabolitos extracelulares de B. cereus.

Slei y Logan sometieron a la acción de la tripsina los

filtrados de un cultivo de B. cereus, observando que las propiedades letales y hemolíticas se destruyeron completamente; sin embargo, la actividad de la fosfolipasa-C no se alteró.

La diferencia en la estabilidad de los productos de B. cereus bajo condiciones alcalinas y ácidas también pusieron en evidencia que las tres actividades no están en función de una misma identidad molecular. No hubo un decremento observable de la actividad hemolítica bajo condiciones ácidas, pero sí hubo un 75% de decremento en su actividad bajo condiciones alcalinas. El título de la toxina letal disminuyó también tanto en condiciones ácidas como alcalinas, pero la actividad de la fosfolipasa-C no se apreció bajo ninguna circunstancia.

En base a todos estos experimentos anteriores se demostró convincentemente que las tres actividades extracelulares son catalizadas por distintas proteínas.

Molnar, en 1962, por medio de una precipitación con sulfato de amonio, de un tratamiento con etanol y de una cromatografía en gel de fosfato de calcio de los filtrados del cultivo, logró la separación de la toxina letal en dos subunidades: el factor letal I y el factor letal II. La combinación de éstos formaron una mezcla tóxica la cual fue letal para el ratón. La actividad de la fosfolipasa se encontró solamente en la muestra que contenía el factor I.

El primer reporte que se tiene acerca de una buena purificación de la toxina letal libre de hemolisina y fosfolipasa fue el de Ezepchuk y Fluer en 1973, quienes utilizaron una cromatografía de columna Biogel, seguida de una precipitación con sulfato de amonio del filtrado de un cultivo de B. cereus. La

pureza de la toxina letal se hizo evidente en análisis llevados a cabo por sedimentación durante la precipitación por ultracentrifugación y por electroforesis. Al hacer el análisis de la toxina purificada, se mostró que es una proteína libre de ácidos nucleicos con un coeficiente de sedimentación de 4.65, correspondiendo a un peso molecular de 55 000-60 000. El análisis de los aminoácidos reveló que esta proteína está constituida por 18 aminoácidos; no se encontraron cistina, cisteína y oxiprolina. La toxina se inactiva con urea 6M, ácido cianhídrico y 0.8% de formalina, sus propiedades se modifican con sulfato de fierro y otras sales inespecíficas de metales pesados y su toxicidad se reduce por medio de un tratamiento con EDTA 0.01 y 0.05 M (69).

La toxina tuvo acción letal tanto para conejos como para ratones, pero aparentemente no fue así para cobayos; al inyectarles a los gatos una dosis de la toxina letal de 7-13 mg/kg de peso por vía intravenosa, a los 50-60 minutos se presentó vómito violento, con náusea, sofocamiento y debilidad. En reportes subsecuentes se vió que la dosis mínima por vía intravenosa que provoca el vómito en gatos es de 70-80 μ g/kg de peso corporal, y la dosis mínima letal para el ratón fue de 15 μ g/kg.

Se observó una estrecha relación entre la actividad letal y la inducción del fluido en el asa ligada del conejo y las actividades de pruebas cutáneas en conejos y cobayos (69).

Spira y Goepfert notaron que en las pruebas del asa ligada del ileon del conejo, los que la dieron positiva murieron a las 10 horas .

En las fracciones que se obtuvieron por cromatografía en Sephadex G-75, el sulfato de amonio precipitó el filtrado de células libres del concentrado, éstas poseían el factor activo del asa esencialmente libre de hemolisinas y fosfolipasa, también poseían la capacidad de matar al ratón y alterar la permeabilidad de los vasos sanguíneos en la piel del conejo (69).

Turnbull, examinando los filtrados del cultivo libre de células en 88 cepas de B. cereus, encontró que la acumulación del fluido del asa y las alteraciones en la permeabilidad vascular se podían correlacionar con la letalidad en el ratón.

Al someter los filtrados del cultivo a electroenfoque se separó el factor activo del asa y el de la piel a partir de la cereolisina y la fosfolipasa-C (69).

Las fracciones activas asa/piel y cereolisina/fosfolipasa fueron letales para el ratón.

La actividad letal de un filtrado del cultivo de una cepa de B. cereus, es el resultado de las actividades combinadas de dos toxinas separadas, que parece se elaboran independientemente.

Las cepas no letales son débiles productoras de cereolisina y del factor activo asa/piel. La protección en contra de la letalidad se obtiene por medio de un suero que contiene anticuerpos en contra de las actividades cutánea y letal (Factor letal I). Sin embargo, se encontró que el suero de un conejo normal o el de una preinoculación, neutralizaron las actividades letales de la fracción de la cereolisina (Factor letal II). La influencia de la cereolisina en la actividad letal de B. cereus se neutraliza inespecíficamente durante la incubación con el suero. Esto hace pensar que la inducción del fluido del asa, la

alteración de la permeabilidad vascular (ambos acompañados de necrosis) y la letalidad, son tres manifestaciones de un metabolito singular.

La cerecolisina que Bernheimer purificó en 1967 poseía una dosis mínima letal para el ratón de 1 ug de proteína.

Finalmente, Ezechuk reportó en 1979 la purificación de la toxina letal por medio de una cromatografía de intercambio iónico en celulosa DE-32 a partir de un cultivo en caldo de hidrolizado de caseína. El peso molecular de la toxina fue de 100 000; la DM_{50} (Dosis mínima letal) fue de 4-50 ug/ratón. La relación de este metabolito y el reportado en 1973 (PM 55 000 - 60 000) no se describió específicamente. En efecto, ésta última, era una proteína desconocida y no idéntica a ninguno de los polímeros activos de B. cereus biológicamente conocidos. Se demostró que alteraba la permeabilidad vascular en la piel del conejo después de una inyección intracutánea y los pulmones del ratón después de una aplicación intranasal, pero no estimuló la acumulación del fluido en el asa ligada del conejo. Dos diferencias particulares de las toxinas descritas previamente son la sensibilidad a la tripsina y los resultados negativos en la inyección de 300 ug/kg en gatos. En este caso, la respuesta fue solamente una fiebre ligera. Así se concluyó que esta toxina letal provocaba permeabilidad vascular, pero no era una enterotoxina. Probablemente porque la naturaleza precisa de la actividad letal de los filtrados del cultivo de B. cereus se desconoce, solamente están disponibles los datos primitivos de sus características físicas y químicas (69).

Bonventre encontró que mientras la actividad letal era estable a 45°C durante 2 h, se terminaba a 56°C durante 30 min. La tripsina a una concentración de 0.01 %, redujo la actividad letal a cero a 4 min de mantenerlo a 37°C. La exposición de los filtrados libres de células a pH de 2.2, 7.0 y 11.0 redujo la actividad letal al 70%, 0% y 5%, respectivamente (69).

Ezepchuk notó que la actividad tóxica de los precipitados de sulfato de amonio de los cultivos en hidrolizado de caseína, fue susceptible al rango de pH 5.0 - 10.0 con una estabilidad mínima a pH de 4. También se destruyó por exposición a 60°C durante 20 min y por la acción de la tripsina. Esto implica que, el peso molecular elevado de la toxina letal, no se ve afectado por tripsina y tampoco por agentes reductores.

Balacescu, en 1975, reportó resultados similares a los de Bonventre de acuerdo a la estabilidad de la toxina letal ante el calor y pH (69).

La toxina en filtrados de cultivo crudo parece tolerar el congelamiento y descongelamiento repetidas veces.

2.1.1.2 Producción de la toxina letal

Johnson en 1966 y Bonventre en 1970, notaron que la producción de la actividad letal en caldo de infusión de bovino a 37°C ocurre primeramente durante la fase transicional del crecimiento, definido como el lapso entre la terminación del crecimiento vegetativo (marcado en el punto en el cual el pH disminuye y se inicia la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico) y la iniciación de la esporulación (69).

Ivers y Potter en 1977, encontraron que la producción de esta toxina a 30°C en caldo de carne de bovino y plátanos maduros mezclados, es más o menos semejante a la curva de crecimiento (69).

Bonventre y Eckert en 1963, encontraron que la persistencia de la actividad letal en dicho caldo de infusión era corta y su actividad había declinado de una máxima producción a las 9 horas hasta ser indetectable a las 21 horas. Bonventre mencionó haber obtenido un título máximo en el caldo fresco de infusión de carne de bovino permaneciendo estable durante 48 horas a 37°C. Ezepchuk y Fluor obtuvieron un título máximo entre las 12 y 14 horas, después de lo cual bajó a un nivel menor al que permaneció fijo por el resto de las 24 horas del período de prueba. Los títulos de la toxina obtenidos por Balacescu en un medio de cultivo de infusión de extracto de carne mostraron un máximo entre las 12 y 18 horas, llegando a ser indetectable a las 22 horas. En los dos medios en los que Ivers y Potter obtuvieron un incremento de la producción de la toxina letal, el título mostró un máximo al final del período de prueba de 24 horas (69).

Como se infiere, la toxina podría ser elaborada a 30°C, 32°C y 37°C. Bonventre y Johnson obtuvieron el título de letalidad después de la incubación a 37°C, aunque después de la incubación a 30°C se obtuvo el mismo crecimiento. Según Turnbull, la toxina también puede producirse a 25°C.

La presencia de oxígeno en el medio de cultivo es esencial y la gasificación con oxígeno puro mejora significativamente la producción de la toxina letal (61).

Esto contrasta con los datos de que la cereolisina (Factor letal II) se inactiva con oxígeno y de que la reacción que produce la toxina de la permeabilidad vascular (Factor letal I) se produce óptimamente bajo oxigenación limitada (61).

Goepfert y sus colaboradores encontraron que el medio de elección más satisfactorio para la prueba de rutina que determina la actividad letal, es el caldo de infusión cerebro-corazón (Difco) con 0.1% de glucosa extra (BHIG) (69).

No todas las cepas de R. cereus necesariamente producen toxina letal, esto fue indicado primero por Spira (1975) y después por Katsaras (1977), luego se mostró una gran variedad de títulos entre nueve cepas probadas, aunque todas mataron a los ratones (69). Se realizaron pruebas repetidas exhaustivas bajo condiciones de crecimiento diferente y sin estudiar el efecto de concentración, los resultados indicaron una marcada diferencia en la calidad y grado de la producción de la toxina letal de acuerdo a las cepas que producen la actividad letal bajo condiciones estándar (69).

2.1.3 Modo de acción de los factores letales

En general, 0.5 ml de un filtrado de cultivo de R. cereus que posee el potencial letal, inyectado a un ratón o rata, actúa extremadamente rápido y puede producir la muerte a los 10 segundos, aunque generalmente lo hace dentro de los 2 minutos. Se presenta una apariencia típica con convulsiones terminales que se caracterizan por pateo violento de las patas posteriores. Otros

autores han sugerido una dificultad respiratoria, y Torres-Anje interpretó los movimientos convulsivos como parálisis (69).

Cuando Bonventre y Eckert realizaron las necropsias, notaron que los cambios patológicos fueron solamente una congestión masiva con trombina en los vasos y capilares de los pulmones; no se vieron afectados otros órganos. Estos descubrimientos los corroboraron Balacescu y Ezepechuck, quienes también observaron grandes áreas hemorrágicas en los pulmones. Turnbull reexaminó esto cuidadosamente encontrando que, mientras hay congestión en los pulmones, reflejada moderadamente en el hígado, no hubo evidencia de daño tisular o hemorrágico. Observó que, había un paro cardíaco inmediato y como consecuencia de esto resultó la congestión pulmonar. La muerte resulta entonces de la cardiotoxicidad.

La administración intranasal da como resultado una letalidad consistente, con dosis 5 a 10 veces más bajas que las que se usaron en las pruebas anteriormente, y aparentemente podría ser tan instantánea como la inoculación.

Stamatin y Angheliesco propusieron que al producto que se inoculó por la ruta respiratoria parece ser la toxina bacteriana de las más potentes que se conocen. Se supone que se absorbe rápidamente en la sangre de los capilares alveolares produciendo la muerte.

La toxina también es letal cuando se administra por vía intraperitoneal o por vía subcutánea, pero la respuesta no es tan consistente y el tiempo en que se presenta la muerte es mucho más largo (1-24 horas).

Las dosis administradas al ratón oral o intrarrectalmente no causan la muerte.

Es lógico creer que la naturaleza necrótica de los dos factores letales, el I (la toxina que altera la permeabilidad vascular) y el II (la cereolisina), podrían jugar un papel en la muerte aún sin ser obvias histológicamente (69).

2.2 Hemolisinas

Una de las características principales de B. cereus, y a la vez una prueba fundamental para distinguir a este microorganismo de Bacillus anthracis, es la hemólisis en agar sangre. Esto parece haber sido bien conocido desde 1930, en relación a la diferenciación de Bacillus anthrax y Bacillus pseudoanthrax, estableciéndose específicamente para B. cereus por Clark en 1937 (20). Burdon en 1947, consideró que la virulencia de cepas de B. cereus se relaciona con su actividad hemolítica. Ottolenghi en 1961, propuso que las actividades de dos de las sustancias producidas, la hemolisina y la fosfolipasa, eran diferentes.

Slein y Logan, en 1965 obtuvieron datos que sostienen la falta de identidad entre hemolisinas y fosfolipasa. Fossum, en 1963 observó dos picos máximos de actividad hemolítica en sus fracciones.

2.1.2.1 Propiedades y características de las hemolisinas

El filtrado libre de células de un cultivo en caldo semi-mínimo se precipitó con sulfato de amonio, en seguida se fraccionó por electroforesis y la fracción obtenida se reprecipitó con sulfato de amonio. El precipitado redisoluto se purificó por cromatografía en Sephadex G-100, y en base a la electroforesis en un gel de acrilamina se obtuvo el agente hemolítico, el cual es una proteína a la que nombraron cereolisina. Esta, en una forma substancialmente pura, está libre de actividad fosfolipolítica y es capaz de lisar a los eritrocitos a una concentración de 1 ug/ml, se reconoció como uno de los agentes hemolíticos más potentes conocidos *in vitro* (69).

La cereolisina resultó altamente letal para el ratón, la actividad hemolítica fue inhibida por suero humano y por 10 ug/ml de colesterol, esta concentración es necesaria de 10 a 50 veces más, en el caso de otros cinco lípidos que se probaron, para obtener una inhibición equivalente.

Spira y Goepfert, en 1975, por medio de una cromatografía en Sephadex G-75, no obtuvieron el factor de permeabilidad vascular enteramente libre de hemolisinas, y observaron que los perfiles de elución, suficientemente diferentes, podrían indicar entidades también diferentes.

Ezepchuk indicó haber separado exitosamente la hemolisina de la toxina letal (69).

En 1963, Fossum observó en un filtrado de cultivo de la cepa NVH 322 de *B. cereus*, dos picos hemolíticos, a los cuales

designó como H^1 y H^{11} por medio de una cromatografía del sobrenadante del cultivo precipitado con sulfato de amonio en DEAE celulosa.

Un año más tarde, Fossum observó el efecto Arrhenius en las actividades hemolíticas de las dos cepas y notó que la actividad de la cepa NVH 322 fue significativamente mayor entre 90 y 100°C que las cepas aisladas de mastitis bovina, que parecieron producir H^1 . De esto se podría deducir que H^{11} fue el componente responsable del efecto Arrhenius (11).

Parker y Goepfert indicaron la posibilidad de que existieran dos hemolisinas a las cuales identificaron como una estable al calor (45°C durante 30 min) y a la otra como lábil en filtrados del cultivo de *B. cereus*. Ambas se separaron de la fosfolipasa. Se consideró que la hemolisina lábil al calor es la cereolisina (69).

Más tarde, en el mismo año, Coolbaugh y Williams estudiaron también las dos hemolisinas separándolas parcialmente y distinguiéndolas como dos picos distintos por cromatografía en Sephadex G-100. Se rotularon las hemolisinas como H-I y H-II (22).

Con sulfato de amonio al 40% se logró precipitar solamente H-I, a medida que aumentaba la concentración de sulfato de amonio, se incrementaba la precipitación de H-II.

A H-I se le puede caracterizar como una proteína de PM de 50 000-52 000, que pierde su actividad después de 5 min a 40°C, 2 min a 50°C y 2 min a 60°C. Su actividad hemolítica fue inhibida por colesterol y se cree que es la cereolisina.

Bernheimer y Grushoff, en 1967 se interesaron en la posible relación que podría haber entre la cereolisina y la estreptolisina-O; inicialmente concluyeron que no existía. Sin embargo, más tarde se encontró que al usar suero humano pudieron manifestarse estas relaciones antigénicas, las globulinas de anti-estreptolisina-O en caballos hiperinmunes neutralizaron a la cereolisina. Esto fue importante en el establecimiento de que la cereolisina estaba relacionada cercanamente a las citolisinas oxígeno lábil activadas por tiol. Un año más tarde, concluyeron a partir de los resultados obtenidos, que la cereolisina era una proteína homogénea con pI 6.5.

Bernheimer, en 1976 purificó la cereolisina por medio de una cromatografía en Sepharosa AH, de esta forma confirmó su relación antigénica con la estreptolisina-O y encontró que, en común con los miembros de las cereolisinas activadas por tiol, exhibió microheterogeneidad. La causa de ésta no era clara, pero investigando la posibilidad de que las toxinas activadas por tiol existen en las últimas dos formas, una activa reducida requiriendo grupos sulfhidrilos libres para su actividad y otra inactiva oxidada reversiblemente con los grupos sulfhidrilo, se demostró entonces que la cereolisina existe en estas dos formas separables, que son idénticas en tamaño pero con diferentes cargas, el pI para la forma oxidada está entre 6.3 y 6.4, el pI de la forma reducida está entre 6.5 y 6.6. La forma activa reducida, la cual tiene un PM aproximadamente de 55 000, se inhibió con grupos sulfhidrilo; esta inhibición pudo ser reversible por ditiotreitito. Cowell, en 1976 consideró que la cereolisina purificada consistía en una cadena polipeptídica de

518 aminoácidos.

Glatz y Goepfert en 1973 encontraron que la exposición de filtrados del cultivo libre de células, a 45°C por 30 minutos produjo una reducción del 90-97% de la actividad hemolítica sin una alteración significativa en los resultados de la prueba cutánea en conejos y cobayos o en actividades de la fosfolipasa.

La fracción H-II tuvo un PM de 29 000-31 000, exhibió el efecto Arrhenius, mostrando una sensibilidad incrementada a temperaturas superiores de 60°C pero la sensibilidad decreció a temperaturas arriba de 70 y 100°C. A esta hemolisina no la inhibió el colesterol y exhibió un patrón diferente y la hemólisis que presentó en los eritrocitos de conejo a 37°C fue distinta a la que presentó la fracción H-I. Las dos hemolisinas fueron igualmente sensibles al cloroformo, éter, pHs extremos, tripsina y pronasa.

En base a las sensibilidades relativas a la temperatura pudiera parecer posible que la H^I y H^{II} de Fossum corresponden a la H-I y H-II descritas por Coolbaugh y Williams.

Las diferentes sensibilidades al calor se observaron a 50°C durante 30 min, la hemolisina estable tuvo un pI de 5 y la hemólisis lábil de 6.6 (11).

2.1.2.2 Producción de las hemolisinas

La producción de las hemolisinas por B. cereus es un fenómeno que realizan las células vegetativas y, generalmente, de una manera primaria o secundaria, la producción se ha llevado a

cabo en cultivos en aireación. No se ha alcanzado la cinética de su producción.

A 36°C y por crecimiento en infusión cerebro - corazón, la hemolisina aparece al final de la fase exponencial de crecimiento, cerca o exactamente donde se encuentra el punto de pH mínimo. El incremento del título de la hemolisina estable aparece un poco después que el de la cereolisina.

El enriquecimiento con 5% de suero fetal de ternero pueden acelerar ligeramente los ciclos de multiplicación y la producción de metabolitos y los valores de éstos pueden incrementarse, pero no se obtienen resultados reproducibles.

Los ciclos de multiplicación en cultivos estacionarios se retardaron por varias horas cuando se comparó con cultivos en agitación, aunque el valor de la máxima producción de hemolisina total que finalmente se alcanzó, no cambió (69).

El crecimiento bacteriano fue bueno en caldo nutritivo, leche, sopa de cola de res y chícharos, pero no hubo la disminución del pH que se observó en cultivos de BHIG (Caldo de infusión cerebro-corazón + 0.1% de glucosa).

La producción de hemolisina es mejor en leche y chícharos que en el caldo nutritivo y la sopa.

Una disminución notable en los títulos de ambos tipos de hemolisina se observa entre las 10 y 24 horas a 36°C y 40°C, con la excepción del cultivo en leche estéril.

