

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

Titulo: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

Resumen

El grupo *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*) esta integrado por bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas asociadas con intoxicación alimentaria e infecciones oportunistas.

Los cosméticos son los productos más utilizados en el mundo y pueden ser un vector potencial de infecciones por *Bacillus cereus*.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un método de cultivo y un método molecular rápido y confiable utilizando PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-q) para detectar *B. cereus* en cosméticos.

En este estudio, se desarrolló un método de screening utilizando el sistema Life Technologies 7500 Fast -qPCR. Se utilizó un ensayo de Taqman para detectar el fragmento de 285 pb del gen *motB* que codifica la proteína motora de flagelos en el grupo *B. cereus*.

Respecto al método de cultivo, se incorporaron como medios de enriquecimiento selectivo Caldo Trypticase soja – Polimixina y Caldo Manitol Polimixina al método descrito en el Bacteriological Analytical Manual (BAM- FDA).

Los resultados mostraron para la PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-q) que *motB* fue eficaz en la detección del grupo *B. cereus* en sombra de ojos en polvo, mascara facial, delineador para ojos y crema para área ocular.

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

Con respecto al método convencional de cultivo según BAM , la incorporación de los medios de enriquecimiento selectivo , Caldo Manitol Rojo Fenol y Caldo TSB Polimixina B, permitieron una recuperación adecuada del grupo *B. cereus*.

Introducción

El grupo *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*) son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, que forman endosporas que se distribuyen ampliamente en la naturaleza y están asociadas con intoxicación alimentaria e infecciones oportunistas.

Los cosméticos son los productos más utilizados en el mundo y pueden ser un vector potencial de infecciones por *Bacillus cereus*.

Las esporas de *Bacillus cereus* germinan cuando entran en contacto con la materia orgánica o un huésped vivo pudiendo producir infecciones de la región ocular, que pueden conducir a lesiones oftálmicas tales como abscesos corneales acompañados de dolor, quemosis, proptosis, hemorragia retiniana y perivasculitis. La virulencia de *B. cereus* se ha atribuido a la producción de toxinas durante el crecimiento intraocular.

Un método rápido como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ofrecerá la oportunidad de una pronta detección de *B. cereus* en productos cosméticos y garantizará la calidad y seguridad de estos productos.

No existe actualmente un método de ensayo de referencia ni de screening para detección de *B. cereus* en cosméticos por lo tanto el objetivo del presente trabajo es desarrollar un método de

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

cultivo sencillo y aplicable a laboratorios de ensayo de baja complejidad como así también un método de screening para su detección temprana.

Objetivo:

El objetivo de este estudio fue desarrollar un método de cultivo y un screening molecular rápido y confiable utilizando PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-q) para detectar *B. cereus* en cosméticos. En este estudio, se desarrolló un método de screening utilizando el sistema Life Technologies 7500 Fast -qPCR. Se utilizó un ensayo de Taqman para detectar el fragmento de 285 pb del gen motB que codifica la proteína motora de flagelos en el grupo *B. cereus*.

Materiales y métodos:

Muestras:

El estudio se realizó sobre muestras de sombra compacta para ojos, mascara facial, crema para contorno de ojos y delineador para ojos.

Cepas bacterianas:

B. cereus (emético) ATCC 6006, *B. cereus* ATCC 49063, *B. subtilis* ATCC 15563 y *B. thuringiensis* ATCC 35866

Producción de esporas:

La esporulación de las cepas de *Bacillus* sp se indujo por crecimiento de las células vegetativas sobre agar de esporulación durante 7 días a 30°C. A continuación, los cultivos se calentaron a 65°C durante 30 minutos. Las suspensiones de esporas se cosecharon por centrifugación a 3.000 rpm durante 20 minutos y se lavaron 3 veces en solución salina al 0,85%. El último lavado se realizó con 30 ml de solución salina al 0,85% y se calentó a 65 ° C durante otros 30 minutos. Las suspensiones de esporas se almacenaron a 4°C.

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

Condiciones de cultivo:

Las muestras, previamente analizadas por el método BAM para descartar contaminación con el grupo *Bacillus cereus*, se contaminaron artificialmente con una suspensión de esporas del grupo de *B. cereus* y *Bacillus subtilis* y se enriquecieron usando el método descrito en el Bacteriological Analytical Manual (BAM- FDA) con la incorporación de caldos de enriquecimiento selectivo.

