

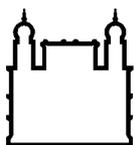
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
LABORATÓRIO DE FISILOGIA BACTERIANA

Doutorado em Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Biodiversidade e Saúde

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS PERTENCENTES
AO GRUPO *Bacillus cereus* lato sensu ISOLADAS NO BRASIL:
FILOGENIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXIGÊNICO
E DE VIRULÊNCIA

Jeane Quintanilha Chaves

Rio de Janeiro
Julho/2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
LABORATÓRIO DE FISILOGIA BACTERIANA
Programa de Pós-Graduação em *Stricto sensu* em
Biodiversidade e Saúde

JEANE QUINTANILHA CHAVES

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS PERTENCENTES AO GRUPO *Bacillus cereus* lato sensu ISOLADAS NO BRASIL: FILOGENIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXIGÊNICO E DE VIRULÊNCIA

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Saúde

Orientador: Prof. Dr. LEON RABINOVITCH

RIO DE JANEIRO

Julho/2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

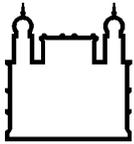
C512 Chaves, Jeane Quintanilha

Caracterização de linhagens pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* lato sensu isoladas no Brasil: filogenia e avaliação do potencial toxigênico e de virulência / Jeane Quintanilha Chaves. – Rio de Janeiro, 2015.
xv,113 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2015.
Bibliografia: f. 93-112

1. *Bacillus cereus* l.s.. 2. Enterotoxinas. 3. Fatores de virulência. 4. Rep-PCR. 5. Tipagem molecular. I. Título.

CDD 579.362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
LABORATÓRIO DE FISILOGIA BACTERIANA
Programa de Pós-Graduação em *Stricto sensu* em
Biodiversidade e Saúde

AUTOR: JEANE QUINTANILHA CHAVES

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS PERTENCENTES AO GRUPO *Bacillus cereus*
lato sensu ISOLADAS NO BRASIL: FILOGENIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
TOXIGÊNICO E DE VIRULÊNCIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. LEON RABINOVITCH

Aprovada em: 29 / 07 / 2015

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Viviane Zahner (IOC/FIOCRUZ) **Presidente**

Prof. Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza (UFRJ)

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade (UERJ)

SUPLENTE:

Prof. Dra. Adriana Marcos Vivoni (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 29 de Julho de 2015

Aos meus pais, Albertina Quintanilha Chaves e José Ribamar Chaves pelo carinho e dedicação e pelos sábios ensinamentos e minha querida irmã Luciane pelo incentivo e atitudes sempre carinhosas.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Leon Rabinovitch, pela orientação e apoio, pelas condições de trabalhos oferecidas, pelos ensinamentos constantes, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho e principalmente pela amizade.

À Dra. Adriana Marcos Vivoni, pelo carinho, por sua amizade, pela prestatividade e imensa boa vontade em compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio nas análises de sequenciamento genético e pela ajuda inestimável nas análises estatísticas.

À Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados, pelo carinho e amizade e pela confiança.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, Edmar Justo, Josiane, Vera, Sônia, Danielle, Cláudio, Vitor Hugo, Ronaldo pela colaboração, incentivo e amizade.

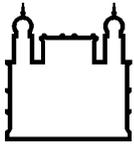
Aos funcionários e colegas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz por toda atenção dispensada.

Ao coordenador Dr. Cleber Galvão e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, pela oportunidade.

A secretaria do curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde pela atenção dispensada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

Cumpre-me agradecer a todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente contribuíram e me apoiaram ao longo deste percurso para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

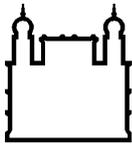
CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS PERTENCENTES AO GRUPO *Bacillus cereus* lato sensu ISOLADAS NO BRASIL: FILOGENIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXIGÊNICO E DE VIRULÊNCIA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Jeane Quintanilha Chaves

Neste estudo, foram analisadas 167 cepas [82 *B. thuringiensis* (*Bt*), 70 *B. cereus* (*Bc*) e 15 *B. mycoides*], isoladas no Brasil e provenientes de diversas origens. Foram avaliados alguns aspectos fenotípicos, tais como, a capacidade de motilidade, atividade hemolítica, produção de lecitinase e hidrólise do amido, bem como, genótipos relacionados ao potencial toxigênico e de virulência. A maioria das estirpes produziu enzimas extracelulares, tais como, amilase e lecitinases, o que ressalta o potencial deteriorante dessas espécies. A motilidade e a atividade hemolítica apresentaram proporções semelhantes nas cepas analisadas. A maioria das estirpes (155, 93%) foi β -hemolítica. A expressão dos genes toxigênicos e de virulência foram investigados através da PCR. De acordo com a ocorrência dos genes das enterotoxinas e da toxina emética, as cepas selecionadas foram divididas em 7 perfis toxigênicos. O perfil predominante, o perfil I, incluiu 119 cepas (71%) que foram positivas para todos os genes das enterotoxinas. As enterotoxinas HBL e NHE foram detectadas em 143 (86%) e 164 (98%) das cepas, respectivamente. Todas as cepas possuem genótipo positivo para *entFM*. O gene da *cytK-2* estava presente em 134 cepas (80%). Todas as cepas foram negativas para os genes *cytK-1* e *ces*. Na distribuição dos fatores de virulência, o perfil predominante, o perfil I, (20%, 34/167) incluiu cepas positivas para todos determinantes hemolíticos, sendo divididos em 24 perfis. Entre os genes de virulência a *hlyIII* foi o mais prevalente (130/78%). O gene *piplc* foi encontrada em 112 cepas (67%) e o gene *pcplc* em 118 cepas (71%). Já o gene *sph* foi detectado em 76 estirpes (45%). O gene menos comum, a *hlyII* foi detectada em 69 das estirpes (41%). Para ambos os perfis, a espécie *Bt* apresentou alta prevalência desses genótipos. Somente o genótipo mesofílico (gene *cspF*) foi detectado nas cepas selecionadas. Além das 28 cepas que amplificaram todos os fatores de virulência (20 *Bt* e 8 *Bc*), 12 cepas (3 *Bt* e 9 *Bc*) foram selecionadas randomicamente entre as 167 estirpes, as quais foram submetidas a caracterização genotípica por rep-PCR e MLST. Através da análise do rep-PCR, observa-se que a distribuição das sequências rep-PCR em *Bt*, tende a ser menos variáveis, havendo uma propensão para o agrupamento dos perfis eletroforéticos específicos de cepas de *Bt*, não sendo a mesma orientação apresentada pelas cepas de *Bc*, que demonstraram perfis altamente polimórficos. O MLST permitiu caracterizar e observar as relações filogenéticas entre as estirpes selecionadas agrupando-as em 20 STs, com 17 dos STs apresentando perfis alélicos novos (ST156 a ST170). A análise por MLST demonstrou que as cepas de distintas fontes compartilham origens clonais comuns surgindo de diferentes grupos filogenéticos. A expressiva distribuição dos determinantes de virulência observada entre as cepas estudadas atesta o dinamismo e o alto potencial toxigênico e deteriorante, fatos que provavelmente contribuem para entender a epidemiologia e a biodiversidade das espécies que compõem o *B. cereus* l.s.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF STRAINS BELONGING TO *Bacillus cereus* lato sensu GROUP ISOLATED IN BRAZIL: PHYLOGENY AND ASSESSMENT OF TOXIGENIC AND VIRULENCE POTENCIAL

ABSTRACT

PhD THESIS IN: BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Jeane Quintanilha Chaves

In this study, 167 isolates [82 *B. thuringiensis* (*Bt*), 70 *B. cereus* (*Bc*) and 15 *B. mycoides*], isolated in Brazil from diverse sources were analyzed. Some phenotypic aspects such as motility, hemolytic activity, lecithinase production and hydrolysis of starch, as well as toxigenic and virulence genotypes were evaluated. Most isolates produced extracellular enzymes, such as amylase and lecithinases, which emphasizes the spoilage potential of these species. Motility and hemolytic activity were found in similar proportions among the isolates analyzed. The majority of the isolates (155, 93%) were β -hemolytic. Detection of toxigenic and virulence factors were investigated by PCR. According to the occurrence of genes encoding enterotoxins and the emetic toxin, the isolates were divided into 7 toxigenic patterns. The predominant toxigenic pattern was type I (119, 71%) which included isolates positive for all toxin genes but *ces*. The nonhemolytic enterotoxin (NHE) was found in 164 isolates (98%) positive for the three genes (*nheA*, *nheB*, *nheC*). All isolates were positive for *entFM*. Enterotoxigenic HBL complex (*hblA*, *hblC* and *hblD*) was found in 143 (86%) isolates. The *cytK-2* gene was present in 134 (80%) isolates. All isolates were negative for *cytK-1* gene. For the additional virulence factors analyzed, 24 patterns were observed and the predominant pattern was type I (20%, 34/167) which included isolates positive for all hemolytic genes. Among the additional virulence genes studied *hlyIII* was the most prevalent and was found in 130 (78%) isolates. *pipIc* was found in 112 (67%) isolates and *pcplc* in 118 (71%) isolates. *sph* was detected in 76 (45%) isolates. Far less common, *hlyII* was detected in 69 (41%) of the isolates. For both, toxigenic and virulence patterns, *Bt* lineages showed high prevalence of genotypes including the highest numbers of genes. Only the mesophilic genotype (gene *cspF*) was detected in the isolates. The isolates that amplified all virulence determinants (20 *Bt* and 8 *Bc*) and 12 isolates (3 *Bt* and 9 *Bc*) randomly selected were genotyped by rep-PCR and MLST. By rep-PCR analysis, it was observed that the distribution of rep-PCR sequences in *Bt*, tend to be less variable, there is a tendency for clustering of specific electrophoretic profiles of *Bt* isolates, which was far less common for *Bc* isolates and demonstrated highly polymorphic profiles. MLST allowed observing the phylogenetic relationships among the 40 isolates selected, grouping them into 20 STs, with 17 of STs assigned new allelic pattern (ST156 to ST170). The MLST analysis demonstrated that the isolates from distinct sources share common clonal origin located in different phylogenetic groups. The significant distribution of virulence determinants observed among isolates studied attests to the dynamism and the high toxigenic and spoilage potential among the isolates, facts that probably contribute to understand the epidemiology and the biodiversity of species that comprise the *B. cereus* l.s.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 - Gênero <i>Bacillus</i>	1
1.2 - Grupo <i>Bacillus cereus</i>	5
1.2.1 - <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
1.2.2 - <i>Bacillus cereus</i>	8
1.2.3 - <i>Bacillus mycoides</i>	11
1.2.4 - <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	12
1.2.5 - <i>Bacillus cytotoxicus</i>	13
1.2.6 - <i>Bacillus anthracis</i>	14
1.3 - Patogenicidade do Grupo do <i>B. cereus</i>	15
1.3.1 - Adesão e Resistência à Fagocitose	15
1.3.2 - Enterotoxinas	15
1.3.3 - Toxina Emética	17
1.3.4 - Hemolisinas	18
1.3.5 - Fosfolipases	21
1.4 - Ocorrência e Detecção de Genes Associados à Produção de Enterotoxinas e Fatores de Virulência nas Espécies do Grupo <i>Bacillus cereus</i>	23
1.5 - Tipagem Molecular para Caracterização das Espécies do Grupo <i>B. cereus</i>	32
2 OBJETIVOS	39
2.1 - Objetivo Geral	39
2.2 - Objetivos Específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 - Aspectos Bioquímicos	40
3.1.1 - Cepas Bacterianas Empregadas e suas Procedências	40
3.1.2 - Detecção de Enzimas Extracelulares, Atividade Hemolítica e Motilidade Bacteriana	40

3.1.2.1 - Hidrólise do Amido	40
3.1.2.2 - Produção da Lecitinase	41
3.1.2.3 - Produção de Hemólise	41
3.1.2.4 - Teste de Motilidade	42
3.2 - Detecção de Genes Codificadores de Enterotoxinas, Fatores de Virulência, Proteína de Choque Frio e da Assinatura Específica do DNA ribossomal 16S do Gene <i>rrs</i> através da Reação em Cadeia da Polimerase	42
3.2.1 - Extração do DNA através de Lise Térmica	42
3.2.2 - Detecção Simultânea dos Genes das Enterotoxinas e Citotoxina K	42
3.2.3 - Detecção de Genes Codificantes de Fatores de Virulência	44
3.2.4 - Caracterização Genotípica de Cepas de <i>B. thuringiensis</i> e <i>B. cereus</i> Psicrotróficas	45
3.2.4.1 - Detecção dos Genes <i>cspA</i> e <i>cspF</i>	45
3.2.4.2 - RFLP-PCR para a Assinatura Específica do DNAr 16S do Gene <i>rrs</i>	45
3.3 - Genotipagem	48
3.3.1 - Caracterização Genotípica por Rep-PCR	48
3.3.2 - Caracterização Genotípica por MLST	48
3.3.2.1 - Amplificação dos Genes Alvo Através de PCR	49
3.3.2.2 - Análise das Sequências	50
4 RESULTADOS	51
4.1 - Aspectos Bioquímicos	51
4.2 - Distribuição dos Genes que Codificam Fatores de Virulência e Toxigênicos	53
4.3 - Presença dos Genótipos <i>cspA</i> , <i>cspF</i> e <i>rrs</i> nas Espécies <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. mycooides</i>	60
4.4 - Tipagem de Sequências Repetitivas (Rep-PCR)	61
4.5 - Análise das Sequências de Multilocus (MLST)	66
5 – DISCUSSÃO	70
6 – CONCLUSÕES	92
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
8 - ANEXO	113

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Microscopia eletrônica de transmissão de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*: (A) Cristais proteicos (CP), corte transversal de esporângio (CTE); (B) Esporângio: nucleóide do esporo (N), exosporium (Ex), capa externa (CE), capa interna (CI), parede celular (PC) e membrana citoplasmática (MC); (C) Célula vegetativa (CV); (D) Esporângio com endósporo central no formato cilíndrico, as setas indicam lise celular. Cepa pertencente à CCGB/LFB/IOC. Imagens realizadas na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, IOC/FIOCRUZ. 2
- Figura 2:** Microscopia eletrônica de transmissão de esporângio de *B. thuringiensis*, revelando o esporo cilíndrico não deformante (E) e a inclusão para-esporal (cristal proteico) (CP). Cepa pertencente à CCGB/LFB/IOC. Imagem realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, IOC/FIOCRUZ. 7
- Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão de esporângio de *Bacillus cereus*, revelando o endósporo cilíndrico subterminal (E). Cepa pertencente à CCGB/LFB/IOC. Imagem realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, IOC/FIOCRUZ. 8
- Figura 4:** Cultivo em meio de cultura sólido demonstrando colônia com crescimento rizoide característico do *B. mycoides* (<http://exploringtheinvisible.com>). 12
- Figura 5:** Microscopia óptica comum demonstrando cadeias de células de *B. anthracis*, com extremidades em ângulo reto. Os endósporos e esporos livres não deformantes revelam-se na forma elipsoidal preponderantemente e estão localizados na posição predominantemente central ou para-central no esporângio (<http://textbookofbacteriology.net>). 14
- Figura 6:** Representação da estrutura tridimensional do componente B da hemolisina BL (Banco de Dados de Proteínas, PDB ID: 2NRJ). Foi proposto que o domínio α / β na região inferior da molécula (“Head” Domain) liga e insere-se na membrana de células susceptíveis. (Reproduzido de Madegowda *et al.*, 2008). 16
- Figura 7:** Comparação da estrutura tridimensional das proteínas HBL, NHE e ClyA. (a) Estrutura do componente B do complexo HBL (b) Modelo de homologia do componente NheB (c) Modelo de homologia do componente NheC (d) Estrutura da hemolisina E (ClyA) de *E. coli* (e) Alinhamento estrutural visualizado como uma superposição do componente B da HBL e a hemolisina E. (Reproduzido de Fagerlund *et al.*, 2008). 17
- Figura 8:** Representação da estrutura química da toxina emética. Ionóforo de potássio (Cortesia do Prof. M.S. Salkinoja-Salonem & Raimo Mikkola). 17

Figura 9:	Representação esquemática do regulon transcricional <i>PlcR</i> e o peptídeo de sinalização célula-célula <i>PapR</i> . Este esquema demonstra a expressão dos fatores de virulência extracelulares modulado pelo regulador pleiotrópico <i>PlcR</i> (Reproduzido de Ramarao & Sanchis, 2013).	19
Figura 10:	Informação estrutural e o mecanismo de ação propostos para as moléculas PC-PLC (a), PI-PLC (b), revelam a lise celular através da atividade enzimática e o complexo HBL (c), pela formação de poros na respectivas membranas. (Reproduzido de Celandroni <i>et al.</i> , 2014).	22
Figura 11:	Distribuição dos fatores de virulência e toxigênicos entre as espécies <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. mycoides</i> analisadas.	58
Figura 12:	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RFLP-PCR do gene <i>rrs</i> de <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i> .	60
Figura 13:	Perfis do polimorfismo de Rep-PCR das cepas de <i>B. cereus</i> amplificados pelos iniciadores Bc-rep-1 e Bc-rep-2 em gel de agarose 1,2%.	63
Figura 14:	Perfis do polimorfismo de Rep-PCR das cepas de <i>B. thuringiensis</i> amplificados pelos iniciadores Bc-rep-1 e Bc-rep-2 em gel de agarose 1,2%. As setas indicam os distintos perfis eletroforéticos.	64
Figura 15:	Dendrograma das cepas de <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i> selecionadas determinado pelo método de agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética (UPGMA) e coeficiente de similaridade de Dice com correlação de 80%.	65
Figura 16:	Árvore filogenética construída utilizando-se o método <i>Neighbour-Joining</i> (NJ) gerado a partir das sequências concatenadas dos 20 perfis alélicos identificados nesse estudo. O nível de confiança de porcentagem <i>bootstrap</i> foi calculado usando 1000 repetições dos dados originais. As setas indicam as distintas origens filogenéticas.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Ocorrência (em %) dos fenótipos e genótipos testados entre as espécies de <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. mycoides</i> coletadas de distintas fontes de isolamento.	52
Tabela 2:	Perfis toxigênicos determinados através do PCR presentes nas espécies <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. mycoides</i> .	55
Tabela 3:	Perfis de virulência determinados através do PCR presentes nas espécies <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. mycoides</i> .	56
Tabela 4:	Distribuição dos fatores de virulência e toxigênicos presente nas espécies <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. mycoides</i> com relação as fontes de origens.	57
Tabela 5:	Ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência nas três espécies do grupo do <i>B. cereus</i> proveniente de distintas fontes de isolamento.	59
Tabela 6:	Números dos alelos, sequência tipos, perfil toxigênico, perfil de virulência e perfil rep-PCR designados para cepas selecionadas.	67

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1:	Sequências e afiliações dos iniciadores utilizados neste estudo.	47
Quadro 2:	Genes, iniciadores e sequências utilizados na MLST-PCR.	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>adk</i> -	Adenilato quinase	MgSO ₄ .7H ₂ O -	Sulfato de Magnésio hepta-hidratado
AFLP -	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos Amplificados	MLEE -	Eletroforese de isoenzimas
BHI -	Infusão Cérebro e Coração	MLST -	Tipagem de sequências multilocus
°C -	Graus Celsius	NaCl -	Cloreto de Sódio
<i>ces</i> -	Cereulida	NHE -	Hemolisina não hemolítica
CCGB -	Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos	ng -	Nanograma
<i>ccpA</i> -	Proteína A controle metabólico	OPAS -	Organização Pan-Americana da Saúde
CDC -	Citolisinas colesterol-dependente	<i>panC</i> -	pantotenato beta-alanina ligase
<i>clo</i> -	Cereolisina O	pb -	Pares de bases
<i>cspA</i> -	Proteína do choque térmico A	PapR -	Peptídeo de sinalização
<i>cspF</i> -	Proteína do choque térmico F	<i>pc-plc</i> -	Fosfolipase C específica para fosfatidilcolina
<i>cytK</i> -	Citotoxina K	PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA -	Ácido desoxirribonucleico	PFGE -	Eletroforese em campo pulsado
DNAr -	DNA ribossomal	pH -	Potencial de hidrogênio
dNTPs -	Desoxiribonucleotídeos Trifosfatos	<i>pi-plc</i> -	Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético	PlcR -	Regulador transcricional pleiotrópico
ETA -	Enfermidades Transmitidas por Alimentos	<i>pta</i> -	Fosfato acetiltransferase
<i>entFM</i> -	Enterotoxina FM	p/v -	Peso por volume
FIOCRUZ -	Fundação Oswaldo Cruz	<i>pycA</i> -	Piruvato carboxilase
<i>glpF</i> -	Glicerol proteína de absorção	q.s.p. -	Quantidade suficiente para
<i>glpT</i> -	Glicerol 3-fosfato permease / transportador	rep-PCR -	Polimorfismo de elementos repetitivos
g/L -	Gramas por litro	RFLP -	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
h -	Hora	RNA -	Ácido ribonucleico
HBL -	Hemolisina BL	RNAr -	RNA ribossomal
HlyII -	Hemolisina II	RPM -	Rotações por minuto
HlyIII -	Hemolisina III	s -	Segundos
IOC -	Instituto Oswaldo Cruz	<i>sph</i> -	esfingomielinase
LFB -	Laboratório de Fisiologia Bacteriana	<i>SspI</i> -	<i>Sphaerotilus</i> species (ATCC 13925)
Kb -	Kilo bases	ST -	<i>Sequence Type</i>
MgCl ₂ -	Cloreto de Magnésio	T -	Temperatura
mg -	Miligrama	<i>taq</i> -	<i>Thermus aquaticus</i>
min -	Minutos	TBE -	Tris-Borato EDTA
mL -	Mililitros	TE -	Tris-EDTA

μg - Micrograma

μL - Microlitros

μM - Micromolar

mm - Milímetros

mM - Milimolar

U - Unidades

UPGMA - Agrupamento pelo método pareado não ponderado baseado na média aritmética

UV - Ultravioleta

V - Volts

% - Porcentagem

1 INTRODUÇÃO

1.1 - Gênero *Bacillus*

No presente, microrganismos do Domínio Bactéria em forma de bastonetes, aeróbios ou aeróbios facultativos, que produzem endósporos resistentes ao calor e que são, geralmente, Gram-positivos, são incluídos na Classe III: *Bacilli*, da Ordem I: *Bacillales*, Família I: *Bacillaceae* (Logan & De Vos, 2009). Como integrantes do atual Filo Firmicutes, a Família I: *Bacillaceae* e o Gênero I: *Bacillus* passaram a compartilhar posições taxonômicas com outros gêneros, alguns relativamente novos, como *Amphibacillus* (Niimura et al, 1990), *Gracilibacillus* (Waino et al, 1999), *Halobacillus* (Spring et al, 1996), *Paenibacillus* (Shida et al, 1997), *Brevibacillus* (Shida et al, 1996), *Salibacillus* (Waino et al, 1999) e *Virgibacillus* (Heyndrickx et al, 1999).

Bacillus formam um extenso grupo taxonômico com diversas características fenotípicas e genotípicas, integrado por muitas espécies consideradas, na sua maioria, não patogênicas. Compreendem bactérias em geral quimioheterotróficas, comumente encontradas no solo, água, vegetais, poeiras e ar. Por outro lado, são consideradas alóctones, ou seja, não são membros naturalmente residentes na microbiota gastrointestinal do homem (Gordan et al, 1974; Claus & Berkeley, 1986; Logan & De Vos, 2009).

Suas células vegetativas, quando em condições específicas, em geral desfavoráveis desenvolvem um ciclo de esporulação típico de *Bacillus* e gêneros correlatos e que os esporos podem ser de formatos variados como, por exemplo, cilíndricos, elípticos e esféricos preponderando na população de células da espécie. Podem estar localizados na região central, subterminal ou terminal da célula, também de modo preponderante (Figura 1). Estes esporos bacterianos não exibem atividade metabólica e representam uma fase altamente resistente contra um ambiente adverso (Claus & Berkeley, 1986; Logan & De Vos, 2009).

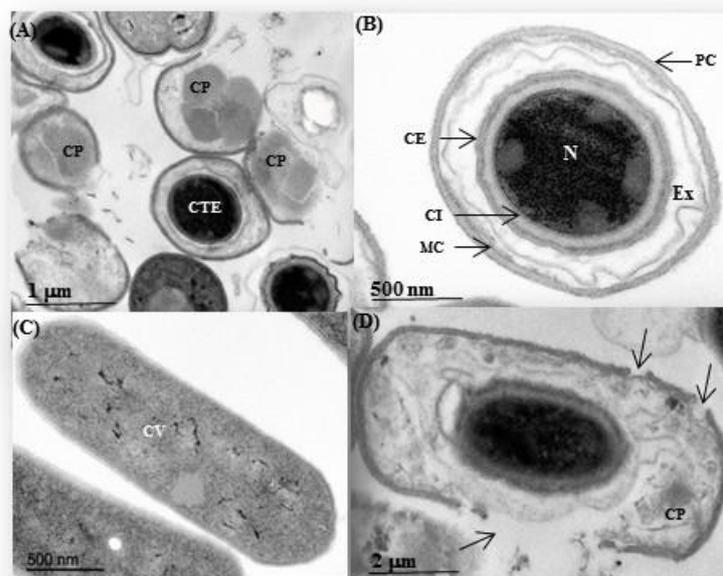


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*: (A) Cristais proteicos (CP), corte transversal de esporângio (CTE); (B) Esporângio: nucleoide do esporo (N), exosporium (Ex), capa externa (CE), capa interna (CI), parede celular (PC) e membrana citoplasmática (MC); (C) Célula vegetativa (CV); (D) Esporângio com endósporo central no formato cilíndrico, as setas indicam lise celular. Cepa pertencente à CCGB/LFB/IOC. Imagens realizadas na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, IOC/FIOCRUZ.

O peptidoglicano, da maioria das espécies do gênero, possui ligação cruzada dos polímeros de mureína *meso*-DAP (ácido meso-diaminopimélico) sendo este o mais comum, porém outros polímeros como L-Lys-D-Glu, Orn-D-Glu e L-Orn-D-Asp têm sido ocasionalmente reportados (Claus & Berkeley, 1986; Logan & De Vos, 2009). As células vegetativas possuem flagelos em geral peritríquios ou peritríquios modificados (filamentos axiais, localizados ao longo do eixo da célula abaixo da membrana externa, normalmente usados na locomoção em meio líquido), os quais apresentam antígenos que auxiliam na taxonomia, por proporcionar o estabelecimento de sorotipos e sorovares dentro das espécies (De Barjac et al, 1990; Logan & De Vos, 2009).

As bactérias deste gênero são aeróbicas ou aeróbicas facultativas, porém algumas espécies são descritas como estritamente aeróbicas. O metabolismo pode ser respiratório, fermentativo ou ambos, usando vários substratos, orgânicos e inorgânicos (Claus & Berkeley, 1986). O acceptor terminal de elétrons é o oxigênio, substituível em algumas espécies por vias respiratórias alternativas. Inúmeras espécies deste gênero fermentam carboidratos na ausência de aceptores de elétrons exógenos, podendo utilizar o nitrato na ausência de oxigênio (Claus & Berkeley, 1986; Logan & De Vos, 2009).