En cuanto a su capacidad para elaborar hemolisinas, las variaciones de las diferentes cepas de B. cereus se conocen desde que se usa el agar sangre para el aislamiento y estudios de este microorganismo.

En los títulos letales de hemolisinas detectados en filtrados de células de 155 cepas, usando 0.5% de sangre humana, 10 tuvieron títulos de menos de 1:5 que fue la dilución más baja probada, pero se duda que existan cepas de B. cereus verdaderamente negativas.

Aunque los resultados no se han analizado plenamente, es interesante notar en estos títulos, si no una relación exclusiva, sí marcados títulos altos de hemolisina y altas actividades de la fosfolipasa como se determinó en agar de yema de huevo de acuerdo a los métodos de Turnbull.

Varios investigadores han usado la sangre de una gran variedad de mamíferos y aves y ninguna ha mantenido una resistencia notable a la hemolisina de B. cereus. En pruebas preliminares hechas a los títulos referidos, no se notaron diferencias significantes en las susceptibilidades entre la sangre humana y de conejo.

Rowley y Hunter encontraron que los eritrocitos de conejo fueron considerablemente menos sensibles a la hemolisina de B. cereus que los eritrocitos de pollo. Es razonable esperar que la cereolisina exhiba diferencias similares en las sensibilidades a la hemolisina (69).

Ivers y Potter en 1977, estudiaron la producción de hemolisina de B. cereus en medios comerciales de carne y chicharos y en plátanos maduros pelados. Reportaron que la producción de la hemolisina a 30°C se realizó en las preparaciones de carne de ternero y pavo, pero no en el plátano, lo cual sugiere que éste debe ser deficiente en algún nutriente

esencial o debe tener un pH bajo (5.0) (69).

La producción de hemolisinas en carne de ternero y chicharos siguió un patrón sobre un periodo estudiado de 24 horas. A 4°C, y después de 48 horas, se había perdido aproximadamente el 55 y 80% de su actividad en las preparaciones de carne y chicharos, respectivamente. En carne de ternero, solamente se perdió el 50% de la actividad hemolítica ante su exposición a 65°C por 30 min y 70% después de 20 min.

2.1.2.3 Modo de acción de las hemolisinas de B. cereus

Hunter, en 1949, encontró que los filtrados de los cultivos de B. cereus en caldo peptona proteasa tuvieron solamente un pequeño efecto sobre la respiración de los glóbulos rojos de pollo. Al observar cambios en la transmisión de la luz a través de suspensiones de eritrocitos, se vió que se alteró el volumen de los glóbulos rojos reflejando cambios en la permeabilidad y efecto osmótico, Hunter notó que los filtrados de B. cereus tuvieron un efecto marcado en la condición osmótica de los eritrocitos de pollo y tiburón. Rowley y Hunter, en 1951, probaron la fragilidad de los glóbulos rojos que se expusieron a toxinas de B. cereus, observando hemólisis subsecuente durante su hinchamiento en solución Ringer 1.25 y 2 M. Al comparar los resultados se observó que una exposición de 2 1/2 horas produjo glóbulos rojos de conejo requiriendo de 4 1/2 a 7 horas y las células de tiburón requirieron más tiempo.

Concluyeron que la exposición a las toxinas de B. cereus

debilitó la superficie de los eritrocitos, conduciéndolos eventualmente a la hemólisis, pero no afectó los canales a través de los cuales penetran pocos lípidos insolubles no electrolíticos (glicerol, etilenglicol, urea, tiourea y eritritol), se pensó que la fosfolípasa podría ser el principal factor en causar la debilidad de la superficie de los eritrocitos.

Pendleton, en 1972, examinó los efectos de la cereolisina sobre la membrana de los eritrocitos de conejo, por electromicroscopía encontró que, aunque son más pequeños en diámetro o menos frecuentes, los hoyos y arcos característicos o estructurales en forma de anillo, similares a los producidos por la estreptolisina-O, también los produjeron por cereolisina.

Se mostró que la unión de ambas lisinas ocurre en células que contienen colesterol, pero no en las membranas de las que está ausente.

El colesterol de la membrana es el sitio de unión de la cereolisina y estreptolisina-O.

Cowell, en 1976, observando cereolisinas análogas a las citolisinas lábiles al oxígeno, definió algunas de sus propiedades y modos de acción probables (13).

El sitio de unión para estas toxinas en la membrana de los eritrocitos, como ya se mencionó, es el colesterol, la preincubación de la toxina con colesterol inhibe la hemólisis, pero no afecta la reacción una vez que ha ocurrido la unión. Se requieren varios cientos de moléculas de hemolisina para lisar a un solo glóbulo rojo. El rango de hemólisis es proporcional a la concentración de la toxina y está en función de la temperatura, aunque la unión inicial de la toxina a los eritrocitos no depende

de la temperatura. La hemólisis ocurre por medio de un mecanismo coloideosmótico en el cual se producen los pequeños orificios en la membrana de los eritrocitos y se pierde la capacidad para prevenir el intercambio libre de iones atravesando la membrana.

El K^{1+} intracelular escapa, pero el flujo de iones y el agua dentro de la célula causa la ruptura.

No hay evidencia de que estas toxinas alteran los componentes de la membrana enzimáticamente, se propone que es un secuestro directo y una depleción de colesterol lo que conduce a los orificios; estas toxinas pueden causar cambios de permeabilidad en un espectro amplio de tipos de célula que contienen colesterol en sus membranas. De las dos formas de cereolisina, oxidada y reducida, es aparentemente la última la que es hemolíticamente activa, la forma oxidada es incapaz de unirse a la membrana de los eritrocitos o su afinidad por ella es baja. Todavía tiene que estudiarse el modo de interacción de la cereolisina con su receptor de colesterol.

Coolbaugh y Williams, en 1978, encontraron que la hemólisis implica dos estados: uno de ataque y otro de lisis. El rango de hemólisis en el segundo estado se reduce progresivamente por enfriamiento a $0^{\circ}C$; aún cuando todavía puede ocurrir; el número requerido de glóbulos rojos removieron toda la hemolisina de una suspensión estándar en menos de un minuto (11).

En efecto, la capacidad de los eritrocitos para absorber hemolisinas a $0^{\circ}C$ sin lisis, se usó para quitar hemolisinas del filtrado del cultivo y para demostrar que son diferenciales la

hemolisina y las pruebas cutáneas.

Los rangos de las medidas de la reacción hemolítica a 37°C se presentaron de la siguiente manera: la máxima hemólisis producida por la H-I (cereolisina) se extendió en menos de un minuto a todas las concentraciones probadas, mientras que la de la H-II se alcanzó una máxima hemólisis después de 2-7 min. Se propuso que podría presentarse una etapa intermedia en la hemólisis por H-II y se demostró que es dependiente de la temperatura.

La cereolisina H-I fue inhibida por el colesterol, pero la H-II no.

El efecto letal rápido de la cereolisina purificada, al inyectarse en el ratón, indica que la hemolisina es una toxina, y a pesar de considerarse uno de los agentes hemolíticos más potentes *in vitro* queda incierto cuál es el papel que juega en las infecciones por B. cereus.

La primera idea que se tuvo acerca de la patogenicidad de una cepa de B. cereus se relacionó con su actividad hemolítica y ha sido imposible encontrar alguna relación entre los títulos hemolíticos *in vitro* de cepas infecciosas y la severidad reportada de las respectivas infecciones.

Dado que el suero normal impide la actividad hemolítica rápidamente, es probable que las hemolisinas de B. cereus tengan poco significado *in vitro*. La hemólisis no es aparente en secciones histológicas provenientes del ratón, el cual sucumbe a la actividad letal de la cereolisina. Las reacciones de permeabilidad vascular alterada y necrosis producidas por la cereolisina, sugieren que es un metabolito fuertemente activo, y pudiera intervenir en heridas y otras infecciones donde no

tiene la oportunidad de actuar el efecto inhibitor del suero (69). Coolbaugh y Williams argumentaron que la ubicuidad de las hemolisinas y el metabolismo de su producción, sugieren que deben tener una función, pero con las hemolisinas de B. cereus así como con las de otros microorganismos, éste sigue siendo un misterio hasta ahora (11).

2.1.3 Fosfolipasa-C

2.1.3.1 Propiedades y características de la fosfolipasa-C

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas cuyos sustratos son fosfolípidos, los cuales se encuentran casi exclusivamente en membranas biológicas. Hay dos clases de éstos: glicerofosfolípidos y esfingolípidos.

Entre los más importantes fosfolípidos de las membranas celulares de mamíferos están la fosfatidilcolina (lecitina), un glicerofosfolípido y esfingomiélin, un esfingolípid. Además, el colesterol de las membranas citoplasmáticas está asociado con los fosfolípidos en la doble capa membranosa y al producirse la hidrólisis de éstos por medio de las fosfolipasas se afecta el colesterol (69).

Oficialmente, la fosfolipasa-C es una fosfatidilcolina colinefosfohidrolasa, pero parece que comprende un grupo de enzimas que hidrolizan varios tipos de glicerofosfolípidos y esfingomiélin.

Las fosfolipasas se designan de la A a la D y las C son las

más estudiadas, las producen una gran variedad de bacterias, tanto Gram negativas, como Gram positivas.

La fosfolipasa-C de B. cereus no posee actividad hemolítica ni letal, es menos activa en fibroblastos humanos, no afecta a protoplastos bacterianos ni la afectan los factores quelantes, tiene un pI de 8.1 y un PM de 23 000 d.

Se ha reportado la producción de fosfolipasa A (acilhidrolasa) por B. cereus, bajo ciertas circunstancias, aunque en otras investigaciones realizadas, se ha observado la falta de producción de las fosfolipasas A y D. La fosfolipasa-C si se encuentra presente, lo que hace pensar que las producidas por B. cereus son exclusivamente del tipo C (65).

La titulación de los productos finales que resultan de la hidrólisis de la lecitina de yema de huevo, de alguna manera ha sido una prueba básica para el ensayo de la actividad de la fosfolipasa- C.

Se han encontrado tres enzimas diferentes producidas por B. cereus las cuales tienen actividad de fosfolipasa-C. Todas se consideran metabolitos del crecimiento vegetativo. La más ampliamente estudiada es la que hidroliza la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos naturales, y es a la que comunmente se refieren como la fosfolipasa-C.

La segunda y la tercera enzimas tienen especificidad para el fosfatidilinositol y para la esfingomielina.

La fosfatidilcolina colinefosfohidrolasa, la primera de las enzimas, se ha purificado y analizado extensamente. Es una metaloenzima monomérica de PM 23 000 con su máxima actividad a pH 7.2-7.5, contiene dos átomos esenciales de zinc importantes en su

estabilidad conformacional y no tiene puentes disulfuro. Su actividad no está influenciada por iones de Ca^{2+} . Se ha mencionado la importancia de varios residuos de aminoácidos y grupos carboxilo en los enlaces y actividades catalíticas de la enzima, su pI está a discusión, mencionándose que se encuentra entre 6.5, 7.2 y 8.5, aunque también se encontró que mediante el corrimiento isoeléctrico, aparecen dos especies con puntos isoeléctricos de 6.8 y 7.5 respectivamente (69).

Se ha aceptado que esta enzima no es hemolítica para eritrocitos intactos, aunque Mollb cita dos reportes atestiguando hemólisis en eritrocitos de cobayo, algunos otros más se citaron indicando la susceptibilidad de los glóbulos rojos humanos después de someterlos a detergentes y también de glóbulos rojos de pollo y de sapo, después de la depleción de su ATP. Se observa generalmente que no es letal, aunque se puede ver que tiene una LD_{50} de 1.6-1.7 mg/kg, lo cual está aparentemente en el límite que se considera generalmente tóxico en una proteína (LD_{50} ppm). La enzima no es dermonecrótica para conejos y no causa incremento en la permeabilidad de fibroblastos humanos o en las membranas plasmáticas de la fibra muscular de las ratas (32).

La fosfolipasa-C, que hidroliza el fosfatidilinositol, es la segunda fosfolipasa de D. cereus, la encontraron desde 1963 y fue purificada y caracterizada años después, tiene un PM de 29 000 d, un pI de 5.4 y no depende de grupos sulfhidril intactos o cationes divalentes. La enzima libera específicamente fosfatasa alcalina de las membranas celulares. Se ha notado que

los filtrados crudos de B. cereus, B. anthracis y B. thuringiensis cuando se inyectaron a conejos les produjeron hiperfosfatemia.

El suero en contra de la lecitinasa de B. anthracis inhibió la fosfatemia, pero no la actividad de la lecitinasa en filtrados de B. cereus, los filtrados viejos también fueron fosfatemia negativa, pero lecitinasa positiva, inicialmente se pensó que el factor responsable de la fosfatemia no era la fosfolipasa-C. Sin embargo, después se demostró que B. cereus produjo una segunda fosfolipasa que pudo asociarse con el fenómeno por lo que recibió el nombre de factor de la fosfatemia. Subsecuentemente se mostró que éste era la fosfolipasa-C que hidrolizaba el fosfatidilinositol (31).

La tercera fosfolipasa-C de B. cereus es la esfingomielinasa, la cual fue detectada por Slein y Logan y purificada por Ikezawa .

Los primeros autores no creían que esta enzima tuviera actividad hemolítica, pero de acuerdo a Ikezawa, se trata de una proteína de peso molecular de 24 000 d y pI 5.6 y aparentemente es capaz de actuar sobre de la esfingomielina de la parte externa de la bicapa lipídica de glóbulos rojos de carnero, produciendo la hemólisis.

Ikezawa, en 1960 (30), investigó esta acción hemolítica más detalladamente y encontró que hubo una fuerte correlación entre el contenido de la esfingomielina de glóbulos rojos y la sensibilidad a las enzimas. Los glóbulos rojos de carnero, con 51% de esfingomielina, fueron los más sensibles entre los glóbulos rojos probados (los eritrocitos humanos contienen 26.9%,

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

los de conejo 19%, los de caballo 13.6% y los de ratas 12.8%).

El rompimiento de la esfingomielina precedió a la hemólisis por calor y 10 mM de Ca^{2+} inhibieron lo primero con la supresión completa de la hidrólisis (30).

La hemólisis por calentamiento y enfriamiento brusco empezó inmediatamente después del contacto con la enzima, antes de la pérdida apreciable de esfingomielina y se llevó a cabo con la presencia de 10 mM de Ca^{2+} . Se concluyó que, mientras la hidrólisis por calor depende de la degradación enzimática de la esfingomielina, la hemólisis por calentamiento seguido de un enfriamiento brusco, no. Ambos tipos de hemólisis se estimulan por la presencia de Mg^{2+} y especialmente con Ca^{2+} presente también. A 37°C, con la presencia de 10 mM de MgCl_2 y 10 mM de CaCl_2 se perdió el 40% y el 85% de esfingomielina a los 15 y 30 min, respectivamente; los glóbulos rojos se hacen esféricos (esferocitos) en 30 min con un 60% de lisis aproximadamente.

Monlar (88) afirmó que la toxicidad de la toxina letal en ratón fue distinta de la actividad de la fosfolipasa habiéndose establecido que las preparaciones purificadas de la fosfolipasa de B. cereus no eran letales ni hemolíticas (30).

Se notó que al inyectar fosfolipasa-C de B. cereus purificado en la piel del conejo, se produjo una alteración prominente pero transitoria, de la permeabilidad vascular.

Por medio de una serie de pruebas quirúrgicas e inmunológicas, se determinó que el hueso es la fuente del exceso sérico de la fosfatasa alcalina, la cual se produce en respuesta a esta fosfolipasa-C.

El hecho de que la fosfatasa alcalina se eleve, es un indicador de daño al hígado o de una enfermedad en los huesos. Esta actividad de la fosfolipasa-C hidrolizante del fosfatidilinositol podría verse como una actividad tóxica.

Aunque no hay pruebas que indiquen confiablemente que la esfingomielinasa pueda considerarse como la tercera fosfolipasa-C de B. cereus y de que pueda ser o no una toxina *in vivo*.

En 1978 (69), se vió que no era probable que la fosfolipasa-C de B. cereus pudiera tener un significado patológico, sin embargo, la accesibilidad de esta enzima a sus substratos (fosfolípidos) en las membranas de las células del huésped, podría prevenirse bajo circunstancias normales *in vivo*. Puede haber ocasiones donde actúe secundariamente después de la exposición de los fosfolípidos a algún otro factor. Un ejemplo podría ser el efecto sinérgico entre la esfingomielinasa de S. aureus y la fosfolipasa de B. cereus en la hemólisis de los eritrocitos.

En 1970, se propuso que la fosfolipasa podría ser, como las hemolisinas, factor auxiliar de virulencia.

2.4 Toxina necrótica

Entre los años 1950 y 1960 se estableció que B. cereus era un agente capaz de causar diarrea, es decir, se sugirió su mecanismo posible de patogénesis. La primera sugerencia concerniente a su modo de acción la hizo Nygren en 1962, quien postuló que la fosfolipasa de B. cereus podría ser la toxina

responsable de la intoxicación alimentaria, pero esto nunca fue apoyado.

No obstante, en 1970, Bonventre y Johnson fueron capaces de establecer que no era posible identificar el o los productos tóxicos responsables de la intoxicación alimentaria por B. cereus (tipo diarreico) y que podría ser la toxina letal, la fosfolipasa, o una combinación de las dos (75).

La primera indicación clave de la posible existencia de una enterotoxina se encuentra reportada en los escritos de Goepfert, cuando en 1972 extrajo el fluido acumulado en el asa intestinal del ileon ligado del conejo. Un año más tarde, Spira y Goepfert dieron más detalle sobre esto, de acuerdo a las respuestas positivas de la acumulación del fluido, e hicieron varias observaciones importantes.

- 1) Bajo condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo, diferentes cepas de B. cereus produjeron distintos grados de acumulación del fluido, en asa ligada de conejo.
- 2) Aunque se probaron varios tipos de medios, el BHI produjo gran respuesta del asa; en cambio, los cultivos en caldo nutritivo fueron consistentemente negativos.
- 3) La respuesta del asa no mostró diferencia entre las cepas de B. cereus aisladas en distintas etapas de la intoxicación alimentaria.
- 4) La respuesta fue pobre e inconsistente en conejos adultos, pero consistente en conejos jóvenes.
- 5) La respuesta no se afectó significativamente por la posición del asa a lo largo del intestino.
- 6) Cuando una o más de las asas mostraba reacción fuertemente

positiva los animales estaban expuestos a morir dentro de las diez horas siguientes.

7) Los cultivos introducidos directamente en el ileon no ligado por catéter, no produjeron diarrea.

8) La acumulación del fluido se asocia significativamente con el incremento de dos a tres veces más el número de bacterias dentro del asa ligada, en el caso en el que haya una disminución en el número bacteriano, no habrá acumulación del fluido.

9) Grandes cantidades de células vegetativas (8×10^9 células/ml) provocaron acumulación del fluido en el asa.

10) Los sobrenadantes de los cultivos de 12 horas en BHI produjeron fuertes respuestas positivas.

De los resultados se concluyó que los incrementos en el número celular fueron más bien una consecuencia de la acumulación del fluido que una causa de ella; la multiplicación intraluminal del microorganismo, no estuvo involucrada con la acumulación del fluido; y la diarrea inducida por *B. cereus* probablemente fue el resultado de la intoxicación, más que de la infección por el microorganismo.

En base a la capacidad de este producto para inducir la acumulación del fluido en el asa le llamaron una enterotoxina, factor diarreagénico, toxina diarreica o toxina necrótica (por lo que más adelante se mostrará su actividad necrótica).

2.1.4.1 Propiedades y características de la toxina necrótica

La enterotoxina diarreaica es una proteína antigénica de un peso molecular de 50 000 d (22,53,69).

Dado que no ha sido posible someterla a una completa purificación, el rendimiento obtenido ha sido del 70 al 90% (22).

Es una toxina termolábil, mantiene su máxima actividad a 32°C de 4-15 hrs después de la inoculación, sufriendo una disminución de su actividad a las 24 h y ya no se detecta a las 48 horns. Se inactiva a 56°C durante 30 min pero no a 45°C durante 30 min (22,53,69).

Spira y Goeppfert (65,69) encontraron que este factor es inestable a 25°C y 4°C, por los estudios realizados a 4°C se menciona lo siguiente: (22,69,74)

1) La estabilidad de la enterotoxina está estrechamente relacionada a la fuerza iónica de la solución amortiguadora que la transporta. La fuerza iónica de 0.3 otorga una máxima estabilidad a la toxina, a medida que decrece, se presenta una pérdida mayor de la actividad. La sensibilidad de la toxina es proporcional a su pureza. Utilizando NaCl, CaCl₂, NH₄ HCO₃ o soluciones amortiguadoras de fosfatos de sodio y potasio a pH 7.2 o 7.9 se proporciona el medio iónico apropiado y se demuestra que los iones particulares involucrados son irrelevantes, es decir, la naturaleza de las especies iónicas tiene poco efecto en la estabilidad de la enterotoxina. Las preparaciones concentradas son más sensibles a la pérdida de la actividad.