Se utilizaron como medios de enriquecimiento selectivo Caldo Trypticase soja – Polimixina y Caldo Manitol Polimixina.

El método de cultivo utilizado en este estudio se basa en el Capítulo 14 para *B. cereus* y el Capítulo 23 sobre Métodos Microbiológicos para Cosméticos del manual Bacteriological Analytical Manual (BAM)- Food and Drug Administration (FDA) .

Las porciones de ensayo (2 gramos) con el neutralizador (1% de Tween-80) y el medio de enriquecimiento caldo Leethen modificado se inocularon con diluciones en serie de 10^{-4} a 10^{-7} de las distintas especies de *Bacillus* spp. (*B. cereus* (emético), *B. subtilis* y *B. thuringiensis* y *B. cereus* (sensibilidad). La cantidad de esporas de *B. subtilis* fue 10 veces superior a la ensayada para el grupo *B. cereus* (especificidad) . Se incubaron durante 24 horas a 30 ° C , se aisló el ADN y se realizó qPCR.

Aislamiento del ADN:

El ADN se extrajo utilizando el kit de extracción de ácido nucleico PrepSEQ para pruebas alimentarias y ambientales para *Listeria* spp.

PCR en tiempo real:

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

Se realizó el ensayo de PCR en tiempo real de Taqman dirigido al fragmento de 285 pb del gen *motB* que codifica la proteína motora de flagelos en el grupo *B. cereus*.

El qPCR se realizó utilizando 10 μ l de Taqman Environmental Master Mix 2. 0,1 μ l de la concentración 20X de los cebadores (Tabla 5), 2,4 μ l de Reactivo Taqman Control Positivo Interno (Applied Biosystems), 2,6 μ l de agua purificada y 4 μ l de ADN template en un volumen final de 20 μ l. La amplificación se realizó a 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos y 60 °C durante 1 minuto.

Figura 1. Esquema de tratamiento de las muestras

2g of muestra



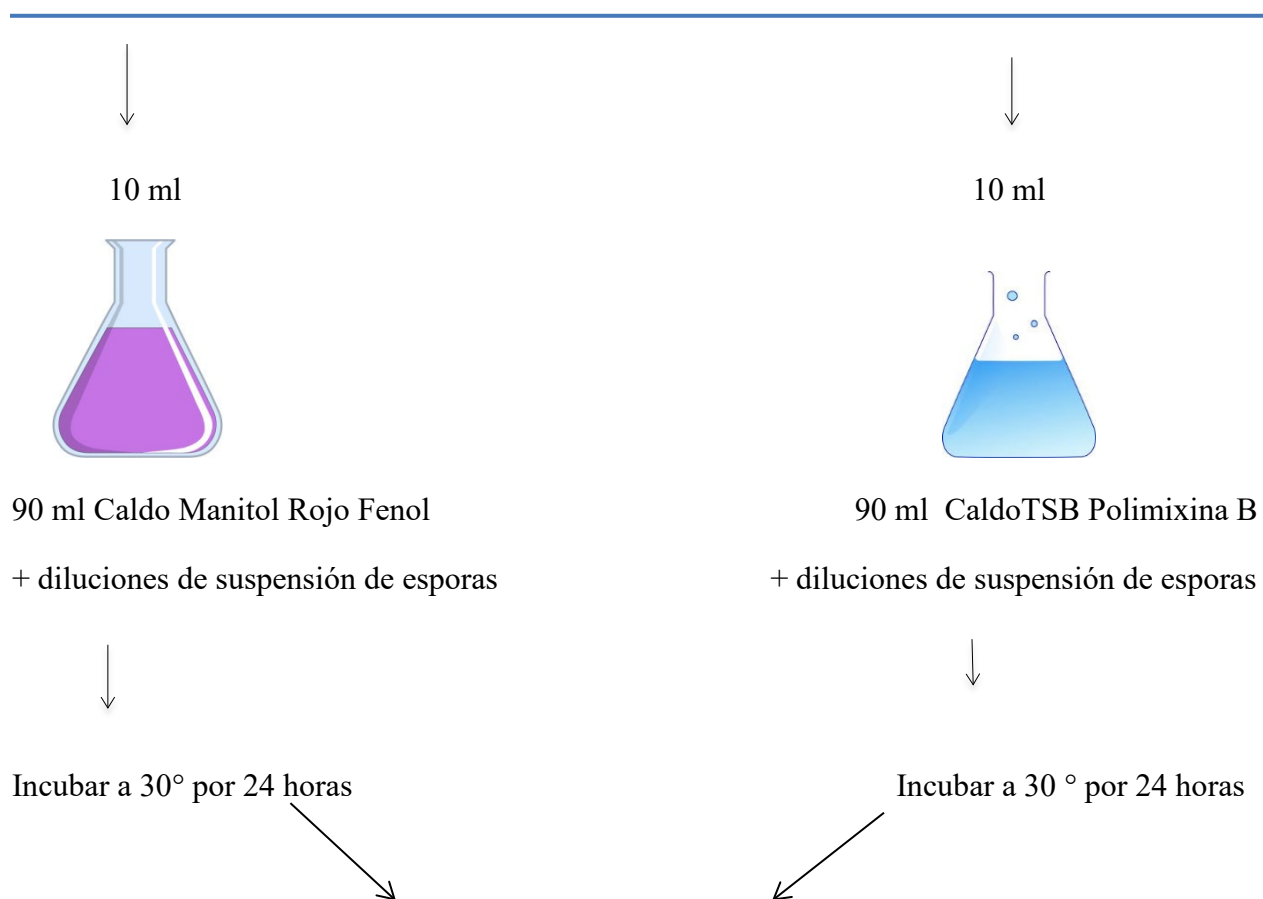
2 ml tween 80+ 16 ml Caldo Leethen Modificado (MLB)