Diversas espécies crescem em meio de cultivo de rotina como Ágar Nutriente, Ágar Triptona de Soja e o Ágar Sangue. A morfologia colonial e o tamanho dos bastonetes variam entre e dentro das espécies. Este gênero possui ampla diversidade nas propriedades fisiológicas, variando de psicrotrófico ao termófilico, e do acidófilico ao alcalifílico; algumas cepas são tolerantes ao sal outras são halofílicas (Logan & De Vos, 2009).

Na “*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*” elaborada pelo pesquisador J.P. Euzéby, há no gênero *Bacillus* atualmente 301 espécies e 7 subespécies descritas, conforme a *homepage* <http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html>. Existem efetivamente 178 espécies aceitas e, a partir dos anos 2000, um grande número de espécies, 123, foi incluído neste gênero.

As reclassificações no gênero *Bacillus* foram baseadas, sobretudo, em análises comparativas das sequências de RNA ribossomal 16S e 23S. Ash et al. (1991) utilizaram a análise sequencial do RNAr 16S de 51 espécies de *Bacillus* definindo 5 grupos filogenéticos. Nielsen et al. (1994) descreveram subsequentemente um sexto grupo pertencente aos *Bacillus* alcalófilos. Atualmente, a família *Bacillaceae* inclui o gênero *Bacillus* e outros 18 gêneros (Logan & De Vos, 2009).

A organização desse gênero se iniciou em 1992 com a formação da família *Alicyclobacillus* (Wisotzkey et al, 1992) que agrupou 3 espécies acidófilas e termófilas. Posteriormente, foram propostos e validados outros gêneros na família *Bacillaceae*, incluindo: *Aneurinibacillus* e *Brevibacillus* (Shida et al, 1996), *Gracilibacillus* e *Salibacillus* (Waino et al, 1999), *Geobacillus* (Nazina et al, 2001), *Marinibacillus* (Yoon et al, 2001), *Paenibacillus* (Shida et al, 1997), *Ureibacillus* (Fortina et al, 2001), *Virgibacillus* (Heyndrickx et al, 1998) e *Lysinibacillus* (Ahmed et al, 2007), todos os gêneros propostos com, pelo menos uma espécie, inicialmente pertencente ao gênero *Bacillus*. O gênero *Amphibacillus* (Niimura et al, 1990), *Filobacillus* (Schlesner et al, 2001), *Jeotgalibacillus* (Yoon et al, 2001) e *Halobacillus* (Spring et al, 1996) são igualmente constituídos de bacilos Gram-positivos, esporulados, aeróbios ou aeróbios facultativos.

Os bastonetes são geralmente saprófitos e não patogênicos para os animais. A espécie de maior potencial patogênico é o *B. anthracis*, agente etiológico do carbúnculo hemático nos animais e no homem, tendo sido imortalizado pelos postulados de Robert Koch (1876).

O gênero *Bacillus* é integrado por bactérias de importância ambiental cujo habitat principal é o solo, onde possuem um papel importante no ciclo do carbono e do nitrogênio. A resistência dos esporos e a diversidade fisiológica das formas vegetativas fazem com que sejam considerados ubíquos, podendo ser isolados de ambientes como o solo, a água, de gêneros alimentícios e espécimes clínicos (Logan & De Vos, 2009).

Certas espécies do gênero *Bacillus* produzem esporos que são hidrófobos, ou seja, aderem fortemente a diversos materiais, resistindo aos procedimentos de limpeza. A resistência dos esporos ao calor, radiação, desinfetantes e dessecação resulta em formas inoportunas que contaminam salas de cirurgias, jalecos cirúrgicos, produtos farmacêuticos e alimentos estocados (Logan & Turnbull, 2003; Logan & De Vos, 2009).

Além das espécies *B. cereus*, frequentemente associados a doenças de origem alimentar e infecções oportunistas, e *B. anthracis*, agente etiológico do carbúnculo hemático, *B. licheniformis* e *B. pumilus* já foram associados a casos de toxinfecções alimentares e outras infecções em animais e no homem, e são conhecidos como contaminantes em processos industriais. O *B. subtilis*, também foi incriminado em episódios de intoxicação alimentar e na deterioração microbiana de alimentos. Estes organismos produzem uma toxina altamente termoestável a qual pode ser similar à toxina do tipo emética produzida pelo *B. cereus* (Logan & De Vos, 2009).

Outro integrante desse gênero é a espécie entomopatogênica, *B. thuringiensis*, que produz inclusões intracitoplasmáticas proteicas cristalinas (protoxinas) durante o processo de esporulação, sendo então amplamente empregado no controle biológico de insetos-praga e insetos vetores de doenças humanas. Estas proteínas possuem atividades tóxicas, após sua digestão, por parte de diferentes grupos de insetos (Schnepf et al, 1998; Rabinovitch et al, 2008).

A produção de proteínas entomotóxicas não é fato único nas espécies que compõem o gênero *Bacillus*. *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Paenibacillus popilliae*, *Brevibacillus laterosporus* e certas linhagens do *Paenibacillus lentimorbus* são capazes de sintetizar tais inclusões proteicas (Shida et al, 1996; Pettersson et al, 1999; Ahmed et al. 2007).

Estudos taxonômicos empregando uma ampla gama de caracteres têm demonstrado ser uma proposta efetiva para a revisão do Gênero *Bacillus*. O primeiro alvo desta pesquisa foi estabelecer relações entre os gêneros e entre as espécies representativas para inúmeras propriedades, usando procedimentos taxonômicos numéricos, particularmente aliados aos métodos moleculares (Logan & De Vos, 2009).

1.2 – Grupo *Bacillus cereus*

Segundo Granum (2005) ao longo dos últimos trinta anos, o gênero *Bacillus* foi expandido para acomodar mais de 100 espécies, e a família *Bacillaceae* foi subdividida em 19 gêneros. O primeiro é o gênero *Bacillus*, onde se encontram os membros do “Grupo *Bacillus cereus*”.

O termo “Grupo *Bacillus cereus*” não é um termo taxonômico, mas tem sido comumente utilizado e refere-se a um grupo de bactérias cuja posição taxonômica tem sido amplamente discutida. Esse grupo, também denominado *B. cereus lato sensu* (l.s.) é composto por sete espécies geneticamente relacionadas que são: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* (Nakamura, 1998), *B. weihenstephanensis* (Lechner et al, 1998) e *B. cytotoxicus* (Guinebretiere et al, 2013).

Estudos genômicos extensivos realizados com linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*, empregando diferentes ferramentas como eletroforese de isoenzimas (MLEE) (Helgason et al, 1998), sequenciamento de genes codificantes de proteínas (Helgason et al, 2000), polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) (Ticknor et al, 2001; Hill et al, 2004a) e a técnica de tipagem de sequências multilocus (MLST) (Helgason et al, 2004), têm sugerido a classificação de *B. thuringiensis* e *B. anthracis* como subespécies da espécie *B. cereus* (Didelot et al, 2009).

Estes estudos estão fundamentados no fato de que a distinção entre estas espécies do grupo *B. cereus* é atribuída essencialmente às características fenotípicas e às propriedades patogênicas, cujos genes que as codificam estão, muitas vezes, localizados em plasmídeos. Esse é o caso da produção do cristal proteico pelas células de *B. thuringiensis* e da produção de toxinas e de cápsula pelas células de *B. anthracis*. Logo, estes determinantes genéticos de patogenicidade podem ser transferidos entre as espécies que compõem o *B. cereus* l.s., principalmente através da transferência horizontal de genes entre as diferentes cepas (Didelot et al, 2009; Kolsto et al, 2009).

As espécies do grupo *B. cereus* compartilham um nível elevado de similaridade genética, de modo que tanto a hibridização DNA-DNA, quanto a análise das sequências do RNAr 16S e 23S (Ash et al, 1991; Ash & Collins, 1992), não conseguiram separar claramente essas taxa que são, conseqüentemente, considerados, para alguns taxonomistas, como variantes de uma única espécie, embora alguns autores reportem que, pelo menos, o *B. anthracis* representa um táxon independente (Radnedge et al, 2003). Portanto, a análise das sequências desses genes pode ser utilizada apenas para caracterizar uma determinada linhagem como pertencente ao grupo *B. cereus*, sem ser capaz de identificar a espécie (Stenfors Arnesen et al, 2008).

Do ponto de vista ecológico, a taxonomia do *B. cereus* l.s. apresenta-se complexa quando consideramos as variações associadas à simbiose, como a virulência espécie-específica (Swiecicka, 2008). Por exemplo, a cereulida, normalmente associada com cepas eméticas de *B. cereus*, também é produzida por algumas estirpes de *B. weihenstephanensis* (Thorsen et al, 2006), enquanto que determinadas cepas de *B. cereus* podem causar sintomas clínicos semelhantes àqueles do antraz pulmonar (Hoffmaster et al, 2004; Hoffmaster et al, 2006; Oh et al, 2011). Outras propriedades atribuídas a determinada espécie podem não ser intrinsecamente exclusivas, como exemplo, a psicrotolerância, característica primária do *B. weihenstephanensis*, que foi relatada entre cepas de *B. thuringiensis* e *B. mycoides* (Bartoszewicz et al, 2009; Soufiane & Cote, 2010).

Dados registrados durante a última década revelaram a importância do meio ambiente no processo de evolução, diversificação e adaptação bacteriana (Connor et al, 2010). O solo, que é o principal nicho ecológico para as espécies do grupo *B. cereus* (Ceuppens et al, 2013), produz condições favoráveis para que estes processos ocorram devido à sua heterogeneidade em nutrientes, pH, umidade e microbiota (Guinebretiere et al, 2008; Raymond et al, 2010).

Assim, os chamados ecótipos, definidos como um grupo coeso de bactérias que são ecologicamente similares entre si e estreitamente relacionadas em nível molecular que evoluíram e proliferaram como resultado da aquisição de determinantes genéticos ou mutações favoráveis que lhes conferiram vantagens seletivas conducentes ao ecossistema ou nicho específico. Deste ponto de vista, os ecótipos representam linhagens evolutivas distintas dentro de uma determinada espécie (Connor et al, 2010).

Diante desses fatos, uma nova estrutura genética do *B. cereus* l.s. foi proposta (Guinebretiere et al, 2008). Esta taxonomia filogenética separa as espécies em sete grupos (I a VII), principalmente com base na capacidade em crescer em diferentes temperaturas. No entanto, nem todas as cepas bacterianas dentro de um mesmo grupo genético têm a mesma capacidade de induzir enfermidade, sendo assim, a distinção entre as estirpes inócuas e patogênicas no grupo *B. cereus* não pode ser feita através dessa metodologia (Guinebretiere et al, 2008).

A ambiguidade taxonômica do grupo ilustra a dificuldade para a definição das espécies bacterianas, logo estudos dos aspectos genômicos e populacionais tornaram-se relevantes para as espécies que compõem o *B. cereus* l.s.

1.2.1 - *Bacillus thuringiensis*

São bactérias Gram-positivas, esporuladas, aeróbias ou aeróbias facultativas, mesófilas e quimioheterotróficas. Suas células vegetativas possuem a forma de bastonete, são geralmente móveis, em função da presença de flagelos peritríquios e, quando em condições específicas, em geral desfavoráveis (baixas concentrações de fontes de carbono e nitrogênio), desenvolvem um ciclo de esporulação típico dos bacilos, com esporos predominantemente cilíndricos, podendo ser elípticos, localizados na região central ou subterminal da célula (Figura 2) (Claus & Berkeley, 1986; Logan & De Vos, 2009).

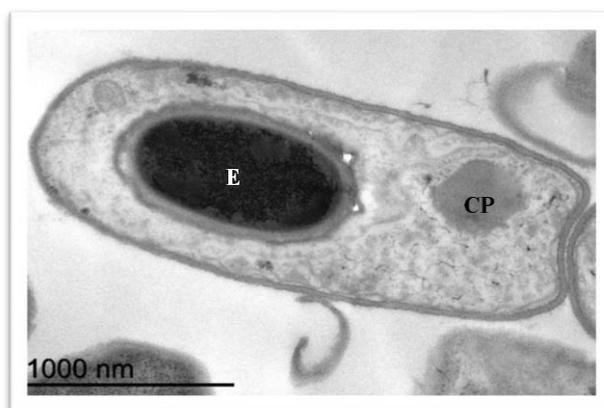


Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão de esporângio de *B. thuringiensis*, revelando o esporo cilíndrico não deformante (E) e a inclusão para-esporal (cristal proteico) (CP). Cepa pertencente à CCGB/LFB/IOC. Imagem realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, IOC/FIOCRUZ.

As células de *B. thuringiensis* produzem inclusões cristalinas proteicas, que conferem atividade entomopatogênica para várias espécies pertencentes a inúmeras ordens de insetos, destacando-se Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera (Schnepf et al, 1998; Lacey, 2007).

Estas proteínas são codificadas por genes que geralmente se localizam em plasmídeos e, com menor frequência, no cromossomo bacteriano (Crickmore, 2006). Esses cristais de proteínas são formados por polipeptídeos denominados δ -endotoxinas que compreendem as toxinas Cry, com atividade inseticida específica, e Cyt, com atividade citolítica inespecífica (Schnepf et al, 1998). A produção desses cristais proteicos representa uma característica típica de *B. thuringiensis* que o diferencia das células de *B. cereus*.

O *B. thuringiensis* possui destaque dentro deste grupo devido à sua importância como agente de controle biológico. De acordo com Charles & Nielsen-LeRoux (2000), o *B. thuringiensis* é o mais bem

sucedido princípio ativo bacteriano que compõem inseticidas (biopesticidas) de importância comercial, sendo os produtos com base nesse ativo responsáveis por 90% do mercado no campo microbiano (Rabinovitch et al, 2008; Bravo et al, 2011).

Suas aplicações para a proteção de plantações e florestas (controle de lagartas desfolhantes), bem como a prevenção de doenças humanas (controle de larvas do *Aedes aegypti*), são práticas realizadas em várias partes do mundo em projetos integrados, visando diminuir o emprego de inseticidas químicos, contra os quais pesa a questão da resistência de insetos. Hoje existem diversos bioinseticidas com base nessa bactéria, disponíveis no mercado mundial (Rabinovitch et al, 2008; Boyce et al, 2013).

1.2.2 - *Bacillus cereus*

São bactérias amplamente encontradas na natureza, sobretudo no solo. Apresenta-se na forma de bastonete, é Gram-positivo aeróbio facultativo, sendo caracterizado pela formação de endósporo (Figura 3). Originalmente descrito como um organismo mesófilo, esta espécie multiplica-se bem na faixa entre 10°C a 50°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento está entre 28°C a 35°C. As células de *B. cereus* desenvolvem-se em alimentos com atividade de água igual ou superior a 0,95 e multiplicam-se na faixa de pH entre 4,3 a 9,3 (Logan & De Vos, 2009).

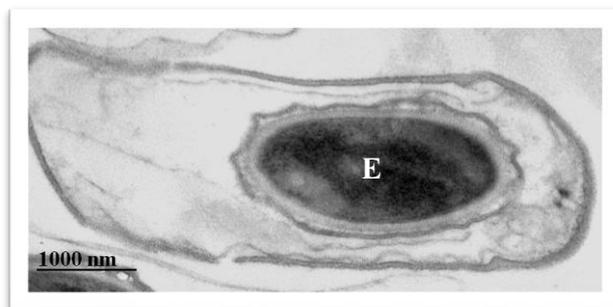


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão de esporângio de *Bacillus cereus*, revelando o endósporo cilíndrico subterminal (E). Cepa pertencente à CCGB/LFB/IOC. Imagem realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, IOC/FIOCRUZ.

Já foram identificadas estirpes psicrotóficas e termodúricas capazes de se multiplicar na faixa entre 3°C e 75°C (Stenfors Arnesen et al, 2008). Os mecanismos de adaptação de *B. cereus* às condições ambientais são diversos e contribuem para sua sobrevivência e disseminação no ambiente (Carlin et al, 2010).

As células de *B. cereus* apresentam motilidade por meio de flagelos peritríquios e os esporos são termorresistentes podendo sobreviver aos processamentos térmicos utilizados principalmente na indústria de alimentos (Aires et al, 2009). Os endósporos de *B. cereus* são resistentes às condições ambientais extremas, tais como altas temperaturas e desidratação. Quando a condição é favorável, os esporos podem germinar e se multiplicar nos alimentos (Abee et al, 2011; Markland et al, 2013).

Comparados aos esporos de outras espécies do gênero *Bacillus*, os esporos de *B. cereus* apresentam maior hidrofobicidade (Araújo et al, 2009). Essa propriedade lhes confere uma capacidade de adesão especialmente elevada em materiais hidrofóbicos. Acredita-se que essa característica promova a formação de biofilmes em materiais utilizados em superfícies de equipamentos, como o aço inoxidável, comumente empregado pelas indústrias de alimentos e afins (Lemon et al, 2008; Mendes et al, 2011; Seminara et al, 2012).

O *B. cereus* também está presente no ambiente hospitalar. Fômites, sistemas de ventilação e roupas de cama, são algumas das fontes de transmissão documentadas de surtos em unidades de terapia intensiva (Bottone, 2010; Ramarao et al, 2014).

A presença de dispositivos invasivos, tais como cateteres intravenosos e umbilicais, sondas urinárias, além de válvulas cardíacas e marca-passos, predispõem à contaminação pelo bacilo, pois este forma biofilmes que aderem facilmente a esses dispositivos, podendo causar infecção crônica persistente. A partir do biofilme pré-formado, as células de *B. cereus* podem ser liberadas periodicamente na corrente sanguínea, se dispersando para órgãos distante causando bacteremia (Kuroki et al, 2009; Sasahara et al, 2011).

A presença de células vegetativas de *B. cereus* pode ocasionar a deterioração de alimentos, causando prejuízos principalmente na indústria de laticínios e afins. Nos últimos anos, os surtos de gastroenterites de origem alimentar relacionados ao microrganismo têm adquirido elevada importância, sobretudo nos países industrializados (Fricker et al, 2007; EFSA, 2013).

O *B. cereus* produz uma variedade de exotoxinas, as quais são responsáveis pela patogênese e a maioria das manifestações clínicas causadas pela espécie. As doenças alimentares relacionadas ao *B. cereus* manifestam-se, classicamente, sob duas formas clínicas: a síndrome diarreica e a síndrome emética (Kramer & Gilbert, 1989; Ceuppens et al, 2013).

A síndrome diarreica é uma intoxicação alimentar causada por células vegetativas, ingeridas como células viáveis ou esporos, que produzem enterotoxinas proteicas no intestino delgado, após a ingestão de alimentos contaminados com populações de aproximadamente 10^5 a 10^8 células viáveis/g ou mL. Os

alimentos mais frequentemente contaminados incluem produtos à base de carnes, sopas vegetais, pudins e molhos, leite e produtos lácteos (Rabinovitch et al, 1985; Stenfors Arnesen et al, 2008). Na maioria dos casos, os sintomas manifestam-se após 12h do consumo do alimento contaminado, com um período de incubação compreendido de 8h a 16h, e incluem dores abdominais, diarreia aquosa (ou sanguinolenta) e ocasionalmente náuseas e vômitos.

Atualmente, entende-se que a doença alimentar do tipo diarreico atribuído ao *B. cereus* é causada por várias enterotoxinas termolábeis, tais como a hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não hemolítica (NHE) e a citotoxina K (CytK) (Bottone, 2010).

Ainda existe a enterotoxina FM (*entFM*), considerada como possível toxina diarreica, embora não haja relatos de que a mesma possa ser causadora de enfermidades transmitidas por alimentos (Kotiranta et al, 2000). Porém, foi relatado que a *entFM* está envolvida com a motilidade bacteriana, na formação de biofilme e na adesão do *B. cereus* nas células epiteliais (Tran et al, 2010).

Já a síndrome emética é uma intoxicação alimentar atribuída a uma toxina pré-formada no alimento, a cereulida, um polipeptídeo cíclico termoestável sintetizado por uma enzima sintetase de peptídeo não ribossômico codificada nos genes *ces* (Agata et al, 1994; Ehling-Schulz et al, 2004). Esta toxina liga-se nos receptores do nervo vago aferente (5-HT₃) induzindo o quadro emético caracterizado por ocorrência de náuseas e vômito (que podem ser seguidos de diarreia), geralmente 2h após o consumo do alimento contaminado, com um curto período de incubação de 30min a 6h. Ao estimular o nervo vago ou pneumogástrico, inibe a oxidação dos ácidos graxos pelas mitocôndrias hepáticas, provocando lesões reversíveis nas células do fígado (Mahler et al, 1997).

A dose infectante da toxina emética foi estimada em 30µg por kg de peso corporal. Esta síndrome tem sido amplamente associada a alimentos ricos em amido, como produtos à base de arroz, batatas, massas e alimentos prontos para consumo (Agata et al, 1995).

Além das doenças de origem alimentar, o *B. cereus* pode causar algumas infecções sistêmicas e locais, como septicemia, meningite, pneumonia, endocardite e infecções necrosantes (Granum, 1994; Bottone, 2010). Estas infecções são pouco frequentes e, geralmente, estão associadas às hemolisinas, cereolisinas e fosfolipases produzidas pelo microrganismo, as quais podem causar danos extensos nos tecidos e necrose em órgãos viscerais (Stenfors Arnesen et al, 2008; Horii et al, 2011).

A capacidade das células de *B. cereus* em produzir e secretar certas toxinas relaciona-se ao aspecto bioquímico mais importante desse microrganismo. Inúmeras linhagens sintetizam grande

variedade de metabólitos extracelulares, incluindo enzimas proteolíticas que podem promover a deterioração dos alimentos (Granum, 1994; Asano et al, 1997).

Entre as enzimas que desempenham um papel importante na virulência da espécie, bem como, na deterioração de diferentes gêneros alimentícios incluem: proteases, fosfolipases, lecitinases, amilases, collagenases e lipases (Granum, 1994).

A presença da β -lactamases nas células de *B. cereus* promove a inativação das penicilinas e cefalosporinas tornando, assim, a espécie resistente a esses antibióticos (Bhunja, 2008; Sankararaman & Velayuthan, 2013).

As enterotoxinas do complexo HBL e NHE encontram-se amplamente distribuídas entre as espécies do grupo *B. cereus* (Pruss et al, 1999). Inúmeros estudos reportam a presença de, no mínimo, um dos genes associados ao complexo hemolítico e às diferentes enterotoxinas em cepas de *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. weihenstephanensis* indicando o potencial patogênico dessas espécies que integram o grupo (Samapundo et al, 2011; Oh et al, 2012).

Algumas estirpes de *B. cereus* possuem regiões do DNA ribossômico com assinaturas específicas para o comportamento psicrotrófico semelhante ao *B. weihenstephanensis*, sugerindo formas intermediárias entre as duas espécies (Stenfors & Granum, 2001).

Logo, as análises filogenéticas das espécies do grupo *B. cereus* são dificultadas principalmente pela extensa transferência horizontal de genes que ocorrem entre as diferentes espécies deste grupo (Cardazzo et al, 2008).

1.2.3 - *Bacillus mycoides*

São bactérias Gram-positivas, aeróbias facultativas, com esporos elípticos no esporângio não deformante. Quanto à temperatura de crescimento, essa espécie multiplica-se na faixa mínima de 10°C a 15°C, e máxima 35°C a 40°C (Logan & De Vos, 2009).

A presença de colônias com crescimento rizoide na superfície do meio de cultivo é característico da espécie *B. mycoides* e tem sido relatada a existência de estirpes que expressam pelo menos um gene de virulência, o que indica seu potencial patogênico, bem como estirpes com características psicrotolerantes (Figura 4) (Soufiane & Cote, 2013).



Figura 4: Cultivo em meio de cultura sólido demonstrando colônia com crescimento rizoide característico do *B. mycooides* (<http://exploringtheinvisible.com>).

B. mycooides é considerado um organismo saprófito, o que o torna ecologicamente distinto das espécies patogênicas do grupo *B. cereus* (Nakamura & Jackson, 1995). Além da morfologia colonial rizoide e a falta de motilidade, o *B. mycooides* pode ser distinguido das espécies do grupo *B. cereus* pelas diferentes composições de ácidos graxos celulares e atividade da produção de acetanilida (Nakamura & Jackson, 1995).

Fletcher & Logan (1999) demonstraram citotoxicidade e resultados positivos em ensaios imunológicos para as toxinas do complexo HBL e NHE em várias cepas de *B. mycooides*, mas não há relatos de doenças de origem alimentar associadas a esta espécie.

Suribabu et al. (2014) isolaram cepas de *B. mycooides* proveniente do ambiente marinho produtoras de α -amilase. Tais enzimas amilolíticas tem grande aplicação biotecnológica e econômica. A espécie *B. pseudomycooides* é composta de um grupo de cepas de *B. mycooides*, com composição de ácidos graxos distintos (Nakamura, 1998).

1.2.4 – *Bacillus weihenstephanensis*

Esta espécie é constituída por estirpes psicrotrópicas com capacidade de crescer aerobiamente entre 4°C e 7°C em cultura líquida, mas que não crescem a 43°C. Geneticamente, *B. weihenstephanensis* pode ser diferenciado pela presença de sequências com assinaturas típicas na região do DNAr 16S e do gene das proteínas de choque-frio (*cspA*) (Lechner et al, 1998).

Outra pesquisa demonstra que nem todas as estirpes de *B. cereus* psicrotolerantes podem ser classificadas como *B. weihenstephanensis* e que existe uma forma intermediária entre as duas espécies (Stenfors et al, 2011). Nestas formas intermediárias observamos a amplificação tanto dos produtos da assinatura de mesófilo quanto aquelas da assinatura de psicrotolerante. Algumas cepas de *B. cereus*

identificadas como mesófilas possuem capacidade em crescer a 10°C, e outras estirpes contendo sequências com assinaturas *cspA* foram capazes de crescer a 43°C (Stenfors & Granum, 2001).

Estudos confirmaram o potencial enterotoxigênico da espécie *B. weihenstephanensis* através de testes de citotoxicidade, além da detecção de genes associados à produção de enterotoxinas (Stenfors et al, 2002; Guinebretiere et al, 2010; Rejasse et al, 2012), e da capacidade de produção da toxina cereulida (*ces*) em alimentos (Thorsen et al, 2006; Thorsen et al, 2009). Algumas cepas de *B. weihenstephanensis* demonstraram também capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes, não sendo, portanto uma característica espécie-específica (Baron et al, 2007).

1.2.5 - *Bacillus cytotoxicus*

Definida como uma espécie termo-tolerante, o *B. cytotoxicus* (Guinebretiere et al, 2013) foi isolado durante um surto grave de intoxicação alimentar ocorrido na França em 1998, quando seis pacientes tiveram diarreia sanguinolenta e três vítimas vieram ao óbito (Lund et al, 2000). Os pesquisadores relataram que a toxina envolvida foi a citotoxina K, capaz de causar enterite necrótica semelhante àquela causada pela β -toxina produzida por *Clostridium perfringens* tipo C.