2) La toxina necrótica de los filtrados del cultivo de B. cereus en BHIG pierde actividad en forma significativa durante 7 días a

4°C o en varias semanas a -20°C .

3) La alquilación con mercaptoetanol más iodoacetamida o acrilonitrilo la protegieron parcialmente contra la pérdida de actividad, pues ésta se puede atribuir parcialmente a la formación de enlaces disulfuro, conduciendo a la agregación molecular.

4) La estabilidad de la toxina es máxima a pH entre 5-10, decreciendo en forma aguda fuera de este rango.

La toxina es sensible a la tripsina y pronasa, pero resistente al EDTA y a la glucuronidasa (22,69).

La estabilidad es mínima a pH 4, el cual está en la vecindad del pI de la toxina cuyo valor está entre 4.9 - 5.3 (22,69). La toxina permanece inalterada por enfriamiento y descongelamiento (69).

Turnbull (69) determinó que permanecía una actividad del 100% en un filtrado libre de células después de 14 días a 4°C y una hora a 36°C; 53% y 21% después de una hora a 50°C y 55°C respectivamente, 6% después de 5 min a 80°C y 0% después de 20 min a 55°C o 10 min a 80°C (65,69,74,75).

No se llevaron a cabo pruebas de estabilidad en preparaciones purificadas por electroenfoco.

No están disponibles los reportes sobre estudios detallados acerca de la capacidad de las cepas para mantener su toxicidad, pero según la experiencia de quienes han estudiado el factor necrótico, los subcultivos frecuentes de una cepa fuertemente toxigénica en agar inclinado, conducen a una pérdida solo parcial, de la toxigenicidad. No se conoce la naturaleza de este

fenómeno (22).

La estabilidad de la toxina es notablemente más pequeña en los cultivos en fermentación con una caída muy rápida en la actividad en 2-4 horas. Las limitaciones de oxígeno en cierto modo reducen la inestabilidad. La aparición de proteasas se presentó en la fase estacionaria tardía, mucho después de que hubiera ocurrido la pérdida de la toxina. Por lo anterior se puede ver que la inestabilidad no se atribuye a la proteasa, sino al factor que degradó a la toxina, que fue una enzima inducible relacionada transitoriamente a la esporulación, la inestabilidad se relacionó a una etapa temprana de la esporulación (69).

La enterotoxina diarreica es un metabolito distinto de la fosfolipasa-C y de las dos hemolisinas de B. cereus y constituye uno de los dos factores letales producidos por este microorganismo (22).

La toxina necrótica produce acumulación del fluido en asas del ileon del conejo, altera la permeabilidad vascular en la piel del mismo y mata a los ratones infantiles cuando se les inyecta en forma intravenosa; también puede provocar diarrea a monos (22,69,75).

Hay evidencia de que esta enterotoxina es responsable del síndrome diarreico de la enfermedad y que las propiedades dermonecroticas y necrosantes sobre las paredes intestinales, son relevantes en la patogénesis de las infecciones por B. cereus (22,75).

2.1.4.2 Producción de la toxina necrótica

La toxina es un metabolito producto del crecimiento vegetativo activo, se sintetiza y se libera durante la fase de crecimiento logarítmico tardío de E. cereus a una temperatura óptima de 32-37°C. En el laboratorio se han encontrado las condiciones de crecimiento que dan lugar a la producción de altos rendimientos de la toxina (69,74).

Durante los estados tempranos del crecimiento, ocurre un decremento característico del pH como el que ocurre durante la glicólisis, alcanzando un mínimo que coincide con la máxima actividad de la enterotoxina alrededor de 5 horas (61).

Una depleción de la glucosa disponible y la desaminación, causan un incremento progresivo en el pH del medio, mientras que la actividad de la enterotoxina decrece rápidamente, posiblemente como resultado de la degradación proteolítica. Junto con la aparición de la enterotoxina, se pueden detectar las actividades hemolíticas y fosfolipolíticas (22,61,69).

No hay incremento apreciable de la toxina durante la fase estacionaria.

La enterotoxina no la forman las células en crecimiento dentro del intestino en el asa del íleon, se ingiere en un estado preformado (69).

Ciertas cepas de E. cereus pueden elaborar una toxina capaz de provocar un daño severo en la pared intestinal. Se observó que un filtrado concentrado libre de células, preparado fresco a partir del absceso del cerebro de un infante, era capaz de producir este efecto (75).

Las cepas que producen la toxina necrótica lo hacen en diferentes grados, de acuerdo a las condiciones dadas, pero los resultados de los cultivos en arroz y BHIG, indican que la oportunidad para una multiplicación adecuada del microorganismo es un prerrequisito para la producción de la toxina y que produzca daño tisular.

Al determinar las condiciones de producción óptima de la toxina, se estudió su producción en cultivos con crecimiento fermentativo en caldo base semidefinido de ácidos casamínicos, consiguiendo así varios descubrimientos:

1) Un inóculo de 14 horas de la fase estacionaria y uno de 3 horas de la fase exponencial dió igual rendimiento.

2) 0.1% y 1% de inóculo dieron buenos rendimientos, pero un inóculo de 10% dió como resultado un bajo rendimiento de la toxina.

3) Los rendimientos óptimos se obtuvieron cuando se incorporó un 0.5-1% de glucosa al medio.

4) El control del pH entre 7-8 tuvo un efecto dramático en el incremento del rendimiento, comparado con un pH no controlado o si se lleva un control a otros valores de pH.

5) La producción ocurrió en todas las temperaturas entre 20 y 40°C, pero una producción marcada fue a 32°C.

6) La máxima agitación, sin generar espuma, dió los más altos rendimientos.

7) El rendimiento bajo las condiciones óptimas dadas fue 50 veces más grande que por los métodos de producción comerciales.

8) El tiempo de cosecha fue de 5 horas.

Hubo algunos desacuerdos en cuanto a los niveles de oxígeno

disuelto en los cultivos en crecimiento. Se encontraron los niveles óptimos entre 0-1%, encontrando que del 10% o más, el rendimiento de la toxina decreció progresivamente, aunque finalmente la población celular se incrementó (74,75).

Los valores en atmósferas del oxígeno disuelto, mostraron así que el mejor rendimiento de la toxina era en valores menores a 0.002 atmósferas, aunque el crecimiento celular más grande se obtuvo a una tensión de oxígeno de 0.1 atmósferas. También observaron que en la fase post-exponencial, la pérdida de actividad tóxica coincidió con un rápido incremento en la demanda del oxígeno celular. La producción significativa de la toxina se obtuvo anaeróbicamente (61).

En 1975, se observó que la producción de enterotoxina se incrementa a bajos niveles de oxígeno disuelto, lo cual refleja el intento del microorganismo para vencer la restricción de oxígeno y para disponer de electrones bajo la limitación de oxígeno y la regulación del balance de energía.

La pérdida observable de la actividad de la toxina necrótica ocurre en el punto en el cual el cultivo celular parece estar en transición a la fase de esporulación. No se sabe, sin embargo, si la degradación de la actividad tóxica ocurre antes de esto o si ocurre solamente después de que se ha establecido un nuevo cambio celular fisiológico en este punto de transición.

La pérdida de la actividad de la toxina necrótica en la fase post-exponencial coincide con un incremento en la demanda del oxígeno celular, y esto podría prevenirse restringiendo el suministro de oxígeno en este punto. El incremento de la

actividad respiratoria está relacionado intimamente con la pérdida de la actividad tóxica. Félix y Lundgren han observado un incremento progresivo en las enzimas del transporte de electrones y los citocromos de la membrana de B. cereus cuyos cultivos se encuentran en la fase exponencial, pero antes de la transición a la esporulación. Es sabido que el proceso de esporulación coincide con un rápido incremento en la actividad del transporte de electrones y una alta demanda de oxígeno celular.

Con la intención de purificar la toxina, se utilizaron, por un lado, caldo BHI para un crecimiento óptimo del microorganismo y, por otro, la producción de la enterotoxina en medios de cultivo cuyos constituyentes no fueran de gran peso molecular, los cuales fueran indeseables en la subsecuente purificación. Se observó que el rendimiento de la toxina RPV se incrementaba hasta 10 veces con agitación y se propuso que el método ofrecía una alternativa más barata y más simple que las fermentaciones para preparaciones destinadas a purificación. El rendimiento de la toxina fue mucho más alto cuando los medios de cultivo se sometieron a agitación (69).

2.1.4.3 Modo de acción de la toxina necrótica

No es mucho lo que se conoce sobre su modo de acción, primero porque esta toxina se produce entre una profusión de otros metabolitos de los cuales no se separa realmente; segundo, por su labilidad y tercero, por las dificultades de encontrar condiciones confiables para su producción y purificación.

Turnbull (74,75) intentó determinar la acumulación del

fluido en el asa del ileon, evento que fue mediado por AMPc. Se midieron las actividades de la adenilato ciclasa (ACA) obtenida de células epiteliales de las mucosas homogenizadas, a partir de asas de ileon extraídas después de una exposición in vitro a filtrados de cultivos libres de células durante 3 a 4 1/2 horas. Los resultados de múltiples pruebas indican que la acumulación del fluido podría asociarse con el incremento del ACA (69).

La intoxicación alimentaria por B. cereus, tiene un comienzo tardío, de 8-16 horas, se caracteriza por el síndrome diarreico, dolor abdominal y tenesmos rectales, que se resuelven usualmente a las 24 horas (77).

La enterotoxina de B. cereus tiene efecto transitorio sobre la permeabilidad del ileon de conejo. Aparentemente, no tiene la capacidad de alterar en forma prolongada la permeabilidad, ni una gran capacidad de unirse firmemente a su receptor, tampoco actúa en algún sitio fuera del intestino para causar algún otro síndrome enterotóxico.

La naturaleza transitoria del efecto enterotoxigénico, al igual que su sensibilidad al calor y a la tripsina, podrian explicar porque no está fuertemente involucrada como causa de intoxicación alimentaria (22).

Cuando una cepa aislada de un brote diarreico crece en varios medios de cultivo produce diarrea, pero no vómito.

Se ha mencionado una amplia variedad de alimentos como responsables, incluyendo carne y sopa de vegetales, carne guisada y aves, verduras cocidas, pudines y ensaladas (77).

Se sigue estudiando la asociación de la alta producción de

esta toxina con la gran variedad de enfermedades no gastrointestinales severas que se pueden presentar.

En la salud humana, es más importante en relación a estas enfermedades que a las diarreicas (69).

2.1.5 Toxina emética

De acuerdo a resultados serológicos, se sostiene la teoría de que B. cereus podría causar dos formas distintas de intoxicación alimentaria. De esta evidencia se infiere que algunas cepas de B. cereus podrían elaborar una enterotoxina diarreica; mientras que otras podrían producir una enterotoxina emética; también podría existir una tercera no toxigénica (69).

El síndrome de tipo emético se ha asociado casi exclusivamente con el consumo de arroz cocido, usualmente frito, sobre todo de restaurantes chinos, puesto que gran número de los microorganismos se han aislado de residuos de arroz guisado.

La presencia de esta toxina se ha puesto de manifiesto de acuerdo a los resultados de pruebas preliminares en monos (128).

2.1.5.1 Propiedades y características de la toxina emética

La toxina emética producida por B. cereus se ha purificado solo parcialmente (22,69).

Se usaron monos que por ser susceptibles se podían estudiar en ellos la toxina, con lo cual se establecieron un gran número de descubrimientos:

1) El sobrenadante de un cultivo de arroz, filtrado por una membrana de 0.45u poseyó actividad emética, con lo cual, aunque solamente tuvo una décima de potencia (DE_{50}) de todo el cultivo, proporcionó la primera evidencia definitiva de la participación de una toxina en el síndrome.

2) Los cultivos en caldo y agar de triptona-soya, de casi la mitad de los alimentos, produjeron emesis.

3) El factor fue altamente estable y resistió a las temperaturas del autoclave, pH extremos y exposición a la tripsina y pronasa.

4) No desarrolló resistencia aparente en cuatro monos, indicando pobre antigenicidad (22,74).

En base a estas observaciones concluyeron que, en contraste con la toxina necrótica con su gran peso molecular y labilidad general, la toxina emética fue un compuesto de un peso molecular menor de 5 000, resistente a la pepsina, tripsina y pronasa.

Esta toxina es un polipéptido no antigénico que posee estabilidad a 126°C durante 90 minutos, estable a pH's extremos (2-11) (22,74).

Los filtrados del cultivo de una cepa extraída de pacientes con un brote de intoxicación que provocaba vómito, no causó acumulación de fluido en las asas ligadas del íleon del conejo (22).

2.5.2 Producción de la toxina emética

Los estudios sobre el crecimiento y la producción de toxina no son fáciles de desempeñar. En vista de la exclusiva relación entre el tipo emético de la intoxicación alimentaria por B. cereus y la ingestión de platicillos de arroz guisado, parece razonable sospechar que la producción de la toxina podría estar relacionada con la esporulación. Melling y Capel llevaron a cabo dos estudios, uno de crecimiento y el otro de producción, con la inclusión de la cuenta de esporas. Parece que en el primer ensayo apareció la emesis en la fase exponencial tardía del crecimiento vegetativo y antes de que los niveles de la espora se hubieran detectado; en el segundo ensayo, la actividad emética no fue aparente hasta varias horas después de que se había alcanzado la fase estacionaria y la cuenta de las esporas hubiera alcanzado su nivel máximo (22,69).

No se ha confirmado o refutado la relación entre la esporulación y la producción de la toxina emética; si existiera tal relación, un simple cultivo de la cepa en un medio de esporulación artificial conteniendo de 48-98% de esporas, produciría emesis en monos.

Los incidentes de intoxicación alimentaria no involucran solamente al arroz, sino también tortilla, leche deshidratada, crema pasteurizada, pasta y platicillos vegetales los que se han implicado en pequeño número (22,69).

En 1978, se determinó que la temperatura óptima para la producción de la toxina en un cultivo de arroz, en 24 horas es

de 30°C.

Entre 35 a 45°C, o a temperaturas mayores, se han obtenido cantidades equivalentes o cantidades mas altas de esporas y células vegetativas, pero la respuesta emética fue menor que cuando se cultivó a 30°C. Dentro de las diferentes copas de B. cereus, cada una la produce en distinto grado.

La prueba del asa del ileon de conejo y la actividad de la adenilato ciclasa no tienen valor para detectar y medir la toxina emética producida por B. cereus (69).

Lo que debería hacerse es mejorar los métodos de purificación de la toxina y poder realizar técnicas inmunológicas de rutina para su detección en especímenes clínicos y en alimentos.

El síndrome emético tiene un tiempo de incubación de 1 a 5 horas, los síntomas predominantes son náuseas y vómito y algunas veces diarrea (77).

2.2 Padecimientos causados por B. cereus

2.2.1 Intoxicación alimentaria

Desde principios de este siglo se ha asociado a Bacillus cereus con episodios de intoxicación alimentaria en Europa, observándose un gran incremento en los últimos años. Incidentes reportados por Lubenau, en 1906 y Brekenfeld, en 1926, son citados por Hauge en Noruega, quien proporcionó la primera descripción clásica de la gastroenteritis en 1950 (23,53).

Actualmente también se ha visto en muchos países americanos.

Se han reportado en Gran Bretaña desde 1971, treinta incidentes de intoxicación alimentaria asociados con el arroz guisado (usualmente frito), generalmente en restaurantes chinos. A partir de esta fecha se reportaron en otros doce restaurantes con un total de 18 casos (23,64).

Igualmente se ha descrito como un agente de intoxicación alimentaria en otras partes de Europa, como Escandinavia.

En contraste con la experiencia europea, los brotes de enfermedades originadas por la comida, atribuidos a B. cereus, se han reportado raramente en Estados Unidos (64).

Las diferentes prácticas en el procesamiento y almacenamiento de los ingredientes de los alimentos podrían explicar la relativa rareza de los brotes de intoxicación reportados en Estados Unidos comparados con Inglaterra y el este de Europa.

El primer brote bien documentado de enfermedad gastrointestinal causada por B. cereus apareció en Estados Unidos

hasta 1971 (64).

Esta intoxicación se debe a la contaminación por B. cereus de un amplio rango de productos alimentarios, lo cual lo han establecido muchos investigadores.

Se reportó que B. cereus fue el tercer causante más común de intoxicación alimentaria en Hungría entre 1960 y 1968, estableciendo que los platillos de carne, vegetales, leche y cocoa fueron los involucrados más comunmente. En otros casos se encontró que las papas, masa, carne desmenuzada, paté, platillos de arroz, pudines y sopas fueron los alimentos más implicados en la intoxicación alimentaria. Hay otros estudios en los que se examinaron productos alimenticios secos encontrando que B. cereus fue un contaminante común de condimentos (55%), especias (40%), papas secas (40%), leche en polvo (37.5%) y plátillos de spaghetti (37.5%) (41,77).

Se ha demostrado que B. cereus es el agente etiológico de dos tipos de síndromes: uno similar al que produce Clostridium perfringens al cual se le ha denominado síndrome diarreico, provocado por la toxina necrótica, que se caracteriza por síntomas del tracto intestinal inferior; y el otro semejante al causado por Staphylococcus aureus que se ha denominado síndrome emético, provocado por la toxina emética, presentando síntomas predominantemente del tracto intestinal superior. El primero se ha encontrado asociado a la ingestión de una gran variedad de alimentos contaminados, pero el segundo se ha asociado casi exclusivamente a la ingestión de arroz frito contaminado (41,64).

Parece ser que muchos restaurantes chinos acostumbran cocer grandes cantidades de arroz y después someterlo a secado en un

cuarto caliente o a temperatura ambiente durante un periodo indeterminado (entre doce horas y tres días, pero generalmente durante la noche). Después, el arroz es recalentado o generalmente frito con huevo batido y una pequeña cantidad de aceite por un tiempo muy corto (aproximadamente un minuto) antes de servirse. El huevo batido no siempre se prepara al momento y podría ser que estuviera altamente contaminado con una gran variedad de bacterias. A los chinos no les es práctico almacenar el arroz cocido en el refrigerador, pues dicen que los granos del arroz cocido se pegan entre sí y les es difícil sacudirlo en el huevo batido para freirlo. En última instancia el arroz frito lo almacenan a temperatura ambiente y se frie de nuevo antes de servirse.

La situación es todavía peor al preparar grandes cantidades de arroz, las cuales toman mucho tiempo para enfriarse, hay reportes que señalan la práctica de añadir porciones frescas de arroz cocido al volumen residual del arroz viejo, el cual quedó del día anterior. Si el arroz cocido se deja secar por varios periodos a temperatura ambiente o a temperaturas tibias, las condiciones podrían ser ideales para la germinación y crecimiento de las esporas que han sobrevivido a los procesos de cocimiento.

Para prevenir los brotes de intoxicación alimentaria por esta causa; se señalan las siguientes medidas:

- a) El arroz podría ser cocido en cantidades menores en varias ocasiones durante el día, reduciendo el tiempo de almacenamiento antes de freirlo.
- b) Después de cocerlo, el arroz podría mantenerse caliente a

no menos de 63°C o enfriarse rápidamente y transferirse a un refrigerador dentro de las dos horas siguientes al enfriamiento. Este enfriamiento, especialmente de grandes volúmenes de arroz cocido, se debe apresurar dividiendo el producto en porciones separadas o por propagación del volumen en recipientes limpios y poco profundos.

- c) El arroz cocido o frito no debe almacenarse bajo condiciones tibias y nunca a temperaturas entre 15 y 50°C. Por lo tanto, bajo ninguna circunstancia debe guisarse el arroz cuando se dejó enfriar a temperatura ambiente por más de dos horas.
- d) El huevo batido que se usa para la preparación del arroz frito debería ser preparado al momento (23).

De acuerdo a pruebas realizadas para ensayar la resistencia de las esporas de B. cereus en el arroz cocido, se observó que el crecimiento del microorganismo se mantuvo a temperaturas entre los límites de 4 a 55°C.

La temperatura mínima para el crecimiento de células vegetativas es entre 10 y 15°C.

Después de 24 horas de almacenamiento se presenta un alto número de B. cereus en el arroz cocido y por medio de una observación bajo el microscopio se muestra que muchas de las células vegetativas contenían esporas. Al freír rápidamente el arroz se redujo el número de microorganismos, pero los que sobrevivieron, presumiblemente las esporas resistentes al calor, fueron capaces de germinar y crecer.