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016



Extracción de DNA y Real Time PCR según Ji Su Lim *et al.*, 2011 (1) and Kamila Oliwa- Stasiak *et al*, 2011; (2).

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016



Secuencias de los oligonucleotidos usados en este estudio

Oligonucleotido	Secuencia (5'-3')
BCFomp2	CGCCTCGTTGGATGACG
BCRomp2	GATATACATTCACTTGACTAATACCG
MotB-FAM-1	FAM-TTCAAGCATCTTTGACAATTTTACTGCAT-BBQ



y Aislamiento en BACARA™ Chromogenic Media (BAM) (3; 4)



La identificación bioquímica VITEK® 2 bioMérieux.

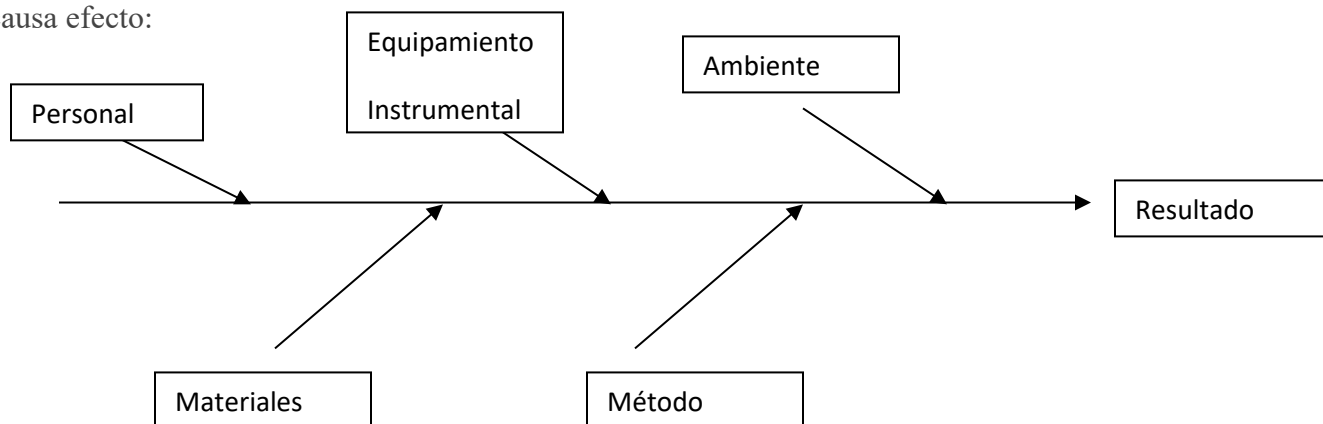
Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

También se evaluaron las fuentes de incertidumbre del ensayo en base al diagrama de Ishikawa causa efecto:



Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

Para mantener todos los factores que afectan la incertidumbre del método bajo control, se establecieron programas de calibraciones para termómetros, material volumétrico, balanzas, pesas y se realizaron perfiles térmicos de incubadoras para garantizar la estabilidad y homogeneidad de la temperatura de incubación.