Esta toxina foi exaustivamente caracterizada por Fagerlund et al. (2004) que demonstraram que a citotoxina K, uma proteína de 34kDa, é necrótica e hemolítica, possuindo capacidade de formar poros na bicamada lipídica e sendo altamente tóxica para as células intestinais humanas (Hardy et al, 2001).

Esta citotoxina possui duas variantes distintas, a CytK-1 e CytK-2, as quais exibem 89% de homologia de sequência de aminoácidos. A principal diferença entre as isoformas da proteína é o efeito biológico: a toxina formadora de poros CytK-1 apresentou toxicidade muito maior em ensaios com células Vero e em culturas de células Caco-2, quando comparada com CytK-2 (Fagerlund et al, 2007).

A proteína CytK-1, expressa pelo gene *cytK-1*, é provavelmente a toxina que causa a lise das células epiteliais do intestino delgado, provocando a diarreia grave (Hardy et al. 2001; Guinebretiere et al, 2006). A presença desse gene revelou-se um marcador confiável na identificação do *B. cytotoxicus* (Fagerlund et al, 2007). Já o gene *cytK-2* encontra-se amplamente distribuído entre cepas de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. weihenstephanensis* (Ehling-Schulz & Messelhäusser, 2013; Oltuszk-Walczak & Walczak, 2013).

1.2.6 - *Bacillus anthracis*

Como outras espécies de bacilos, o *B. anthracis* é um bastonete Gram-positivo, aeróbico ou anaeróbico facultativo, quimiorganotrófico e imóvel (Figura 5). Não apresenta exigências nutricionais significativas, crescendo nos meios Ágar Nutriente e Ágar Sangue, onde não produz hemólise. É característica da espécie a sensibilidade ao fago gama, assim como aos antibióticos do tipo penicilinas naturais, ciprofloxacina e doxiciclina (Logan & De Vos, 2009).

As cepas de *B. anthracis* virulentas são caracterizadas pela presença de dois plasmídeos, pX01 e pX02, os quais são portadores de genes que codificam uma exotoxina proteica com três componentes [antígeno protetor (PA), fator edema (EF) e fator letal (LF)] e uma cápsula polipeptídica (ácido-poli-D-glutâmico). Estes fatores de virulência já foram observados em outras espécies, como *B. cereus* e o *B. circulans* (Hoffmaster et al, 2006; Luna et al, 2006).

B. anthracis causa uma doença aguda fatal (carbúnculo hemático) e é considerada uma arma biológica devido à alta toxicidade de algumas estirpes (Stenfors Arnesen et al, 2008).

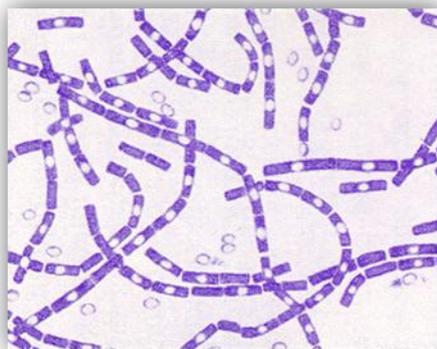


Figura 5: Microscopia óptica comum demonstrando cadeias de células de *B. anthracis*, com extremidades em ângulo reto. Os endósporos e esporos livres não deformantes revelam-se na forma elipsoidal preponderantemente e estão localizados na posição predominantemente central ou para-central no esporângio (<http://textbookofbacteriology.net>).

1.3 – Patogenicidade do Grupo *Bacillus cereus*

A patogenicidade deste grupo é o reflexo da sua capacidade em gerar formas de resistência (esporos livres ou maduros), que lhes permite sobreviver sob condições ambientais adversas. A virulência das espécies do grupo *B. cereus* é atribuída à sua capacidade de produzir diferentes fatores de virulência extracelulares, como toxinas e enzimas (Kotiranta et al, 2000).

1.3.1 - Adesão e Resistência à Fagocitose

A aderência é essencial para muitas bactérias expressarem seus fatores de virulência. Na célula vegetativa, a camada S (*S-layer*), é uma proteína que recobre a parede celular do *B. cereus*, e tem sido implicada na adesão e na resistência à fagocitose pelos neutrófilos (Kotiranta et al, 2000). No esporo, estruturas como exosporium são responsáveis pela adesão ao epitélio intestinal, bem como os flagelos e pilus das células de *B. cereus* que podem atuar como adesinas, favorecendo uma interação estável entre a bactéria e as células epiteliais humanas, constituindo um fator de virulência suplementar (Ramarao & Lereclus, 2006).

1.3.2 – Enterotoxinas

A hemolisina BL (HBL) é um sistema lítico de membrana composto por três proteínas antigenicamente distintas e termolábeis. O componente de ligação B (37,5kDa) e dois elementos líticos designados L₁ (38,2kDa) e L₂ (43,5kDa) são codificados pelos genes *hblA*, *hblD* e *hblC*, respectivamente. Estes genes estão organizados em um *operon* único (*hbl*), cuja transcrição, a qual ocorre conjuntamente de forma policistrônica, é regulada pelo regulador pleiotrópico *plcR* (Beecher & Macmillan, 1991; Beecher & Wong, 1994; Lereclus et al, 1996).

Estas proteínas são secretadas independentemente, e todos os três componentes são necessários para tornar máxima a atividade hemolítica, citotóxica e dermonecrótica. Esta hemolisina destrói tecidos pela alteração da permeabilidade vascular das células epiteliais da parede intestinal (Senesi & Ghelardi, 2010).

A estrutura cristalina correspondente ao componente B da hemolisina BL foi elucidada através da cristalografia com raios-X, e revelou um longo feixe α -helicoidal e um domínio α / β na região inferior da molécula (Senesi & Ghelardi, 2010) (Figura 6).

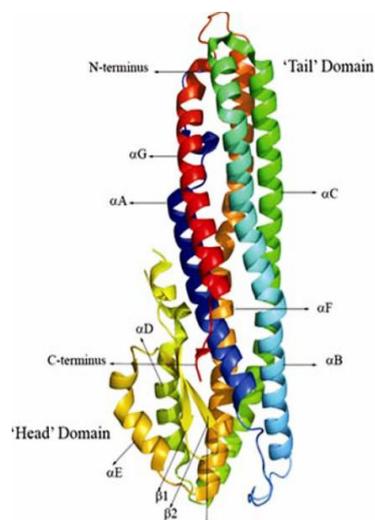


Figura 6: Representação da estrutura tridimensional do componente B da hemolisina BL (Banco de Dados de Proteínas, PDB ID: 2NRJ). Foi proposto que o domínio α / β na região inferior da molécula (“Head” Domain) liga e insere-se na membrana de células susceptíveis. (Reproduzido de Madegowda et al, 2008).

Esta estrutura é altamente semelhante àquela apresentada pela hemolisina E (HlyE, ClyA, Shea) de *Escherichia coli*. Com base na homologia estrutural do componente B da hemolisina BL e da hemolisina E, um modelo de formação de poros foi proposto no qual a oligomerização do componente de ligação B pode formar poros na forma de heptâmero ou octâmero na membrana celular (Madegowda et al, 2008).

A enterotoxina não hemolítica (NHE) também é um complexo de três componentes que difere da hemolisina BL por não apresentar atividade hemolítica (Lund & Granum, 1996). As proteínas NheA (41kDa), NheB (39,8kDa) e NheC (36,5kDa) são codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* organizados em forma de *operon* (*nhe*) e modulado pelo regulador pleiotrópico *plcR* (Guinebretiere et al, 2002).

Como descrito para HBL, as proteínas são secretadas independentemente e a atividade biológica máxima em ensaios com células Vero requer todos três componentes numa proporção molar de 10:10:1 das proteínas NheA, NheB e NheC, respectivamente. A proteína NheB é o componente de ligação do complexo da enterotoxina e um aumento na concentração da proteína NheC resulta numa diminuição da atividade tóxica do complexo NHE (Lindback et al, 2004).

A atividade citotóxica do complexo NHE demonstrada nas células epiteliais é devido à lise osmótica após a formação de poros na membrana plasmática (Fagerlund et al, 2008). O mesmo estudo também demonstrou atividade hemolítica do complexo NHE, embora menor que do complexo HBL, e os modelos de homologia revelaram características estruturais comuns entre o componente B da HBL e as proteínas NheB e NheC (Figura 7) (Fagerlund et al, 2008; Madegowda et al, 2008; Senesi & Ghelardi, 2010).

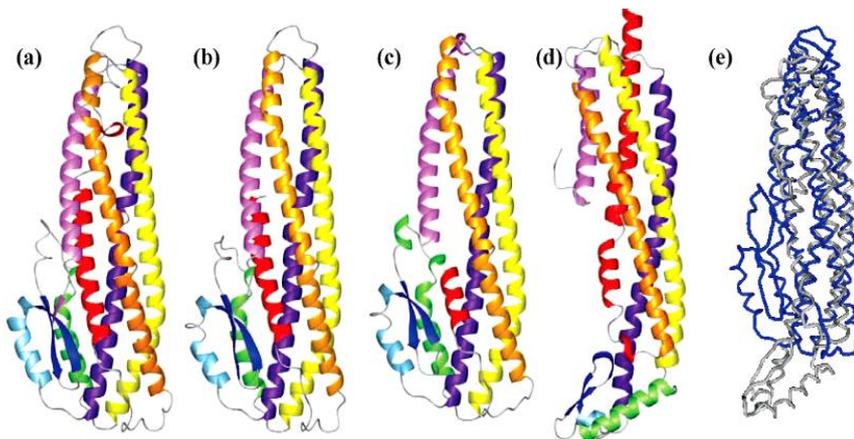


Figura 7: Comparação da estrutura tridimensional das proteínas HBL, NHE e ClyA. (a) Estrutura do componente B do complexo HBL (b) Modelo de homologia do componente NheB (c) Modelo de homologia do componente NheC (d) Estrutura da hemolisina E (ClyA) de *E. coli* (e) Alinhamento estrutural visualizado como uma superposição do componente B da HBL e a hemolisina E. (Reproduzido de Fagerlund et al, 2008).

1.3.3 – Toxina Emética

A toxina emética é um peptídeo cíclico, codificado pelo gene *ces*, e também chamado de cereulida. Consiste em três repetições de quatro aminoácidos modificados ($_D\text{-O-Leu-}_D\text{-Ala-}_L\text{-O-Val-}_L\text{-Val}$)₃ que formam uma estrutura em anel (dodecapsipeptídeo), com peso molecular de 1,2kDa (Figura 8). É um ionóforo de potássio produzido durante a fase estacionária do crescimento celular e que é semelhante à valinomicina, um composto antimicrobiano produzido por *Streptomyces* spp. (Agata et al, 1994; Agata et al, 1995).

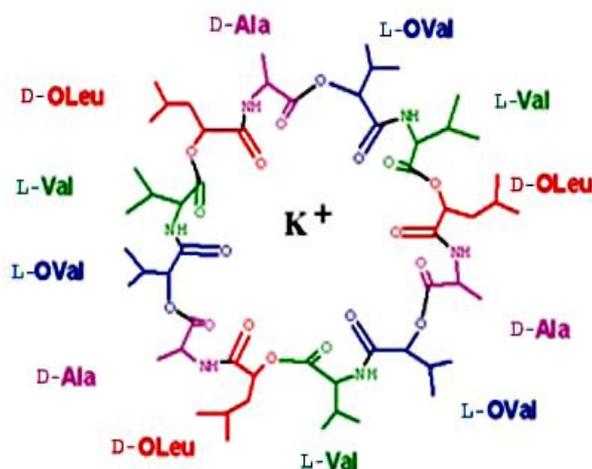


Figura 8: Representação da estrutura química da toxina emética. Ionóforo de potássio (Cortesia do Prof. M.S. Salkinoja-Salonem & Raimo Mikkola).

Esta toxina é sintetizada por um complexo enzimático não ribossômico e é altamente hidrofóbica. A cereulida é estável ao calor, à acidez e à proteólise, porém não é antigênica (Ehling-Schulz et al, 2004; Bhunia, 2007; Rajkovic et al, 2008). Devido a essas características, a toxina não é inativada pelo suco gástrico nem pelas enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal e permanece viável nos alimentos reaquecidos (Stenfors Arnesen et al, 2008). A toxina emética possui propriedades citotóxicas, hepatotóxicas e de toxicidade mitocondrial (Agata et al, 1995; Mikkola et al, 1999; Hoornstra et al, 2003).

1.3.4 – Hemolisinas

As hemolisinas são responsáveis pela atividade hemolítica e consideradas importantes em processos infecciosos. As hemolisinas da família citolisinas colesterol-dependentes (CDC), também conhecidas como citolisinas tiol-ativadas são toxinas formadoras de poros em membranas, e foram identificadas nas espécies do grupo *B. cereus*.

A Hemolisina I foi primeiramente descrita em 1967, e era conhecida como cereolisina O (CLO) em *B. cereus*, thuringiolisina O (TLO) em *B. thuringiensis* e anthrolisina O (ALO) em *B. anthracis*. Essas proteínas apresentam similaridade de 98% nas suas sequências de aminoácidos (Bernheimer & Grushoff, 1967; Shannon et al, 2003). A CLO, codificada pelo gene *clo*, é uma proteína termolábil cuja atividade hemolítica é inibida pelo colesterol (<10ng/mL) e neutralizada pela globulina anti-estreptolisina-O (Bernheimer & Grushoff, 1967).

A CLO demonstrou ainda 57%-68% de similaridade de aminoácidos para perfringolisina-S (PFO) de *Clostridium perfringens* e estreptolisina-O de *Streptococcus pyogenes*. A Hemolisina I, produzido por membros do grupo *B. cereus*, pode, portanto, ser considerada como pertencente à família das citolisinas colesterol-dependente (CDC) (Alouf et al, 2005).

As toxinas CDC rompem as membranas celulares, através da formação de poros. A atividade citolítica das CDCs requer especificamente a presença de colesterol nas membranas e não dependem de qualquer outro receptor específico na superfície celular. As CDCs são, portanto, capazes de romper as membranas citoplasmáticas de quase todas as células animais além de romperem e permeabilizarem as células do hospedeiro ou organelas intracelulares durante o processo de infecção (Palmer, 2001).

A CLO do *B. cereus* é letal quando injetada por via intravenosa (1-2µg) em camundongos e é hemolítica em concentrações menores que 1ng/mL (Bernheimer & Grushoff, 1967). Essa toxina induz a

liberação da lactato desidrogenase no tecido da retina *in vitro*, sugerindo que pode agravar a necrose típica da endoftalmite por *B. cereus* (Beecher & Wong, 2000).

Em *B. cereus* e *B. thuringiensis*, a expressão de CLO e TLO é modulada pelo ativador transcricional *plcR* (Agaisse et al, 1999). Para atividade, o gene *plcR* requer a proteína *papR*, um peptídeo expresso como pro-peptídeo, sob controle do regulador transcricional *plcR* (Bouillaut et al, 2008). O sistema *plcR/papR* é conhecido como regulador transcricional central para os genes de virulência em *B. cereus* no início da fase estacionária (Slamti & Lereclus, 2002). Esse sistema controla a expressão de um regulon com pelo menos 45 genes, incluindo enzimas de degradação, proteínas da superfície celular e de toxinas, a maioria das quais podem ser consideradas potenciais fatores de virulência (Figura 9) (Gohar et al, 2008).

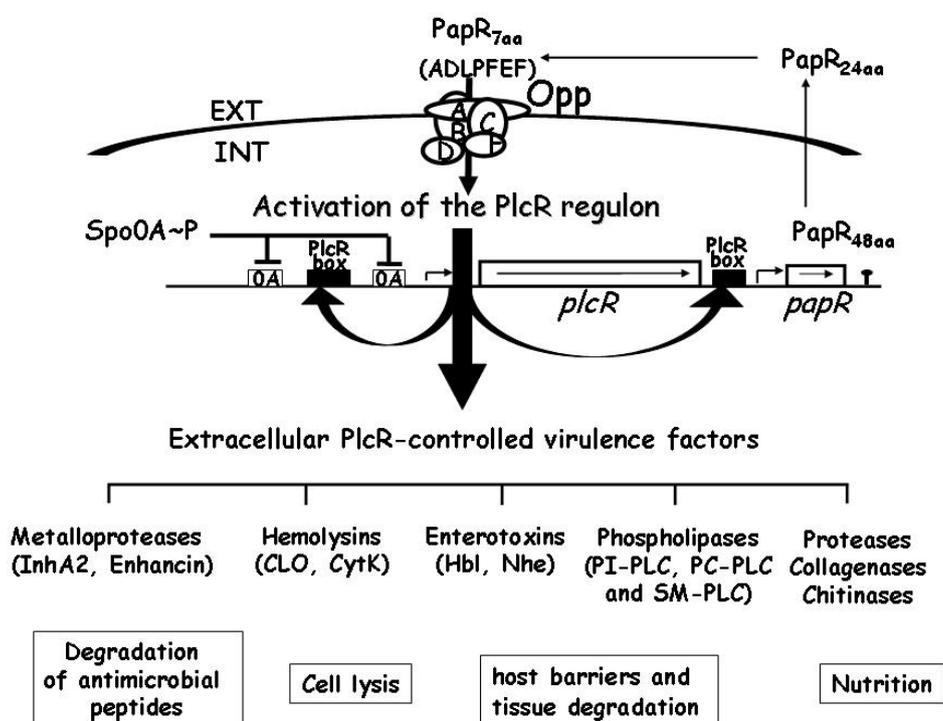


Figura 9: Representação esquemática do regulon transcricional *plcR* e o peptídeo de sinalização célula-célula *papR*. Este esquema demonstra a expressão dos fatores de virulência extracelulares modulado pelo regulador pleiotrópico *plcR* (Reproduzido de Ramarao & Sanchis, 2013).

Além de CLO, estudos posteriores detectaram outras hemolisinas expressas por *B. cereus* e *B. thuringiensis*, entre estas, a hemolisina II (HlyII) codificada pelo gene *hlyII* e a hemolisina III (HlyIII) codificada pelo gene *hlyIII* (Coolbaugh & Williams, 1978; Baida & Kuzmin, 1995).

A HlyII é uma proteína com propriedade hemolítica, é termolábil e susceptível às enzimas proteolíticas e sua atividade não é afetada pelo colesterol, ou anticorpos anti-estreptolisina-O (Sinev et al, 1993). É uma toxina oligomérica formadora de poros na membrana citoplasmática do tipo β -barril. Este grupo de toxinas incluem a α -toxina de *Staphylococcus aureus*, a β -toxina de *C. perfringens* e a citotoxina K de *B. cereus* (Fagerlund et al, 2004; Andreeva et al, 2006). A sequência de aminoácidos da HlyII exibe 28%-31% de similaridade com a α -toxina estafilocócica (Miles et al. 2002; Miles et al, 2006).

Esta hemolisina induz a lise dos eritrócitos, embora não possua receptor específico nas hemácias (Andreeva et al, 2006). Além disso, a HlyII induz a lise de células fagocíticas (hemócitos de insetos, macrófagos de camundongos, monócitos humanos e células dendríticas), mas não de células epiteliais (Tran et al, 2011). Apesar de ser hemolítica e citotóxica para células humanas, essa toxina não tem sido implicada na síndrome diarreica causada por *B. cereus* (Andreeva et al, 2006).

Foi demonstrado que a HlyII está envolvida especificamente na morte de células do sistema inune por apoptose (Tran et al, 2011), e que esta hemolisina é produzida por estirpes isoladas de amostras clínicas humanas (Cadot et al, 2010), o que sugere um papel importante nas infecções por bactérias oportunistas.

Em contraste com os genes *hbl*, *nhe*, *clo* e *cytK*, a expressão do gene *hlyII* não é modulada pelo regulador pleiotrópico *plcR*, mas controlada pelo regulador transcricional HlyIIR (Budarina et al, 2004) e pelo regulador global Fur (Sineva et al, 2012; Tran & Ramarao, 2013).

O gene codificador da hemolisina III, *hlyIII*, foi sequenciado e caracterizado (Baida & Kuzmin, 1996). Esta hemolisina atua através da formação de poros transmembrana provocando a lise de eritrócitos (Baida & Kuzmin, 1996). É uma proteína termolábil cuja atividade hemolítica não é inibida pelo colesterol.

A análise da sequência da região do promotor do gene *hlyIII* não revelou a presença da sequência palindrômica altamente conservada que é o alvo para o reconhecimento específico do ativador transcricional *PlcR*, indicando que a expressão do gene *hlyIII* é independente de *PlcR* (Baida & Kuzmin, 1996).

A Hemolisina IV, ou citotoxina K, é composta por um único peptídeo de 34kDa e possui, além da capacidade de formar poros em membranas celulares de procaríotos, atividade necrótica em modelo animal, hemolítica e citotóxica (Beecher et al, 2000).

Esta proteína apresenta similaridade de 37% e 30% da sequência de aminoácidos com a hemolisina II do *B. cereus* e a α -hemolisina do *S. aureus*, respectivamente, sugerindo que, do ponto de vista estrutural, a CytK (assim como HlyII) pertence à família oligomérica formadora de poros tipo β -barril (Lund et al, 2000). A expressão do gene *cytK* também é regulada pelo sistema *PlcR/PapR* (Ceuppens et al, 2011).

1.3.5 – Fosfolipases

Com relação à classe de toxinas representadas pelas fosfolipases, as fosfolipases C são as mais conhecidas dentro dessa família de proteínas expressas por linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Essas espécies produzem três tipos de fosfolipases C, cada uma com diferentes mecanismos de ação.

De acordo com a classe de fosfolipídios em que atuam, tem-se a fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC) (Callegan et al, 2002), fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) (Ikezawa & Taguchi, 1981) e esfingomielinase (SPH) (Pomerantsev et al, 2003), as quais são codificadas pelos genes *pcplc*, *piplc* e *sph*, respectivamente.

Tais moléculas promovem a lise celular, através da atividade enzimática e não pela formação de poros (Figura 10). Causam a liberação de enzimas lisossômicas dos neutrófilos e estão envolvidas em alterações teciduais, especialmente após a contaminação de feridas e infecções oculares. Estas fosfolipases permitem que as bactérias resistam à fagocitose (Celandroni et al, 2014).

A toxicidade de PC-PLC pode ser explicada pela hidrólise de diferentes fosfolipídios como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina, ressaltando-se que todas essas moléculas fazem parte da maioria das membranas plasmáticas de eucariotos e procariotos, sugerindo-se, assim, que essas fosfolipases participam da destruição do epitélio de tecidos infectados e da degradação da matriz subepitelial (Figura 10a) (Kotiranta et al, 2000; Celandroni et al, 2014).

Já a PI-PLC cliva o fosfatidilinositol e derivados glicosilados de fosfatidilinositol, os quais participam do ancoramento de proteínas na superfície de membranas plasmáticas de eucariotos (Figura 10b). Essa molécula é parte de uma família de enzimas produzidas por vários microrganismos, incluindo patógenos bacterianos (Griffith & Ryan, 1999). Quando secretada por esses patógenos, as PI-PLCs exercem suas atividades citotóxicas nas células hospedeiras e atuam como importantes fatores de virulência (Callegan et al, 2002; Ghelardi et al, 2007).

A esfingomielinase (SPH) é uma proteína de atividade hemolítica e participa do processo de ligação do *B. cereus* aos eritrócitos (Granum & Lund, 1997). PC-PLC e SPH compõem a unidade citolítica cereolisinaAB e a ação desse complexo são dependentes da esfingomielinase, uma vez que a presença de esfingomielinina em membranas inibe a atividade da PC-PLC (Ruiz-Arguello et al, 1998).

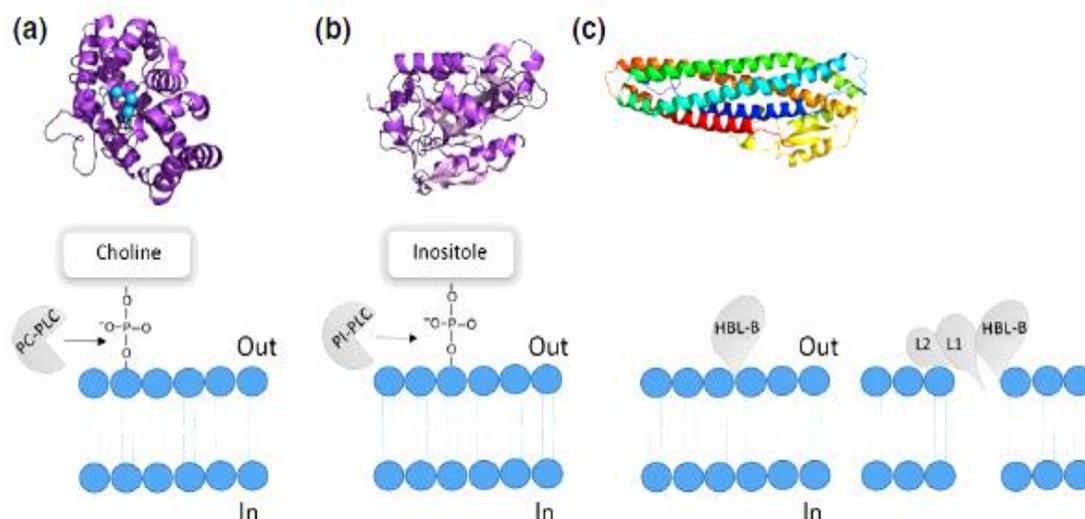


Figura 10: A informação estrutural e o mecanismo de ação propostos para as moléculas PC-PLC (a), PI-PLC (b), revelam a lise celular através da atividade enzimática e o complexo HBL (c), pela formação de poros na respectivas membranas. (Reproduzido de Celandroni et al., 2014).

1.4 – Ocorrência e Detecção de Genes Associados à Produção de Enterotoxinas e Fatores de Virulência nas Espécies do Grupo *Bacillus cereus*

Nas últimas décadas, verificou-se o aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas. Avanços nos estudos de biologia molecular proporcionaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos que auxiliam na identificação e tipagem de microrganismos.

Tais metodologias oferecem a possibilidade de uma identificação precisa e específica de amostras de *B. cereus* e espécies correlacionadas (Martinez-Blanch et al, 2011). Dentre essas, destacam-se as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), que tem sido utilizada para avaliar o potencial toxigênico das espécies do *B. cereus* l.s., e de outras espécies de *Bacillus* spp. (Hsieh et al, 1999; Hansen et al, 2001; Hendriksen et al, 2006).

As toxinas diarreicas e a toxina emética associadas ao *B. cereus* e demais espécies do grupo são alvos frequentes de estudos. Tais estudos baseiam-se na técnica de PCR e também em outros métodos, como os imunológicos e citotóxicos.