B. cereus se ha aislado de restos de arroz guisado, de

especímenes de materia fecal o de ambos.

La ausencia de otros patógenos en los alimentos, la demostración de altos números de B. cereus en la comida y la respuesta positiva de los microorganismos aislados en la prueba para la enterotoxigenicidad, sostienen fuertemente que B. cereus es el causante de esta intoxicación.

Debido a que este bacilo no se encuentra en número apreciable en las heces de las personas afectadas y que su determinación en los productos alimenticios involucrados no es un procedimiento de rutina, no es sorprendente que muchos de los casos de intoxicación pasen desapercibidos, por lo que se encomienda investigar los brotes de enfermedad gastrointestinal que presenten como antecedentes la ingestión de arroz chino (23).

2.2.2 Diversas enfermedades debidas a B. cereus

En 1952, Bacillus spp. se consideraba como contaminante de laboratorio, pero en 1957 Breed y colaboradores citaron a B. anthracis como la especie más patógena para el hombre. Sin embargo, hay reportes bien documentados de enfermedades producidas al hombre por otras especies del género Bacillus

Stopler, en 1964 describió un caso en el cual B. cereus se aisló de cultivos de sangre anti-mortem y del corazón, pulmón y bazo post-mortem de un paciente con bronconeomonia quien tuvo un curso rápido y fatal (14).

Dentro del género Bacillus que contiene aproximadamente 25

especies, B. cereus es, después de B. anthracis, la especie más patógena, pues se encuentra con más frecuencia originando infecciones diseminadas, siendo mortales en algunos casos. Esto se presenta en pacientes inmunocomprometidos y/o situaciones en las que la puerta de entrada del microorganismo es artificial como el uso de catéteres, transfusiones, intervención quirúrgica, etc. (14).

Excluyendo los casos de intoxicación alimentaria, las infecciones por B. cereus ocurren en pacientes con enfermedad debilitante marcada o heridas post-traumáticas (infecciones locales). Dentro de las enfermedades asociadas con la infección por B. cereus, se encuentra la leucemia (en asociación a la quimioterapia), asma (donde se administran esteroides por largo tiempo), enfermedad renal crónica que conlleva a la hemodiálisis e hidrocefalo.

Según los casos revisados por Pearson. afirma que las infecciones por B. cereus se presentan en pacientes predispuestos por alguna enfermedad como cáncer, diabetes, enfermedad renal crónica, obstrucción crónica del pulmón, cirrosis, insuficiencia respiratoria e hiperbilirrubinemia en el recién nacido. B. cereus puede ser una amenaza real para el paciente granulocitopénico (27). Este microorganismo se ha implicado como agente etiológico en neumonía, pleuritis purulenta, bacteremia como una complicación de hemodiálisis, septicemia, osteomielitis, endocarditis, meningitis, etc. (38).

Dado que las características clínicas son comunes en los pacientes de quienes se aísla B. cereus, la atención debería ser

dirigida a este microorganismo como un agente etiológico de infecciones en pacientes con las enfermedades antes mencionadas, ejemplo, cáncer con neumonía progresiva o sepsis.

La puerta de entrada podría ser el tracto respiratorio, una lesión de la piel o una herida traumática.

El número de reportes de enfermedades causadas por B. cereus continúa incrementándose. Comprenden un amplio rango de condiciones clínicas, con frecuencia severas y ocasionalmente fatales.

Bacillus spp. se encuentran comunmente en cultivos en los laboratorios clínicos y tienden a considerarse como contaminantes ambientales. Por esto mismo, se consideró necesario un estudio estadístico, para observar la frecuencia con que se encuentra B. cereus en casos de enfermedades no gastrointestinales.

En base a 137 casos en los que se aisló a B. cereus, se encontró su participación en un amplio espectro: heridas traumáticas (post-operativas o casuales), panoftalmítis, septicemias heridas o infecciones del sistema nervioso central, abscesos y pústulas, peritonitis o ascitis, enfermedades del tracto respiratorio, quemaduras, infecciones del sistema nervioso central, ombligo infectado en niños, úlceras, etc.

Los detalles específicos que se consideran importantes para considerar la relevancia o el grado de patogenicidad que juega B. cereus en una infección, se tomaron a partir de clínicos y microbiólogos, quienes estuvieron directamente involucrados en cada caso.

Tabla No. 6 Criterios usados para considerar la relevancia de B. cereus en una infección (73).

- 1.- Aislamiento de B. cereus
 - En qué magnitud se encuentra presente (+ a ++++).
 - Si el cultivo que se obtiene es puro o forma parte de una mezcla de microorganismos.
 - Si se encuentra en una o más ocasiones.

- 2.- Aislamiento de otros microorganismos.
 - Identidades y tipos (si se conocen).
 - Proporciones relativas (¿)

- 3.- Naturaleza y condición del sitio de infección.

- 4.- Respuesta del paciente (por ejemplo: pirexia, reacción tóxica, etc).

- 5.- Factores predisponentes a la infección.

- 6.- Quimioterapia que se aplica.

Las investigaciones sobre la relación entre la actividad hemolítica de una cepa aislada y la severidad de la infección, sugieren que la producción de la hemolisina está involucrada también en la patogenicidad de B. cereus; sin embargo, se ha mostrado que ésta se neutraliza in vitro con suero normal.

Los resultados también indican que la fosfolipasa-C no tiene probablemente un significado patológico directo en las

enfermedades por B. cereus. Esto sugiere que podría jugar un papel patógeno auxiliar abatiendo los fosfolípidos de la membrana de la célula huésped, expuestos por la acción de otras enzimas o toxinas.

Los casos analizados en este estudio muestran que queda la duda cuando se aísla B. cereus de si podría ser un contaminante casual o realmente considerarlo como el agente etiológico de dicha infección (73).

Los padecimientos producidos por B. cereus, generalmente caen dentro de una o dos categorías:

- a) Locales (por infecciones en heridas, quemaduras, etc.) con una fuente de inoculación reconocida.
- b) Diseminados en pacientes inmunocomprometidos (9).

2.2.2.1 Panoftalmítis

Es una inflamación supurativa de la uvea (tercera túnica del ojo), en la cual el globo ocular se llena de pus, se extiende a todas las estructuras del ojo, y finaliza con la destrucción completa del órgano, debido a la infección.

La patogenicidad de los bacilos Gram positivos aerobios hacia los ojos, se reconoció primero en la literatura europea al principio de este siglo y fue enfatizada por François en 1934 (46).

Sin embargo, con las dificultades en la taxonomía de las especies, se reportaron infecciones que se atribuyeron en general

al género Bacillus , sin identificar con precisión a la especie. En 1952, Davenport y Smith, en base a un caso reportado, atrajeron su atención hacia la naturaleza destructiva de la enfermedad por B. cereus (46). Desde entonces ha habido reportes esporádicos de varias infecciones oculares atribuidas a Bacillus sp., pero el curso destructivo de la panoftalmitis por B. cereus, separa a este microorganismo de los otros miembros del género Bacillus. Se postuló que una combinación de enzimas específicas de B. cereus contribuye a la virulencia de este microorganismo en el ojo (45,46).

Características clínicas

Las infecciones oculares pueden llevarse a cabo por vía exógena o endógena (8,44,46,81).

La mayoría de las debidas a B. cereus, han ocurrido como resultado de la diseminación hematógena, generalmente en personas adictas a drogas intravenosas (57,76) (cocaína, heroína, opio, etc.). Sin embargo, en 1952 se reportó el caso de un trauma agudo con un cuerpo extraño metálico. Otros casos reportados han ocurrido en un medio ambiente sucio como puede ser en establecimientos agrícolas o rurales, una granja, un pajar o un taller mecánico, en estas situaciones el cuerpo extraño se generó al golpear metal con metal. La baja velocidad con que los proyectiles metálicos entraron a los ojos en el limbus o esclera anterior, causó prolapsos del vítreo en el saco de la conjuntiva (44,46,81).

El hecho de que estos pacientes perdieran la vista y/o los

ojos a las 72 horas de haber sufrido el daño, a pesar de la terapia médica vigorosa y/o quirúrgica, enfatiza el curso fulminante de este problema (76).

El examen de los casos analizados revelan una uniformidad relevante de las características clínicas (46).

Tabla No. 7 Características clínicas de la panoftalmítis exógena por B. cereus (46).

<u>PRESENTACION</u>	<u>18-24 HORAS</u>	<u>48 HORAS</u>	<u>72-HORAS</u>
- Lesión aguda en la envoltura del humor vítreo.	-Dolor severo -Quimosis (edema inflamatorio de la conjuntiva ocular)		
- Baja velocidad del cuerpo extraño metálico.	+Edema periorbital. +Proptosis		
- Posibilidad de contaminación del suelo.	+Fiebre +Leucocitosis polimorfonuclear. *Edema periférico corneal	Abscesos en el anillo corneal. Rápida pérdida visual.	Ceguera Evisceración.

En forma característica, los dolores severos se desarrollan dentro de las 24 horas del daño, seguido rápidamente de quimosis, tumefacción periorbital y proptosis extrema. Luego, ocurre un bajo grado de fiebre que se acompaña de una leucocitosis polimorfonuclear moderada. Invariablemente se forma un anillo de

edema en la córnea periférica por el rápido desarrollo de un absceso de la córnea circunferencial. Este proceso no está relacionado al sitio del daño (46).

Estos signos parecen ser de significado clínico desde que coinciden con la pérdida irreversible de la vista.

Aunque el curso de la infección endógena por B. cereus no se ha podido determinar con el mismo grado de precisión en todos los casos, las manifestaciones son idénticas a las observadas en la forma exógena (46).

Hay situaciones en las cuales se debe sospechar la infección por B. cereus. Es muy importante la historia de un daño agudo con un cuerpo extraño metálico, aunque la contaminación con suelo es otra posibilidad. En tales circunstancias, fiebre y leucocitosis se asocian con la evidencia de una panoftalmítis rápidamente progresiva con signos nefastos de infección por B. cereus (46).

La infección intraocular causada por otros microorganismos no produce signos sistémicos. En base a la experiencia, se observa que Clostridium perfringens es el otro microorganismo capaz de causar fiebre y leucocitosis en asociación con panoftalmítis. El anillo del absceso de la córnea es un descubrimiento en la infección ocular. Su ocurrencia es una indicación de la naturaleza devastadora de la reacción inflamatoria y generalmente tiene un grave pronóstico para los ojos (97).

Aunque se han mencionado una gran variedad de microorganismos, incluyendo Pseudomonas aeruginosa y Proteus sp. como responsables de abscesos en anillo, Bacillus sp. se ha

aislado más frecuentemente. Sin embargo, la experiencia de los autores tiende a sostener que la formación del absceso de la córnea es una característica sobresaliente de la panoftalmitis por B. cereus (46).

El examen del ojo enucleado muestra gran desorganización de los contenidos oculares. La córnea, la cámara anterior, el iris, el cuerpo ciliar, el vítreo, la esclera y el nervio óptico se encuentran todos infiltrados con leucocitos polimorfonucleares. La retina se presenta como un fragmento desorganizado desprendido y la córnea se ve reemplazada con una banda circunferencial larga de hemorragia (8).

Para identificar la otra posible fuente del microorganismo se cultivaron 59 muestras de heroína e inyección de parafernalia. En 20 cultivos hubo crecimiento de microorganismos con predominancia de Bacillus sp. y, dentro de éstos, el 38% se identificaron como B. cereus. Así, las infecciones causadas por Bacillus sp. en adictos a las drogas pueden asociarse probablemente con el abuso de la droga intravenosa, dado que la mezcla de heroína y de parafernalia se contaminan frecuentemente con este microorganismo (26,57).

Dentro del género Bacillus, B. cereus y B. subtilis se han reconocido como patógenos en adictos a las drogas y en pacientes inmunocomprometidos. También se han reportado casos en los que los pacientes a quienes se administran en forma intravenosa medicamentos, o reciben una transfusión, han manifestado los síntomas de la panoftalmitis por B. cereus. Este microorganismo se ha aislado del aspirado vítreo de los pacientes y también de la jeringa utilizada, entonces, el

material inyectado podría ser la fuente del microorganismo. En adictos a las drogas, la infección endógena probablemente sigue a bacteremias transitorias como resultado de una inyección directa de heroína y/u otras drogas contaminadas con el microorganismo. En efecto, dentro de los casos descritos en la literatura, los pacientes han mostrado cultivos positivos en sangre. Esta teoría está de acuerdo con la hipótesis de Kerkenezov, quien indica que ocurre la infección ocular cuando un émbolo diminuto se aloja en un vaso oftálmico (la arteria retinal o ciliar o las arteriolas retinales): por una posible predilección por el tejido ocular, la bacteria contenida en el émbolo causa panoftalmitis (8).

Las infecciones exógenas con perforación o penetración de los ojos, probablemente ocurren como resultado de una combinación de factores (destrucción del obstáculo anatómico secundario al daño e introducción de un inóculo masivo de microorganismos en los ojos). Se confirmó el papel del último factor al inyectar 0.1 ml de un inóculo conteniendo 10 B. cereus/ml en la cámara del ojo de un conejo, ya que una quimosis severa e iritis siguieron a esta inoculación. La panoftalmitis hemorrágica se desarrolló 18 horas después de la inyección del mismo inóculo en el humor vítreo (57).

Microbiólogos clínicos y de laboratorio deben establecer el papel patógeno que juega B. cereus, porque ahora y, probablemente en el futuro, va a ser más frecuentemente implicado en infecciones endógenas y exógenas.

El efecto de un microorganismo específico en una infección,

depende de varios factores (46):

- 1) El sitio de la infección (desafortunadamente el humor vítreo del ojo permite el crecimiento de muchos microorganismos).
- 2) La virulencia del microorganismo mismo (lo cual frecuentemente se relaciona a su producción de toxina).
- 3) La capacidad del huésped para contrarrestar la infección (la cual es relativamente pobre en el vítreo no vascular).

B. cereus produce una toxicidad dramática con proptosis, quimosis, tumefacción orbital, absceso corneal y bajo grado de fiebre. Se sugiere que el efecto se relaciona probablemente con una toxina específica.

Probablemente la toxina necrótica es la responsable de los efectos citotóxicos, trombóticos y necróticos en panoftalmítis. Los trabajos se han dirigido hacia la determinación de las cepas que secretan esta toxina en altas concentraciones; la concentración de la toxina se relaciona directamente con la severidad de la infección.

La notable falta de éxito en el tratamiento de la panoftalmítis por B. cereus, puede deberse probablemente no solo al diagnóstico tardado, sino también a la falta de un antibiótico efectivo. Desafortunadamente, la severidad de la inflamación y la velocidad con la cual ocurren los cambios irreversibles una vez que se establece la infección, dan muy poco tiempo para salvar los ojos; además de que en los pacientes, la tardanza entre el daño y

el reconocimiento de un proceso de infección, tarda un promedio de 29 horas, con un rango entre 17 horas a dos días (46).

2.2.2.2 Endoftalmitis

Esta enfermedad, también conocida como uveítis purulenta, generalmente involucra todo el tracto uveal.

Poco frecuente, el proceso se limita a la córnea (coroiditis supurativa), el exudado purulento llena el humor vítreo (absceso del humor vítreo), sin una inflamación evidente en forma externa, pero siempre con la pérdida de la visión. Se obtiene un reflejo amarillento o amarillo grisáceo del interior del ojo; la masa purulenta degenera, se contrae y forma una membrana, la retina se desprende, el globo ocular se ablanda y el proceso finaliza con una atrofia del globo ocular.

Con más frecuencia, el exudado purulento llena el interior y envuelve el tracto uveal entero constituyendo la endoftalmitis séptica. Los síntomas son como los de una iridociclitis aguda y muy severos: mucho dolor, congestión conjuntival, quimosis, inflamación de párpados, la córnea se torna turbia, pus en el humor acuoso como en el humor vítreo, destrucción constitucional y pérdida de la vista; finalmente, permanece el globo ocular degenerado, contraído y sin vista (atrofia del globo ocular).

Etiología

La endoftalmitis por R. cereus, aunque no es muy común, es particularmente devastadora por su virulencia (40).

Aunque la patogenicidad de Bacillus sp. fue observada primero por François en 1934, la primera identificación bacteriológica positiva de B. cereus como causante de endoftalmitis fue publicada por Davenport y Smith en 1952 (40,55).

Existen dos formas en las cuales se puede adquirir esta infección: una es por la ruta endógena, por difusión hematógena del microorganismo al ojo, a partir de una fuente de bacteremia, tal como podría ser la transfusión de productos de sangre contaminada o uso de drogas por vía intravenosa y la ruta exógena, por una infección post-traumática como la que sigue a la penetración al ojo dañado. En ambos casos la rapidez con la que la infección cubre la envoltura vitreal, el daño retinal y la pérdida visual se presentan en forma similar (15).

Curso clínico

El curso clínico de la endoftalmitis por B. cereus es único cuando se compara con alguna otra también de origen bacteriano. Se presenta dolor, quimosis, fiebre y edema corneal periférico predominantemente en las primeras 24-36 horas después del daño. Durante esta fase hay una destrucción vitrea causada por la toxina liberada. Las toxinas de este microorganismo causan una marcada respuesta inflamatoria, resultando una necrosis retinal extensa. Consecuentemente, la visión rápidamente se deteriora. Durante las siguientes 48 horas se produce un anillo de absceso corneal. En este estado se presenta una leucocitosis. Dentro de las 72 horas siguientes se presenta una ceguera irreversible, secundaria a una rápida panoftalmitis destructiva. Otras causas

de infecciones de endoftalmitis no exhiben tales manifestaciones sistémicas ni curso clínico fulminante (40).

El pronóstico de la endoftalmitis por B. cereus es malo (40,55).

El microorganismo se multiplica rápidamente liberando la toxina y causando necrosis vítrea mientras el diagnóstico aún no se considera.

B. cereus es uno de los más agresivos y devastadores microorganismos para causar endoftalmitis post-traumática (107).

Parece probable que pudieran existir algunas condiciones predisponentes por las cuales se favorece el crecimiento de este microorganismo cuando se introduce al ojo después de haber sido éste dañado. Parece haber una fuerte relación entre la presencia de un cuerpo extraño intraocular y el desarrollo de una infección debida a Bacillus sp. En una serie de cinco pacientes con infección post-traumática involucrando estas especies, todos los individuos desarrollan endoftalmitis en presencia de un cuerpo extraño intraocular. Es importante hacer notar que en este estudio el rango de endoftalmitis post-traumática debido a B. cereus fue aproximadamente dos veces mayor que la provocada por cualquier otro microorganismo diferente del género Bacillus cuando el trauma ocular ocurrió en asociación con un cuerpo extraño o aún sin retención de él.

En forma similar, se han reportado tres casos de infección con Bacillus sp. que estuvieron ligados a la presencia de un cuerpo extraño intraocular, igualmente se reportaron otros seis casos. Otro caso que se menciona también involucró una infección

seguida de la retención de un cuerpo extraño, aunque en este caso el paciente removió el agente irritante antes de buscar atención médica (15).

Tan importante como la introducción de un cuerpo extraño en el ojo, son las circunstancias bajo las cuales tienen lugar los daños. En general, la mayoría de las infecciones post-traumáticas con este microorganismo han ocurrido probablemente por la contaminación del ojo y/o cuerpo extraño, o ambos, con suelo y polvo. Las circunstancias por las cuales el microorganismo puede entrar al ojo son poco claras. Parece haber un número sorprendente de daños por metal o proyectiles de metal, generalmente producidos por el choque de un objeto metálico con otro, que produce fragmentos. Cuatro de los seis casos presentados por O'Day cayeron en esta categoría. Esta observación parece sugerir que los fragmentos generados, lógicamente estériles, podrían ser suficientes para causar la infección (15).

Otra hipótesis alterna es que la contaminación del cuerpo extraño ocurre al penetrar al globo. Bajo estas circunstancias la endoftalmítis podría ocurrir al haber una colonización transitoria de la superficie corneal o de la esclera por el microorganismo, como consecuencia de la exposición del huésped a un medio ambiente apropiado. La infección podría ocurrir cuando un objeto agudo, inocula la flora superficial del ojo hacia el interior de las estructuras profundas (15).

Se ha demostrado que la endoftalmítis endógena por St. aureus, podría estar relacionada estrechamente a la contaminación de equipo intravenoso, al administrar medicamento, vitaminas,

drogas, etc. (55).

Se ha descrito la infección por B. cereus como la más rápida, en comparación con el curso de alguna infección similar encontrada (15).

Una característica de la infección por este microorganismo es su frecuente asociación con signos sistémicos, tales como fiebre y leucocitosis. En la endoftalmitis bacteriana causada por otros microorganismos patógenos, el paciente usualmente no manifiesta signos aparentes de enfermedad sistémica pesar de que podría presentarse una severa infección localizada. De acuerdo a la experiencia de algunos investigadores, creyeron que Clostridium perfringens, un potente productor de toxinas, fue la otra especie bacteriana capaz de producir tales manifestaciones sistémicas en el sitio de la infección ocular localizada.