Se realizó una verificación preliminar del método aplicando LOD (Limite de Detección) según: www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/Pubs/DEMO.xls. La Sensibilidad y Especificidad, fueron determinadas de acuerdo a la GUIA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS GUI-LE-05 Versión: 1 Fecha de entrada en vigencia: 26-junio-2013 del Organismo Argentino de Acreditación a los fines de poder evaluar la aplicabilidad del método de ensayo.

Resultados

Los resultados obtenidos para la PCR a tiempo real se detallan en las Tablas 1 a 5 y en las Figuras 1 a 5.

Tabla 1 Resultados de Real time PCR para *Bacillus* sp en sombra en polvo para ojos

Organismo	UFC/ g de muestra	Medios de cultivo	
		Manitol Polimixina B	TSB Polimixina B
6006 <i>B. cereus</i> emetico	22	(+)	(+)
	9	(+)	(+)

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

	-----	(-)	(-)
49063 B. <i>cereus</i>	19	(+)	(+)
	6	(+)	(+)
	---	(-)	(-)
35866 B. <i>thuringiensis</i>	23	(+)	(+)
	10	(+)	(+)
	----	(-)	(-)
15563 B. <i>subtilis</i>	240	(-)	(-)
	12	(-)	(-)
	--	(-)	(-)

Figura 2 Taqman Real-Time PCR para *Bacillus* sp en sombra para ojos en polvo

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

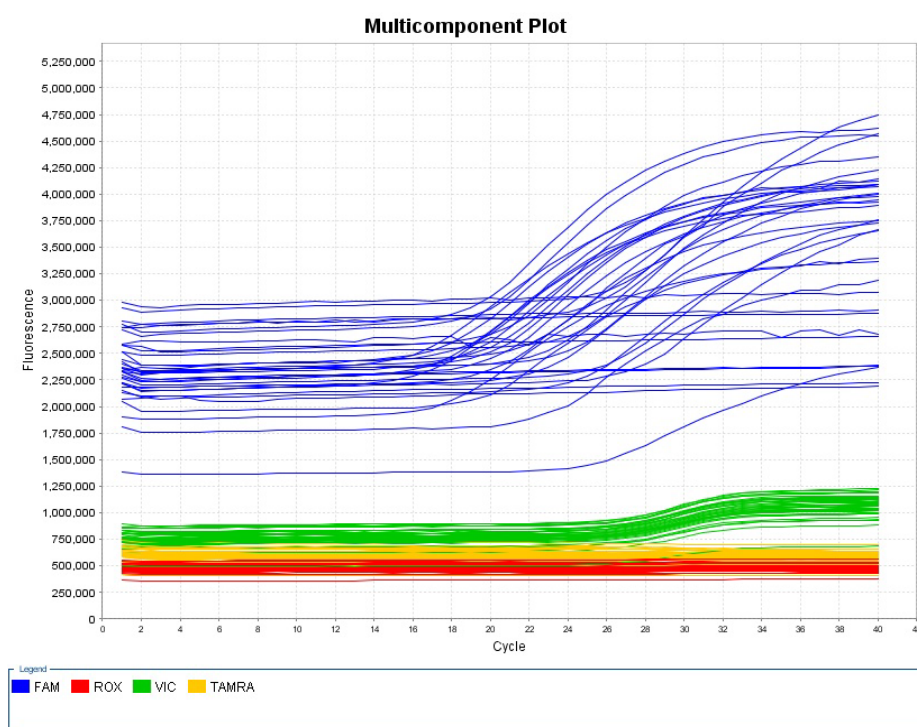


Tabla 2 Resultados Real Time PCR *Bacillus* sp en mascara

Organismo	ufc/ g de mues tra	Medios de cultivo	
		Manitol Polimixina B	TSB Polimixina B
6006 <i>B. cereus</i> emetico	22	(+)	(+)
	9	(+)	(+)
	--	(-)	(-)