Os testes imunológicos para diagnóstico de toxinas de *B. cereus* utilizam anticorpos sintetizados para o complexo HBL e NHE. Ainda não há relatos da comercialização de testes para a identificação da CytK (Stenfors Arnesen et al, 2008). Diferentemente das toxinas causadoras da síndrome diarreica, a cereulida possui baixa atividade antigênica, por esse motivo não existem ensaios imunológicos capazes de identificar a presença dessa toxina (Kotiranta et al, 2000). Entretanto existe uma grande variedade de testes *in vivo* e *in vitro* para a identificação da toxina emética. A maioria destes testes se baseia na capacidade citotóxica da cereulida de produzir danos estruturais em diferentes tecidos animais (Stenfors Arnesen et al, 2008).

As infecções alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos que se multiplicaram e excretaram fatores de virulência no próprio alimento, e as toxinfecções alimentares resultam da ingestão de alimentos com certa quantidade de microrganismos causadores de doenças, capazes de produzir ou expressar toxinas após serem ingeridos. As doenças transmitidas por alimentos constituem um dos problemas de saúde pública mais frequente do mundo contemporâneo. São causadas por agentes etiológicos que penetram no organismo humano através da ingestão de água e alimentos contaminados (OPAS, 2001).

O *B. cereus* tem sido relacionado como um dos agentes etiológicos implicados em diversos surtos de enfermidades de origem alimentar verificados em diferentes regiões do mundo. Inúmeros pesquisadores relataram a ocorrência de *B. cereus* em diferentes tipos de alimentos, tais como: cereais, arroz cozido ou frito, produtos cárneos, vegetais, massas, sopas, produtos desidratados e prontos para consumo, especiarias, alimentos infantis, leite e produtos lácteos, os quais podem ser eventualmente veículos dessa bactéria causadora de intoxicação alimentar (Rabinovitch et al, 1985; Silva et al, 1993; Pirhonen et al, 2005; Quoba et al, 2008; Batchoun et al, 2011; Chaves et al, 2011; Chon et al, 2012; Malek et al, 2013; Rahimi et al, 2013; Kim et al, 2014; Zhou et al, 2014).

Vários estudos já foram feitos com o objetivo de realizar a caracterização toxigênica e avaliação da capacidade de produção das principais toxinas relacionadas a surtos de intoxicação alimentar, bem como o potencial de *B. cereus* de causar deterioração em função da temperatura de armazenamento e sua capacidade de produção de enzimas proteolíticas. No primeiro estudo realizado no Brasil em 1993, Guaycurus et al. descreveram a presença de proteínas extracelulares (definidas como enterotoxinas) produzidas por *B. cereus* isolados de surtos de intoxicação alimentar no Rio de Janeiro. Estas moléculas apresentaram atividade de permeabilidade vascular em coelhos, letalidade para camundongos e citotoxicidade para células Vero e Hela.

O *B. cereus* é frequentemente isolado de amostras de leite *in natura* e derivados lácteos. Os estudos sobre a ocorrência do microrganismo têm adquirido importância devido ao isolamento de cepas psicrotróficas produtoras de toxinas e às propriedades de adesão e termorresistência de seus esporos (Svensson et al, 2004; Rezende-Lago et al, 2007; Watanuki et al, 2008; Zhou et al, 2008; Zhou et al, 2010; Bartoszewicz et al, 2013). *B. cereus* pode provocar fenômenos indesejáveis em laticínios e afins, como a agregação da camada lipídica em leite pasteurizado e a coagulação da caseína, ambos causados por ação das enzimas proteolíticas (lipases e proteases) e lecitinases (fosfolipases) produzidas pelo microrganismo (Bartoszewicz et al, 2008; De Jonghe et al, 2010; Montanhini et al, 2012; Vithanage et al, 2014).

Recentemente, Arslan et al. (2014) isolaram 29 cepas do grupo *B. cereus* (22 *B. cereus*, 5 *B. anthracis* e 2 *B. thuringiensis*) de amostras de sorvetes, coletadas de estabelecimentos varejistas em Bolu, Turquia. Os resultados demonstraram que as cepas eram potenciais produtoras de enterotoxinas e enzimas extracelulares, e exibiam certas características de resistência aos antibióticos. Os autores concluíram que a presença de cepas naturais de *Bacillus* spp. que expressam determinantes patogênicos e enzimas deteriorantes em produtos lácteos podem representar potencial risco à saúde pública, à segurança alimentar e a qualidade dos produtos.

As análises microbiológicas e toxigênicas têm sido ferramentas fundamentais para a obtenção de dados sobre a qualidade, higiene e segurança na produção de alimentos e tais medidas têm sido adotadas na indústria alimentícia para o controle de qualidade dos produtos.

Em pesquisa sobre a contaminação de leite integral pasteurizado coletado em supermercados na China, Zhou et al. (2008) detectaram a presença de *B. cereus* em 26 das 54 amostras analisadas. No total 102 cepas foram isoladas, sendo 92 *B. cereus*, 9 *B. thuringiensis* e 1 *B. mycoides*. Os genes do complexo HBL foram detectados em 33,7% (31/92) e os genes que codificam o complexo NHE em 46,7% (43/92) das cepas de *B. cereus*. Todas as nove cepas de *B. thuringiensis* foram positivas para os seis genes codificadores de enterotoxinas e o *B. mycoides* possuía caráter psicrotrófico, e não apresentou nenhum gene do complexo HBL, mas apresentou os genes *nheA* e *nheC*. Ressalta-se a ocorrência das espécies do grupo *B. cereus* em produtos lácteos chineses e a preocupação de que estes produtos promovam surtos de intoxicação alimentar associados a essa espécie.

Em outra pesquisa desenvolvida por Zhou et al. (2014) na China, três cepas de *B. cereus* foram isoladas de um surto de intoxicação alimentar após o consumo de grãos de soja fermentados (Douchi). Duas cepas de *B. cereus* foram capazes de produzir a toxina emética e a terceira expressou as enterotoxinas do complexo HBL, NHE e CytK-2, sendo essas possivelmente as cepas responsáveis pelo incidente de origem alimentar causado pelo consumo de um alimento natural fermentado.

Surtos de *B. cereus* são muitas vezes relatados, mesmo que os sintomas da intoxicação sejam geralmente rápidos e autolimitados. No entanto, ressalta-se a ocorrência de cepas hipervirulentas que aumentam os riscos para a saúde pública. A possibilidade de produção de toxina emética e enterotoxinas por uma mesma cepa bacteriana têm sido considerada. A suspeita baseia-se na ocorrência, concomitante, de quadros clínicos característicos de ambas as síndromes em alguns indivíduos acometidos por doença alimentar causada por *B. cereus*.

Recentemente, Lopez et al. (2015) relataram um caso clínico, que ocorreu na Argentina, de intoxicação alimentar grave, quando a vítima (mulher adulta saudável) apresentou emese e diarreia concomitantes. A cepa de *B. cereus* isolada foi altamente citotóxica em ensaios biológicos (teste com células Caco-2), e positiva para os genes do complexo HBL, enterotoxina S e a toxina emética. Como se considera que o *cluster* das linhagens eméticas de *B. cereus* evoluiu de uma população panmítica (plenamente recombinante) de cepas diarreicas, sugere-se que esta cepa seja uma forma intermediária entre tais linhagens.

Naranjo et al. (2011) descreveram um caso de intoxicação alimentar letal que ocorreu em Bruxelas, Bélgica. Estes autores descreveram um óbito (homem jovem) após a ingestão de um tipo de massa (espaguete) contaminada com células de *B. cereus*. Cepas eméticas foram isoladas e níveis elevados da toxina emética (14,8ng/g) foram encontrados na refeição.

No estudo realizado por Rahimi et al. (2013) tanto a incidência de *B. cereus* em alimentos infantis quanto à presença dos genes associados aos complexos HBL e NHE e as enterotoxinas T e FM foram investigados. Os resultados mostraram que os produtos infantis são umas das principais fontes de *B. cereus* portadores de genes enterotoxigênicos na província de Isfahan, Irã. Logo, a inspeção das matérias-primas e dos aditivos é importante para diminuir a carga microbiana nos alimentos infantis e consequentemente, reduzir a incidência de surtos diarreicos.

É cada vez maior o número de doenças gastrintestinais transmitidas por alimentos no mundo inteiro. Entretanto, a notificação desses surtos não é obrigatória no Brasil, não sendo possível desta forma determinar o número real de surtos de origem alimentar. Segundo informações da Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos do Ministério da Saúde, no levantamento realizado no período de 2000 a 2013, o *B. cereus* surge como o 3º na relação de agentes etiológicos causadores de enfermidades gastrintestinais transmitidas por alimentos no Brasil (Brasil, 2010) (<http://portalsaude.saude.gov.br>).

Em 1985, Rabinovitch et al. avaliaram a incidência e a toxicidade de cepas de *B. cereus* isoladas de diferentes classes de alimentos comercializados no Rio de Janeiro. Dentre as 114 cepas isoladas, 13 provieram de três casos de toxinfecções alimentar. Nos ensaios biológicos realizados, o aumento da permeabilidade capilar (APC) ocorreu em 86,85% das 114 cepas, e 65,79% foram letais para camundongos e a combinação de ambos foi observada em 59,65%. O APC associado à necrose ocorreu com 34,21% das cepas testadas. A letalidade, APC e necrose, associados, foram observadas em 28,07% das cepas. Todos estes fatos foram evidenciados nas cepas isoladas de alimentos causadores da enfermidade, confirmando a ação de fatores promotores de intoxicação alimentar.

Em outro estudo desenvolvido por Zahner et al. (2005), a distribuição dos genes que codificam os fatores de virulência (*vip3A*, *bceT*, *pc-plc*, *sph*, *nheBC*, *hbla*) foram determinados em 80 cepas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* isoladas de distintas fontes (amostras clínicas, solos e alimentos) no Brasil. Os resultados demonstraram ampla distribuição dos genes de virulência entre ambas as espécies, sugerindo que esses determinantes desempenham um papel importante nas infecções em mamíferos. A maioria desses fatores toxigênicos e de virulência foram detectados com maior ocorrência em estirpes de *B. thuringiensis* do que em *B. cereus*.

O primeiro registro do perfil toxigênico em amostras de *B. cereus* isolados no Brasil foi realizado em 2008 por Aragon-Alegro et al. Estes autores avaliaram a produção dos complexos HBL, NHE, CytK e da toxina emética em 155 cepas de *B. cereus* provenientes de alimentos produzidos no Brasil. Através dos ensaios imunológicos, a expressão dos genes *hblD* e *nheA* foi detectada em 105 (67,7%) e 154 (99,4%) das cepas estudadas, respectivamente. Todas as cepas apresentaram pelo menos um gene do complexo NHE, enquanto 96,1% delas foram positivas para os genes do complexo HBL. CytK-2 foi detectada em 123 (79,4%) das cepas. Estes autores concluíram que todas as cepas demonstraram capacidade toxigênica e podem representar um risco aos consumidores se boas práticas não forem seguidas.

A relação entre a presença de genes de virulência, a diversidade desses genes e a patogenicidade, bem como, a origem de amostras brasileiras de *B. cereus* isolados de alimentos associados com surtos de intoxicação alimentar, alimentos prontos para consumo e amostras de solo foi investigada por Santos et al. (2011). Os resultados demonstraram que cepas de *B. cereus* potencialmente causadoras de surtos de intoxicação alimentar, não apresentam um perfil genético específico, como a presença de um gene obrigatório ou um determinado alelo para um gene específico. Pelo contrário, combinações diferentes de genes que codificam fatores de virulência podem estar presentes em diferentes isolados de *B. cereus* potencialmente causadoras de surtos de intoxicação alimentar. Corroborando estes estudos, os resultados de Chaves et al. (2011) demonstraram que a maioria das estirpes presentes em diferentes tipos de alimentos coletados a partir de produtos nacionais em períodos distintos, representam um risco potencial de causar intoxicação alimentar, devido à alta prevalência de genes das enterotoxinas expressas nessas estirpes.

B. cereus é considerado um microrganismo termodúrico, uma vez que seus esporos podem sobreviver aos principais processamentos térmicos utilizados na indústria de alimentos (Cronin & Wilkinson, 2008). A combinação das características termodúrica e psicrotrófica em uma espécie microbiana denota seu potencial deteriorante (Matta & Pung, 1999).

Os mecanismos de adaptação do *B. cereus* às condições ambientais são diversos e contribuem para sua sobrevivência e disseminação no ambiente (Carlin et al, 2010). Algumas estirpes de *B. cereus* podem se multiplicar em temperaturas de refrigeração (García-Armesto & Sutherland, 1997; Larsen & Jorgensen, 1999; Guinebretiere et al, 2008) e os esporos podem sobreviver à pasteurização, fatores que podem ser considerados um problema para a indústria de alimentos (Svensson et al, 2004; Planchon et al, 2011).

Alguns estudos atestam a produção de enterotoxinas por cepas psicrotróficas de *B.cereus* (Granum et al, 1993; Beuchat et al, 1997; Rowan & Anderson, 1998; In't Veld et al, 2001). A natureza psicrotrófica

de algumas cepas, aliada à capacidade de produção de enterotoxinas, eleva o risco de doença alimentar por *B. cereus* (McKillip, 2000; Stenfors Arnesen et al, 2008). Dufrenne et al. (1995) identificaram várias estirpes de *B. cereus* psicrotóxicas isoladas de diferentes produtos alimentícios e de surtos diarreicos. Zhou et al. (2010) encontraram *B. cereus* psicrotóxicos em amostras de sorvete avaliadas na China.

Na maioria das vezes, as infecções alimentares estão relacionadas ao consumo de alimentos que sofreram manipulação exacerbada associada ao armazenamento e acondicionamento em temperatura inadequada, propiciando a sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos. Em 1993, Silva et al. analisaram o crescimento em distintas faixas de temperatura do *B. cereus* em três diferentes tipos de alimentos formulados e servidos em instituições públicas. Os autores observaram que o *B. cereus* foi capaz de se multiplicar nos alimentos analisados, principalmente na temperatura de 35°C, na ausência ou presença de microrganismos autóctones. Logo, estes concluíram que boas práticas de higiene durante a preparação e consumo desses produtos, bem como o tempo de armazenamento e temperatura devem ser considerados.

Segundo Watanuki & Gallo (2008), o tratamento térmico aplicado ao leite estimula a germinação dos esporos de *B. cereus* que, na ausência da microbiota competitiva, encontram condições favoráveis para multiplicar-se no produto. No estudo realizado por Merzougui et al. (2014), o *B. cereus* foi apontado como possível agente etiológico em casos de intoxicação alimentar ocorrido em Marrocos. Os resultados revelaram elevada prevalência em diversos tipos de alimentos, principalmente leite e produtos lácteos. Isso enfatiza a importância da refrigeração do leite após o tratamento térmico, para assegurar a qualidade do produto a ser oferecido à população e, por conseguinte, diminuir os riscos de toxinfecção alimentar.

Devido à sua natureza ubiqüitária, são diversas as matrizes de alimentos relatadas como fontes de isolamento de *B. cereus* (McIntyre et al, 2008; Fangio et al, 2010; Samapundo et al, 2011). Batchoun et al. (2011) demonstraram a ocorrência de cepas de *B. cereus* eméticas e enterotoxigênicas em diferentes alimentos consumidos na Jordânia. Samapundo et al. (2014) reportaram a incidência, diversidade e características enterotoxigênicas e o potencial deteriorante das espécies do grupo *B. cereus* em vários tipos de produtos alimentícios, principalmente em alimentos processados refrigerados de vida útil prolongada disponível no mercado de varejo da Bélgica.

B. cereus também pode ser encontrado no ambiente hospitalar e os esporos resistem à maioria dos procedimentos e produtos de limpeza aplicados nesses ambientes. Casos de infecções intestinais graves por *B. cereus* foram relatadas em recém-nascidos em uma unidade de terapia intensiva neonatal (Decousser et al, 2013). Um surto nosocomial de gastroenterite por *B. cereus*, que envolveram pacientes e

atendentes, em uma unidade hospitalar de referência de Omã, em 2008, foi relatado por Al-Abri et al. (2011), no qual as fontes de contaminação foram às refeições servidas pela cozinha do hospital.

Em outro estudo, em um hospital no Japão, Dohmae et al. (2008) noticiaram o aumento de infecções nosocomiais por *B. cereus* no período de 2000 a 2005. Em 2005, infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateter intravascular ocorreram em cinco pacientes. Os autores associaram a transmissão de *B. cereus* para pacientes através da reutilização de toalhas e roupas de cama contaminadas. Todas as cepas de *B. cereus* isoladas no hospital foram diferenciadas das estirpes que provieram de pacientes acometidos por intoxicação alimentar. A resistência à ciprofloxacina foi observada apenas nas cepas clínicas. Os resultados sugerem que cepas específicas de *B. cereus* estão circulando nos hospitais, com genótipos, susceptibilidade aos antibióticos e perfis de virulência geralmente distintos daqueles de surtos de intoxicação alimentar, e que no Japão, as toalhas são uma fonte importante de contaminação.

Com relação às áreas hospitalares existem poucos registros sobre surtos nosocomiais de infecção por *B. cereus* em unidades de terapia intensiva para adultos e recém-nascidos. Quase sempre esses surtos nosocomiais estão relacionados com equipamentos médicos contaminados e procedimentos de desinfecções inadequados (Gray et al, 1999; Van Der Zwet et al, 2000; Dolan et al, 2012). Kalpoe et al. (2008) descreveram a disseminação de uma cepa de *B. cereus*, resistente à vancomicina, isolada dos sensores de fluxo de ar dentro do sistema de ventilação mecânica de uma unidade de terapia intensiva pediátrica. Horii et al. (2011) investigaram os fatores de risco por *B. cereus* em infecções na corrente sanguínea, e concluíram que o antibiograma foi essencial para selecionar um tratamento adequado, pois neste estudo estirpes isoladas de amostras clínicas apresentaram CMIs elevadas para β -lactâmicos e quinolonas.

Dentre as espécies do grupo *B. cereus* potencialmente produtoras de enterotoxinas, destaca-se também o *B. thuringiensis*, utilizado comercialmente como bioinseticida devido à capacidade de síntese de cristais proteicos tóxicos a algumas espécies de insetos.

Desde a década de 90, *B. thuringiensis* vem sendo descrito como agente produtor de enterotoxinas (Drobniewski, 1993; Damgaard et al, 1996) e causador de intoxicação alimentar (Jackson et al, 1995). Neste período, inúmeros estudos pesquisaram a ocorrência de genes de enterotoxinas de *B. cereus* em linhagens de *B. thuringiensis* (Gaviria Rivera et al, 2000; Swiecicka & Mahillon, 2006; Ngamwongsatit et al, 2008). Tal fato preocupa e pode gerar uma série de problemas, uma vez que produtos à base de *B. thuringiensis* têm sido dispersados na natureza para o controle biológico de pragas agrícolas e de importantes vetores de doenças humanas em vários países. Alguns autores já relataram a presença de

enterotoxinas em cepas de *B. thuringiensis* isoladas de inseticidas comerciais (Damgaard, 1995; Rosenquist et al, 2005). Frederiksen et al. (2006) demonstraram que resíduos de inseticidas à base de *B. thuringiensis* podem ser encontrados em frutas e vegetais frescos e as cepas isoladas destas fontes foram potencialmente enterotoxigênicas.

Scarano et al. (2009) avaliaram a expressão das enterotoxinas diarreicas em cepas de *B. thuringiensis* isoladas de bioinseticidas comerciais. Os resultados revelaram elevada frequência das enterotoxinas dos complexos NHE, HBL, CytK e a cereolisinaAB. Em virtude aos dados obtidos, os autores sugeriram que os procedimentos de biossegurança para estas formulações sejam revisto, e que estes excluam a utilização de cepas enterotoxigênicas.

Rabinovitch et al. (2014) estudaram a aplicação da radiação gama (Co60) para eliminar esporos em preparações de biopesticidas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* de forma a se evitar a liberação de esporos viáveis no ambiente. Os resultados demonstraram a inativação total dos esporos nos bioinseticidas sem que houvesse mudança na atividade larvicida. Estes autores concluíram que formulações irradiadas seriam mais seguras para o meio ambiente e para os seres humanos, pois a eliminação dos esporos viáveis neutraliza o potencial patogênico de cepas de *B. thuringiensis*.

Cepas toxigênicas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* também foram isoladas de amostras de arroz e cereais na Correia do Sul e nos EUA, e todas as cepas de *B. thuringiensis* foram positivas para as enterotoxinas dos complexos NHE e HBL (Ankolekar et al, 2009; Park et al, 2009; Kim et al, 2014). Pang et al. (2010) isolaram 62 cepas de *B. thuringiensis* da microbiota de solo de Taiwan. Todas as cepas foram citotóxicas em ensaios biológicos e carregavam os genes do complexo HBL. Cepas de *B. thuringiensis* de diferentes sorovares com características psicotolerantes já foram identificadas por Bartoszewicz et al. (2009) e Soufiane & Cote (2010).

Uma vez que células de *B. thuringiensis* provenientes de aplicações de biopesticidas foram encontradas em alimentos e bebidas (Zhou et al, 2008), a presença de genes que codificam as enterotoxinas e a capacidade de produção das mesmas deve ser considerada (Swiecicka & Mahillon, 2006), mesmo que poucos casos de infecções gastrointestinais por *B. thuringiensis* tenham sido registrados (Jackson et al, 1995; McIntyre et al, 2008). É possível que em virtude da dificuldade de diferenciar o *B. thuringiensis* do *B. cereus*, o papel do *B. thuringiensis* em surtos de doenças transmitidas por alimentos possa ter sido subestimado (Scarano et al, 2009).

Em estudo desenvolvido por Rosenquist et al. (2005) 31 cepas *B. thuringiensis* provenientes de diferentes tipos de alimentos expressaram os genes dos complexos HBL, NHE e CytK envolvidos na

síndrome diarreica. Estes autores observaram que esta espécie pode ser responsável por diversos surtos de intoxicação alimentar previamente atribuído ao *B. cereus*.

As enterotoxinas são proteínas que causam citotoxicidade, acúmulo de fluidos na alça ileal ligada de animais de laboratório produzindo dermonecrose, e que são letais para camundongos e citotóxicas em culturas de células Vero. A susceptibilidade de diferentes células alvo revelaram que as enterotoxinas de *B. cereus* atuam como os principais fatores de virulência e que sua toxicidade não é restrita ao nível das infecções gastrointestinais (Bottone, 2010). Jebberger et al. (2014) observaram diferentes níveis de citotoxicidade nas toxinas dos complexos HBL e NHE através de ensaios biológicos. Estes concluíram que a diferença na citotoxicidade total está relacionada com a presença de receptores específicos para estas toxinas.

Alguns autores já relataram a ocorrência dos genes associados às enterotoxinas e aos fatores de virulência em outras espécies do gênero (Hansen & Hendriksen, 2001; Gaviria Rivera et al, 2000; Yang et al, 2005; Martinez-Blanch et al, 2009; Soufiane & Cote, 2013). Em estudo desenvolvido com diversas espécies, entre elas *B. mycoides*, *B. pasteurii* e *B. thuringiensis*, Mantynen & Lindstrom (1998) relataram resultados positivos para a presença do gene *hblA* para todas as espécies estudadas, exceto para duas espécies termofílicas. A ocorrência de genes que codificam toxinas e sua relação com enfermidades de transmissão alimentar também foi relatada nas espécies *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. pumilus* (Kramer & Gilbert, 1989; Mikkola et al, 2000). Existem registros que *B. licheniformis* pode causar esporadicamente doenças diarreicas de origem alimentar (Mikkola et al, 2000). A espécie termotolerante *B. cytotoxicus* encontra-se ocasionalmente associada a casos de intoxicação alimentar grave (Guinebretiere et al, 2013).

Todas estas pesquisas refletem a ampla biodiversidade que as espécies do grupo *B. cereus* e espécies correlacionadas apresentam no meio ambiente. Distintos métodos moleculares atestam a diversidade genotípica dessas espécies e a heterogeneidade quanto à presença dos fatores de virulência que conseqüentemente aumentam as chances de persistência do microrganismo no ambiente.

1.5 - Tipagem Molecular para Caracterização das Espécies do Grupo *B. cereus*

A análise epidemiológica molecular de cepas bacterianas provenientes de diferentes origens remete à uma avaliação das relações filogenéticas existentes entre essas cepas. A principal questão a ser respondida nessas análises é saber se diferentes amostras de um determinado patógeno representam a disseminação de um organismo comum ou clone. Neste sentido a epidemiologia molecular sempre tem buscado desenvolver técnicas que proporcionem avaliar as relações genéticas existentes entre distintas cepas bacterianas.

Com advento da biologia molecular, nos anos 70, ficou evidente que o cromossomo representa a molécula fundamental de identidade das bactérias, tornando possível a elaboração de novas técnicas epidemiológicas (Persing & Tenover, 2004). Desde então uma série de técnicas vem sendo descritas e aprimoradas e estas, se utilizadas em conjunto com a epidemiologia clássica, com avaliações clínicas e toxigênicas apropriadas, tendem a facilitar não apenas o trabalho realizado por pesquisadores, mas, também, aquele dos próprios clínicos.

A tipagem de microrganismos progrediu consideravelmente nos últimos anos, em consequência do desenvolvimento de técnicas moleculares que fazem uso da variabilidade encontrada no genoma. O advento da tipagem molecular permitiu não só grandes avanços nos domínios da identificação, classificação e diagnóstico, mas também no estudo da evolução e filogenia dos microrganismos (Ehling-Schulz & Messelhäusser, 2013). Inúmeras técnicas moleculares baseadas no estudo da similaridade dos cromossomos foram desenvolvidas, dentre elas se destacam a eletroforese em campo pulsado – PFGE, o polimorfismo dos elementos repetitivos – rep-PCR e a tipagem de sequências de multilocos – MLST (Schwartz & Cantor, 1984; Versalovic et al, 1991; Maiden et al, 1998).

A tipagem molecular encontra aplicações relevantes na microbiologia clínica, na epidemiologia, dado o seu potencial para esclarecer a origem e disseminação de uma estirpe causadora de um surto infeccioso (Madigan et al, 2004). De forma geral, surtos resultam da exposição a uma fonte comum do agente etiológico e da sua disseminação rápida entre a população potencialmente hospedeira. Organismos geneticamente relacionados compartilham características genéticas, bioquímicas e, muitas vezes, fatores de virulência. Assim, em epidemiologia, o processo de tipagem é crítico, quer na identificação de surtos infecciosos e de episódios de transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, quer no reconhecimento da fonte de contaminação e de estirpes particularmente infecciosas (Madigan et al, 2004; Ehling-Schulz & Messelhäusser, 2013).

O conceito básico das técnicas de tipagem molecular propõe que cepas bacterianas epidemiologicamente relacionadas possuem um precursor comum, desta forma, estudos empregando essas técnicas permitem um melhor entendimento sobre os mecanismos evolutivos, surgimento de estirpes virulentas e reservatórios de cepas bacterianas (Ehling-Schulz & Messelhäusser, 2013).

Diversas técnicas estão disponíveis para a determinação da variabilidade genética. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares em todo o genoma do organismo. Tais marcadores genéticos são utilizados para a detecção dessa variabilidade, gerando informações sobre a diversidade genética.