Mientras no puede considerarse patognomónico de la infección con este microorganismo la presencia de deterioro corneal progresivo, la formación del anillo del absceso podría ser una complicación casi esperada de la panoftalmitis causada por B. cereus (ocasionalmente se encuentra en infecciones debidas a Pseudomonas sp. y otros bacilos Gram negativos). Este fenómeno ocurre a pesar de la administración usual de antibióticos tópicos y perioculares. El anillo del absceso usualmente aparece dentro de las 48 horas después de la infección, frecuentemente siguiendo al desarrollo temprano del edema periorbital, proptosis e inflamación corneal periférica. Este patrón parece presentarse en infecciones clínicas en humanos y en los modelos animales desarrollados por O'Day, quién se basa en una inyección

intravítreal de B. cereus en conejos. Sigue rápidamente la pérdida visual como se pone en evidencia en pacientes afectados. La retención del globo, pero no con percepción de la luz detectable, permanece como el resultado más exitoso hasta ahora. Frecuentemente hay una extensión de la infección vítrea envolviendo directamente la retina (15,55).

A pesar de conocer el problema de la infección ocular por B. cereus tan mencionada en la reciente literatura médica, la experiencia médica común de endoftalmitis bacteriana, generalmente permanece limitada los patógenos oculares, como Staphylococcus y Streptococcus. Este prejuicio podría deberse a la familiaridad con las formas más prevalentes de endoftalmitis, señaladamente las que son de origen endógeno o post-quirúrgico.

En un estudio reciente de infección post-traumática, B. cereus fue el segundo más común en causar infecciones intraoculares.

Mecanismo patogénico

A pesar del extenso estudio de las propiedades bioquímicas del microorganismo, aún permanece poco claro el mecanismo de virulencia de B. cereus en la infección ocular. Años atrás se daba mucho énfasis a la elaboración de lecitinasa y fosfolipasa-C por el microorganismo para explicar su notable patogenicidad en el tejido ocular; recientemente, en 1982, se postuló que la actividad de la fosfolipasa-C sí era la responsable de esta patogenicidad.

El papel preciso que juega la toxina en la infección ocular,

se investiga a la par que sus funciones tanto en la endoftalmitis como en otras infecciones no gastrointestinales.

La virulencia particular de B. cereus en la infección de los ojos se presenta como una compleja interacción entre las toxinas elaboradas, las características de crecimiento de la cepa y el microambiente único en el que se encuentra (15).

2.2.2.3 Endocarditis

Se ha visto que Bacillus cereus es causante de un amplio rango de problemas infecciosos, generalmente en pacientes cuyas defensas antibacterianas están comprometidas, o en personas que son adictas a la droga o son sometidas a procedimientos quirúrgicos (6).

Se describió en 1967 un ejemplo de endocarditis por prótesis debido a Bacillus sp. Sin embargo, la especie del microorganismo infectante no se determinó y los criterios del diagnóstico no se establecieron claramente, por lo tanto, la etiología de la infección era desconocida.

A partir de un reporte publicado por Block, en 1978, se describe el caso de una paciente que se sometió a un procedimiento quirúrgico colocándole una prótesis de la válvula mitral, sin haber evidencia de una endocarditis infecciosa. Sin embargo, 17 días después de la operación la paciente presentó anemia, ictericia, esplenomegalia y hemorragias del esfínter. Cuatro días más tarde desarrolló una hemiplegia izquierda.

Se hizo un diagnóstico clínico de endocarditis infecciosa y

de los 17 cultivos de sangre que se le tomaron en este periodo, en diez de ellos se obtuvieron bacilos Gram positivos identificados como B. cereus (6).

De acuerdo a la necropsia llevada a cabo, el corazon se encontró dilatado, posiblemente el microorganismo podria haber sido implantado directamente al tiempo de la cirugía (13).

Otra paciente, adicta a las drogas, ingresó al hospital con indicios de piquetes con agujas. Se presentaron toda una serie de datos de daño cardíaco y pulmonar, así como una elevación de leucocitos.

En los cultivos de sangre que se efectuaron el día que ingresó y en los siguientes cuatro días, se identificó B. cereus. Este microorganismo se aisló cinco veces de esta paciente. No hubo crecimiento de ningún otro microorganismo en este tiempo. Se sospecha que la endocarditis infecciosa por B. cereus se indujo durante la autoadministración de drogas (26).

B. cereus podria ser el microorganismo más patógeno del género Bacillus (aparte de B. anthracis) por la producción de la toxina letal que mata a ratas por la producción masiva de trombina en los vasos pulmonares (69).

Los infiltrados pulmonares transitorios en los pacientes podrían haber sido causados por esta toxina.

2.2.2.4 Osteomielitis

De acuerdo a un caso verificado de osteomielitis por B. cereus con anemia talasémica con eritrocitos en forma de hoz, la

observación de bacilos Gram positivos en varios frotis de médula ósea y el subsecuente aislamiento de B. cereus en medios de cultivo, no deja duda en este caso, de que el microorganismo haya sido el agente etiológico de la osteomielitis (60).

El paciente manifestó inicialmente fiebre, dolor en la espalda y un infiltrado en el lóbulo inferior derecho del pulmón. En su historial clínico incluía antecedentes de abusar del alcohol, hepatitis y múltiples embolias pulmonares. Percibió un acentuado dolor en la espina lumbar que se incrementó con el movimiento de las extremidades inferiores. Su cuenta leucocitaria fue normal. Los múltiples cultivos de sangre y expectoración fueron normales. Un aspirado de la médula ósea de la cresta ilíaca posterior derecha mostraron debridamiento necrótico purulento conteniendo acúmulos de bacilos Gram positivos que en el cultivo se identificaron como B. cereus. Se le aplicó el tratamiento antimicrobiano adecuado y el paciente se recuperó.

La puerta de entrada para este microorganismo ubicuo permanece incierta. Pero, dado que el paciente mantenía el uso intravenoso de narcóticos, se cree que este microorganismo podría haber sido introducido de esta manera. El infiltrado en el lóbulo inferior derecho del pulmón de este paciente, sin presencia de síntomas pulmonares, probablemente no fue el sitio original de la infección, es probable que haya sido por la toxina extracelular elaborada por este microorganismo. Esta toxina ha sido implicada experimentalmente con la producción de trombina en los casos pulmonares.

La mayoría de los pacientes en quienes se reporta una

infección sistémica por E. cereus estuvieron en alguna forma inmunocomprometidos.

Se postula que la combinación de la anemia talasémica con eritrocitos en forma de hoz, el abuso del alcohol, y la dependencia narcótica fueron los factores predisponentes a la infección (16,60).

2.2.2.5 Septicemia

Las puertas de entrada de un microorganismo al cuerpo son muy diversas, pero sabiendo que E. cereus se encuentra en el suelo, polvo, agua, etc, se considera un contaminante, y tratándose de un paciente con pocas defensas inmunes, puede presentarse como oportunista (25).

Los avances modernos en las técnicas quirúrgicas y médicas como la hemodiálisis, las sondas urinarias, etc, crean situaciones en las cuales el microorganismo podría ser introducido en el tejido de pacientes con enfermedad interrecurrente debilitante (68).

Al día siguiente en que una persona sufrió un politraumatismo en el que le ligaron la vena yugular y le suturaron la vena subclavia, el paciente presentó un cuadro de fiebre intermitente. Dieciséis cultivos de sangre fueron positivos para E. cereus, pero la fuente de infección no se pudo establecer (25).

Hay muchas hipótesis para determinar los focos de infección y el punto de partida de la septicemia. Para explicar esto y la rapidez con la que se presentó, se sugiere que el microorganismo

se introdujo probablemente a través de las venas e inmediatamente tomó su rumbo por toda la sangre del paciente cuyos mecanismos de defensa estaban disminuidos por los múltiples daños y problemas circulatorios (25).

Por otra parte, se conoce la aparición de una septicemia por B. cereus en un enfermo con un cateter venoso central, en especial con las enfermedades relacionadas a una afección maligna. Este tipo de complicación no se había descrito, en relación a un material totalmente implantable por perforación venosa, ya que es arriesgado por las complicaciones infecciosas locales o generales. Esto pone en evidencia el riesgo de llevar a una septicemia por microorganismos oportunistas. La demora entre la implantación quirúrgica de los artefactos de perfusión y la aparición de la septicemia, excluye la posibilidad de una inoculación preoperatoria (14).

En 1967, Curtis y colaboradores reportaron una septicemia por B. cereus como complicación de la hemodiálisis intermitente en 5 pacientes. En uno de estos pacientes, los cultivos de sangre demostraron el crecimiento continuo de B. cereus durante un periodo de 10 semanas, con leucocitosis, fiebre y escalofríos durante y entre la diálisis. Estas anomalías se aminoraron con una terapia antimicrobiana. En el resto de los pacientes B. cereus se aisló en una o dos ocasiones durante las reacciones febriles que se presentaron a lo largo de la diálisis. Se demostraron los protoplastos de B. cereus en una muestra de nefrectomía de uno de estos pacientes quien también había sido tratado con una droga antimicrobiana. La fuente de las

septicemias fue a través de la contaminación del dializador de Kill coincidiendo con el uso de ácido acético, en lugar de formalina como agente esterilizante (70).

Chastel presentó otro caso en 1977, en donde a un paciente se le aplicó una sonda urinaria, 31 días después presentó fiebre, acompañada de escalofríos, de acuerdo a los 8 hemocultivos hechos durante 5 horas, se reportó la presencia de B. cereus en 7 de ellos. Este microorganismo penetró fácilmente por la sonda y después a la vena (14).

Cuando un paciente sufre de una enfermedad maligna, cuyo tratamiento consiste en quimioterapia, que debilita al paciente disminuyendo sus defensas, la hipótesis más probable es que la inoculación de B. cereus por vía transcutánea en el momento de administrarle la quimioterapia pudo haber sido favorecida por dos factores: un defecto en la asepsia de la piel o el estado inmunodeprimido del paciente.

Cuando el paciente se somete a quimioterapia, ésta provoca una leucopenia, lo cual sin duda deja al paciente expuesto a la infección, el curso de ésta se presenta con fiebre y los hemocultivos llevados a cabo resultan positivos para B. cereus. El restablecimiento del paciente se ve favorecido al utilizar un antimicrobiano adecuado lo cual se refleja en el retorno a los números adecuados de granulocitos (25,66).

2.2.2.6 Infecciones pulmonares

Las especies de *Bacillus* están distribuidas en la naturaleza y se consideran saprófitas o contaminantes del laboratorio cuando se aíslan de humanos. Sin embargo, ciertas especies de este género, principalmente *B. cereus*, se han implicado como responsables de neumonía fatal en pacientes inmunocomprometidos.

La patogénesis de las infecciones pulmonares por *B. cereus* señala que se deben a una infección del parénquima pulmonar causado por aspiración oral más que por rutas hematógenas o embólicas, pues no se han reportado este tipo de infecciones.

Estadísticamente, de ocho casos reportados de infecciones pulmonares por *B. cereus*, cuatro de los pacientes tuvieron como enfermedad asociada la leucemia, presentando anemia y leucocitosis, al someterse a quimioterapia, decreció la cuenta leucocitaria. Se presenta generalmente fiebre, tos, escalofríos y dolor en el pecho. En las tinciones al Gram del aspirado transtraqueal se observan algunos leucocitos y bacilos Gram positivos. De los cultivos de sangre, expectoración y líquido pleural, se aisló *B. cereus* (3,38,70).

De los tres casos que fueron fatales, creció *B. cereus* en los cultivos post-mortem del pulmón, bazo e hígado.

Perlino reportó en 1979 un caso de un paciente que presentó pulmonía con antecedentes de hepatitis crónica activa y cirrosis. Desarrolló un cuadro de fiebre, disnea y dolor del pecho, hemoptisis e infiltrados en ambos lobulillos inferiores del pulmón. Los cultivos del líquido pleural fueron positivos para *B. cereus* (47).

Se presentaron dos casos de pacientes que tuvieron asociado el abuso del alcohol. Ambos pacientes desarrollaron complicaciones de neumonía con B. cereus, incluyendo hemoptisis masiva, insuficiencia respiratoria aguda, empiema; presentaron un cuadro de fiebre, tos, dolor del pecho y disnea. Presentaron leucocitosis. Las tinciones al Gram de los cultivos de la expectoración, de la sangre y del líquido pleural revelaron bacilos Gram positivos, que después se identificaron como B. cereus. Los pacientes se recuperaron después de un tratamiento antimicrobiano muy acertado (3,33).

En 1985 se reportó el último caso. Se trata de un paciente con cardiomiopatía isquémica. Presentó dolor pleural del lado derecho, sin fiebre ni signos anormales, no tuvo evidencia de infarto al miocardio, su cuenta leucocitaria fue normal. La tinción al Gram del líquido pleural mostró bacilos Gram positivos. Los cultivos del líquido pleural produjeron un crecimiento puro de B. cereus (9).

Su función renal se deterioró, lo cual se demostró por una azotemia pre-renal progresiva, esto se debió a una pobre función ventricular izquierda. El paciente murió (9).

2.2.2.7 Infección similar a la gangrena gaseosa

Se reporta el caso de una infección similar a la gangrena gaseosa en la mano de un paciente con linfoma histiocítico

recibiendo quimioterapia y aislándose B. cereus.

Al sufrir una penetración accidental por una pieza de metal dentro de su mano, a pocas horas de ésto mostró signos de infección desarrollando fiebre. La mano presentó inflamación con una coloración purpúrea de los dedos y de las superficies dorsal y palmar. En el dorso le aparecieron ampollas con ligero drenaje del fluido serosanguíneo. Hubo inflamación de los ganglios axilares. Al hacer una aspiración del fluido del tejido edematoso, y en la tinción al Gram se observaron bacilos Gram positivos, los cuales se identificaron más tarde como B. cereus (70,71)

El paciente fue sometido a una incisión y drenaje. Un cultivo hecho de la herida quirúrgica mostró crecimiento de B. cereus.

El paciente con un linfoma histiocítico difuso con quimioterapia indujo la depresión de la médula ósea mostrando una reacción poco común a la infección accidental con B. cereus.

Se asume que la recuperación de la médula ósea con una cuenta leucocitaria 14 días después del inicio de su infección, contribuyó grandemente a limitar el proceso de infección.

Este caso demuestra que en pacientes recibiendo quimioterapia que les produce granulocitopenia, las infecciones son comunmente causadas por patógenos bien conocidos u oportunistas.

El caso reportado enfatiza la necesidad de una identificación de laboratorio acertada y una interpretación rigurosa de tales encuentros. Además, este caso demuestra la frecuencia de infecciones accidentales en pacientes con resistencia disminuida (70,71).

2.2.2.8 Meningitis

En el caso de un paciente bajo tratamiento citostático en altas dosis, como lo es la quimioterapia para la leucemia mielomonocítica aguda, la cuenta granulocítica fue de cero en la sangre periférica, dos meses después de mantenerse este valor el paciente presentó fiebre y bacilos Gram positivos de un cultivo de sangre. Después de habersele administrado un tratamiento antimicrobiano, el paciente sucumbió a la sepsis fulminante con invasión meningea. B. cereus se aisló del líquido cefalorraquídeo.

Así se observa que durante la fase de pancitopenia después de una quimioterapia intensiva para la leucemia aguda u otros procesos malignos, las defensas del paciente quedan disminuidas y por consiguiente expuesto a cualquier infección, por lo mismo se recomiendan ciertas medidas para prevenirlos, como son cuartos con flujo de aire laminar y sus cuidados deben ser en forma aislada y con esterilización completa (10).

3. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

3.1 Aislamiento e identificación de B. cereus

Se han descrito varios medios selectivos para el aislamiento de B. cereus a partir de alimentos y muestras clínicas. Existen dos pruebas que lo caracterizan como son la reacción en agar yema de huevo y la incapacidad de B. cereus para fermentar el manitol. La polimixina B se utiliza como un agente selectivo en el medio MYP de Mossel y en el medio KG (Kim y Goepfert). Dado que no todas las cepas de B. cereus precipitan la yema de huevo, Holbrook y Anderson ingeniaron un nuevo medio, PEMBA, el cual puede detectar las cepas que la precipitan y las que no, por las distintas apariencias de las colonias. Gilbert y Taylor encontraron "que ciertas cepas que producen intoxicación alimentaria dan una reacción muy débil en la yema de huevo, pero forman colonias características en el agar sangre (29,42).

Para el aislamiento directo de B. cereus a partir de muestras de alimentos y clínicas, se emplean cajas de Petri con agar sangre de caballo al 5% y se incuban en condiciones aerobias a 35-37°C durante 48 horas (72). Las cepas de B. cereus producen colonias grandes (4-7 mm de diámetro), lisas, mate, con una coloración grisácea. Los microorganismos aislados producen generalmente hemólisis parcial, pero algunas cepas la producen total. Este método ha tenido éxito para realizar cuenta colonial en muestras fecales y alimentos altamente contaminados (72).

Donovan en 1958, describió un medio de agar con yema de huevo, extracto de carne de vaca-peptona, el cual contiene cloruro de

extracto de carne de vaca-peptona, el cual contiene cloruro de litio y polimixina B como agentes selectivos para el aislamiento de B. cereus (29).

Mosse, Koopman y Jongerius usaron manitol rojo de fenol en un medio yema de huevo-polimixina para mejorar la diferenciación de los microorganismos aislados de muestras de alimentos.

Kim y Goepfert describieron un medio de yema de huevo-polimixina, el cual contiene bajas concentraciones de peptona y extracto de levadura con 1.8% de agar, para mejorar la esporulación para estudios serológicos (42).

Los medios de cultivo antes mencionados aprovechan dos características importantes del microorganismo:

a) Producir una enzima que se denomina lecitinasa o fosfolipasa.

b) Resistir a la polimixina b.

El microorganismo tiende a formar colonias, su estabilidad determina su forma, la cual varía grandemente en diferentes cepas. En un extremo de la colonia tiene una apariencia de vidrio esmerilado y un margen ondulado a partir del cual no hay desarrollo. Del otro extremo de la colonia se extiende el crecimiento ampliamente sobre la superficie del agar.

El pigmento rojo de las colonias lo producen algunas cepas en medios de almidón conteniendo suficiente hierro. Algunas cepas producen un pigmento fluorescente amarillo-verdoso en varios medios. En agar nutritivo algunas cepas lo oscurecen ligeramente y otras producen un pigmento difusible rosa-café.

El crecimiento anaerobio ocurre en medios complejos, eso se presenta con glucosa o nitrato.

Las esporas se desarrollan de 18 a 24 horas, en condiciones aerobias o anaerobias.

El microorganismo se desarrolla en caldo glucosado en condiciones anaerobias a un pH 5.2 y en rangos de temperatura de 10 a 48°C, con una temperatura óptima de 30°C (20).

Identificación de E. cereus

(4, 20, 33, 39, 42, 59)

Características bioquímicas

- | | |
|---|---|
| - Formación de acetilmetilcarbinol
(Reacción de Voges-Proskauer) | + |
| - Reducción de nitratos a nitritos | + |
| - Catalasa | + |
| - Utilización de citrato | + |
| - Formación de ureasa | + |
| - Anaerobiosis. Gas a partir de nitratos | + |
| - Anaerobiosis. Crecimiento en caldo glucosado | + |
| - Actividad de la lecitinasa en yema de huevo | + |
| - Degradación de tirosina | + |
| - Formación de Indol | + |
| - Reducción del azul de metileno | + |

Hidrólisis

- | | |
|------------|---|
| - Almidón | + |
| - Caseína | + |
| - Gelatina | + |
| - Lecitina | + |
| - Esculina | + |

Reacción de lecitinasa

- Resistencia a la lisosima +
- Desarrollo en 7% de NaCl +
- Produce β -hemólisis en agar sangre de carnero +

3.2 Identificación inmunológica

3.2.1 Localización de antígenos de *E. cereus* por la técnica de anticuerpos marcados con fluoresceína

El marcaje fluorescente de anticuerpos fue introducido por Coons y colaboradores en 1941. Ellos mostraron que los fluorocromos (substancias que emiten luz en la región visible del espectro cuando se irradian con luz ultravioleta) podrían acoplarse a anticuerpos sin pérdida de especificidad inmunológica. Si tal anticuerpo marcado se hacía reaccionar con una preparación que contenía los antígenos homólogos, el sitio de reacción se localizaba por la emisión de fluorescencia, cuando la preparación se ilumina con luz ultravioleta. El método lo emplearon posteriormente Coons y Kaplan (21).