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

49063 B. <i>cereus</i>	19	(+)	(+)
	5	(+)	(+)
	--	(-)	(-)
35866 B. <i>thuringiensis</i>	23	(+)	(+)
	10	(+)	(+)
	--	(-)	(-)
15563 B. <i>subtilis</i>	236	(-)	(-)
	117	(-)	(-)
	21	(-)	(-)

Figura 3 Taqman Real-Time PCR para *Bacillus* sp en mascara facial

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

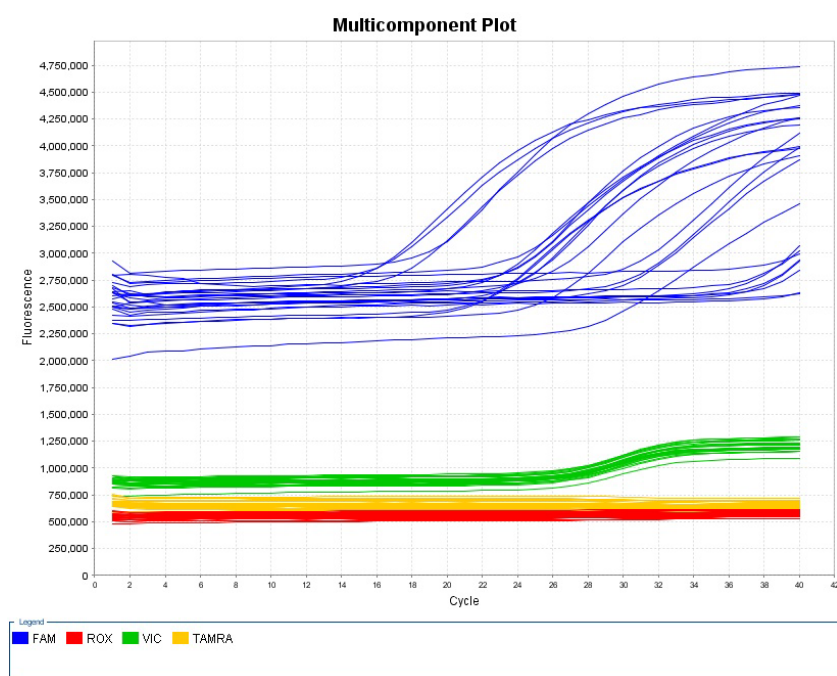


Tabla 3 Resultados de Real time PCR para *Bacillus* sp en delineador

Organism	ufc/ g de muestra	Medios de cultivo	
		Mannitol Polymyxin B	TSB Polymyxin B
6006 B. cereus emetico	22	(+)	(+)
	9	(+)	(+)
	--	(-)	(-)

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

49063 B. <i>cereus</i>	19	(+)	(+)
	5	(+)	(+)
	--	(-)	(-)
35866 B. <i>thuringien sis</i>	23	(+)	(+)
	10	(+)	(+)
	--	(-)	(-)
15563 B. <i>subtilis</i>	236	(-)	(-)
	117	(-)	(-)
	21	(-)	(-)

Figura 4 Taqman Real-Time PCR para *Bacillus* sp en delineador para ojos

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016



Tabla 4 Resultados de Real time PCR para *Bacillus* sp en crema para contorno de ojos

Organism	ufc/ g de mues tra	Medios de cultivo	
		Mannitol Polymyxin B	TSB Polymyxin B
6006 <i>B. cereus</i> emeticus	221	(+)	(+)
	91	(+)	(+)
	10	(+)	(+)

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

49063 B. <i>cereus</i>	193	(+)	(+)
	56	(+)	(+)
	12	(+)	(+)
15563 B. <i>subtilis</i>	236	(-)	(-)
	117	(-)	(-)
	21	(-)	(-)
35866 B. <i>thuringiensis</i>	234	(+)	(+)
	101	(+)	(+)
	17	(+)	(+)