Uma abordagem, introduzida no estudo de bactérias, envolve uma técnica altamente reproduzível, baseada em ampliações por PCR. Esta técnica, denominada rep-PCR, faz uso de sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas conservadas e presentes em numerosas cópias no genoma de diversas espécies bacterianas (Versalovic et al, 1991; 1994). Existem várias famílias de sequências repetitivas de DNA que têm sido relatadas em organismos procariotos, sendo as sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (*Repetitive Extragenic Palindromic* - REP-PCR) e as sequências intergênicas consensuais altamente repetitivas de enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC-PCR) as mais correntemente estudadas (Higgins et al, 1988; Hulton et al, 1991).

As sequências REP consistem de repetições invertidas e conservadas de 35-40 nucleotídeos, constituindo um palíndromo, onde cópias sucessivas são organizadas em orientação alternada (Versalovic et al, 1991). Tanto as sequências ERIC quanto os elementos REP encontram-se em regiões não-codificadoras, mas são provavelmente transcritos e possuem potencial para formar estruturas secundárias (Stern et al, 1984; Higgins et al, 1988). Esta técnica tem sido considerada importante para a análise da estrutura populacional bacteriana, podendo ser utilizada na caracterização de bactérias em diferentes níveis taxonômicos (Ishii & Sadowsky, 2009).

A evolução dos genomas bacterianos tem sido relacionada com duplicações, inversões e outros rearranjos (Komine et al., 1990), sendo estes eventos frequentemente relacionados com sequências de DNA repetitivo. Portanto, a organização do genoma depende da ação da seleção natural e, sendo assim, a dispersão de sequências repetitivas de DNA pode ser um indicativo da estrutura e da evolução do genoma bacteriano (Ishii & Sadowsky, 2009).

Regiões repetitivas apresentam maior variabilidade do que outras regiões genômicas e podem ser utilizadas para analisar a relação genética entre linhagens, além de caracterizar e discriminar as espécies em nível genômico (Kumar et al, 2014). Da Silva et al. (2013) utilizando a técnica rep-PCR, detectaram a

divergência genética entre 47 cepas de *B. thuringiensis* isoladas de solos de diferentes localidades do Brasil. Godoy et al. (2012) aplicaram esta técnica para diferenciar linhagens de *B. cereus* associadas a um surto infeccioso em psitacídeos em cativeiro. Brumlik et al. (2001) utilizando o rep-PCR, identificaram cinco grupos filogenéticos em 105 cepas de *B. anthracis* de diversas origens geográficas.

De acordo com Sauka et al. (2011) a referida técnica permitiu a distinção de 131 estirpes de *B. thuringiensis* coletados de diferentes ecossistemas argentinos. Estes autores demonstraram que sorovares de *B. thuringiensis* podem ser diferenciados e identificados com base nos perfis da análise do rep-PCR e mesmas cepas localizadas num mesmo sorotipo foram diferenciadas. Este estudo pode ajudar a estabelecer um sistema de classificação de cepas de *B. thuringiensis* com um nível de discriminação maior que o estabelecido através da sorotipagem flagelar.

Devido à alta plasticidade genômica, a estrutura populacional do grupo *B. cereus* l.s. revelou-se completamente dinâmica, e existe, dentro deste grupo de bactérias, um amplo potencial para o surgimento de novas linhagens patogênicas, com maior virulência, ou com capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas (Kolsto et al, 2009; Ehling-Schulz et al. 2011; Tourasse et al, 2011).

Um conhecimento profundo da estrutura populacional do grupo *B. cereus* l.s. é, portanto, não só de interesse acadêmico em geral, mas também de grande importância para o diagnóstico em microbiologia alimentar e clínica (Ehling-Schulz & Messelhäuser, 2013).

Durante a última década, vários esquemas baseados em MLST foram desenvolvidos para tipagem das espécies do grupo *B. cereus* l.s., os quais têm sido amplamente utilizados para inferência das relações genéticas entre as espécies do grupo provenientes de diferentes origens, como amostras de solo, insetos, alimentos e humanos (Ehling-Schulz et al, 2005; Vassileva et al, 2006; Cardazzo et al, 2008; Hoffmaster et al, 2008; Tourasse & Kolsto, 2008; Raymond et al, 2010). Embora os diferentes esquemas de MLST empreguem distintos genes constitutivos, todos revelaram três *clusters* principais para as espécies que compõem esse grupo de bactérias. Visto que inúmeras cepas foram comuns para diferentes estudos, uma correspondência foi estabelecida entre os vários *clusters*, cladogramas, linhagens ou complexos clonais previamente determinados (Helgason et al, 2004, Ko et al, 2004; Priest et al, 2004; Sorokin et al, 2006).

É interessante observar que os mesmos *clusters* principais foram demonstrados através da análise por espectrometria de infravermelho transformada de Fourier - FTIR, apontando características fenotípicas conservadas das espécies geneticamente relacionadas (Ehling-Schulz et al, 2005). No entanto, independentemente do método de tipagem utilizado, diferentes cepas das espécies do grupo *B. cereus*

estão alocadas em diferentes *clusters*, questionando a adequação dos diagnósticos exclusivamente com base na identificação das espécies.

O polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados - AFLP (Vos et al, 1995) foi o método de escolha por Guinebretiere et al. (2008) para a tipagem de 425 cepas de espécies distintas do grupo *B. cereus* provenientes de diferentes nichos ecológicos. Sete *clusters* principais (denominados I – VII) foram identificados, os quais se correlacionam com as propriedades fisiológicas das estirpes.

Despontando como uma das principais técnicas de *fingerprinting* de DNA, o PFGE tornou-se um dos métodos de tipagem mais importantes para análise epidemiológica da maioria das bactérias patogênicas, principalmente para agentes patogênicos de origem alimentar em situações de surto. Em princípio, o PFGE foi utilizado para tipagem de *B. cereus* (Carlson et al, 1994; Liu et al, 1997; Ohsaki et al, 2007), porém a *PulseNet International* (2014), uma rede de monitoramento de infecções alimentares em todo mundo, não forneceu até momento um protocolo padrão de tipagem molecular para o *B. cereus* (Swaminathan et al, 2006; www.pulsenetinternational.org). Em estudos epidemiológicos, especialmente nos casos de surtos de origem alimentar, protocolos padrões seriam obrigatórios para gerar informações reprodutíveis entre laboratórios em todo mundo.

MLST e AFLP são metodologias utilizadas com mais frequência para diferenciação e investigações epidemiológicas dos membros do grupo *B. cereus*, se comparado às técnicas de PFGE. A análise do número variável de repetições em tandem de multilocus (*multilocus VNTR typing* – MLVA) e do polimorfismo de troca de base única (*single-nucleotide polymorphism* - SNP) são atualmente os métodos de escolha para tipagem de isolados pertencentes às espécies altamente monomórficas como o *B. anthracis* (Keim et al, 2000; Kuroda et al, 2010).

O MLST é uma técnica de caracterização molecular e investigação epidemiológica que foi inicialmente desenvolvida para genotipagem de *Neisseria meningitidis* (Maiden et al, 1998), bem como, para outras espécies patogênicas bacterianas, dentre as quais *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. (Maiden, 2006). Esta metodologia vem sendo utilizada com sucesso para explorar a estrutura populacional de bactérias, além de estudar a evolução das propriedades de virulência e identificar clones epidêmicos (Helgason et al, 2004).

O MLST é um método altamente discriminatório que se baseia na análise de polimorfismos de nucleotídeos na sequência de DNA em genes constitutivos (genes *housekeeping*) de pelo menos sete fragmentos internos (*loci*) com aproximadamente 400-500 pares de bases de determinados genes que codificam enzimas de manutenção celular. O fato de utilizar enzimas do metabolismo, não submetidas a

pressão seletiva, permite detectar variações neutras que definem linhas clonais relativamente estáveis (Enright & Spratt, 1999). Estas regiões são inicialmente amplificadas através da PCR e, então, as suas sequências são determinadas. As diferentes sequências para cada gene são denominadas de alelos. A composição de alelos dos diferentes genes sequenciados para cada cepa fornece um perfil alélico denominado de *sequence type* (ST). As sequências obtidas são comparadas com as de alelos conhecidos que estão depositadas em bancos de dados disponíveis na Internet (<http://www.mlst.net>; <http://mlstoslo.uio.no>; <http://pubmlst.org/bcereus/>).

Helgason et al. (2004) desenvolveram um esquema para análise filogenética das espécies do grupo *B. cereus* através do MLST. Este esquema apresenta um alto grau de resolução e revelou-se uma ferramenta excelente para estudar a estrutura populacional e epidemiológica deste grupo de bactérias.

Esquemas alternativos foram posteriormente desenvolvidos por vários outros grupos de pesquisas (Candelon et al, 2004; Ko et al, 2004; Priest et al, 2004; Sorokin et al, 2006). O MLST passou então a ser amplamente utilizado como o principal método de tipagem para analisar a estrutura populacional e genômica das espécies que compõem o grupo *B. cereus* (Tourasse et al, 2006). Tourasse & Kolsto (2008) desenvolveram um banco de dados designado *SuperCAT*, que compila todos os dados do MLST a partir dos cinco esquemas publicado para o grupo *B. cereus*. Estes autores relacionaram as informações filogenéticas obtidas através do MLST, a fim de produzir uma visão integrada da estrutura genômica e populacional das espécies do grupo *B. cereus* acessível em <http://mlstoslo.uio.no>. Após a criação do *SuperCAT* os dados do banco foram compilados para construir uma árvore filogenética e foram integrados aos resultados da eletroforese de multilocus enzimáticos - MLEE e de AFLP, dois outros métodos de tipagem que têm sido utilizados para a escala de grandes estudos populacionais do grupo. O MLST combinado ao MLEE e aos dados do AFLP foram incorporadas ao um novo banco de dados designado *HiperCAT* (<http://mlstoslo.uio.no>) (Tourasse et al, 2010).

A adequação da caracterização das espécies do grupo *B. cereus* tornou-se essencial nos estudos epidemiológicos. Neste contexto, Tourasse et al. (2011) realizaram a análise de múltiplos dados usando as ferramentas do banco de dados *HiperCAT*, e compilaram os dados obtidos por MLST, AFLP e MLEE. As principais observações incluem a detecção de grupos filogeneticamente separados que representam novas linhagens evolutivas no *B. cereus* *l.s.*, um novo ramo evolutivo entre as cepas de *B. anthracis*, bem como novos grupos de cepas relacionadas agrupadas com amostras de origem clínica e ambiental.

A estrutura populacional de bactérias patogênicas varia amplamente de estritamente clonal a efetivamente panmítica (Maynard-Smith et al, 1993). Sorokin et al. (2006) usaram o MLST para avaliar as relações filogenéticas de uma coleção de cepas do *B. cereus* *l.s.* de origem ambiental. Os resultados

sugerem uma população panmítica (recombinação entre indivíduos de diferentes genótipos que devem ocorrer ao acaso, sem qualquer preferência) entre as cepas de *B. weihenstephanensis*, enquanto que as estirpes de *B. cereus* e *B. thuringiensis* mostraram-se clonais.

Dois estudos suplementares, cada qual utilizando um conjunto de genes constitutivos diferentes para MLST, também sugeriram uma estrutura populacional clonal à fracamente clonal para o *B. cereus* l.s., com mudanças evolutivas ocorrendo através de mutações pontuais (Helgason et al, 2004; Priest et al, 04). Helgason et al. (2000) e Ehling-Schulz et al. (2005) demonstraram que amostras de *B. cereus* patogênicas associadas com periodontites e gastroenterite emética formam um grupo clonal específico.

Em estudo desenvolvido por Barker et al. (2005) oito cepas de *B. cereus* isoladas de infecções clínicas foram analisadas através do MLST. Os autores demonstraram que estas amostras possuíam diferentes origens filogenéticas e concluíram que as cepas de *B. cereus* envolvidas em infecções oportunistas não pertenciam a um único complexo clonal de cepas altamente virulentas.

O isolamento crescente de *B. cereus* de hemoculturas e de infecções sistêmicas graves demonstram que esse microrganismo está se tornando um importante patógeno nosocomial. Zhang et al. (2011), com a aplicação de MLST, demonstraram que seis cepas de *B. cereus* isoladas de surtos de infecção hospitalar foram filogeneticamente relacionadas ao *B. anthracis*. A análise dos genes de virulência mostrou que as seis linhagens possuem a sequência Ba813 (marcador cromossômico específico para *B. anthracis*) e somente uma estirpe foi *cap*-positivo (antígeno capsular). Os resultados sugerem que as cepas envolvidas em surtos e isoladas de hemoculturas possuem características que as possibilitam causar infecções graves, e que a descrição de marcadores moleculares, como o gene constitutivo *dnaJ* [codifica a proteína do choque térmico 40 (Hsp40)], é importante para identificá-las.

Vassileva et al. (2006) analisaram através do MLST, dez cepas de *B. cereus* provenientes de casos de infecções sistêmicas graves e letais. Cinco cepas agruparam-se próximas as cepas de *B. anthracis* revelando uma origem filogenética comum. As cepas de casos letais com sintomas respiratórios foram alocadas nos dois principais clados. Através das análises realizadas, os autores relataram que cepas patogênicas formaram diferentes *clusters* na árvore filogenética.

Em outro estudo, Hoffmaster et al. (2008) utilizando MLST demonstraram que cepas de *B. cereus* de origem clínica foram filogeneticamente diversas e encontravam-se distribuídas entre dois dos três *clusters* previamente descritos. Neste estudo não foi possível confirmar se linhagens específicas ou complexos clonais de cepas clínicas estão associados com a enfermidade, semelhante ao que ocorre com *B. cereus* eméticos e *B. anthracis* que formam um complexo clonal específico.

Em estudo recentemente desenvolvido por Drewnowska & Swiecicka (2013) a estrutura ecogenética do *B. cereus* L.s. provenientes de diferentes ambientes do noroeste da Polônia foram avaliadas. Apesar da alta diversidade genética observada através do MLST, os autores verificaram que entre as espécies do grupo *B. cereus* isoladas de amostras ambientais que provieram de três habitats distintos, as populações analisadas parecem ter aspecto clonal. As análises filogenéticas revelaram que somente um pequeno número de amostras, principalmente as cepas ambientais associadas aos fatores antropogênicos, agruparam no *cluster* I e estavam associadas com o *B. cereus* L.s. patogênicos, enquanto que a maioria das amostras agrupou-se no *cluster* III que incluem as linhagens ambientais. Com base nas propriedades genéticas das cepas isoladas, os autores não encontraram argumentos para unir as espécies em um único clado. Ao contrário do *B. cereus* L.s., associados aos casos clínicos humanos, que exibem similaridade significativa, as amostras de origem ambiental são mais complexas (Drewnowska & Swiecicka, 2013).

Para entender a estrutura genética do grupo *B. cereus* com relação à virulência, Didelot et al. (2009) utilizaram o MLST para caracterizar 667 cepas, e reconstruíram a história evolutiva das espécies do *B. cereus* L.s. tanto em termos de herança clonal como de recombinação. A análise evolutiva confirmou a existência de três *clusters* principais e demonstrou que cepas de *B. cereus* de origem clínica (com exceção das cepas produtoras de toxina emética) estão distribuídas uniformemente entre e dentro dos *clusters* I e II. Já as estipes eméticas de *B. cereus* e *B. anthracis* mostraram estrutura clonal e estão restritos ao *cluster* I. Na caracterização dos perfis de transferência genética, os resultados das análises revelaram que existem barreiras parciais ao fluxo gênico entre os três *clusters*. No entanto, tem ocorrido um grande número de importações recentes para o *cluster* I de cepas de origem externa, o que indica uma mudança constante dos limites do fluxo gênico neste *cluster*, e estudos posteriores serão importantes para se estabelecer as fontes, causas e consequências destas importações (Didelot et al, 2009).

Mediante a escassez de dados genotípicos e de virulência relativos às cepas das espécies do *B. cereus* L.s. originárias do Brasil, a caracterização molecular e toxigênica de cepas isoladas ao longo de quatro décadas expõem informações relevantes a respeito da epidemiologia molecular das espécies estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo realizar uma análise da estrutura populacional de cepas identificadas como espécies do grupo do *B. cereus* provenientes de três origens diferentes, avaliando a distribuição dos genes codificadores de enterotoxinas, e de outros fatores de virulência, entre cepas isoladas de diferentes nichos ecológicos e períodos de tempo distintos.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar, com base nos fenótipos, a produção de enzimas extracelulares tais como lecitinase e amilase, bem como a atividade hemolítica e a capacidade de motilidade das cepas;
- Determinar a distribuição e a frequência dos genes codificadores de toxinas dos complexos HBL (Hemolisina BL) e NHE (Enterotoxina não-hemolítica), bem como dos genes codificadores da citotoxina K (*cytK1* e *cytK2*), da enterotoxina FM (*entFM*) e da toxina emética (*ces*) caracterizando as cepas selecionadas quanto ao potencial enterotoxigênico;
- Determinar a distribuição e a frequência dos genes que codificam outros fatores de virulência, que incluem as fosfolipases (*pipIc*, *pcplc* e *sph*) e as hemolisinas (*hlyI*, *hlyII* e *hlyIII*) frequentemente associadas às infecções sistêmicas caracterizando as cepas selecionadas quanto ao potencial adicional de virulência;
- Identificar a presença dos genes codificadores da proteína de choque frio (*cspA* e *cspF*) e a assinatura específica do DNAr 16S do gene *rrs* que caracterizam cepas psicrotólicas;
- Avaliar a similaridade intraespecífica através do polimorfismo de elementos repetitivos - Rep-PCR com a finalidade de determinar a variabilidade genética entre as cepas selecionadas;
- Determinar o perfil alélico através da tipagem de sequências de multilocus - MLST das cepas selecionadas, com intuito de avaliar as relações filogenéticas e populacionais das cepas entre as mesmas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Aspectos Bioquímicos

3.1.1 - Cepas Bacterianas Empregadas e suas Procedências

O anexo 1 apresenta as 167 cepas isoladas no Brasil ao longo de quatro décadas (anos 80, 90 e 2000, 2010) e provenientes de três fontes distintas (solos de diversas localidades, diversos tipos de gêneros alimentícios e larvas de insetos), que foram identificadas no Laboratório de Fisiologia Bacteriana como espécies do grupo do *B. cereus*, sendo 82 cepas de *B. thuringiensis*, 70 cepas de *B. cereus* e 15 cepas de *B. mycooides*. Todas as culturas estão catalogadas e encontram-se depositadas sob a forma liofilizada na Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGB) do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ /RJ. Os frascos-ampola com os líofilos são conservados à temperatura de refrigerador ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Todas as cepas bacterianas foram cultivadas a 33°C em Caldo Nutriente (Oxoid) com agitação (150rpm) por 4h e subcultivadas em Ágar Nutriente (Oxoid) com incubação a 33°C . Após 24h, os cultivos foram transferidos para tubos de ensaios (em duplicata) com Ágar Nutriente.

3.1.2 – Detecção da Produção de Enzimas Extracelulares, Atividade Hemolítica e Motilidade

3.1.2.1 – Hidrólise do Amido

Para a detecção da enzima amilase foi utilizado o meio Ágar Nutriente acrescido de amido solúvel na proporção de 0,2%, como previamente descrito (Claus & Berkeley, 1986). Após a autoclavação e resfriamento do meio à 45°C a mistura foi distribuída assepticamente (15mL) em placas de Petri (15 X 90mm).

Cada placa de Ágar Amido foi dividida em quatro partes iguais e, em cada parte foi inoculado 10 μL do crescimento de 24h em Caldo Nutriente. Após a incubação por 24h, a atividade amilolítica foi revelada adicionando-se à superfície do meio de cultura algumas gotas de solução aquosa de Lugol diluída 1:5 (Iodeto de Potássio 10%; Cristais de Iodo 5%). A presença de uma zona de transparência incolor ao redor e sob as colônias indicou a produção de amilase. Nas culturas não hidrolíticas de amido, o meio de cultura mostrou-se corado de azul intenso. Os controles positivo e negativo utilizados foram *B.*

cereus NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) e *B. sphaericus* ATCC 14577 (LFB-FIOCRUZ 742), respectivamente.

3.1.2.2 – Produção da Lecitinase

Para a detecção da enzima lecitinase foi utilizado o meio de cultura formulado de acordo com Vasconcellos & Rabinovitch (1995) cuja composição em g/L é: Triptona (Difco) – 10; Tris-(hidroximetil) aminometano (Sigma) – 1,21; Cloreto de sódio (Sigma) – 5; MgSO₄.7H₂O (Sigma) – 0,2; Resazurina – 0,01; Ágar-ágar (Oxoid) – 20; pH 7,2 ± 0,2. A esterilização foi feita em autoclave a 120°C por 20min, resfriou-se o meio até 45°C e adicionou-se assepticamente 50mL de gema de ovo estéril (Oxoid) seguindo-se homogeneização, sendo após vertidos 15mL da mistura em placas de Petri (15x90mm).

As placas de Ágar Lecitina de Ovo foram divididas em quatro partes iguais, inoculadas com 10µL de cultivo de cada cepa e observadas após a incubação a 30°C por 24h. A hidrólise da lecitina foi observada como um halo turvo contornando as colônias, podendo ser levemente corado em rosa, em contraste com o restante do meio de cultura que permanece com a cor rosa mais intensa. Os controles positivo e negativo utilizados foram *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) e *B. sphaericus* ATCC 14577 (LFB-FIOCRUZ 742), respectivamente.

3.1.2.3 – Produção de Hemólise

Para a avaliação da atividade hemolítica das cepas sobre hemácias de carneiro foi utilizado o meio de Ágar Sangue, preparado com a adição de 5% de sangue desfibrinado de carneiro ao Ágar BHI (*Brain Heart Infusion* – Oxoid) e distribuído em placas de Petri (15x90mm). A atividade hemolítica foi avaliada pela inoculação de 10µL do crescimento das culturas bacterianas sobre a superfície da placa contendo Ágar Sangue (Claus & Berkeley, 1986).

As placas foram incubadas a 30°C por 24h e, após este período, se pesquisou a existência e o tipo de atividade hemolítica, sendo a mesma classificada como β-hemólise (indicada por uma zona de hemólise total de 2-4mm de diâmetro ao redor do crescimento bacteriano) ou α-hemólise (indicada pela formação de um halo esverdeado no contorno da colônia). Os controles positivo e negativo utilizados foram *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) e *B. sphaericus* ATCC 14577 (LFB-FIOCRUZ 742), respectivamente.

3.1.2.4 – Teste de Motilidade

Para a avaliação de motilidade utilizou-se o meio específico cuja composição em g/L é: Triptose (Oxoid) – 10; NaCl (Sigma) – 5; Ágar-Ágar (Oxoid) - 5; pH $7,2 \pm 0,2$ (Gordon et al. 1973).

A prova foi efetuada inoculando-se em linha reta, através da técnica de punctura (com agulha), 2/3 do meio semisólido. Os tubos inoculados foram incubados a 33°C por 48h. A prova indica motilidade quando os microrganismos crescem deslocando-se da linha de inoculação, turvando parcial ou totalmente o meio. A prova é negativa quando os microrganismos ficam restritos ao local da inoculação sem, contudo, turvar o meio. Os controles positivos utilizados foram *E. coli* ATCC 25922 e *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) e o controle negativo o *S. aureus* ATCC 25923.

3.2 – Detecção de Genes Codificadores de Enterotoxinas, Fatores de Virulência, Proteína de Choque Frio e da Assinatura Específica do DNA ribossomal 16S do Gene *rrs* através da Reação em Cadeia da Polimerase

3.2.1 - Extração do DNA através de Lise Térmica

A extração do DNA bacteriano foi realizada de acordo com Vivoni et al. (2006). As amostras foram cultivadas em placas de Ágar Nutriente (Oxoid) a 33°C. Após 18h foi retirado, com auxílio de uma alça descartável e estéril, o crescimento equivalente a uma colônia. O crescimento foi suspenso em 1mL de tampão TE (Tris-HCl 1M, pH 8.0 e EDTA 0,5M, pH 8.0) e posteriormente agitado em vórtex.

Após a centrifugação (3000rpm/5min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso novamente em 400µL de tampão TE. Esta suspensão foi mantida à temperatura de 100°C por 10min. A seguir, as amostras foram centrifugadas (11000rpm/1min) e o sobrenadante coletado e transferido para microtubos plásticos estéreis, que foram estocados a -20°C até o momento do uso.

3.2.2 - Detecção Simultânea dos Genes Codificadores das Enterotoxinas e Citotoxina K

Os ensaios da PCR foram efetuados em um termociclador (*Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700*). Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação encontram-se descritos no Quadro 1.

A detecção simultânea dos genes codificadores da hemolisina BL (*hblA*, *hblC* e *hblD*), enterotoxina não hemolítica (*nheA*, *nheB* e *nheC*), enterotoxina FM (*entFM*) e toxina emética (*ces*) foram realizadas através de reações de multiplex-PCR segundo a metodologia descrita por Yang et al. (2005).

As reações da PCR foram feitas em um volume de reação de 25µL contendo 1X de tampão PCR 10X (Tris-cloridrato 50mM, KCl 10mM, [NH₄]₂SO₄ 5mM, MgCl₂ 2mM, pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM de cada base nitrogenada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 40 a 350mM de cada iniciador (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 1U de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*) e 1µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/2 min, seguindo-se 30 ciclos de 95°C/30s, 60°C/30s e 72°C/45s com um ciclo final de extensão de 72°C/7 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X (Tris Base 890mM, Ácido Bórico 890mM, EDTA 20mM, pH 8,0), submetidos a voltagem de 65V por 1h sendo observados após 30min de imersão em solução corante (*GelRed™ Biotium*). Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação (*MiniBis-Pro photodocumentation system - DNR Bio-Imaging Systems Ltda*). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com padrão de tamanho molecular de DNA de 100pb (*Amersham Pharmacia Biotech*). Foram utilizadas as cepas de referência *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) como controle positivo para as enterotoxinas e as cepas de *B. cereus* RIVM-Bc 0062 (LFB-FIOCRUZ 1539) e *B. cereus* NHV 0173/05 (LFB-FIOCRUZ 1540) como controles positivos para a toxina emética.

Os genes da citotoxina K (*cytK1* e *cytK2*) foram detectados através da PCR descrita por Guinebretiere et al. (2006). As reações da PCR para citotoxina K (*cytK1* e *cytK2*) foram realizadas em um volume de reação de 25µL contendo 1X de tampão PCR 10X, MgCl₂ 2,5mM, dNTPs 0,2mM de cada nucleotídeo, iniciadores 0,25µM de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 0,75U de *Taq* DNA polimerase e 1µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/5 min, seguindo-se 30 ciclos de 94°C/15s, 57°C/30s e 72°C/30s com um ciclo final de extensão de 72°C/7 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X a 65V por 45min e observados após 30min de imersão em solução corante. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador de DNA de 100pb. Foram utilizadas as cepas de referência *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) e o *B. thuringiensis* IPS-82 (LFB-FIOCRUZ 584) como controle positivo para a citotoxina K (*cytK2*).