La técnica puede aplicarse por medio de dos métodos: el directo y el indirecto (43,49,50,51).

- Método directo.- Los anticuerpos específicos marcados se

combinan con los sitios de los receptores específicos en las paredes celulares de B. cereus (bacterias homólogas) y su combinación no se ve afectada con el lavado, solamente son eliminados los anticuerpos marcados que se encuentran en exceso. En el caso de una bacteria heteróloga, los anticuerpos marcados no se combinan en el sitio receptor del antígeno en la pared celular de la bacteria, y durante el lavado todos los anticuerpos marcados se eliminan. Si la preparación es irradiada después con luz ultravioleta, solamente B. cereus que se combinó con sus respectivos anticuerpos marcados específicamente, produce fluorescencia (49,50,51).

- Método indirecto.- Los antígenos de B. cereus se hacen reaccionar con sus anticuerpos específicos no marcados, esta combinación no se afecta por el lavado. El complejo antígeno-anticuerpo anterior se hace reaccionar con un anticuerpo específico para la especie de la cual se produjo la primera globulina específica (si los anticuerpos específicos en contra de B. cereus fueron preparados en conejos, entonces los segundos anticuerpos se preparan en contra de las globulinas del conejo en carnero), estos anticuerpos se marcan previamente con fluoresceína. Después de esto, el complejo obtenido se somete a un lavado, donde se arrastra el exceso de anticuerpos marcados.

Con microorganismos heterólogos, es decir, diferentes a B. cereus, no ocurrirá tal combinación, dado que en la primera etapa no hay reacción antígeno-anticuerpo.

Después del lavado, la preparación se examina con un microscopio fluorescente el cual contiene una fuente de luz

ultravioleta. Solamente los microorganismos homólogos, los cuales reaccionaron con los anticuerpos marcados pueden verse fluorescentes.

La ventaja de la técnica directa es su simplicidad, pero de acuerdo a su aplicación, cada suero antiespecie debe marcarse con el fluorocromo. La técnica indirecta tiene la ventaja de que un suero específico de especie marcado, puede utilizarse con varios anticuerpos diferentes; la especificidad de la tinción se determina en la primera etapa. Sin embargo, este método involucra un paso adicional con la posibilidad de que se incremente la tinción no específica debido a la doble aplicación del suero en la preparación.

El fluorocromo ideal debe combinarse con los anticuerpos presentes en el suero para formar un conjugado estable sin afectar su especificidad o fuerza de combinación y debe emitir luz de intensidad y color apropiados en la irradiación. Varios fluorocromos llenan estos requerimientos, y de éstos, el isotiocianato, el cual tiene una fluorescencia verde, y la rodamina B200, la cual da una fluorescencia roja, son los más usados (43,48).

Los anticuerpos marcados que se preparan en contra de las células sensibles al calor se combinan con el antígeno en la pared celular, la cual emite fluorescencia con mucho brillo. En el caso de B. cereus, el cual es un microorganismo móvil, el suero preparado en contra de él, también podría contener pequeñas cantidades de anticuerpos flagelares, y esto puede provocar la tinción del flagelo (48).

Los sueros específicos para B. cereus se prepararon en

contra de esporas y células vegetativas. La conjugación de los anticuerpos en contra de las esporas se hace con isotiocianato de fluoresceína y la de los anticuerpos en contra de las células vegetativas sensibles al calor, se hace con rodamina B200, es posible observar en esta forma los cambios antigénicos que se llevan a cabo durante la germinación y esporulación por medio de la tinción con la mezcla de estos anticuerpos en contra del microorganismo en sus varios estadios (43).

La cubierta de la espora de B. cereus permanece intacta hasta que aparece la célula vegetativa después de que la célula se ha dividido varias veces. Estas diferencias son claramente ilustradas por los cambios de color, del verde (sitios del antígeno de la cubierta de la espora) a rojo (sitios antigénicos de la pared de la célula vegetativa).

Con el uso de anticuerpos marcados con fluoresceína se pueden obtener varios tipos de información, así, se puede decir que, desde el punto de vista diagnóstico, los anticuerpos caen en dos categorías: los específicos con un amplio espectro de especies y los específicos de estrecho espectro de cepas (aunque hay categorías intermedias). Los primeros son útiles para la identificación de microorganismos dentro de tejidos en condiciones patológicas o en cultivos. Los segundos, aunque menos comunes en el diagnóstico, son aún útiles en estudios epidemiológicos. Al utilizar los anticuerpos marcados, es posible seguir la distribución y transmisión de una capa particular dentro de una población (43).

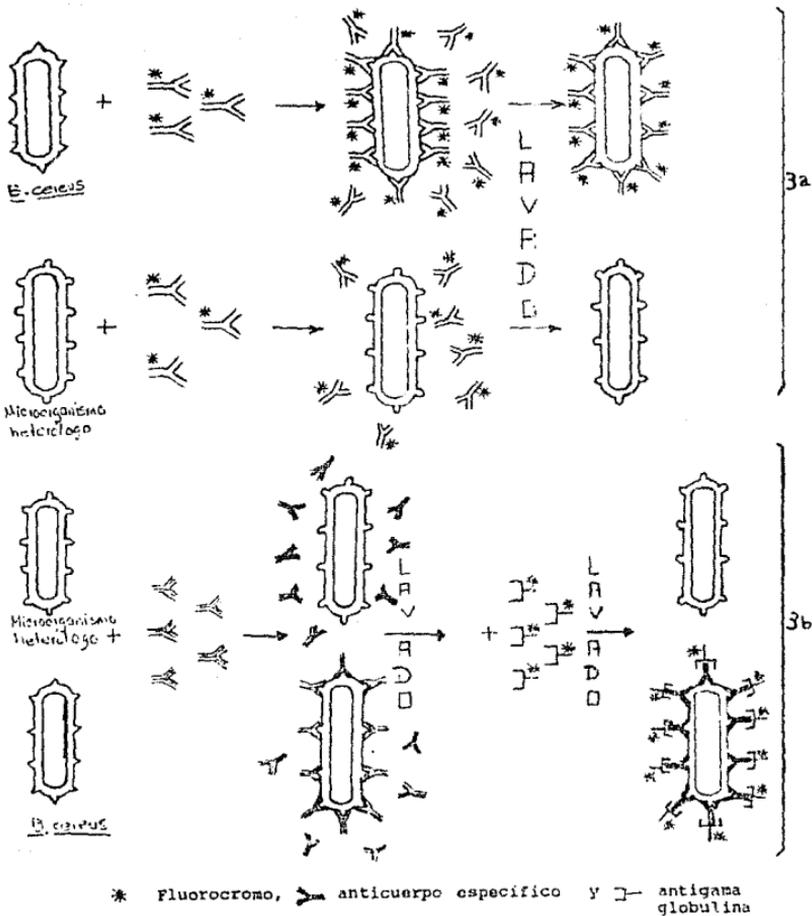


Fig. 3a y 3b Representación esquemática del método directo e indirecto del marcaje fluorescente de los anticuerpos.

3.2.2 Localización de antígenos de *E. gerous* por la técnica de anticuerpos marcados con ferritina

El uso de anticuerpos marcados con ferritina lo describió primero Singer (1959), esta técnica ha permitido identificar áreas del antígeno específico en estudios ultraestructurales por medio del microscopio electrónico. El valor de la técnica del marcaje con ferritina radica en la alta fuerza de dispersión electrónica de esta molécula.

La ferritina es una proteína que contiene fierro y está presente en muchos tejidos del cuerpo, pero principalmente se produce en el bazo, se dice que el fierro se encuentra en 23% del peso de este órgano, en la forma de una micela de $Fe(OH)_3$ dentro de la molécula de ferritina. Bajo el microscopio electrónico, esta micela se muestra claramente como un sitio opaco con 120 \AA de diámetro.

Se han utilizado dos tipos de ferritina con igual éxito para los anticuerpos marcados. Ambos se han derivado del bazo de caballos normales entre 6 y 12 años de edad que no se hayan sometido a ninguna inmunización, se determinaron uno por el método de Granick y el otro por el método de van Heyninger descrito por Florey (43).

3.2.3 Inmunolectroforesis

En este método se utilizan como antígenos tanto las células vegetativas como las esporas de B. cereus las cuales se desintegran por irradiación ultrasónica para aprovechar el antígeno. Los anticuerpos se obtienen a partir de suero de conejo previamente inmunizado con inyecciones de células vegetativas y esporas desintegradas.

En el agar se hace un surco, el cual se llena con el anticuerpo, en forma paralela a él se hacen pequeños pozos, en donde se colocan los distintos antígenos. Esto se somete a una diferencia de potencial entre los dos electrodos y las moléculas se mueven a través del agar a la dirección y al grado determinado por el carácter y medida de las cargas residuales en sus moléculas y por los efectos de endosmosis. Después de un determinado tiempo de difusión en el campo eléctrico se tiñe la placa, con lo cual aparecen arcos de precipitación en donde se encuentra el antígeno en el agar y el anticuerpo correspondiente en el suero; los antígenos se identifican por la posición de los arcos correspondientes en el gel. El uso de diferentes sueros podría proporcionar información extra. Este método solamente es cualitativo, pero hay otros métodos que pueden ser más sensibles y rendir resultados cuantitativos en donde el diámetro de los círculos de precipitación es proporcional a la concentración del antígeno, previniendo que la concentración del anticuerpo sea mayor que la del antígeno.

Otro método de electroforesis en forma cuantitativa es el de

Laurell; en éste, el agar contiene el suero y se va a aplicar el antígeno, es decir la substancia que se va a someter a la electroforesis, los arcos de precipitación parecen trayectorias de cohetes. Si en el agar solamente están incluidos anticuerpos en contra de un solo componente de la mezcla de antígenos de la substancia de prueba, el arco que se forme corresponderá a este componente, la concentración de éste último puede determinarse por comparación con los arcos producidos en la misma placa con las concentraciones estándares del componente puro (43).

4. TRATAMIENTO

Las pruebas in vitro para determinar la susceptibilidad al antibiótico indican que El cereus, en virtud de su producción de penicilinasa y cefalosporinasa, es generalmente resistente a las penicilinas naturales, a sus formas semisintéticas y a las cefalosporinas (39,57); aún a concentraciones elevadas, los halos de inhibición son muy pequeños .

Se observa también que este microorganismo es sensible a los aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina), al cloramfenicol, clindamicina, tetraciclina, eritromicina, vancomicina, pristinamicina y rifampicina (3,21,27,47,60,68,70).

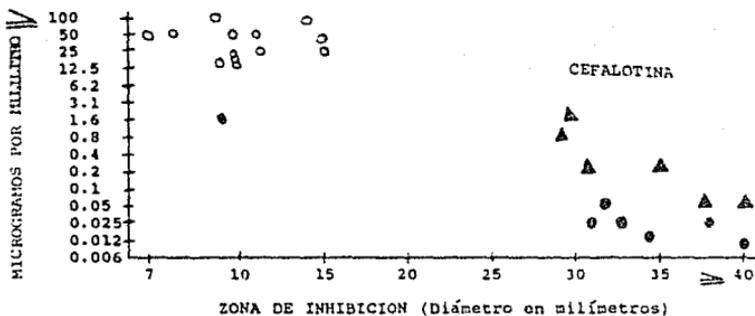
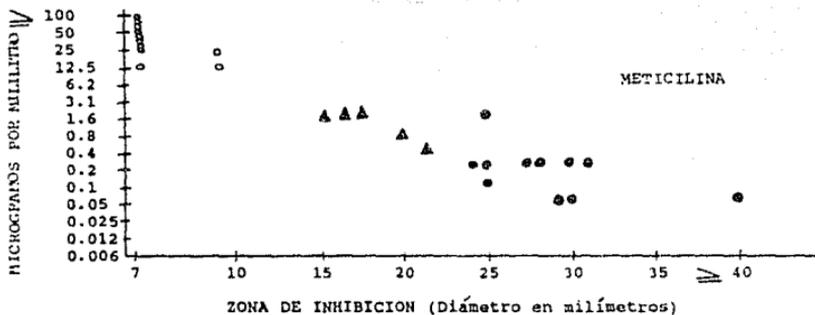
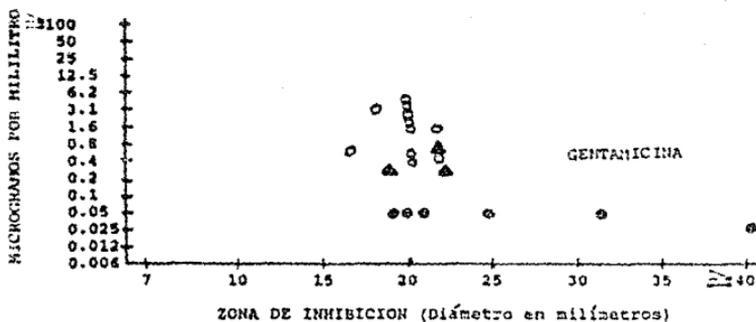
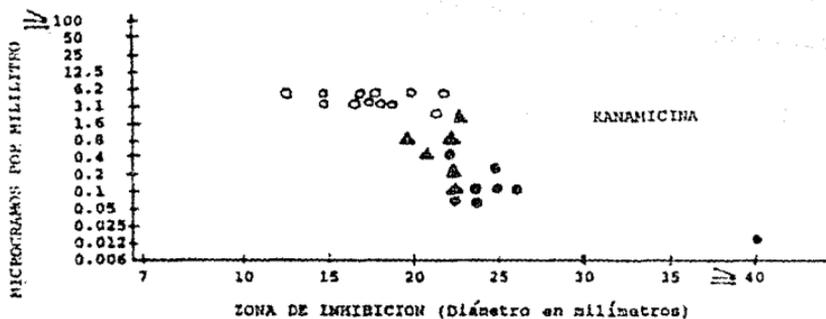
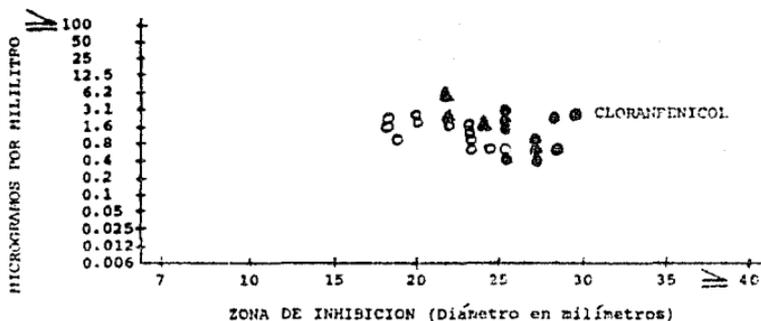
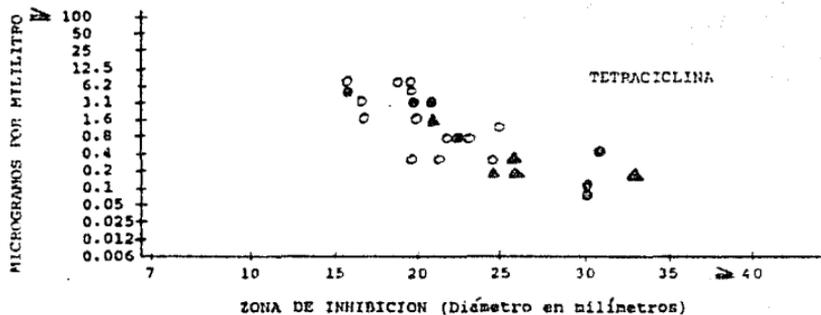


Figura no. 6 y 7. Relación del diámetro del halo de inhibición (por el método Kirby-Bauer) con la concentración mínima inhibitoria de la meticilina y cefalotina respectivamente llevada a cabo en 14 cepas de *B. cereus* (O), 12 cepas de *B. subtilis* (Δ) y 7 cepas de *B. pumilus* (Δ).



Figuras no. 8 y 9. Relación del diámetro del halo de inhibición (por el método de Kirby-Bauer) con la concentración mínima inhibitoria de la kanamicina y gentamicina respectivamente llevada a cabo en 14 cepas de *B. cereus* (○), 12 cepas de *B. subtilis* (△) y 7 cepas de *B. pumilis* (◻).



Figuras 10 y 11. Relación del diámetro del halo de inhibición (por el método de Kirby-Bauer) con la concentración mínima inhibitoria de la tetraciclina y cloranfenicol respectivamente llevada a cabo con 14 cepas de *B. cereus* (○), 12 cepas de *B. subtilis* (⊙) y 7 cepas de *B. pumilis* (△).

Tabla no.8

Susceptibilidad de *B. cereus* a los antibi6ticos (46)

	MIC*	MBC!
	(ug/ml)	(ug/ml)
Penicilina	6.7	6.7
Meticilina	16.0	16.0
Ampicilina	8.0	10.0
Cefalotina	16.0	16.0
Gentamicina	0.25	0.25
Kanamicina	0.67	0.67
Eritromicia	0.29	0.38
Cloranfenicol	3.67	6.67
Clindamicina	0.54	0.79
Tetraciclina	1.84	2.35
Vancomicina	0.83	0.91

MIC* .- Concentraci3n inhibitoria m6nima.

MBC! .- Concentraci3n bactericida m6nima.

Respecto a las infecciones oculares, el pronóstico en las edoftalmitis y panoftalmitis por B. cereus es muy pobre (40). Sin embargo, la terapia antibiótica empírica temprana dirigida contra B. cereus podría ser exitosa en la prevención de la visión (40,46,81).

Aunque B. cereus es sensible a la gentamicina, varios estudios indican que por sí misma es inadecuada para erradicar la infección y dado que este microorganismo es también sensible a la clindamicina, la terapia combinada de ésta con gentamicina parece ofrecer el mejor aprovechamiento(57). Estos son dos agentes a los cuales B. cereus es susceptible y cuya toxicidad hacia la retina parece ser mínima. La clindamicina parece ser especialmente exitosa por su baja MIC para B. cereus, es de fácil penetración en el ojo aplicándose sistémica y periocularmente (15). En 1981, O'day estudió un modelo experimental en conejo, en el cual empleó una combinación de gentamicina y clindamicina sistémica, periocular e itraocularmente, así encontró que, empleándolo tempranamente en el curso de la infección, proporcionó la mejor erradicación del microorganismo del globo ocular, pero la visión no se pudo recuperar. También presentó datos demostrando que el tratamiento con la combinación de gentamicina y clindamicina ocular fue sinérgica y más efectiva en el control de infecciones por este microorganismo que con ningún antibiótico utilizado solo (40,55,76). Enfatizó igualmente la importancia de la iniciación temprana de la terapia intraocular con gentamicina y

clindamicina, en los casos en que se sospecha la infección por este microorganismo (55).

Brinton sugirió el tratamiento con clindamicina en combinación con gentamicina intraocular, periocular y sistémica en todos los casos confirmados de endoftalmitis por B. cereus (55).

Mientras algunos autores abogan por el tratamiento con gentamicina y clindamicina intraocular para todos los casos de endoftalmitis, incluyendo casos post-traumáticos, otros recomiendan esta combinación solo cuando existen cultivos demostrados de B. cereus o cuando hay un alto índice de sospecha de su presencia (55).

A veces es difícil seleccionar los casos de endoftalmitis post-traumática debidos a B. cereus. Cuando se describe una panoftalmitis en asociación con un infiltrado del anillo corneal, leucocitosis y fiebre, ésta última podría estar ausente en el curso temprano de la enfermedad, cuando la terapia es efectiva (55).

Las diferencias en los hallazgos dificultan la aplicación de terapia antibiótica precisa. Las enfermedades intraoculares post-traumáticas por B. cereus podrían tratarse con éxito, preservando la vista, si el daño ocular que se presente alrededor no es irreparable y si el tratamiento se empieza en un estado temprano de la inflamación con la combinación de gentamicina y clindamicina intraocular, periocular y sistémica (55).

En contraste, los pacientes que presentan panoftalmitis o una inflamación intraocular extensa, no pudieron ser tratados con

éxito a pesar de utilizar la terapia apropiada, ésto, debido a que la farmacocinética de la clindamicina en un ojo normal es diferente a la de un ojo inflamado. Otros factores, tales como las variaciones en la sensibilidad a los antibióticos y las interacciones huésped-microorganismo podrían afectar también el resultado (55).

Dada la alta frecuencia y pobre pronóstico de las infecciones por Bacillus sp. al presentarse el trauma, se cree que el tratamiento con clindamicina intraocular, junto con la gentamicina intravitreal, se justifica en todos los casos de sospecha de endoftalmitis post-traumática (55).