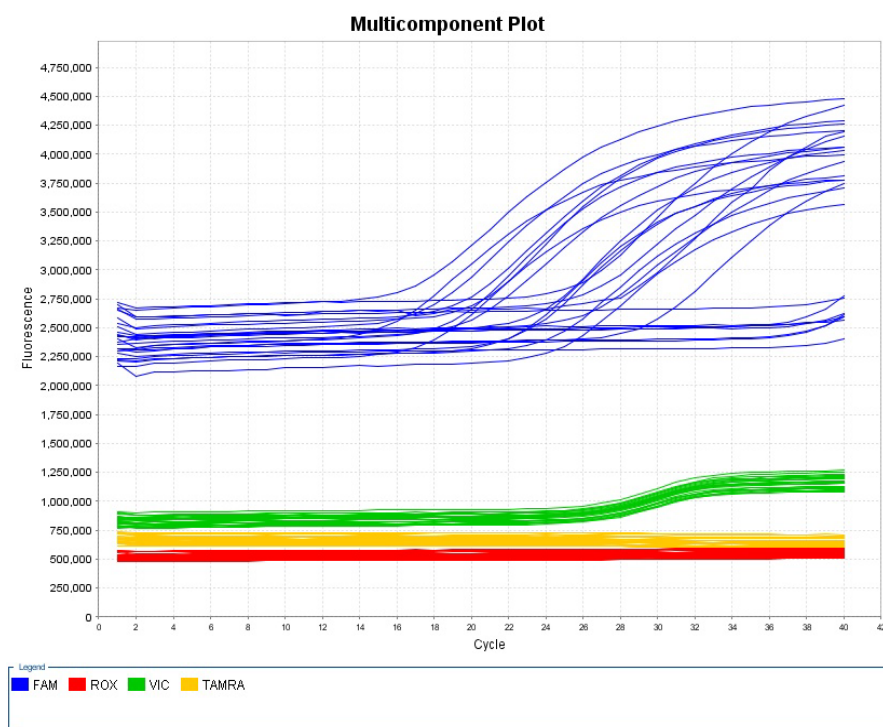
Figure 5 Taqman Real-Time PCR para *Bacillus* sp en delineador para ojos

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016



Todos los microorganismos identificados por VITEK® 2 bioMérieux correspondieron a las especies inoculadas.

El LOD obtenido fue:

Menor a 1 ufc/ g de muestra para delineador para ojos, mascara facial y sombra para ojos. Para crema para contorno de ojos fue de 1 ufc/ g de muestra.

Todos los miembros del grupo de *B. cereus*, probados, fueron detectados (sensibilidad). No fue detectado *Bacillus subtilis* (especificidad).

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron del 100% para todas las matrices ensayadas

Conclusiones:

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta evaluación preliminar del método de screening PCR en tiempo real (PCR-q), *motB* fue efectivo para la detección del grupo *B. cereus* en sombra para ojos en polvo, mascara, crema para contorno de ojos y delineador para ojos.

No se detectaron interferencias en la PCR en tiempo real (PCR-q) en las matrices ensayadas por parte de los componentes de las muestras ni de los medios de cultivos selectivos ensayados de acuerdo a los controles internos de amplificación.

Con respecto al método convencional de cultivo según BAM, la incorporación de medios de enriquecimiento selectivo (Caldo Manitol Rojo Fenol y Caldo TSB Polimixina B permitieron una recuperación adecuada del grupo *Bacillus cereus*.

Referencias

- (1) Ji Su Lim, Mi Ra Kim, Won Kim, and Kwang Won Hong, (2011) Detection and Differentiation of Non- Emetic and Emetic *Bacillus cereus* Strains in Food by Real-Time PCR. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. **54** (1), 105-111.
- (2) Kamila Oliwa- Stasiak, Olga Kolaj-Robin and Catherine C. Adley. (2011) Development of Real Time PCR Assays for Detection and Quantification of *Bacillus cereus* Group Species: Differentiation of *B. weihenstephanensis* and Rhizoid *B. pseudomycoides* Isolates from Milk. Appl. Environ. Microbiol. **77** (1):80.
- (3) FDA, Bacteriological Analytical Manual. Chapter 23 Microbiological Methods for Cosmetics, 2001.

Especialización Calidad Industrial

Trabajo Final Integrador: Investigación de *Bacillus cereus* en cosméticos

María Cristina Fernández

2016

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm073598.htm>

(4) FDA, Bacteriological Analytical Manual. Chapter 14, *Bacillus cereus*, 2012.

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070875.htm>