3.2.3 - Detecção de Genes Codificadores de Fatores de Virulência

Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação encontram-se descritos no Quadro 1. Os genes que codificam os fatores de virulência fosfolipases C (*pipIc*, *pcplc* e *sph*) e hemolisinas (*hlyII* e *hlyIII*) foram detectados por meio da PCR como descrito por Hendriksen et al. (2006). Já a cereolisina O (*clo*) foi detectada através de PCR como descrito por Martinez-Blanch et al. (2009).

As reações da PCR foram realizadas em um volume de reação de 25µL contendo 1X de tampão PCR 10X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,1mM de cada nucleotídeo, iniciadores 1pmol de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 0,5U de *Taq* DNA polimerase e 1µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/2min, seguindo-se 30 ciclos de 94°C/15s, 56°C/45s e 72°C/2min e um ciclo final de extensão por 7min/72°C.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X a 65V por 1h e observado após 30min de imersão em solução corante. Os fragmentos foram detectados sob iluminação com luz UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador de DNA 100pb. Foram utilizadas as cepas de referência de *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) como controle positivo para os fatores de virulência.

As reações de PCR para cereolisina O (*clo*) foram realizadas em um volume de reação de 25µL contendo 1X de tampão PCR 10X, MgCl₂ 1,5mM, solução dNTPs 100µM, iniciadores 1µM de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 0,5U de *Taq* DNA polimerase e 1µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/5min, seguindo-se 30 ciclos de 94°C/30s, 56°C/45s e 72°C/45s, comum ciclo final de extensão por 5min/72°C.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8% (p/v) preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X a 65V por 35min e observado após 30min de imersão em solução corante. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador de DNA 100pb. Foi utilizada a cepa de referência *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) como controle positivo para a cereolisina O.

3.2.4 – Caracterização Genotípica de Cepas de *B. thuringiensis* e *B. cereus* Psicrotróficas

3.2.4.1 - Detecção dos Genes *cspA* e *cspF*

Para a detecção dos genes *cspA* e *cspF*, codificadores da proteína de choque frio, a reação da PCR foi realizada como descrito por Francis et al. (1998). Regiões específicas dos genes *cspA* e *cspF* foram amplificadas utilizando os iniciadores BcAPF1, BcAPR1 e BcFF2 (Quadro 1).

As reações da PCR foram feitas em um volume de reação de 25µL composto por 1X de tampão PCR 10X, MgCl₂ 25mM, dNTPs 0,2mM de cada, iniciadores 25pmol de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 1U de *Taq* DNA polimerase e 1µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 95°C/5 min, seguindo-se 30 ciclos de 95°C/15s, 55°C/30s e 72°C/30s com extensão final de 72°C/2min.

Alíquotas dos produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X a 65V por 45min e observados após 30min de imersão em solução corante. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador de DNA 100pb. A amplificação dos genes *cspA* (genótipo psicrófilo) e *cspF* (genótipo mesofílico) gera fragmentos de DNA com 160pb e 284pb, respectivamente. As cepas de referência de *B. weihenstephanensis* 6A24 (LFB-FIOCRUZ 1672), 6A46 (LFB-FIOCRUZ 1673) e a 6A50 (LFB-FIOCRUZ 1674) foram utilizadas como controle positivo para genótipo psicrófilo e o *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) como controle positivo para genótipo mesofílico.

3.2.4.2 - RFLP-PCR para a Assinatura Específica do DNAr 16S do Gene *rrs*

Com a finalidade de diferenciar cepas mesófilas e psicrotróficas foi realizada a amplificação e digestão enzimática do produto amplificado da sequência de assinatura específica do DNA ribossomal 16S do gene *rrs*, como definido por Prüss et al. (1999) (Quadro 1).

As reações da PCR foram feitas em um volume de reação de 25µL composto por 1X de tampão PCR 10X, MgCl₂ 25mM, dNTPs 0,2 mM de cada, iniciadores 50pmol de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 1U de *Taq* DNA polimerase e 1µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 95°C/2 min, seguindo-se 30 ciclos de 95°C/15s, 55°C/30s e 72°C/30s com extensão final de 72°C/2min.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão de eletroforese TBE 0,5X a 65V por 30 min. Após conferida a amplificação do fragmento, os produtos da PCR foram submetidos à restrição enzimática com enzima de restrição *SspI* seguindo as recomendações do fabricante (*New England Biolabs*): uma alíquota de 10µL da mistura enzimática (contendo *SspI* 5U, BSA 2mg e tampão da enzima *SspI*) foi adicionada diretamente à 15µL do produto amplificado e a solução resultante incubada a 37°C por 4h.

Os fragmentos de DNA oriundos da restrição enzimática foram separados em gel de agarose a 2% em tampão de eletroforese TBE 0,5X e submetido à eletroforese a 65V por 45min. O gel foi corado por imersão em solução corante por 30min. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. As cepas de referência de *B. weihenstephanensis* 6A24 (LFB-FIOCRUZ 1672), 6A46 (LFB-FIOCRUZ 1673) e a 6A50 (LFB-FIOCRUZ 1674) foram utilizadas como controle positivo para genótipo psicrófilo e o *B. cereus* NCTC 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) como controle positivo para genótipo mesofílico.

Quadro 1: Sequências e afiliações dos iniciadores utilizados neste estudo.

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>hblA</i>	HA-F1	ATT AAT ACA GGG GAT GGA GAA ACT T	237	Yang <i>et al.</i> (2005)
	HA-R1	TGA TCC TAA TAC TTC TTC TAG ACG CTT		
<i>hblC</i>	HC-F1	CCT ATC AAT ACT CTC GCA ACA CCA AT	386	Yang <i>et al.</i> (2005)
	HC-R1	TTT TCT TGA TTC GTC ATA GCC ATT TCT		
<i>hblD</i>	HD-F1	AGA TGC TAC AAG ACT TCA AAG GGA AAC TAT	436	Yang <i>et al.</i> (2005)
	HD-R1	TGA TTA GCA CGA TCT GCT TTC ATA CTT		
<i>nheA</i>	NA-F1	GCG GAT ATT GTA AAG AAT CAA AAT GAG GT	475	Yang <i>et al.</i> (2005)
	NA-R1	TTT CCA GCT ATC TTT CGC TGT ATG TAA AT		
<i>nheB</i>	NB-F1	ATT ACA GGG TTA TTG GTT ACA GCA GT	328	Yang <i>et al.</i> (2005)
	NB-R1	AAT CTT GCT CCA TAC TCT CTT GGA TGC T		
<i>nheC</i>	NC-F1	GTG CAG CAG CTG TAG GCG GT	557	Yang <i>et al.</i> (2005)
	NC-R1	ATG TTT TTC CAG CTA TCT TTC GCA AT		
<i>ces</i>	EM-F1	AGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT	635	Yang <i>et al.</i> (2005)
	EM-R1	GTATTTCTTTCCCGCTTGCCTTTT		
<i>enFM</i>	FM-F2	CAA AGA CTT CGT AAC AAA AGG TGG T	290	Yang <i>et al.</i> (2005)
	EM-F1	TGT TTA CTC CGC CTT TTA CAA ACT T		
<i>cytK-1</i>	CK1F	CAA TTC CAG GGG CAA GTG TC	426	Guinebretiere <i>et al.</i> (2006)
	CK1R	CCT CGT GCA TCT GTT TCA TGA G		
<i>cytK-2</i>	CK2F	CAA TCC CTG GCG CTA GTG CA	585	Guinebretiere <i>et al.</i> (2006)
	CK2R	GTG IAG CCT GGA CGA AGT TGG		
<i>piplc</i>	PhosC 1	CGCTATCAAATGGACCATGG	569	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	PhosC 2	GGACTATTCCATGCTGTACC		
<i>pcplc</i>	CERA1	ACTGAGTTAGAGAACGGTAT	536	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	CERA2	CGCTTACCTGTCATTGGTGT		
<i>sph</i>	CERB1	TCGTAGTAGTGAAGCGAAT	457	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	CERB2	AGTCGCTGTATGTCCAGTAT		
<i>hlyII</i>	BcHlyII-S	AGAAGGAGTGGCTGTCTGTA	535	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	BcHlyII-A	TTCTTTCCAAGCAAAGCTAC		
<i>hlyIII</i>	BCHEM 1	AATGACACGAATGACACAAT	444	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	BCHEM 3	ACGATTATGAGCCATCCCAT		
<i>clo</i>	BC-1	CTGTAGCGAATCGTACGTATC	185	Wang <i>et al.</i> (1997)
	BC-2	TACTGCTCCAGCCACATTAC		
<i>cspA</i>	BcAPF1	GAGGAAATAATTATGACAGTT	284	Francis <i>et al.</i> (1998)
	BcAPR1	CTTYTTGGCCTTCTTCTAA		
<i>cspF</i>	BcFF2	GAGATTTAAATGAGCTGTAA	160	Francis <i>et al.</i> (1998)
	BcAPR1	CTTYTTGGCCTTCTTCTAA		
<i>rrs</i>	rrsF	GTCGAGCGAATGGATTAAG	473	Prüss <i>et al.</i> (1999)
	rrsR	GCTGCTGGCACGTAGTTA		

3 - Genotipagem

3.3.1 - Caracterização Genotípica por Rep-PCR

A tipagem por rep-PCR das cepas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* selecionadas foi realizada como descrito por Reyes-Ramirez & Ibarra (2005). As regiões específicas foram amplificadas utilizando-se os iniciadores: Bc-REP1 (ATTAAAGTTTCACTTTAT) e Bc-REP2 (TTTAATCAGTGGGG) (Quadro 1).

As reações da PCR foram feitas em um volume de reação de 25µL contendo 1X de tampão PCR 10X, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 200µM da solução, iniciadores 300ng de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 2,5U de *Taq* DNA polimerase e 1µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/5min, seguindo-se 34 ciclos de 94°C/1min, 42°C/1min e 72°C/90s e extensão final de 72°C/7min.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X a 2V/cm por 4h, sendo observados após 30min de imersão em solução corante. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador de DNA 1kb.

Os perfis de fragmentos amplificados obtidos foram analisados por inspeção visual e com o auxílio do programa *Gel Compar II - Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns* (versão 1.5) (*Applied Maths, Kortrijk, Bélgica*). O grau de similaridade entre os perfis obtidos foi determinado pela construção de uma matriz de similaridade, aplicando-se o coeficiente de Dice com 1% de tolerância de posição e 0,40% de otimização. Esta matriz foi transformada em dendograma pelo método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA) (Rohlf, 2002).

3.3.2 - Caracterização Genotípica por MLST

O protocolo de MLST-PCR utilizado para amplificação dos genes alvo neste estudo encontra-se descrito no site <http://mlstoslo.uio.no/bcereus>, desenvolvido por Tourasse & Helgason (2006) para o grupo *B. cereus*.

3.3.2.1 - Amplificação dos Genes Alvo através da PCR

Os genes alvo e as sequências dos iniciadores utilizados na amplificação para esse esquema de MLST encontram-se no Quadro 2. Para o sequenciamento dos fragmentos amplificados foram utilizados os mesmos iniciadores (*Invitrogen, São Paulo, Brasil Life Technologies*).

O MLST foi realizado com base na sequência de nucleotídeos dos sete genes constitutivos (*housekeeping*) citados no site mencionado acima: *adk* (adenilato quinase); *ccpA* (proteína A controle metabólico); *glpF* (glicerol proteína de absorção); *glpT* (glicerol 3-fosfato permeasse / transportador); *panC* (pantotenato beta-alanina ligase); *pta* (fosfato acetiltransferase) e *pycA* (piruvato carboxilase).

O protocolo de MLST-PCR utilizado para amplificação dos genes alvo neste estudo encontra-se descrito no site <http://mlstoslo.uio.no/bcereus>, desenvolvido por Tourasse & Helgason (2006).

As reações do MLST-PCR para as cepas selecionadas foram efetuadas em volume final de 50µL, contendo 2µL de DNA molde (aproximadamente 50ng), iniciadores isotérmicos 20µM de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), dNTPs 2mM de cada base nitrogenada, 1X de tampão PCR 10X, MgCl₂ 1,5mM, 1U de Taq polimerase e água bidestilada estéril para completar o volume de 50µL.

Todas as reações da MLST-PCR realizadas neste estudo ocorreram nas seguintes condições: um ciclo de 94°C/4min seguido de 40 ciclos de 94°C/1min, 55°C/1min e 72°C/1min. A reação foi concluída com um ciclo de extensão final de 72°C/7min.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X a 65V por 45 min e observados após 30min de imersão em solução corante. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o marcador de DNA 100pb.

A etapa de purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se o kit “*QIAquick PCR Purification Kit*” (*QUIAGEN, Germany*) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o produto purificado foi quantificado aplicando-se 10µL do mesmo diluído em 2µL de tampão corante, em gel de agarose a 2,0% (p/v) preparado com tampão TBE 0,5X a 65V e submetido à eletroforese por 40min, sendo observado após 30min de imersão em solução corante. Os fragmentos purificados foram observados sob iluminação UV e digitalizados em sistema de fotodocumentação. O padrão de quantificação de DNA *E-Gel® LowRangeQuantitative DNA Ladder* (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*) foi utilizado para determinar a concentração do produto purificado. Os fragmentos purificados e

quantificados foram, então, enviados para o sequenciamento automatizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA/PDTIS/ FIOCRUZ.

Quadro 2: Genes, iniciadores e seqüências utilizados na MLST-PCR.

Gene	Iniciador	Seqüência (5' - 3') ^a	Tamanho do fragmento (pb) ^b
<i>adk</i>	adk F	GGT AAA GGT ACA CAA GCC GAA CAG	411 (648)
	adk R	CTA AGC CTC CGA TGA GAA CAT CG	
<i>ccpA</i>	ccpA F	TAT GAT GTA GCG CGT GAA GC	418 (996)
	ccpA R	CCT TGT AAC TTC TTC GCG CTT CC	
<i>glpF</i>	glpF F	TTG TTA ATC GTA CTT GGT GGC GG	372 (822)
	glpF R	ACT GGA ATC CAT GCA TAC TTC CAG TT	
<i>glpT</i>	glpT F	ATG GGC TGG TAT TCC AGG TAC AC	330 (1,347)
	glpT R	AAG TAA GAG CAA GGA AGA ACA TTG CA	
<i>panC</i>	panC F	CGA TAT CCT CGT GAT ATT GAT AGA G	350 (849)
	panC R	TCC GCA TAA TCT ACA GTG CCT TTC	
<i>pta</i>	pta F	CGC TGC AGA GCG TTT AGC AAA AGA A	414 (972)
	pta R	CTC AGC TAC AGA TGG TAC GAA TGC	
<i>pycA</i>	pycA F	CTA TGC GTT AGG TGG AAA CGA AAG AC	363 (3,447)
	pycA R	GTC GGT GTA TCA AGC ACA GAT ACA T	

a = O conjunto de iniciadores são isotérmicos, com temperatura de anelamento comum de 55°C. Tais iniciadores foram desenhados pelo Dr. Alexei Sorokin, INRA, França

b = Os números entre parênteses refere-se aos comprimentos totais dos genes

3.3.2.2 - Análise das Sequências

As seqüências obtidas foram analisadas pelo software *SeqMan®NGen®* (DNASTAR® Inc., Madison, Wisconsin, USA) e comparadas com as seqüências disponíveis na base de dados acessível em <http://mlstoslo.uio.no/bcereus>, para determinação dos alelos de cada um dos sete genes constitutivos e dos STs. Os perfis de alelos diferentes daqueles já descritos foram enviados para o banco de dados para avaliação e determinação de novos STs. A árvore filogenética foi construída com base nos alinhamentos múltiplos das seqüências concatenadas dos sete genes MLST através do método de *neighbor-joining* usando software MEGA 6.0 (www.mlst.net) (Tamura et al, 2007). Algumas cepas conhecidas do banco de dados MLST do grupo *B. cereus* foram incluídas para avaliar as relações dessas linhagens com aquelas identificadas nesse estudo.

4 RESULTADOS

4.1 – Aspectos Bioquímicos

A detecção de enzimas extracelulares, avaliação da atividade hemolítica e da motilidade nas espécies de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides* foram determinadas com base nos fenótipos. A Tabela 1 sumariza os resultados da ocorrência dos caracteres fenotípicos.

A maior proporção de amostras positivas para a maioria das características avaliadas foi encontrada entre as cepas das espécies de *B. cereus* e *B. thuringiensis* isoladas de larvas de insetos. Entre as 22 cepas isoladas dessa fonte todas apresentaram atividade hemolítica e produção de lecitinase, e somente duas amostras não degradaram o amido. Apenas uma cepa de *B. cereus* não demonstrou motilidade (Tabela 1).

Entre as amostras de fontes ambientais (amostras de solos), 70 dentre 80 cepas (88%) demonstraram atividade β -hemolítica, e somente uma cepa revelou-se α -hemolítica. Entre essas cepas foi constatada a menor proporção de amostras positivas para a degradação da lecitina e do amido entre as espécies de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides*. No teste de motilidade, 5 entre 80 cepas (6%) não mostraram esta característica.

Nas amostras provenientes de diferentes tipos de alimentos, 54 entre 65 cepas (83%) apresentaram β -hemólise, 8 foram α -hemolíticas e 3 cepas (2 *B. thuringiensis* e 1 *B. cereus*) não produziram hemólise. Nesta fonte, 89% das cepas degradaram a lecitina e somente 77% hidrolisaram o amido; e apenas uma cepa não foi móvel (Tabela 1).

Tabela 1: Ocorrência (em %) dos fenótipos e genótipos testados entre as espécies de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycooides* coletadas de distintas fontes de isolamento.

Características	FA	AL	IN
	(n = 80)	(n = 65)	(n = 22)
	(43 <i>Bt</i> 23 <i>Bc</i> 14 <i>Bmyc</i>) ¹	(28 <i>Bt</i> 36 <i>Bc</i> 1 <i>Bmyc</i>)	(11 <i>Bt</i> 11 <i>Bc</i>)
Motilidade	94	98	95
Atividade Hemolítica	88	95	100
Hidrólise da Lecitina	77	89	100
Hidrólise do Amido	70	77	91
<i>nhe ABC</i>	100	95	100
<i>hbl ACD</i>	89	82	91
<i>cytK-2</i>	80	77	91
<i>ent FM</i>	100	100	100
<i>ces</i>	0	0	0
<i>hly II</i>	35	43	59
<i>hly III</i>	69	83	96
<i>piplc</i>	58	74	82
<i>pcplc</i>	79	58	77
<i>sph</i>	50	37	55
<i>cspF</i>	100	100	100

Valores entre parênteses indicam o número de cepas.

FA: Isolados de Fontes Ambientais; AL: Isolados de Alimentos; IN: Isolados de Insetos.

1 – *Bt* = *B. thuringiensis* *Bc* = *B. cereus* *Bmyc* = *B. mycooides*

4.2 - Distribuição dos Genes que Codificam Fatores de Virulência e Toxinas

A ocorrência dos genes que codificam a hemolisina BL (*hblA*, C e D), a enterotoxina não-hemolítica (*nheA*, B e C), a citotoxina K (*cytK1* e *cytK2*), a enterotoxina FM (*entFM*) e a cereulida (*ces*) e dos genes que codificam outros fatores de virulência como a hemolisina II (*hly II*), a hemolisina III (*hly III*), a fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (*piplc*), a fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (*pcplc*) e a esfingomielinase (*sph*) foi avaliada (Tabelas 2 e 3).

Do total de 167 amostras, 143 cepas (86%) foram positivas para os três genes que codificam a hemolisina BL e 164 cepas (98%) foram positivas para os três genes codificadores do complexo NHE. O gene *cytK-2* foi detectado em 134 estirpes (80%) e o gene que codifica *entFM* foi o mais frequente, sendo detectado em 100% das estirpes estudadas (Tabela 1). Todas as cepas foram negativas para os genes *ces* e *cytK-1*. Os três genes do complexo HBL e os três genes do complexo NHE foram detectados simultaneamente em 85% das linhagens (142 entre 167 cepas) provenientes de amostras das três fontes de isolamento.

A análise da ocorrência desses genes permitiu a classificação das 167 cepas em 7 perfis toxigênicos (Tabela 2). Os perfis I, II, III foram os mais frequentes e representam 93% (156 entre 167 cepas) das amostras que provieram das três fontes. O perfil predominante, o perfil I, incluiu 119 cepas (71%) que foram positivas para todos os genes das enterotoxinas. Neste perfil encontram-se alocadas 64 das 82 (78%) linhagens de *B. thuringiensis*, 46 das 70 (66%) cepas de *B. cereus* e 9 das 15 (60%) estirpes de *B. mycoides* (Tabela 5).

Com relação à distribuição dos perfis toxigênicos entre as espécies e fontes de isolamento as linhagens de *B. thuringiensis* isoladas de fonte ambiental e alimentos foram agrupadas nos perfis I e II, enquanto que as estirpes de *B. thuringiensis* isoladas de larvas de insetos foram alocadas nos perfis I e III. Já as estirpes de *B. cereus* isoladas do ambiente estão agrupadas nos perfis I, III e IV e as cepas de *B. cereus* de alimentos encontram-se amplamente distribuída nos perfis I a VII. Nos perfis I e II estão os *B. cereus* isolados de larvas de insetos e o *B. mycoides* proveniente de fonte ambiental está agrupado nos perfis I a IV (Tabela 4).

A ocorrência de cada gene das enterotoxinas nas linhagens de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides* encontra-se ilustrada na Figura 11. Nesse estudo, todas as 82 linhagens de *B. thuringiensis* amplificaram os genes do complexo NHE e 92% (75 das 82 cepas) os genes do complexo HBL. A *cytK-2* foi detectada em 87% dos isolados (71 das 82 cepas). Em cepas de *B. cereus*, os genes do complexo NHE e HBL foram detectados em 96% (67 das 70 cepas) e 80% (56 das 70 cepas), respectivamente, e a *cytK-2*

foi detectada em 76% (53 das 70 cepas). Todas as 15 estirpes de *B. mycoides* amplificaram os genes do complexo NHE, e os genes do complexo HBL foram detectados em 80% (12 das 15 cepas) e 67% (10 das 15 cepas) possuiu a *cytK-2*. As maiores porcentagens de detecção dos genes dos complexos HBL, NHE e *cytK-2* foi nas estirpes de *B. thuringiensis*, a qual demonstrou frequência semelhante independente da fonte de isolamento.

Com relação à presença dos fatores de virulência, os genes das hemolisinas *hlyII* e *hlyIII* foram detectados em 69 (41%) e 130 (78%) das 167 estirpes estudadas, respectivamente. Com relação aos três genes que codificam as fosfolipases - fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (*piplc*), fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (*pcplc*) e esfingomielinase (*sph*) - seus produtos foram amplificados em 112 (67%), 118 (71%) e 76 (45%) das estirpes analisadas, respectivamente.

A ocorrência dos genes de virulência em *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* permitiu agrupá-las em 24 perfis de virulência distintos (Tabela 3). Os perfis I, II, III e VII foram os mais frequentes e representaram 53% (88 entre 167 cepas) das amostras provenientes das três origens. O perfil de virulência predominante foi o perfil I (20%, 34 entre 167 cepas), que incluiu as cepas contendo todos os genes codificadores de fatores de virulência analisados (Tabela 3). Neste perfil foram alocadas 25 das 82 (30%) estirpes de *B. thuringiensis* e 9 das 70 (13%) cepas de *B. cereus*.

Com relação à alocação das espécies de fontes diversas nos perfis de virulência encontrados, as estirpes de *B. thuringiensis* isoladas de fonte ambiental encontram-se amplamente distribuída em 12 perfis de virulência, com o perfil I agrupando 13 estirpes (16%); fato observado também para as linhagens provenientes de alimentos que estão distribuídas em 14 perfis, sendo o maior número de estirpes agrupando no perfil I (10, 36%). As 11 cepas de *B. thuringiensis* isoladas de larvas de insetos encontraram-se dispersas em 7 diferentes perfis de virulência. Já as linhagens de *B. cereus* isoladas de amostras de solo foram agrupadas em 9 perfis e as estirpes provenientes de diversos alimentos foram distribuídas em 11 perfis, com o perfil XV agrupando 8 cepas (22%). As 11 linhagens de *B. cereus* isoladas de larvas de insetos apresentaram 6 perfis. As linhagens de *B. mycoides* provenientes de fonte ambiental foram agrupadas em três perfis de virulência (Tabela 4).

A ocorrência de cada gene de virulência nas linhagens de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides* encontra-se ilustrada na Figura 11. Em *B. thuringiensis*, as hemolisinas *hlyII* e *hlyIII* foram detectadas em 66% (54 das 82 cepas) e 88% (72 das 82 cepas) e as fosfolipases *piplc*, *pcplc* e *sph* foram observadas em 79% (65 das 82 cepas), 89% (73 das 82 cepas) e 63% (52 das 82 cepas), respectivamente.

Nas linhagens de *B. cereus*, os genes *hlyII* e *hlyIII* foram amplificados em 21% (15 das 70 cepas) e 81% (57 das 70 cepas) e os genes *piplc*, *pcplc* e *sph* foram encontrados em 67% (47 das 70 cepas), 56% (39 das 70 cepas) e 36% (23 das 70 cepas), respectivamente. Em cepas de *B. mycooides*, a ocorrência dos fatores de virulência foi baixa; seis cepas possuíam o gene *pc-plc* enquanto somente uma cepa apresentou o gene da hemolisina *hlyIII* e uma única estirpe apresentou a esfingomielinase (*sph*) (Tabela 5).

Além das linhagens que possuíram todos os fatores de virulência e toxigênicos (20 cepas *B. thuringiensis* e 8 cepas de *B. cereus*), 12 cepas (3 *B. thuringiensis* e 9 *B. cereus*) foram selecionadas randomicamente entre as 167 cepas para serem submetidas à amplificação do gene de virulência cereolisina O (Hemolisina I). Estas estirpes também foram selecionadas para caracterização genotípica por rep-PCR e MLST.

Tabela 2: Perfis toxigênicos determinados através do PCR presentes nas espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycooides*.

Perfil Toxigênico (n, %)	Genes das Enterotoxinas ^a						
	<i>hbl ACD</i>	<i>nhe A</i>	<i>nhe B</i>	<i>nhe C</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ent FM</i>	<i>ces</i>
I (119, 71,3%)	+	+	+	+	+	+	-
II (23, 13,8%)	+	+	+	+	-	+	-
III (14, 8,4%)	-	+	+	+	+	+	-
IV (8, 4,8%)	-	+	+	+	-	+	-
V (1, 0,6%)	+	+	+	-	-	+	-
VI (1, 0,6%)	-	+	-	+	+	+	-
VII (1, 0,6%)	-	+	-	-	-	+	-

^a +, um produto de PCR do tamanho esperado; -, nenhum produto de PCR resultou em amplificação.

Números em negrito = principais perfis toxigênicos

Tabela 3: Perfis de virulência determinados através do PCR presentes nas espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycooides*.