Se utilizan las siguientes dosis intravitreales recomendadas por Peyman, como no tóxicas para la retina:

Gentamicina	200 ug
Clindamicina	450 ug

La terapia periocular subconjuntiva consiste de:

- 40 ug. de gentamicina
- 35 ug. de clindamicina

La terapia sistémica incluye gentamicina y clindamicina administradas por vía intravenosa, con una dosis de 3 a 5 mg/kg/d y 25 a 40 mg/kg/d, respectivamente (55).

La relación para el uso de la clindamicina subconjuntival e intravenosa se basa en el trabajo de Tabbara y O'Connor, quienes demostraron que los niveles vítreos que podrían ser terapéuticos en el tratamiento de las infecciones por B. cereus, podrían obtenerse con inyecciones subconjuntivales e intramusculares.

El efecto adverso más serio de la terapia con clindamicina sistémica es la colitis pseudomembranosa, la cual, en varios estudios se muestra con una incidencia que fluctúa entre 0.01% y 10%. La colitis pseudomembranosa, se puede presentar con otro tipo de tratamiento antimicrobiano que altera la flora intestinal como por ejemplo, la ampicilina; esto es como resultado de una citotoxina producida por un sobrecrecimiento de Clostridium difficile en el intestino. En este caso se puede suspender la terapia sistémica con clindamicina eligiéndose como alternativa a la vancomicina en forma oral.

Trabajos recientes de Pflugfelder con vancomicina intraocular en conejos han demostrado que este antibiótico es no tóxico a la retina en una dosis intravitreal de 2 mg o menos. También demostró que Bacillus sp. fue sensible a este antibiótico in vitro y que existió algún sinergismo cuando la vancomicina se usó con gentamicina.

Investigaciones recientes pudieron probar que la combinación de gentamicina y vancomicina intraocular es también una terapia efectiva en la endoftalmitis post-traumática causada por Bacillus sp.

Nuevos agentes antimicrobianos como el imipenam parecen tener buena penetración intraocular cuando se dan sistémicamente en animales modelo, pero la experiencia clínica publicada con estas drogas en caso de endoftalmitis es limitada. Existen recomendaciones específicas que mencionan la posibilidad de estos nuevos agentes en el tratamiento de infección con B. cereus u otros patógenos virulentos (15).

Similarmente, la administración intravítreal de uno de los más nuevos aminoglucósidos, la netilmicina, se recomienda en vez de otros aminoglucósidos como parte de la combinación terapéutica para las infecciones documentadas debidas a E. cereus (15).

Adicionalmente, la cirugía vítrea podría ser una ayuda para salvar la visión, pero desafortunadamente, en casos avanzados, la vitrectomía da poca ayuda cuando la destrucción retinal ya ha ocurrido (46).

DISCUSION

Bacillus cereus es un microorganismo ubicuo, ya que se encuentra en el aire, agua, suelo y muchos alimentos.

Este microorganismo pertenece al género Bacillus; como todas las especies incluidas en él, se caracteriza por ser un bacilo recto que presenta positiva la reacción a la tinción de Gram y por formar esporas, muy resistentes a las condiciones adversas.

Según el tamaño de B. cereus, se considera una de las especies más grandes dentro del género, siendo una característica afin para todas el hecho de que las células pueden encontrarse en forma individual o formando grandes cadenas. La mayoría de las especies de este género presentan movilidad en base a flagelos peritricos, dentro de éstas está B. cereus, cabe hacer notar que la formación de cápsulas también es muy común; sin embargo, B. cereus no cuenta con esta característica.

Las esporas que originan las diferentes especies del género Bacillus pueden presentar varias formas como son elipsoidal, cilíndrica, oval o redonda; pueden situarse en diferente posición dentro de la célula madre, localizándose en la parte central, subterminal, terminal o lateral dentro del esporangio y deformándolo o no.

En el caso de B. cereus, éste forma una espora elipsoidal que se sitúa en la parte central del esporangio sin deformarlo, tales características lo sitúan en el grupo I del género Bacillus (bacilos que forman esporas elipsoidales o cilíndricas, centrales o terminales y no deforman al esporangio). Estas

esporas tienen pared delgada.

Actualmente el género Bacillus cuenta con más de veinticinco especies, cuyas características son muy variadas. Esto hace pensar que deberían someterse a una clasificación más profunda lo cual daría lugar a que este género se dividiera en otros cinco o seis donde las especies comprendidas en ellos tuvieran características más afines.

Lo anterior se basa en estudios realizados sobre la composición de bases del ADN (% G+C), donde las especies que pertenecen a un mismo género no deben diferir por más del 10 al 15 %, sin embargo, en el caso del género Bacillus, las especies difieren en más del 30%, por ejemplo, B. cereus tiene un valor de 31.7% molar de G+C y Bacillus thermocatenulatus de 69%. Estos valores indican la gran heterogeneidad que hay dentro del género.

Cuando las cepas pertenecen a una misma especie, el valor molar de G+C del ADN no debe diferir en más del 2%.

Pero, así como se muestra gran falta de relación genética entre las especies del género Bacillus, en base a estudios de reasociación de ADN, se ha observado que B. cereus, B. anthracis y Bacillus thuringiensis podrían considerarse miembros de una misma especie por la gran homología del ADN que tienen entre sí.

Se han hecho muchos intentos para llevar a cabo una buena clasificación taxonómica de este género, pero las características tan irregulares que muestran las especies han sido un gran obstáculo para ello. Sin embargo, estudios realizados de la

composición de bases del ADN, de la reasociación de ADN y de la hibridación del ADN-rARN, han apoyado la idea de recomensar una nueva clasificación taxonómica.

Como se mencionó anteriormente, el género Bacillus se clasifica morfológicamente en tres grupos: cuando las especies tienen necesidades nutricionales simples o relativamente simples es el grupo I; las especies del grupo II necesitan requerimientos más complejos como amonio, aminoácidos, aneurina y biotina; y los requerimientos nutricionales del grupo III son todavía aún más complejos.

B. cereus como miembro del grupo I, no es un microorganismo exigente, para su crecimiento necesita solamente una mezcla de aminoácidos, que puede substituirse con hidrolizado de caseína, pero no necesita vitaminas; aunque pueden desarrollarse cepas que sean independientes de los aminoácidos. Esto se realiza en base a resiembras seriadas de este microorganismo en un medio no enriquecido con aminoácidos, obteniéndose así buen desarrollo.

Aún se desconocen los mecanismos bioquímicos y genéticos que hacen posible el crecimiento de B. cereus en medios no enriquecidos con aminoácidos, pero se cree que están involucrados procesos mutacionales; no obstante, estas mutaciones no son las que provocan en sí el desarrollo de nuevas regiones del genoma capaces de inducir la formación de las nuevas enzimas específicas que se necesitan para la síntesis de los aminoácidos. Se piensa que estas regiones se encontraban presentes en el genoma de las cepas silvestres, pero las enzimas se manifiestan hasta que los mecanismos de control se alteran por las mutaciones.

Todas las especies del género Bacillus se caracterizan por

formar esporas bajo condiciones adversas, es decir, cuando las condiciones de fuente de carbono, nitrógeno o fósforo son limitadas, esto se presenta por lo general al final del crecimiento exponencial y al principio de la fase estacionaria, cuando todos los nutrientes están en decrecimiento. Las esporas se forman dentro de la célula vegetativa, adquiriendo un periodo de latencia por largo tiempo y manteniendo una estructura, composición química y propiedades fisiológicas diferentes a los de la célula vegetativa.

Debe considerarse que las esporas de las bacterias son diferentes a las de los hongos, las bacterianas sirven como subsistencia prolongada bajo las condiciones adversas y las de los hongos sirven para que se diseminen.

Las endosporas son capaces de resistir al calor, las radiaciones ultravioleta y iónica y muchas sustancias químicas tóxicas.

El proceso de esporulación de B. cereus, al igual que las demás especies del género Bacillus, se lleva a cabo en seis etapas a lo largo de las cuales se realiza el ordenamiento del ADN en un filamento axial, se separan los cromosomas hacia los polos de la célula y se presenta la proliferación del septum de la espora, de esta forma se inicia la formación de la corteza, en seguida se presenta la síntesis de las capas de la espora. De acuerdo a la organización y al número de capas que rodean al protoplasto es como se pueden diferenciar las especies del género Bacillus. Después se lleva a cabo la lisis del esporangio y la liberación de la espora. La forma en la cual se abre la envoltura

para liberar a la espora es una característica de cada cepa, pueden abrirse en forma polar o ecuatorial, por expansión de la bacteria quedando las dos mitades de la envoltura de la espora o por lisis de la envoltura, *B. cereus* y *B. megaterium* lisan sus envolturas con frecuencia.

Las esporas del género *Bacillus* tienen una ultraestructura muy compleja, por ejemplo, la espora de *B. cereus* está formada por la corteza, la envoltura o cubierta y el exosporio. La primera contiene muchas capas de peptidoglicano con ácido diamino pimélico, las cuales se unen en forma entrecruzada. La envoltura o cubierta está constituida por tres capas que se sobreponen; la capa externa y la intermedia presentan incorporación de cisteína, la capa interna no la tiene, por eso es delgada y homogénea.

Finalmente, el exosporio está constituido por dos capas: la superficial y la basal fundamental.

Dentro de este patrón estructural, las demás especies del género pueden diferir en la medida del espesor de las capas o en su diferente composición proteica.

De acuerdo a la composición antigénica de la espora, sus antígenos son los que poseen la más alta especificidad de la especie, por lo mismo es que se utilizan con mucha frecuencia en las técnicas de inmunoelectroforesis e inmunofluorescencia para fines de diagnóstico.

En el exosporio es donde se asocian los aglutinógenos y los antígenos precipitantes, que son componentes internos de la espora o también podrían ser de la superficie.

En cada etapa de germinación de una espora se presentan

diferentes antígenos, pues conforme van desapareciendo los antígenos superficiales de la espora (aglutinógenos) y van apareciendo los de la célula germinativa, los que se van presentando tienen diferentes características o propiedades. Esto debe tenerse bien en cuenta para fines de diagnóstico, pues si se está tratando con esporas o células vegetativas en métodos inmunológicos, debe trabajarse con anticuerpos específicos para cada estadio o fase de crecimiento de la bacteria.

La resistencia que muestran las esporas hacia el calor se debe al contenido de ácido dipicolínico, siendo directamente proporcional el contenido de éste, a la aparición de la resistencia durante la esporulación y al tiempo en que se forma la corteza. Así como el ácido dipicolínico confiere resistencia a la espora hacia el calor, también lo hace hacia las radiaciones ultravioleta. Esta protección se debe a que el ácido dipicolínico se concentra en la corteza de la espora formando una capa protectora para el ADN que se encuentra en la región interna. Sin embargo, no se sabe si el ácido dipicolínico juegue un papel sensibilizador o dañino frente a las radiaciones gamma sobre el ADN.

Se ha mostrado que dentro de los ácidos mono y dicarboxílicos, solamente el ácido -picolínico es capaz de inhibir la esporulación al igual que el Verseno, su acción inhibitoria se debe a la acción quelante que muestran sobre los metales esenciales que se encuentran en el medio. Para poder hacer reversible esta acción se sugiere que se tripliquen o cuadrupliquen las cantidades de los metales esenciales o ponerlos

a competir con otro compuesto quelante que sea asimilable.

Hay que hacer notar que la acción inhibitoria del ácido picolinico se presenta antes de que el pH del medio aumente, si se agrega después, no surte ningún efecto.

El ciclo de vida de B. cereus consta de dos estadios: la esporulación y la germinación. El primero se considera muy importante debido a la capacidad que tiene la espora para la subsistencia prolongada del microorganismo cuando las condiciones no le son favorables, en esta forma su capacidad de germinar en un momento dado se mantiene latente durante mucho tiempo, hasta que las condiciones del medio sean propicias para que se pueda llevar a cabo la germinación y el crecimiento del microorganismo.

La germinación comprende tres etapas:

1) La activación, por medio de la cual la espora pierde la refractibilidad y la permeabilidad, se hidrata y de esta forma, al encontrarse en condiciones favorables, puede empezar a germinar.

Hay muchos métodos posibles de aplicar para la activación de la espora, pero un procedimiento efectivo plenamente, aún no se conoce. El que generalmente se emplea es el tratamiento por calor durante 30 min, a una temperatura apropiada, esto según la especie del género Bacillus que se trate, en el caso de B. cereus se considera a 65 °C como la temperatura subletal.

2) La germinación propiamente dicha es el cambio de una espora activada que pasa del estado de latencia, a un estado de actividad metabólica, si las condiciones en las que se lleva a cabo este cambio son favorables, la germinación se lleva a cabo en unos minutos. Entre las condiciones óptimas para que se

propicie la germinación están la temperatura, valores de pH, fuerza iónica del medio, valores que dependen mucho del microorganismo que se trate.

3) El crecimiento incluye la maduración de la célula y el envejecimiento inmediato. Esto se va a llevar a cabo en un medio apropiado para realizar el crecimiento celular. Después de que se presente la germinación emergen las células vegetativas jóvenes, se elongan y se dividen.

Se dice que las características fisiológicas de la espora son diferentes a las de la célula vegetativa por muchos motivos, entre ellos, se ha observado que para una esporulación normal se requiere un sistema funcional de transporte de electrones, mismo que no se necesita para la germinación, tan es así, que las esporas tienen mayor cantidad de los componentes de la cadena respiratoria que las células vegetativas. También se ha observado que las esporas muestran muy poca o casi ninguna actividad respiratoria, al contrario de las células germinativas que sí la mantienen.

Por otra parte, las enzimas que intervienen en el ciclo del ácido tricarbóxico se forman en la fase de transición entre las células vegetativas y la esporulación, o sea que después del crecimiento logarítmico se lleva a cabo el ciclo del ácido tricarbóxico, pues el ARN y las proteínas que se sintetizan en la fase exponencial se siguen transfiriendo y se sintetizan nuevos mARN, actividades que requieren energía.

Una característica muy importante de B. cereus es la producción de metabolitos extracelulares, entre los cuales

algunos se consideran toxinas por la gran actividad patógena que mantienen sobre el hombre y algunos animales superiores, tal es el caso de la toxina letal, la toxina diarreica o necrótica y la toxina emética.

Existen otros metabolitos como las hemolisinas, cereolisinas, etc, que aunque no ejercen gran influencia sobre la patogenicidad de B. cereus (sobre humanos y animales superiores) se ha considerado muy importante su actividad para fines de identificación del microorganismo en el laboratorio. B. anthracis no tiene la capacidad de producir hemolisinas, entonces esto puede ser criterio para diferenciarlo de B. cereus. Por otro lado, B. thuringiensis, especie con una gran cercanía taxonómica a B. cereus, produce dos hemolisinas, una con un PM de 47 000 d y una segunda con un PM de 29 000 d, las cuales parecen ser análogas a las producidas por B. cereus.

Entre las otras especies que se han reportado como productoras de actividades hemolíticas están B. alvei, B. laterosporus, B. licheniformis y B. subtilis, pero claro, los pesos moleculares de sus hemolisinas son diferentes a los de las de B. cereus, características que pueden marcar la diferencia en un momento dado.

Cuando se reportó la existencia del factor de acumulación del fluido en B. cereus, se notó que una cepa de B. thuringiensis también lo producía, por lo tanto se consideró que la especie también era capaz de producirlo. Pero no así otras especie del género como B. megaterium, B. subtilis, B. licheniformis, etc.

Curiosamente, el filtrado de B. thuringiensis fue neutralizado por el suero con anticuerpos en contra del filtrado de B. cereus.

No se conoce con exactitud si otras especies del género Bacillus son capaces de producir la toxina emética; sin embargo, se piensa que esta característica no está restringida a B. cereus.

De acuerdo a la patogenicidad de B. cereus se considera de gran importancia la producción de intoxicación alimentaria, en la cual están involucradas dos tipos de toxinas, la emética y la diarreica o necrótica. De acuerdo a una gran variedad de investigaciones llevadas a cabo, se encontró que la primera toxina está muy relacionada con las intoxicaciones que sufren las personas que de alguna forma ingieren arroz cocido en restaurantes chinos. La explicación que se da es que en estos locales, dado el alto consumo de arroz, éste se cuece en altas cantidades desde un día anterior, entonces tarda mucho tiempo en enfriarse, por lo tanto se mantiene durante largo tiempo a una temperatura óptima para que se desarrolle el microorganismo y libere la toxina. Esta mala costumbre de los restaurantes debe ponerse a juicio de los asistentes de la Salud Pública a fin de que pueda corregirse en alguna forma, ya que los casos reportados al respecto están aumentando considerablemente. Se ha encontrado también que las intoxicaciones alimentarias por la toxina diarreica o necrótica provocan el síndrome diarreico, el cual se asocia a la ingestión de muchos otros alimentos contaminados con B. cereus.

Los síndromes diarreico y emético cesan después de haberse

eliminado por completo las toxinas del organismo, por lo mismo, es que no es necesario someter a la persona a ningún tratamiento médico.

Por otra parte, B. cereus ha cobrado aún más importancia al verse involucrado en enfermedades no gastrointestinales. Hasta hace algunas décadas se consideraba a este microorganismo, al igual que a las otras especies del género Bacillus, como un simple contaminante de laboratorio, al contrario de B. anthracis, única especie patógena de este género.

Sin embargo, a lo largo de los últimos diez años se han reportado muchos casos de enfermedades como endoftalmitis, septicemias, osteomielitis, endocarditis, meningitis, neumonía, etc. Los casos reportados muestran que se presentaron en forma severa o potencialmente severa, en muchos de los casos provocando la muerte.

La toxina responsable de la naturaleza necrótica y purulenta en las enfermedades causadas por B. cereus, parece ser la toxina responsable del síndrome de tipo diarreico asociado con este microorganismo, ésta es un factor determinante de la virulencia.

Las enfermedades causadas por este microorganismo pueden ser locales o diseminadas y aunque se considera un microorganismo oportunista, por lo mismo es que puede ser una grave amenaza en pacientes inmunocomprometidos, como aquéllos que presentan enfermedades predisponentes como leucemia, alcoholismo, cirrosis, o en personas que acostumbran administrarse drogas por vía intravenosa. Si la infección no se detecta a tiempo al igual que

el agente etiológico, la enfermedad puede presentar un curso de mal pronóstico. Por lo mismo es que se hace mucho hincapié, en el hecho de que si en el laboratorio se llega a aislar a B. cereus, no por considerarse un microorganismo oportunista se le ignore, al contrario, si el paciente presenta enfermedades debilitantes como las mencionadas anteriormente, el microorganismo podría reportarse como el agente etiológico. Así pues, de un buen y rápido diagnóstico, depende el tratamiento más acertado.

De acuerdo al tratamiento, éste resulta un poco complicado, pues dada la capacidad que tiene B. cereus de sintetizar beta lactamasas, la alternativa a seguir es utilizar algún otro antibiótico diferente a los β -lactámicos y al que si sea sensible el microorganismo, para ello es muy recomendable que el laboratorio realice el antibiograma, para así dar el tratamiento adecuado.

Como se puede observar, el trabajo que se realice en el laboratorio es básico. Aprovechando la producción de esporas y toxinas, se han utilizado métodos inmunológicos como la electroforesis para su identificación igualmente la inmunofluorescencia, tanto para las esporas como para las células vegetativas. Esto, independientemente del aislamiento del microorganismo en los medios de cultivo apropiados y con sus pruebas bioquímicas características.

CONCLUSIONES

- 1.- B. cereus ha cobrado gran interés en el campo clínico, ya que aunque se considere un microorganismo oportunista, los cuadros infecciosos que produce en pacientes inmunocomprometidos se consideran de mal pronóstico.
- 2.- Los factores predisponentes que exponen al paciente a sucumbir a una enfermedad por B. cereus son: enfermedades malignas (en asociación a la quimioterapia), diabetes (como enfermedad debilitante), enfermedades renales crónicas (que conllevan a la hemodiálisis), alcoholismo, cirrosis, narcótico-dependencia, asma (donde se administran por largo tiempo esteroides).
- 3.- Dado que las características clínicas son comunes en los pacientes en quienes se aísla B. cereus, la atención debería dirigirse a este microorganismo como un agente etiológico potencial.
- 4.- Los mecanismos de patogenicidad de B. cereus se basan en la producción de varios metabolitos extracelulares por este microorganismo, entre ellos los más estudiados son las hemolisinas, enzimas como la fosfolipasa-C, toxinas como la letal, emética y la necrótica o diarreica que es la que se ha considerado más importante por verse involucrada en las enfermedades que produce este microorganismo, aparte de los otros metabolitos.