Perfil de Virulência (n, %)	Fatores de Virulência ^a				
	<i>hly II</i>	<i>hly III</i>	<i>piplc</i>	<i>pcplc</i>	<i>sph</i>
I (34, 20,4%)	+	+	+	+	+
II (19, 11,3%)	-	+	+	+	+
III (11, 6,6%)	+	+	+	+	-
IV (5, 3,0%)	+	+	-	+	+
V (4, 2,4%)	+	-	+	+	+
VI (3, 1,8%)	+	+	+	-	+
VII (14, 8,4%)	-	+	+	+	-
VIII (5, 3,0%)	+	+	+	-	-
XI (4, 2,4%)	+	+	-	+	-
X (1, 0,6%)	+	+	-	-	+
XI (1, 0,6%)	+	-	+	+	-
XII (4, 2,4%)	-	+	-	+	+
XIII (1, 0,6%)	-	+	+	-	+
XIV (1, 0,6%)	+	+	-	-	-
XV (10, 5,6%)	-	+	+	-	-
XVI (8, 4,8%)	-	+	-	+	-
XVII (6, 3,6%)	-	-	+	+	-
XVIII (2, 1,2%)	-	-	-	+	+
XIX (1, 0,6%)	-	-	+	-	+
XX (10, 5,6%)	-	+	-	-	-
XXI (6, 3,6%)	-	-	-	+	-
XXII (3, 1,8%)	-	-	+	-	-
XXIII (2, 1,2%)	-	-	-	-	+
XXIV (12, 7,2%)	-	-	-	-	-

^a +, um produto de PCR do tamanho esperado; -, nenhum produto de PCR resultou em amplificação.

Números em negrito = principais perfis toxigênicos

Tabela 4: Distribuição dos fatores de virulência e toxigênicos presentes nas espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides* com relação às fontes de origens.

Fontes de Isolamento (n)	Espécies (n)	Perfil Toxigênico (n, %)	Perfil de Virulência (n, %)	
Fonte Ambiental (80)	<i>Bt</i> (43)	Perfil I (32, 74%) Perfil II (11, 26%)	Perfil I (13, 16%) Perfil II (8, 10%) Perfil III (3, 7%) Perfil IV (3, 7%) Perfil V (3, 7%) Perfil VI (1, 2%)	Perfil VII (4, 9%) Perfil IX (1, 2%) Perfil XII (2, 5%) Perfil XVI (2, 5%) Perfil XVII (2, 5%) Perfil XVIII (1, 2%)
	<i>Bc</i> (23)	Perfil I (17, 74%) Perfil III (5, 22%) Perfil IV (1, 1%)	Perfil I (3, 13%) Perfil II (5, 22%) Perfil IV (1, 4%) Perfil VII (2, 9%) Perfil XV (1, 4%)	Perfil XVI (3, 13%) Perfil XVII (1, 4%) Perfil XX (2, 9%) Perfil XXIV (5, 22%)
	<i>Bmyc</i> (14)	Perfil I (9, 64%) Perfil II (2, 14%) Perfil III (1, 7%) Perfil IV (2, 14%)	Perfil XX (1, 7%) Perfil XXI (6, 43%) Perfil XXIV (7, 50%)	
Diversos Alimentos (65)	<i>Bt</i> (28)	Perfil I (23, 82%) Perfil II (5, 8%)	Perfil I (10, 36%) Perfil II (2, 7%) Perfil III (3, 10%) Perfil IV (1, 4%) Perfil V (1, 4%) Perfil VI (1, 4%) Perfil VII (2, 7%)	Perfil IX (2, 7%) Perfil X (1, 4%) Perfil XIV (1, 4%) Perfil XV (1, 4%) Perfil XVII (1, 4%) Perfil XVIII (1, 4%) Perfil XX (1, 4%)
	<i>Bc</i> (36)	Perfil I (20, 56%) Perfil II (7, 19%) Perfil III (1, 3%) Perfil IV (5, 13%) Perfil V (1, 3%) Perfil VI (1, 3%) Perfil VII (1, 3%)	Perfil I (3, 8%) Perfil III (2, 5%) Perfil VII (6, 17%) Perfil VIII (3, 8%) Perfil XII (1, 3%) Perfil XV (8, 22%) Perfil XVII (2, 5%)	Perfil XIX (1, 3%) Perfil XX (6, 17%) Perfil XXII (3, 8%) Perfil XXIII (1, 3%)
	<i>Bmyc</i> (1)	Perfil II (1, 100%)	Perfil XXIII (1, 100%)	
Larvas de Insetos (22)	<i>Bt</i> (11)	Perfil I (9, 82%) Perfil III (2, 18%)	Perfil I (2, 18%) Perfil II (1, 9%) Perfil III (3, 27%) Perfil VI (1, 9%)	Perfil VIII (2, 18%) Perfil IX (1, 9%) Perfil XI (1, 9%)
	<i>Bc</i> (11)	Perfil I (9, 82%) Perfil II (2, 18%)	Perfil I (3, 27%) Perfil II (3, 27%) Perfil XII (1, 9%)	Perfil XIII (1, 9%) Perfil XV (1, 9%) Perfil XVI (2, 18%)

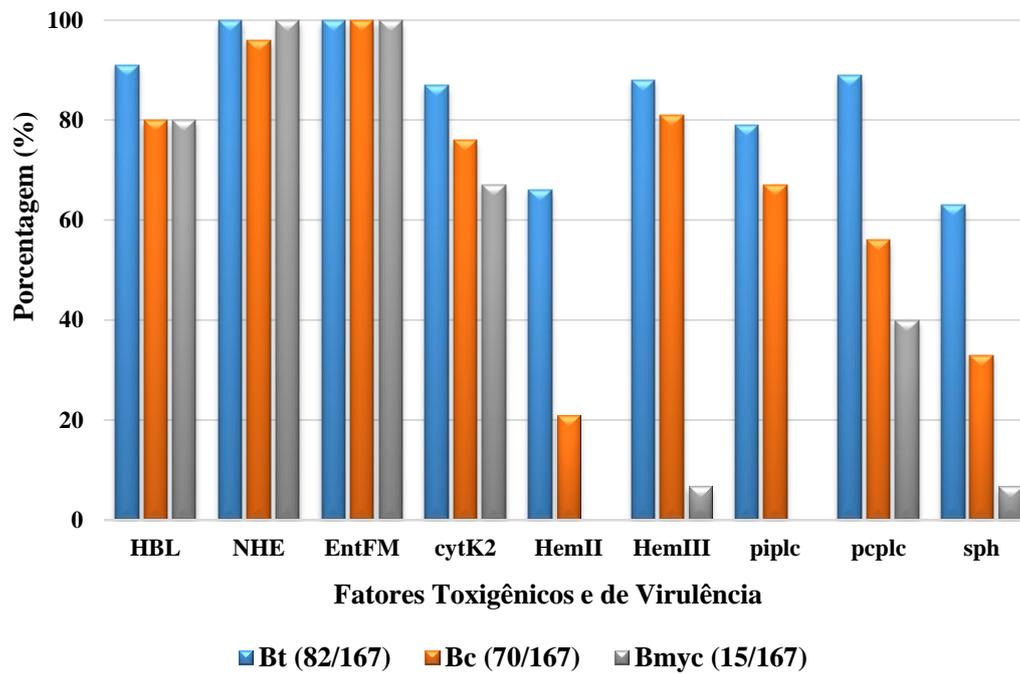


Figura 11: Distribuição dos fatores de virulência e toxigênicos entre as espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides* analisadas.

Tabela 5: Ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência nas três espécies do grupo do *B. cereus* proveniente de distintas fontes de isolamento.

Fontes de Isolamento	Espécies (n) ^a	Gene (Produto)								
		<i>hblACD</i> (Hemolisina BL)	<i>nheABC</i> (Enterotoxina Não Hemolítica)	<i>entFM</i> (Enterotoxina FM)	<i>cytK2</i> (Citotoxina K)	<i>hlyII</i> (Hemolisina II)	<i>hlyIII</i> (Hemolisina III)	<i>piplc</i> (Fosfolipase C)	<i>pcplc</i> (Cereolisina AB)	<i>sph</i>
Fonte	<i>Bt</i> (43)	43 (100) ^b	43 (100)	43 (100)	32 (74)	24 (56)	37 (86)	34 (79)	42 (98)	31 (72)
Ambiental	<i>Bc</i> (23)	17 (74)	23 (100)	23 (100)	22 (96)	4 (17)	17 (74)	12 (52)	15 (65)	9 (39)
(FA)	<i>Bmyc</i> (14)	11(79)	14 (100)	14 (100)	10 (71)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	6 (43)	0 (0)
Alimentos	<i>Bt</i> (28)	23 (82)	28 (100)	28 (100)	28 (100)	20 (71)	25 (89)	21 (75)	23 (82)	17 (61)
Diversos	<i>Bc</i> (36)	28 (78)	33 (92)	36 (100)	22 (61)	8 (22)	29 (81)	27 (75)	15 (42)	6 (17)
(AL)	<i>Bmyc</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Insetos	<i>Bt</i> (11)	9 (82)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	10 (91)	10 (91)	10 (91)	8 (73)	4 (36)
(IN)	<i>Bc</i> (11)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	9 (82)	3 (27)	11 (100)	8 (73)	9 (82)	8 (73)

a = número total de cepas de cada espécie proveniente de cada fonte de isolamento

b = Os valores indicados são os números de isolados que amplificaram o gene específico determinado pela análise da PCR. Os números entre parêntesis são os números em percentagens do número total de cada espécie proveniente de cada fonte de origem.

4.3 – Presença dos Genótipos *cspA*, *cspF* e *rrs* nas Espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycooides*

Através da PCR, as regiões dos genes *cspA* e *cspF* codificadores da proteína de choque frio foram amplificadas, e somente o genótipo mesofílico (gene *cspF* com 284pb) foi detectado para as 167 cepas estudadas. Para assinatura específica do DNAr 16S do gene *rrs*, somente as 40 cepas listada na Tabela 6 foram caracterizadas através do RFLP-PCR.

A amplificação do gene *rrs* gerou um fragmento de DNA com 473pb para todas as 40 linhagens testadas. Em 33 cepas (23 *B. thuringiensis* e 10 *B. cereus*) não houve clivagem do fragmento, e tais cepas foram classificadas como genótipo mesofílico, pois não possuem cópias da assinatura específica do operon *rrs*. Cinco cepas de *B. cereus* [LFB-FIOCRUZ 196 (FA), 540 (AL), 799 (AL), 1263 (FA) e 1691(IN)] apresentaram dois fragmentos (473pb e 351pb) e foram descritas como estirpes mesofílicas do subtipo térmico p/M, pois possuem algumas cópias da assinatura psicrotrófica na região *rrs*. Duas cepas de *B. cereus* [LFB-FIOCRUZ 803 (AL) e 1669 (FA)] apresentaram três fragmentos (473pb, 351pb e 122pb) e foram classificadas como cepas intermediárias do subtipo térmico P/M, pois apresentaram simultaneamente as assinaturas mesófilas e psicrotróficas na região DNAr 16S do gene *rrs* (Figura 12) (Guinebretiere et al, 2008).

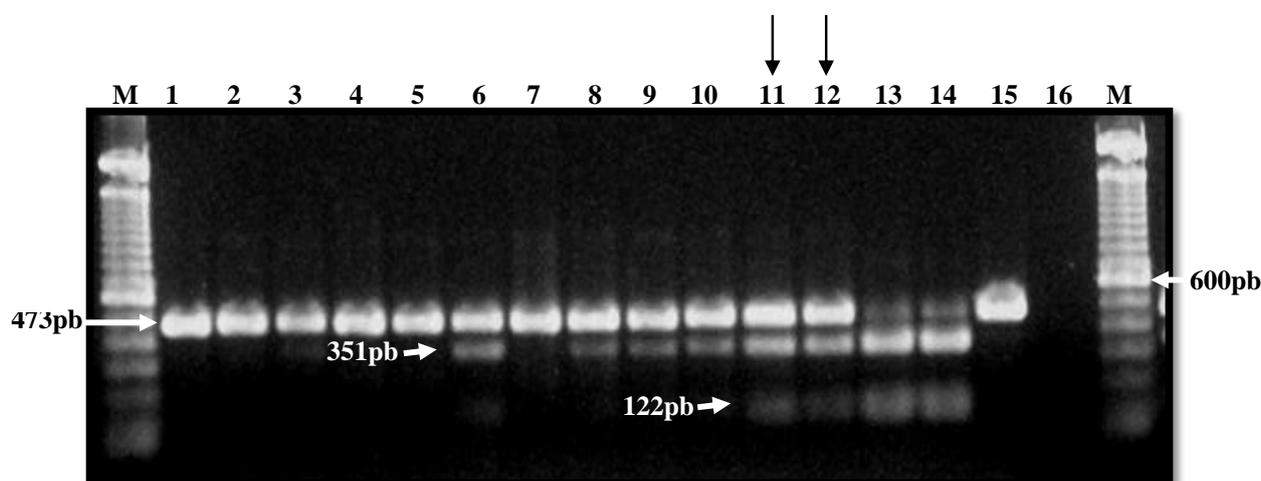


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RFLP-PCR do gene *rrs* de *B. cereus* e *B. thuringiensis*. **M**, Peso Molecular (100pb DNA em escalas); **1**, *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (LFB-FIOCRUZ 857); **2**, *B. thuringiensis* autoaglutinante LFB-FIOCRUZ 907; **3**, *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* LFB-FIOCRUZ 912; **4**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1599; **5**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1606; **6**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 196; **7**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 440; **8**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 799; **9**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1263; **10**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1691; **11**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 803; **12**, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1669; **13**, *B. weihenstephanensis* 6A46 LFB-FIOCRUZ 1673; **14**, *B. weihenstephanensis* 6A50 LFB-FIOCRUZ 1674; **15**, *B. cereus* NCTC 2599 LFB-FIOCRUZ 406; **16**, Controle negativo. As setas indicam as cepas com três fragmentos no operon *rrs* (473pb, 351pb e 122pb).

4.4 – Tipagem pela amplificação de Sequências Repetitivas (Rep-PCR)

Os iniciadores utilizados nesse estudo foram desenhados especificamente de acordo com uma sequência de DNA repetitiva extragênica de 26 pares de bases encontrada no genoma das seis espécies do grupo *B. cereus* (Reyes-Ramirez & Ibarra, 2005).

A amplificação do DNA genômico das 23 linhagens de *B. thuringiensis* e 17 cepas de *B. cereus* gerou fragmentos entre 0.1 e 4.0 Kb (Figuras 13 e 14). O dendrograma de similaridade genética, gerado a partir da análise das 40 linhagens provenientes das três fontes estudadas apresentou uma evidente divisão entre as duas espécies. Ao todo, 20 perfis eletroforéticos foram identificados e a porcentagem de similaridade de acordo com o coeficiente de Dice variou de 20 a 100%. Entre as estirpes, 6 apresentaram menos de 80% de similaridade [4 *B. cereus* (LFB-FIOCRUZ 540, 196, 1606, 766) e 2 *B. thuringiensis* (LFB-FIOCRUZ 1619 e 1561)], sendo, portanto consideradas como não pertencentes a nenhum dos *clusters* observados (Figura 15), as linhagens FIOCRUZ 440 e 799 que apresentaram 20% de similaridade e as estirpes FIOCRUZ 1689 e 1691 com aproximadamente 75% de similaridade.

A análise computacional dos perfis rep-PCR identificaram quatro *clusters* (1-4) com mais de 80% de similaridade pelo coeficiente de Dice (Figura 15). O *cluster* 4 foi o predominante, com 21 cepas de *B. thuringiensis* e dois perfis rep-PCR distintos [10 *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, 10 *B. thuringiensis* não sorotipados (perfil rep-PCR 4a), LFB-FIOCRUZ 156 *B. thuringiensis* sorovar *morrisoni* (perfil rep-PCR 4b)], que incluíram estirpes isoladas de amostras provenientes das três fontes e em períodos diferentes; seguido do *cluster* 1, com 4 cepas de *B. cereus* isoladas de amostras de solo e alimentos em décadas distintas. Nesse *cluster* foram observados 4 perfis eletroforéticos (rep-PCR 1a–1d). Já no *cluster* 2 encontramos duas estirpes de *B. cereus* com perfis rep-PCR altamente similar, com apenas um fragmento de aproximadamente de 0,4Kb que as diferenciam, que foram definidas como perfis rep-PCR 2a (LFB-FIOCRUZ 1599) e rep-PCR 2b (LFB-FIOCRUZ 541), e que foram isoladas de alimentos nas décadas de 1980 e 2010 (Figura 15). No *cluster* 3 três cepas de *B. cereus* e dois perfis rep-PCR foram definidos. Nesse *cluster* estão duas estirpes com o mesmo perfil rep-PCR 3a, as linhagens LFB-FIOCRUZ 821 (AL/1993) e 1687 (IN/2008) com 100% de similaridade, e a estirpe a LFB-FIOCRUZ 1669 (FA/2012) com perfil rep-PCR 3b.

Esses resultados indicam alta diversidade genética entre as estirpes de *B. cereus* e uma expressiva similaridade entre as linhagens de *B. thuringiensis* selecionadas, principalmente as que estão agrupadas no *cluster* 4. Com os resultados obtidos a partir da análise dos perfis rep-PCR observou-se um perfil padrão típico para as linhagens de *B. thuringiensis* que possuem perfil de

proteínas totais e atividade biológica semelhante ao da estirpe de referência *B. thuringiensis* sorovar *israelenses* H:14 (LFB-FIOCRUZ 584), com perfil rep-PCR 4a. Entre as cepas de *B. thuringiensis* foram observados 4 perfis eletroforéticos, estando 20 delas incluídas no perfil rep-PCR 4a (Figura 14). Esse perfil foi representado por fragmentos que variaram entre 0.4 e 3.0 Kb, aproximadamente, com um fragmento comum de 1.5 Kb. A exceção entre as cepas de *B. thuringiensis* foi a LFB-FIOCRUZ 1619. Essa estirpe foi mais semelhante as cepas de *B. cereus*, agrupando entre os *clusters* 1 e 2 (Figura 15).

No *cluster* 4 estão principalmente as linhagens de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e demais estirpes de *B. thuringiensis* não sorotipadas ou autoaglutinantes, as quais compartilharam na análise das proteínas totais o mesmo perfil protéico da linhagem *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 (H:14). Todas estas estirpes possuem atividade entomotóxica para larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (resultado não mostrado). Apenas três estirpes de *B. thuringiensis* apresentaram perfis distintos ao do perfil rep-PCR 4a, foram as cepas LFB-FIOCRUZ 156 (perfil rep-PCR 4b), 1561 e 1619 (Tabela 6).

Entre as estirpes que pertencem ao *cluster* 4 e perfil rep-PCR 4a estão 16 cepas de *B. thuringiensis* com perfis toxigênico e de virulência I e ST 136 isoladas de diferentes fontes e períodos distintos. Nesse *cluster* encontra-se também o *B. thuringiensis* sorovar *morrisoni* que possui perfil rep-PCR 4b com perfil toxigênico II e de virulência I e ST 112 (Tabela 5). Através do rep-PCR, esta linhagem que tem atividade entomotóxica para insetos da ordem Lepidoptera foi totalmente diferenciada das amostras de *B. thuringiensis* que possuem atividade entomopatogênia para insetos da ordem Diptera (Figura 14A).

No *cluster* 4 também estão duas estirpes de *B. thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 1414 (AL/2006) e 1588 (AL/2011) com perfis alélicos distintos (ST 157 e ST 158) e agrupadas nos perfis toxigênico e de virulência I. As duas amostras de *B. thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 1619 (AL/2011) e 1561 (AL/2011) que não pertencem a este *cluster*, também possuem perfis alélicos diferentes e tem perfis toxigênico e de virulência I.

Entre as estirpes de *B. cereus* foram observados perfis de fragmentos altamente polimórficos, que permitiram a identificação de 16 perfis eletroforéticos entre as 17 cepas *B. cereus* selecionadas, com variação de fragmentos de aproximadamente de 0.1 e 4.0 Kb (Figura 13). No *cluster* 2 estão as duas cepas de *B. cereus* (LFB-FIOCRUZ 1599 e 541) isoladas de amostras de alimentos que pertencem ao mesmo ST 33 com perfil toxigênico I (Tabela 5). No *cluster* 1, as quatro estirpes de *B. cereus* possuem perfis rep-PCR e STs distintos (ST 156, 167, 168 e 170) com perfil toxigênico I a III;

e no *cluster* 3 encontram-se três *B. cereus*, e as duas cepas que apresentaram o mesmo perfil rep-PCR 3a tem STs diferentes [LFB-FIOCRUZ 821 (ST 169) e LFB-FIOCRUZ 1687 (ST 160)] e estão no perfil toxigênico I e a LFB-FIOCRUZ 1669 com perfil rep-PCR 3b possui ST 159 e também foi agrupada nos perfis toxigênico e de virulência I.

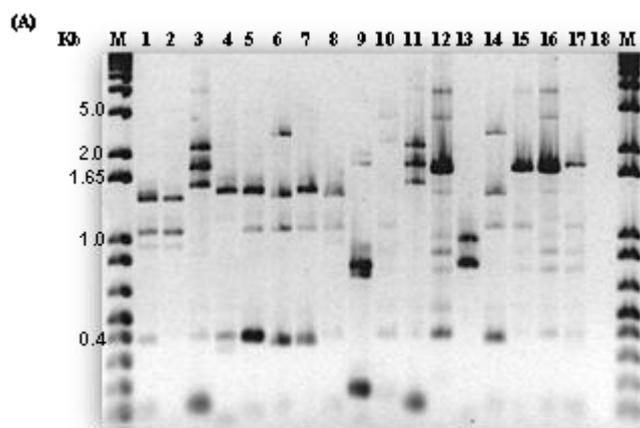


Figura 13: Perfis do polimorfismo de Rep-PCR das cepas de *B. cereus* amplificadas pelos iniciadores Bc-rep-1 e Bc-rep-2 em gel de agarose 1,2%.

(A) Perfis de DNA das cepas de *B. cereus*. M, Tamanho Molecular 1Kb; 1, LFB-FIOCRUZ 196; 2, LFB-FIOCRUZ 766; 3, LFB-FIOCRUZ 1599; 4, LFB-FIOCRUZ 1606; 5, LFB-FIOCRUZ 1669; 6, LFB-FIOCRUZ 1687; 7, LFB-FIOCRUZ 1689; 8, LFB-FIOCRUZ 1691; 9, LFB-FIOCRUZ 440; 10, LFB-FIOCRUZ 540; 11, LFB-FIOCRUZ 541; 12, LFB-FIOCRUZ 774; 13, LFB-FIOCRUZ 799; 14, LFB-FIOCRUZ 821; 15, LFB-FIOCRUZ 970; 16, LFB-FIOCRUZ 1263; 17, LFB-FIOCRUZ 803; 18, Controle Negativo.

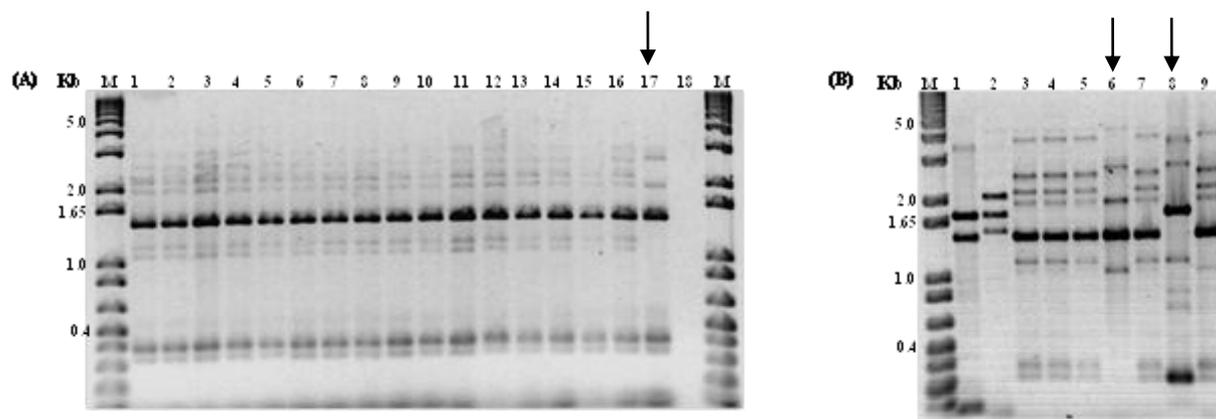


Figura 14: Perfis do polimorfismo de Rep-PCR das cepas de *B. thuringiensis* amplificadas pelos iniciadores Bc-rep-1 e Bc-rep-2 em gel de agarose 1,2%. As setas indicam os distintos perfis eletroforéticos.

(A) Perfis de DNA das cepas de *B. thuringiensis*. M, Tamanho Molecular 1Kb; 1, LFB-FIOCRUZ 772; 2, LFB-FIOCRUZ 784; 3, LFB-FIOCRUZ 1026; 4, LFB-FIOCRUZ 1069; 5, LFB-FIOCRUZ 1075; 6, LFB-FIOCRUZ 1143; 7, LFB-FIOCRUZ 1192; 8, LFB-FIOCRUZ 1227; 9, LFB-FIOCRUZ 857; 10, LFB-FIOCRUZ 912; 11, LFB-FIOCRUZ 894; 12, LFB-FIOCRUZ 907; 13, LFB-FIOCRUZ 1076; 14, LFB-FIOCRUZ 1232; 15, LFB-FIOCRUZ 1244; 16, LFB-FIOCRUZ 1354; 17, LFB-FIOCRUZ 156; 18, Controle Negativo;

(B) M, Tamanho Molecular 1Kb; 1, *B. cereus* 2179/15; 2, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 406; 3, LFB-FIOCRUZ 584; 4, LFB-FIOCRUZ 1234; 5, LFB-FIOCRUZ 1414; 6, LFB-FIOCRUZ 1561; 7, LFB-FIOCRUZ 1588; 8, LFB-FIOCRUZ 1619; 9, LFB-FIOCRUZ 1679.