- 5.- Entre las enfermedades producidas por este microorganismo se encuentran la intoxicación alimentaria, en la cual están involucradas la toxina emética y la diarreica solamente; muy comunes son las infecciones oculares como la panoftalmítis y la endoftalmítis, y también se han presentado casos de septicemia, meningitis, osteomielitis, endocarditis e infecciones pleuropulmonares.
- 6.- *B. cereus* es productor de beta lactamasas, por lo cual resulta resistente a los correspondientes antibióticos. Este problema obliga a tomar otras alternativas para el tratamiento, como son los aminoglucósidos, cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina, eritromicina, vancomicina, pristinamicina y rifampicina.
- 7.- Este microorganismo ha dejado de considerarse como un simple contaminante en el laboratorio, dada la importancia patógena que ha mostrado tener, sobre todo en la última década. Siempre que se aisle en el laboratorio debe considerarse como un posible agente etiológico.

A P E N D I C E

Medios de cultivo

1.- Medio basal de amonio

Composición: KH_2PO_4	1.5	g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	7.0	"
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	"
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3	"
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.040	"
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0025	"
Molibdato de amonio	0.002	"

Estas sales se disuelven en un litro de agua destilada y se ajustan a un pH de 7.0. La solución se somete a ebullición, se filtra y se esteriliza en autoclave durante 20 min 115°C .

2.- Medio basal de caseína

Composición: Se hace a partir de un hidrolizado de caseína en polvo libre de vitaminas, al cual se le agrega:

Tryptofano	0.1	g
Cistina	0.01	"
K_2HPO_4	5.0	"
NaCl	1.0	"

Estos componentes se disuelven en un litro de agua destilada, se ajusta a un pH 7.0, se somete a ebullición, se filtra y se esteriliza en autoclave durante 10 min a 110°C.

3.- Medio 7 AA

Es el mismo medio basal de amonio, el cual se enriquece con los siguientes siete aminoácidos:

L-asparagina	0.04	mg/ml
L-prolina	1.0	"
L-leucina	1.5	"
DL-alanina	0.35	"
L-ácido glutámico	0.5	"
DL-serina	0.2	"
DL-metionina	0.1	"

4.-Medio 14 AA

El medio basal de amonio se enriquece con los siguientes catorce aminoácidos:

DL-alanina	0.08	mg/ml
DL-ácido aspártico	0.10	"
L-arginina	0.16	"
L-cisteina	0.25	"
L-ácido glutámico	0.50	"
Glicina	0.08	"
L-histidina	0.16	"
L-leucina	0.10	"
DL-metionina	0.16	"

DL-fenilalanina	0.20	"
DL-serina	0.08	"
DL-triptofano	0.08	"
L-tirosina	0.14	"
DL-valina	0.32	"

5.- Medio A

Composición: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	11.2	g
KH_2PO_4	2.4	"
$(\text{NH}_4)_2$	2.0	"
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.050	"
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.004	"
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0028	"

Los componentes anteriores se disuelven en un litro de agua destilada y se ajusta a un pH de 7.2.

Si al medio anterior se le agregan 10 gramos de glicerol, se le llama medio A_1 , si se le agregan 10 gramos de glucosa, se le llama medio A_2 .

El medio A, sin las sales de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} y sin las fuentes de carbono, se esterilizan en autoclave 121°C . Estas sales se disuelven en H_2SO_4 0.01 N y se esterilizan en autoclave; con respecto a las fuentes de carbono, se prepara una solución acuosa al 25%; estas soluciones, 20 ml de sales y 40 ml de fuentes de carbono se preparan para un litro de medio completo, pero se

mezclan después de haberse esterilizado en autoclave y enfriado; con respecto a las fuentes de carbono, se prepara una solución acuosa al 25%; estas soluciones, 20 ml de sales y 40 ml de fuentes de carbono se preparan para un litro de medio completo, pero se mezclan después de haberse esterilizado y enfriado.

Factores nutricionales adicionados al medio A:

Vitaminas

Piridoxina	2.0	mg/ml
Piridoxal	2.0	"
Piridoxamina	2.0	"
Rivoflavina	1.0	"
Tiamina	1.0	"
Pantotenato de sodio	1.0	"
Acido nicotínico	1.0	"
Biotina	0.013	"
Tetrahidropteroil- glutamato de calcio		
5 formil	0.01	"

Purinas

Sulfato de adínina	10.0	"
Guanina	10.0	"

Sales

CaCl ₂	1.0	"
CoSO ₄ . 7H ₂ O	1.0	"
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1.0	"
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.1	"

H ₃ BO ₄		"
Na ₂ CO ₄	· 2H ₂ O	"

Aminoácidos

Hidrolizado de caseína	4 900	"
L-cisteína	50	"
DL-triptofano	100	"

Para determinar los requerimientos individuales de aminoácidos, el medio A se enriquece con:

DL-ácido aspártico	60	mg/l
DL-ácido glutámico	140	"
DL-prolina	60	"
DL-metionina	30	"
L-arginina	70	"
Glicina	30	"
DL-serina	15	"
DL-alanina	30	"
DL-fenilalanina	30	"
DL-triptofano	10	"
DL-tirosina	60	"
DL-histidina	40	"
L-isoleucina	40	"
L-leucina	40	"
DL-treonina	60	"
DL-valina	70	"
L-cisteína	50	"
L-licina	50	"

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander, M.,
ADVANCES IN MICROBIAL ECOLOGY
Volumen 2
Board Editorial
New York and London
1980
- 2.- Aronson, Arthur I., Fitz-James, Philip, "Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat", Bact Rev., 40(2): 360-402 (1976)
- 3.- Bekemeyer, William B., Zimmerman, Guy A., "Life-threatening complications associated with Bacillus cereus pneumonia", Am. Rev. Resp. Dis. 131(3): 466-469 (1985)
- 4.- Bergan, T.,
METHODS IN MICROBIOLOGY
Academic Press Inc.
London (1984)
- 5.- Blocher, J.C., Busta, F. F., "Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate", J. Appl. Bact., 59: 469-478 (1985)
- 6.- Block, C. S., Levy, M. L., Fritz, Vivian, "Bacillus cereus endocarditis", South African Medical J., 53: 556-557 (1978)
- 7.- Boschwitz, H., Halvorson, H. O., Keynan, A., Milner, Y., "Trypsinlike enzymes from dormant and germinated spores of Bacillus cereus T and their possible involvement in germination", J. Bact., 164(1): 302-309 (1985)
- 8.- Bouza, Emilio, Grant, Scott, Jordan, M. Colin, Yook, Richard H., Sulit, Héctor L., "Bacillus cereus endogenous panophthalmitis", Arch. Ophthalmol., 97: 498-499 (1979)
- 9.- Carbone, Jerome E., Stauffer, John L., "Bacillus cereus pleuropulmonary infection in a normal host", West J. Med. 143(5): 676-677 (1985)
- 10.- Colpin, G.G.D., Guiot, H. F. L., Simonis, R.F., "Bacillus cereus meningitis in a patient under gnoibiotic care", The Lancet, 2: 694-695 (1981)
- 11.- Coolbaugh, J. C., Williams, R. P., "Production and characterization of two hemolysins of B. cereus", Canad. Journal Microbiol., 24: 1289-1295 (1978)
- 12.- Cortés Bargallo, Jesús,
FENOMENO DE ESPORULACION DEL GENERO BACILLUS
Tesis, 1981

- 13.- Cowell, J. L., Grushoff-Kosyk, F. S., Bernheimer, A. W., "Purification of cereolysin and the electrophoretic separation of the active (reduced) and inactive (oxidized) forms of the purified toxin", *Inf. and Immun.*, 14:144-154 (1976)
- 14.- Chastel, C., Goas, J. Y., "Un nouveau cas de bactériémie a Bacillus cereus", *La Nouvelle Presse Médicale*, 6(19): 1659 (1977)
- 15.- Davey, Richard T., Tauber, William B., "Posttraumatic endophthalmitis: The emerging role of Bacillus cereus infection", *Rev. Infect. Dis.*, 9(1): 110-123 (1987)
- 16.- Davis, M. D. Bernard,
Dulbecco, Renato,
MICROBIOLOGY
3er. ed.
Ed. Harper International
1980
- 17.- Escamilla, E. José, Benito C., María, "Respiratory system of vegetative and sporulating Bacillus cereus", *J. Bact.*, 160(1): 473-477 (1984)
- 18.- Escamilla, J. E., Ramírez, R., Dal Arenal, I. P., "Expression of cytochrome oxidases in B. cereus: Effects of oxygen tension and carbon source", *J. Gen. Microbiol.*, 133: 3549-3555 (1987)
- 19.- Escamilla, José E., Ramírez, Remedios, Del Arenal, Patricia, Aranda, Armando, "Respiratory systems of the Bacillus cereus mother cell and forespore", *J. Bact.*, 167(2): 544-550 (1986)
- 20.- Escartin, F. E.,
MICROBIOLOGIA SANITARIA
Vol. 1
Universidad de Guadalajara
1981
- 21.- Finegold, Sidney M.,
DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO
7a. edición
Ed. Panamericana
1989
- 22.- Gilbert, Richard J., Kramer, John M., " Bacillus cereus enterotoxins: present status", *Biochemical Society Transaction* 12: 198-200 (1984)

- 23.- Glenn, Eduardo, Antillón, Florencia, Garcia, Vera,
"Aislamiento de B. cereus en arroz frito de restaurantes en
Costa Rica", Rev. Lat. Amer. Microb., 30: 15-17 (1988)
- 24.- Gould, G. W.,
METHODS FOR STUDYING BACTERIAL SPORES
Academic Press Inc
1980
- 25.- Grosbois, B., Minet, J., Le Toquart, J. P., Lauvin, R.,
Bracq, J., "Septicémie a Bacillus cereus au décours
d'une chimiothérapie intraveineuse par chambre
implantable", La Presse Medicale, 16 (40): 2029 (1987)
- 26.- Grossniklaus, Hans, Bruner, William E., Frank, K. Ellen,
" Bacillus cereus panophthalmitis appearing as acute
glaucoma in a drug addict", Am. J. Ophthal., 100(2): 334-
335 (1985)
- 27.- Guiot, H. F. L., De Planque M. M., Richel D. J., " Bacillus
cereus: A snake in the grass for granulocytopenic
patients", J. Infect. Dis., 153(6): 1186 (1986)
- 28.- Gutiérrez Rodríguez, E. A.,
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE B. CEREUS EN ALIMENTOS
DESHIDRATADOS
Tesis, 1980
- 29.- Hurst, A.,
Gould, G. W.,
THE BACTERIAL SPORE
Vol. II
Academic Press
1983
- 30.- Ikezawa, H., Mori, M., Taguchi, R., "Studies on
sphingomyelinase of B. cereus: hydrolytic and hemolytic
actions on erythrocyte membranes", Arch. Biochem.
Biophys., 199: 572-578 (1980)
- 31.- Ikezawa, H., V., Yamanegi, M., Taguchi, R., Miyashita, T.,
Ohyabu, T., "Studies on phosphatidylinositol
phosphodiesterase (phospholipase C type) of B. cereus.
I. Purification, properties and phosphatase-releasing
activity", Biochem. Biophys. Acta, 450: 154-164 (1976)
- 32.- Ishida, Akio, Futamura, Noriki, Matsusaka, Tadao,
"Detection of peroxidase activity and its localization in
the forespore envelopes of B. cereus", J. Gen. Appl.
Microbiol., 33: 27-32 (1987)

- 33.- Jonsson, Steinn, Clarridge, Jill, Young, Edward J., "Necrotizing pneumonia and empyema caused by Bacillus cereus and Clostridium bifermentans", Am. Rev. Respir. Dis., 127: 357-359 (1983)
- 34.- Kamat, A. S., Pradhan, D. S., "Involvement of calcium and dipicolinic acid in the resistance of Bacillus cereus B15-59 spores to U.V. and gamma radiations", Int. Radiat. Biol., 51 (1): 7-18 (1987)
- 35.- Knight, B. C. J. G., Proom, H., "A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus Bacillus", J. Gen. Microb., 4: 508-538 (1950)
- 36.- Kutima, Philip M., Foegeding, Peggy M., "Involvement of the spore-coat in germination of B. cereus T spores", Appl. Environm. Microbiol., 53(1): 47-52 (1987)
- 37.- Laszlo, Daniel J., Niwano, Mitsuri, Coral, William W., "Bacillus cereus electron transport and proton motive force during a aerotaxis", J. Bact., 159(3): 820-824 (1984)
- 38.- Leff, A., Jacobs, R., Gooding, V., "Bacillus cereus pneumonia, survival in a patient with cavitory disease treated with gentamicin", Am. Rev. Resp. Dis., 115: 151-154 (1977)
- 39.- Lennette, Edwin H.,
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
4a. edición
Washington, 1985
- 40.- Le Saux, Nicole, Harding, K. H., "Bacillus cereus endophthalmitis", Canad. J. Surg., 30(1): 28-29 (1987)
- 41.- Moreno, Albert J., Orr, Cynthia, Morales, Edmundo, "Bacillus cereus, diarrhea, and home-dried apples", Ann. Intern. Med., 102(6): 868-869 (1985)
- 42.- Mortimer P., Star,
Heinz Slop,
THE PROKARYOTES
Vol. II
Springer-Verlog
New York, 1981
- 43.- Norris, J. R.,
Ribbons, D. W.,
Vol. 5A
Academic Pressm Inc.
London, 1971

- 44.- O'Day, Denis H., Ho, Patrick C., Head, W. Steven,
"Fulminating panophthalmitis due to exogenous infection
with B. cereus: report of 4 cases", Brith. J. Ophthalmol.,
66: 205-208 (1982)
- 45.- O'Day, Denis M., Smith, Richard S., Andrews, John A.,
"Pathogenetic mechanisms in B. cereus panophthalmitis",
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 19 (suppl.): 111-112 (1980)
- 46.- O'Day, Denis M., Smith, Richard S., Gregg, Clark R., "The
problem of Bacillus species infection with special emphasis
on the virulence of Bacillus cereus", Ophthalmol., 88(8):
833-838 (1981)
- 47.- Perlino,, Carl, "Bacillus cereus: not a contaminant", JAMA,
242(19): 2069 (1979)
- 48.- Philipp, Gerhardt, R. G. E. Muray,
MANUAL OF METHODS FOR GENERAL BACTERIOLOGY
American Society for Microbiology
Washington, D. C. (1981)
- 49.- Phillips, A.P., Martin, K. L., "Evaluation of a
microfluorometer in immunofluorescence assays of
individual spores of B. anthracis and B. cereus". J. Imm.
Method., 49:271-282 (1982)
- 50.- Phillips, A. P., Martin, K. L., "Variations of the
staining method in quantitative indirect
immunofluorescence assays for B. cereus spores, and the
use of fluorescein-Protein-A", J. Imm. Method., 54: 361-
369 (1982)
- 51.- Phillips, A. P., Martin, K. L., Broster, M. G.,
"Differentiation between spores of B. anthracis and B. cereus
by a quantitative immunofluorescence technique", J. Clin.
Microbiol., 17(1): 41-47 (1983)
- 52.- Proom, H., Knight, B. C. J. G., "The minimal nutritional
requirements of some species in the genus Bacillus", J.
Gen. Microbiol., 13:474-480 (1955)
- 53.- Rabinovitch,, Leon, Vecente, Maria Marfisa A., Guaycurús,
Thania V., "Avaliação da incidência e da toxicidade de
amostras de Bacillus cereus em diferentes classes de
alimentos comercializados e consumidos no estado do
Rio de Janeiro", Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80(1): 1-9
(1985)

- 54.- Rogers, H. R.,
Perkins, H. R.,
Word, J. B.,
MICROBIAL CELLS WALLS AND MEMBRANES
Chapman and Hall Ltd.
London (1980)
- 55.- Schemmer Garay B., Driebe, William T., "Posttraumatic
Bacillus cereus endophthalmitis", Arch. Ophthalmol, 105:
342-344 (1987)
- 56.- Scherrer, René, Shull, Vivion E., "Microincineration and
elemental X-ray microanalysis of single Bacillus cereus T
spores", Canad. J. Microbiol., 33(4): 304-313 (1987)
- 57.- Shamsuddin, Daliah, Tuazon, Carmelita J., " Bacillus cereus
panophthalmitis: source of the organism", Rev. Infect.
Dis. 4(1): 97-103 (1983)
- 58.- Shibata, H., Ohnishi, Noriaki, "Germination of Bacillus
cereus spores induce by purine ribosides and their
analogs: effects of modification of base and sugar
moieties of purine nucleosides on germination-inducing
activity ", Can. J. Microb., 32(2): 186-189 (1986)
- 59.- Sneath, Peter H. A.,
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY
9th ed.
The Williams and Wilkins Co.
Baltimore, (1986)
- 60.- Solny, N. Meyer, Reed Failing, G., Borges, James S.,
" Bacillus cereus osteomyelitis", Arch. Intern. Med.,
137: 401-402 (1977)
- 61.- Spira, W. M., Silverman, G. L., "Effects of glucose, pH
and dissolved-oxygen tension on B. cereus growth and
permeability factors production in batch culture", Appl.
Environ. Microbiol., 37(1): 109-116 (1979)
- 62.- Stainer, Roger Y.,
Ingraham, John L.,
THE MICROBIAL WORLD
5a. ed.
Prentice-Hall
New Jersey
1986
- 63.- Taylor, A. J., Gilbert, R. J., " Bacillus cereus food
poisoning: a provisional serotyping scheme", J. Med.
Microbiol. 8: 543-550 (1975)

- 64.- Terranova, William, Blake, Paul A., "Bacillus cereus food poisonig", New Engl. J. Med., 298(3): 143-144 (1987)
of Bacillus cereus", J. Bact., 124(1): 593-594 (1975)
- 65.- Thompson, N. E., Ketterhagen, M. J., Bergdoll, M. S., Schantz, E. J., "Isolation and some properties of an enterotoxin produced by Bacillus cereus", Infect. Immun., 43(3): 887-894 (1984)
- 66.- Trager, Garay H., Panwalker, Anand P., "Recovery from Bacillus cereus sepsis", South. Med. J., 72(12): 1632-1633 (1979)
- 67.- Tranter, H. S., Board, R. G., "The inhibition of vegetative cell outgrowth and division from spores of B. cereus T by hen egg albumen", J. Appl. Bact., 52: 67-73 (1982)
- 68.- Tuazon, Carmelita U., Murray, Henry W., Levy, Charles, "Serious infections from Bacillus sp.", JAMA, 241(11): 1137-1140 (1979)
- 69.- Turnbull,, P. C. B., "Bacillus cereus toxin", Pharmac. Ther., 13: 453-505 (1981)
- 70.- Turnbull, P. C. B., French, T. A., Dowsett, Elizabeth G., "Severe systemic and pyogenic infections with Bacillus cereus", Brith. Med. J., 1: 1628-1629 (1977)
- 71.- Turnbull, P. C. B., Jorgensen, Kirsten, Kramer, J. M. "Severe clinical conditions associated with Bacillus cereus and the apparent involvement of exotoxins", J. Clin. Path., 32: 289-293 (1979)
- 72.- Turnbull, P. C. B., Kramer, J. M., "Intestinal carriage of B. cereus:faecal isolation studies in three population groups", J. Hyg. Camb., 95: 629-638 (1985)
- 73.- Turnbull, Peter, Kramer, John M., "Non gastrointestinal Bacillus cereus infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period", J. Clin. Path., 36: 1091-1096 (1983)
- 74.- Turnbull, Peter C. B., Kramer, John M., Jorgensen, Kirsten, "Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal and necrotizing toxins of Bacillus cereus", Am. J. Clin. Nutrit., 32: 219-227 (1979)
- 75.- Turnbull, P. C. B., Nottingham, J. F., Ghosh, A. C., "A severe necrotic enterotoxin produced by certain food, poisoning and other clinical isolates of B. cereus", Br. J. Path., 58: 273-280 (1977)

- 76.- Ullman, Saul, Pflugfelder, Stephen C., Hughes, Randy,
 " Bacillus cereus panophthalmitis manifesting as an orbital
 cellulitis", Am. J. Ophthal., 103(1): 105-106 (1987)
- 77.- Vandeloski, J., " Bacillus cereus-Maine", MMWR, 35(25): 408-
 410 (1986)
- 78.- Vega Moreno, Silvia
 IMPORTANCIA E INCIDENCIA DE BACILLUS CEREUS EN ALIMENTOS.
 Tesis, 1986
 Fac. de Química
- 79.- White, P. J., "The nutrition of B. megaterium and B.
cereus", J. Gen. Microbiol., 71: 505-514 (1972)
- 80.- William G., Walter,
 Richard, M. Mc Bee,
 MICROBIOLOGIA GENERAL
 2a. ed.
 Editorial CECSA
 1972
- 81.- Young, Edward J., Wallace, Richard J., Ericsson, Charles D.
 "Panophthalmitis due to Bacillus cereus", Arch. Intern.
 Med., 140: 559-561 (1980)