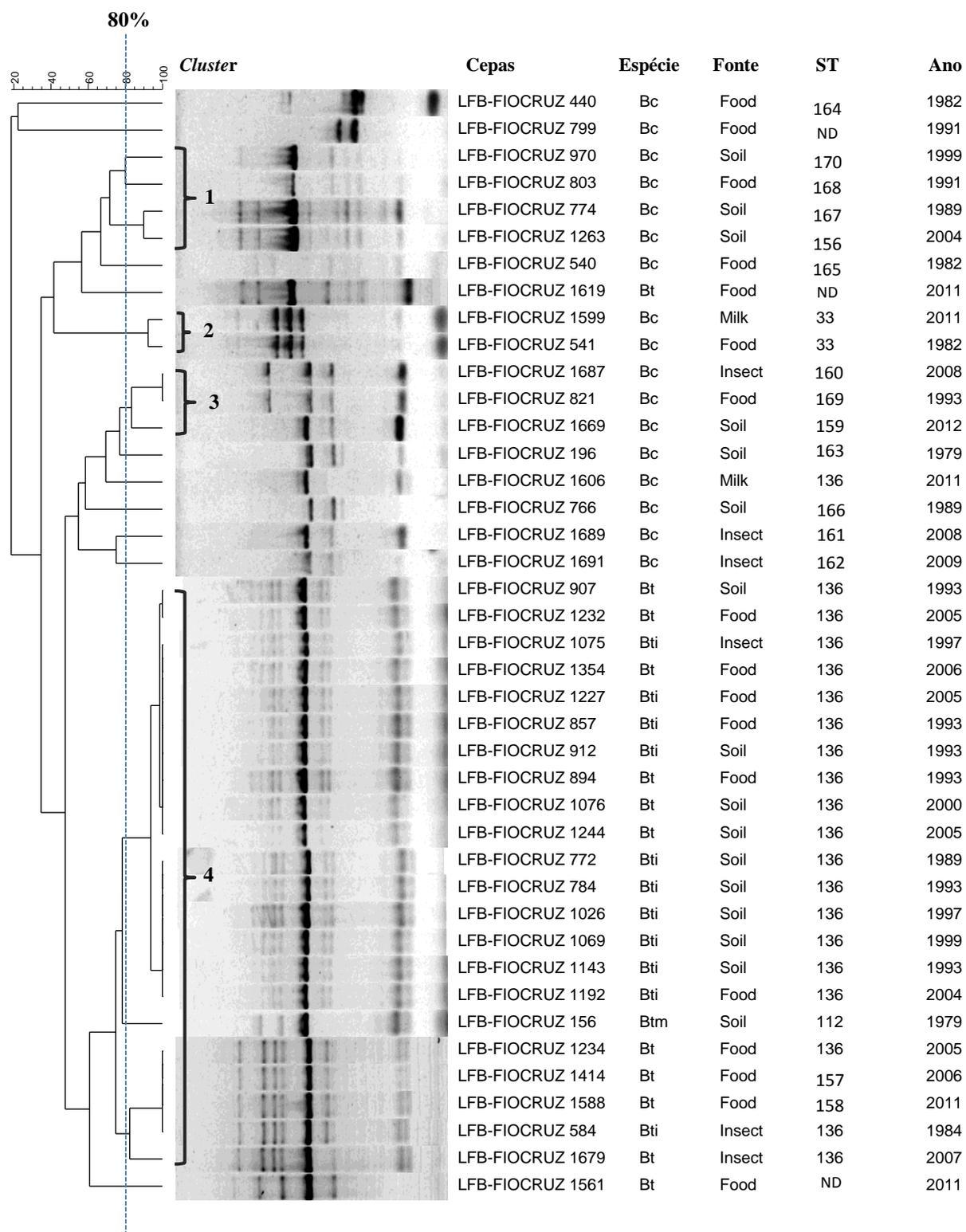


Figura 15: Dendrograma das cepas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* selecionadas determinado pelo método de agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética (UPGMA) e coeficiente de similaridade de Dice com correlação de 80%.

4.5 - Análises das Sequências de Multilocus (MLST)

A tipificação por sequências de multilocus foi realizada em 40 linhagens previamente selecionadas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, sendo 16 amostras de fonte ambiental, 19 amostras de alimentos e 5 amostras de larvas de insetos isoladas no Brasil em períodos distintos.

Neste estudo, as 40 cepas analisadas distribuíram-se em 20 STs, sendo 17 deles novos STs distintos daqueles encontrados na base de dados e aos quais foram atribuídos novos números (ST 156 a ST 170). Foram observados novos STs gerados pela ocorrência de novos alelos (STs 156, 159-163, 165-170) ou por novas combinações de alelos já conhecidos (STs 157, 158, 164). As comparações identificaram 17 novos alelos distribuídos entre 6 dos 7 *loci* do MLST analisados, com cinco novos alelos para o gene *panC*, quatro alelos para o gene *glpT*, três alelos para os genes *ccpA* e *pta* e um alelo para os genes *glpF* e *pycA* (Tabela 6). O número de alelos encontrados para cada locus foram: 7 (*adk*), 10 (*ccpA*), 10 (*glpF*), 14 (*glpT*), 14 (*panC*), 11 (*pta*) e 9 (*pycA*) e a diversidade alélica entre as cepas selecionadas resultaram no número médio de alelos por *locus* de 10,71. Os alelos *adk*-17, *ccpA*-39, *glpF*-1, *glpT*-23, *panC*-36, *pta*-35 e *pycA*-23 foram os mais frequentes por *locus* (Tabela 6).

Entre as linhagens analisadas constatou-se a presença de três STs já descritos, o ST 33 [LFB-FIOCRUZ 1599 (AL/2011) e LFB-FIOCRUZ 541 (AL/1982)] com duas cepas de *B. cereus*, o ST 112 [LFB-FIOCRUZ 156 (FA/1979)] no qual encontra-se o *B. thuringiensis* sorovar *morrisoni*, e o ST 136, o mais representativo, o qual agrupou 19 cepas, sendo 10 linhagens de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, 3 cepas de *B. thuringiensis* autoaglutinantes, 5 cepas de *B. thuringiensis* não sorotipadas e 1 estirpe de *B. cereus* (LFB-FIOCRUZ 1606) isoladas em diferentes períodos (Tabela 5).

A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Neighbour-Joining* gerado a partir da sequência concatenada dos sete alelos (2658pb). Todos os 20 STs obtidos neste estudo foram confrontados com STs selecionados e já presentes no banco de dados (<http://mlstoslo.uio.no/bcereus>). A topologia da árvore filogenética demonstrou que as cepas analisadas possuem estrutura genética populacional clonal com as amostras de distintas fontes alocadas em diferentes grupos filogenéticos (Figura 16). Nestes grupos as estirpes de *B. cereus* e *B. thuringiensis* formaram um *cluster* somente com as cepas brasileiras (17 cepas). Tal fato se deveu à presença de novos alelos como, por exemplo, nas cepas de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1689 (ST 161), 821 (ST 169) e 970 (ST 170) que as diferenciou das estirpes selecionadas no banco de dados. Somente a cepa de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 440 (ST 164), com perfil determinado através de uma nova combinação de alelos, agrupou-se com a estirpe *B. cereus* ATCC 10987 (ST 2), bem como as cepas com STs já descritos (ST 33 e ST136).

Tabela 6: Números dos alelos, sequência tipos, perfil toxigênico, perfil de virulência e perfil rep-PCR designados para cepas selecionadas.

LFB-FIOCRUZ	Espécie/sorovar	PT/PV ^b	Rep-PCR ^c	ST ^a	Alelos detectados nos genes						
					<i>adk</i>	<i>ccpA</i>	<i>glpF</i>	<i>glpT</i>	<i>panC</i>	<i>pta</i>	<i>pycA</i>
196	<i>B. cereus</i>	I/I	U	163	1	67	1	1	84	1	23
766	<i>B. cereus</i>	I/I	U	166	1	67	51	1	83	1	23
772	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
784	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
894	<i>B.thuringiensis</i> autoaglutinante	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
907	<i>B.thuringiensis</i> autoaglutinante	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1026	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1069	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1075	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1076	<i>B.thuringiensis</i> autoaglutinante	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1143	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1192	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1227	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1232	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1234	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1244	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1354	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1414	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	4a	157	17	39	1	1	36	35	23

1561	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	U	ND	17	39	1	23	36	35	12
1588	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	4a	158	34	39	1	23	64	35	46
1599	<i>B. cereus</i>	I/I	2a	33	3	13	12	13	11	12	12
1606	<i>B. cereus</i>	I/I	U	136	17	39	1	23	36	35	23
1619	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	U	ND	3	79	63	78	78	16	3
1669	<i>B. cereus</i>	I/I	3b	159	1	67	56	1	81	75	23
1679	<i>B.thuringiensis</i>	I/I	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
1687	<i>B. cereus</i>	I/I	3a	160	1	67	1	1	82	1	23
1689	<i>B. cereus</i>	I/I	6a	161	1	67	1	79	83	76	23
1691	<i>B. cereus</i>	I/I	6b	162	1	39	1	80	36	1	23
156	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>morrisoni</i>	II/I	4b	112	34	39	1	23	64	35	23
440	<i>B. cereus</i>	I/XX	5a	164	12	16	38	40	59	15	15
540	<i>B. cereus</i>	I/XV	U	165	3	68	63	47	85	3	3
541	<i>B. cereus</i>	I/VIII	2b	33	3	13	12	13	11	12	12
774	<i>B. cereus</i>	I/II	1c	167	13	80	33	4	3	16	74
799	<i>B. cereus</i>	II/VII	5b	ND	38	52	50	55	50	38	14
821	<i>B. cereus</i>	I/VII	3a	169	10	81	81	35	11	77	13
857	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/II	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
912	<i>B.thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	I/XVII	4a	136	17	39	1	23	36	35	23
970	<i>B. cereus</i>	I/II	1a	170	3	80	63	78	62	16	3
1263	<i>B. cereus</i>	III/XXIV	1d	156	13	79	56	33	78	31	16
803	<i>B. cereus</i>	I/XXII	1b	168	3	4	16	82	66	16	16

^aST = Tipo de Sequência

^c1 ao 4 = Perfil rep-PCR

^bPV= Perfil de Virulência

ND = Não definido

^bPT = Perfil Toxigênico

Nº em negrito = Novos Alelos

^cU = Perfil rep-PCR individual, com similaridade genética menor que 80%.

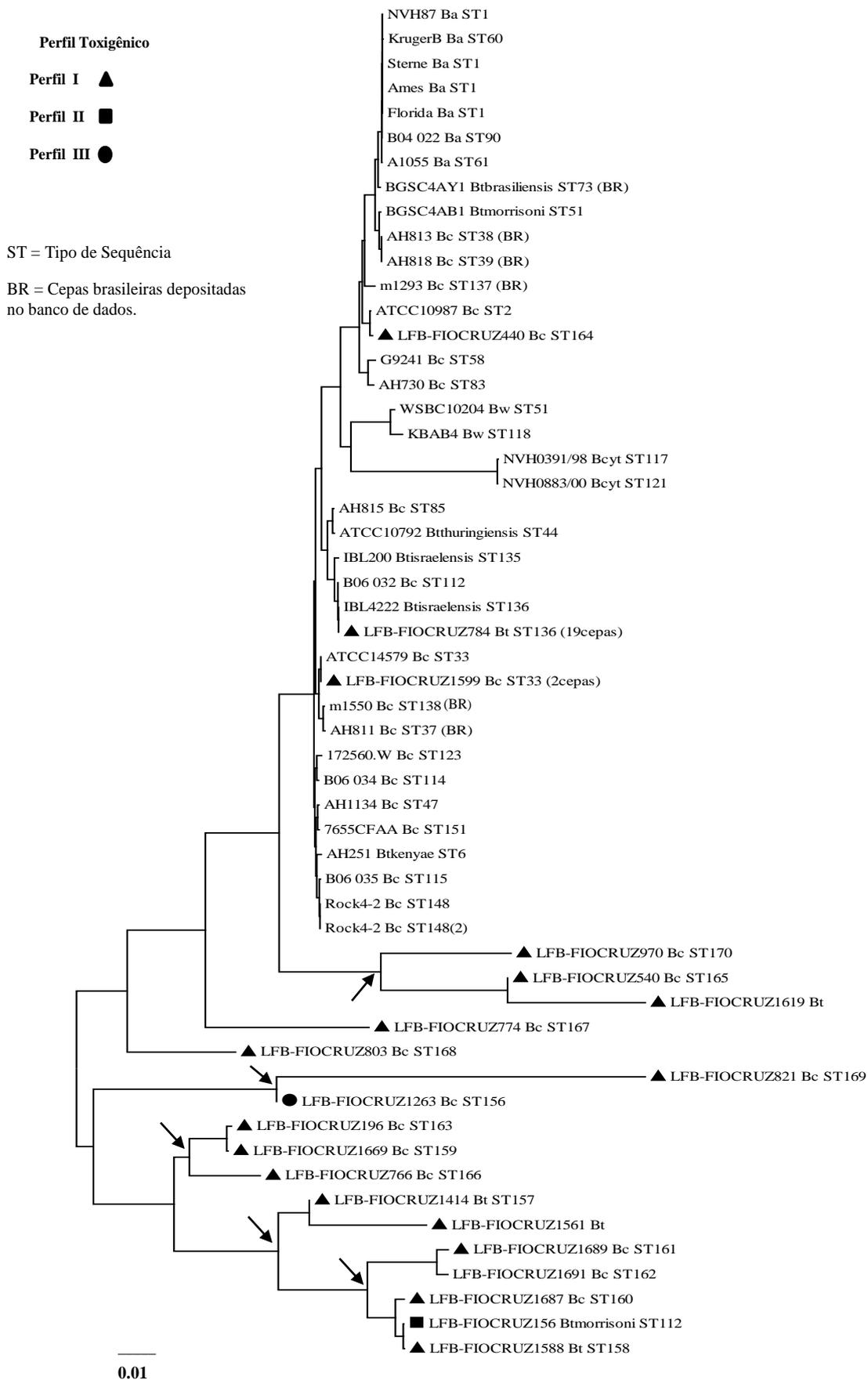


Figura 16: Árvore filogenética construída utilizando-se o método *Neighbour-Joining* (NJ) gerado a partir das sequências concatenadas dos 20 perfis alélicos identificados nesse estudo. O nível de confiança de porcentagem *bootstrap* foi calculado usando 1000 repetições dos dados originais. As setas indicam as distintas origens filogenéticas.

5 DISCUSSÃO

A escassez de dados a respeito da diversidade genotípica e de características de virulência de cepas das espécies pertencentes ao grupo do *B. cereus* originárias do Brasil, motivou a realização desse estudo em busca de informações a respeito da epidemiologia molecular e da biodiversidade das espécies que compõem este grupo de bactérias. Existem poucos dados sobre a ocorrência e distribuição dos genes responsáveis pelos principais fatores de virulência das espécies desse grupo provenientes de países tropicais. A busca desse conhecimento contribui para que se possa estabelecer o perfil de risco de tais cepas e fornecer informações relevantes para a avaliação das relações filogenéticas da população.

No presente estudo, as 167 linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* selecionadas provenientes de fontes ambientais (principalmente amostras de solo), de diferentes tipos de alimentos e de larvas de insetos e que foram coletadas durante quatro décadas (anos 1980, 1990, 2000 e 2010) foram avaliadas quanto aos seus potenciais toxigênicos e deteriorantes (Anexo 1). Tais avaliações foram determinadas através de alguns aspectos fenotípicos como: a capacidade de motilidade, atividade hemolítica, produção de lecitinase e hidrólise do amido, e genótipos relacionados ao potencial toxigênico e de virulência, através da presença dos genes codificantes de fatores de virulência (*hly II*, *hly III*, *piplc*, *pcplc*, *sph*) e das toxinas (*hblACD*, *nheABC*, *cytK*, *entFM* e *ces*).

A virulência dos membros do grupo *B. cereus* está relacionada com vários genes. Esses genes codificam diferentes toxinas e fatores de virulência extracelulares responsáveis pelos efeitos biológicos das espécies desse grupo de bactérias. A transcrição de várias proteínas extracelulares, que incluem hemolisinas, exotoxinas necrosantes e fosfolipases, bem como, os fatores toxigênicos são regulados positivamente pela expressão de um gene regulador transcricional pleiotrópico *plcR* (Lereclus et al, 1996), o qual é específico das espécies que compõem o grupo *B. cereus*. Esse gene regula a expressão dos genes envolvidos com as quatro características fenotípicas e os genótipos dos determinantes de virulência avaliados neste estudo.

Espécies do gênero *Bacillus* produzem uma variedade de enzimas extracelulares, incluindo amilases, hemolisinas, lecitinases, fosfolipases, proteases, β -lactamases e esfingomielinases (Logan & De Vos, 2009). *B. cereus* tem merecido destaque na atualidade devido à sua presença nos

alimentos, sejam esses *in natura*, processados (como os desidratados e esterilizados), semi-prontos ou preparados e servidos em unidades de alimentação (Paiva et al, 2009). A formação de esporos e a resistência fisiológica aliada à sua habilidade de produzir uma vasta gama de enzimas extracelulares que degradam diversos substratos orgânicos possibilitam a esta bactéria estar amplamente distribuída no meio ambiente (Franco & Landgraf, 2002).

As enzimas lipase, protease e particularmente a lecitinase contribuem para a deterioração de produtos lácteos e afins. As alterações associadas às contaminações de produtos lácteos com *B. cereus* e espécies correlacionadas são consideradas importantes sob o ponto de vista tecnológico, uma vez que provocam uma redução do tempo de prateleira e o desenvolvimento de atributos sensoriais indesejáveis (Rezende-Lago et al, 2007; De Jonghe et al, 2010). Entre as 65 linhagens provenientes de diferentes matrizes de alimentos, 58 cepas (89%) degradaram a lecitina e 50 cepas (77%) hidrolisaram o amido (Tabela 1). De acordo com os resultados obtidos, a maioria das estirpes analisadas, que incluem as linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* de diferentes origens, produziram enzimas extracelulares tais como amilase e lecitinases, o que ressalta o potencial deteriorante dessas espécies (Tabela 1).

De Jonghe et al. (2010) investigaram a produção de enzimas deteriorantes entre as espécies de *Bacillus* que prejudicavam a qualidade do leite *in natura*. Os autores observaram que as cepas de *Bacillus* isoladas foram altamente proteolíticas e lipolíticas, e hidrolisaram a lecitina. Arslan et al. (2014) demonstraram a ocorrência da atividade de enzimas extracelulares, como amilase e lecitinase, na maioria das cepas de *Bacillus* isoladas de amostras de sorvetes.

As cepas de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* isoladas de fontes ambientais (com a maioria das estirpes provenientes de amostras de solo) apresentaram proporções menores na produção da lecitinase (77%) e na degradação do amido (70%) (Tabela 1). Tal fato pode estar relacionado com o ambiente no qual estas linhagens foram coletadas ou pela ocorrência de mutação no gene *plcR* associada aos fenótipos negativos para lecitinase e hemolisinas nas espécies *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Slamti et al, 2004).

Analisando os resultados de vários autores (Guinebretiere et al, 2002; Hendriksen et al, 2006; Molva et al, 2009), pode-se observar que tais caracteres fenotípicos estão presentes na maioria das amostras desse grupo de bactérias, porém o percentual de ocorrência desses fenótipos,

entre as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* de diferentes origens, pode variar em consequência da diversidade genética dessas espécies e as metodologias utilizadas para estudá-las (Tabela 1) (Guttman & Ellar, 2000; Santos et al, 2011).

Entre os outros fenótipos avaliados, a motilidade e a atividade hemolítica estiveram presentes em proporções semelhantes nas linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* das três diferentes fontes (Tabela 1). A atividade hemolítica foi amplamente difundida com 155 das cepas (93%) apresentando β -hemólise, bem como, a capacidade de motilidade (96%), a qual é dada pelos flagelos presente nas células bacterianas, e que podem atuar como adesinas favorecendo a interação entre a bactéria e as células epiteliais humanas (Ramarao & Lereclus, 2006). Caracteres como adesão, motilidade bacteriana e citotoxicidade permitem que as bactérias desse grupo colonizem o hospedeiro, lisem tecidos específicos, disseminem e alcancem os tecidos mais profundos. Logo, estas propriedades conferem às espécies do grupo *B. cereus* maior potencial patogênico.

Kamar et al. (2013) demonstraram que estirpes de *B. cereus* patogênicas isoladas de amostras de alimentos associados a surtos de intoxicação alimentar e amostras clínicas poderiam ser diferenciadas de estirpes não patogênicas com base nos fenótipos de colonização do hospedeiro. Esses autores observaram que o potencial de virulência da espécie encontra-se correlacionado com a motilidade, adesão, citotoxicidade e resistência a polimixina B. Assim, todas essas propriedades provavelmente estão de alguma forma, contribuindo para virulência da espécie. Quando as células do *B. cereus* aderem nas células epiteliais do hospedeiro ocorre um aumento da concentração de proteínas extracelulares ativas nas membranas potencialmente envolvidas na patogênese do *B. cereus*.

Os resultados do estudo realizado por Ghelardi et al. (2002) evidenciaram que ambos os processos (motilidade e a virulência), em cepas de *B. thuringiensis* são coordenados pelo gene *flhA* que codifica uma proteína do sistema de exportação flagelar e que parece apresentar papel preponderante para a exportação de proteínas flagelares assim como não flagelares.

Curiosamente, 22 cepas (13 *B. cereus*, 7 *B. thuringiensis* e 2 *B. mycoides*) que foram negativas para os genes da enterotoxina HBL apresentaram β -hemólise, o que sugere a produção de outros fatores enzimáticos que estão contribuindo com atividade hemolítica, pois esse fenótipo de

hemólise é resultado da expressão de várias proteínas de ação hemolítica, tais como, as hemolisinas e a esfingomielinase (Molva et al, 2009; Oda et al, 2010). Três estirpes (2 *B. cereus* e 1 *B. mycoides*) apresentaram α -hemólise e genótipo negativo para a enterotoxina hemolítica HBL porém possuíam os genes codificadores das toxinas CytK-2, HlyIII e SPH, enzimas com propriedades hemolíticas.

Vários estudos já reportaram o isolamento de *B. cereus* e espécies correlacionadas em diferentes tipos de alimentos que podem ser contaminados com células vegetativas ou esporos dessa bactéria (Batchoun et al, 2011; Flores-Urban et al, 2014; Hariram & Labbe, 2015). No presente estudo, as estirpes de *B. cereus* (36 cepas), *B. thuringiensis* (28 cepas) e *B. mycoides* (1 cepa) isoladas de distintas matrizes de alimentos (65 amostras) demonstraram elevados índices de genes codificadores de exotoxinas. Os percentuais de ocorrência desses genes entre as espécies de 95% (*nheABC*), 82% (*hblACD*), 77% (*cytK2*), 100% (*entFM*), 43% (*hlyII*), 83% (*hlyIII*), 74% (*pi-plc*), 58% (*pc-plc*) e 37% (*sph*) (Tabela 1) revelam o potencial que as mesmas possuem de causar surtos de gastroenterite ou infecções oportunistas quando as condições são favoráveis para o crescimento bacteriano. Os alimentos tais como laticínios e suplementos preparados em hospitais ou farmácias ou ainda formulas lácteas para lactentes que estejam contaminados com cepas portadoras de diversos fatores de virulência, representam riscos potenciais para pacientes hospitalizados, particularmente crianças e pacientes inumossuprimidos (Koneman et al, 2008).

Sabe-se que *B. cereus* é a terceira causa mais importante de incidentes de intoxicação alimentar coletiva na Europa, onde foram registrados em 2011 cerca de 220 surtos de origem alimentar como sendo causado por *Bacillus* spp. (3,9% do total de 5.648 surtos de origem alimentar registrados) (EFSA, 2013). No Brasil, segundo a Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, órgão do Ministério da Saúde, *B. cereus* foi a terceira bactéria mais frequente causadora de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA) no país entre 1999 e 2009 (7%, 219 casos dos 3.088 surtos). Como a doença transmitida por alimentos causada por *B. cereus* não é notificada, os números exatos de sua incidência e prevalência não estão disponíveis na maior parte do mundo.

Casos graves e até mesmo fatais de doença de origem alimentar por *B. cereus* foram esporadicamente relatados em alguns países, como a Bélgica (Dierick et al, 2005; Naranjo et al, 2011), Suíça (Mahler et al, 1997; Posfay-Barbe et al, 2008) e Japão (Shiota et al, 2010). As

enterotoxinas do complexo HBL, NHE e a CytK, já foram identificadas em amostras implicadas em surtos, mas os sintomas observados na maioria dos incidentes foram atribuídos à ação das enterotoxinas HBL e NHE (Hendriksen & Hansen, 2006; Stenfors Arnesen et al, 2008; Zhou et al, 2014; Lopez et al, 2015).

Essas três enterotoxinas (NHE, HBL e CytK) formadoras de poros de membranas celulares parecem ser as principais responsáveis por quadros de diarreia provenientes de intoxicação alimentar provocado pelas espécies do grupo *B. cereus* (Stenfors Arnesen et al, 2008; Zhou et al, 2014; Lopez et al, 2015). A distribuição generalizada desses genes entre as estirpes de diversas origens e épocas, como relatam os resultados obtidos, indicam que estas proteínas desempenham uma função biológica importante para esses microrganismos (Gaviria Rivera et al, 2000).

Considera-se relevante a presença dos genes que codificam as enterotoxinas e outros fatores de virulência, pois esses genótipos estão amplamente dispersos nas cepas analisadas e independem da origem e períodos, com exceção das linhagens de *B. mycooides*, em sua maioria, isoladas de amostras de solo, nas quais em somente seis cepas foi detectada a cereolisina A (gene *pcplc*) e em apenas uma a hemolisina III (HlyIII) entre os fatores de virulência analisados (Tabela 5).

Combinações dos diferentes genes que codificam os fatores toxigênicos (7 perfis) e os demais determinantes de virulência (24 perfis) foram encontradas em diferentes amostras de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycooides*, que potencialmente podem causar surtos de intoxicação alimentar devido à formação de exotoxinas (Santos et al, 2011). O perfil toxigênico predominante, o perfil I, incluiu cepas que possuem todos os genes associados à produção das enterotoxinas, *entFM* e *cytK2* exceto a toxina emética (*ces*), o que indica que as linhagens analisadas provavelmente não são capazes de causar síndrome emética, mas apresentam grande potencial de causar a síndrome diarreica.

No perfil toxigênico I estão 64 cepas de *B. thuringiensis* (78%), 46 cepas de *B. cereus* (66%) e 9 cepas de *B. mycooides* (60%), que correspondem a 71% (119 das 167 cepas) das amostras analisadas (Tabela 2). Esses resultados demonstraram que as principais enterotoxinas encontram-se amplamente distribuídas não somente na espécie *B. cereus*, como também entre as outras espécies do *B. cereus* l.s., *B. thuringiensis* e *B. mycooides*, originárias do Brasil.

Os resultados obtidos nesse estudo assemelham-se aos observados por Forghani et al. (2014) que avaliaram a presença e distribuição dos genes das enterotoxinas (*hblC* e *nheA*), *entFM*, *cytK* e da toxina emética em amostras de *B. cereus* e *B. thuringiensis* isolados a partir de várias fontes (alimentos, ambientais e clínicos). Os resultados forneceram informações importantes sobre a dispersão e prevalência das toxinas em *B. cereus* e *B. thuringiensis* coletados de diferentes fontes e concluiu que essas estirpes representam riscos potenciais à saúde, devido à ubiquidade, elevada ocorrência de cepas patogênicas que abrigam esses genótipos independentemente da fonte de isolamento.

Os genes que codificam as enterotoxinas foram mais frequentemente encontrados nas linhagens de *B. thuringiensis* que nas estirpes de *B. cereus* independente das três fontes (Tabela 5 e Figura 11). Entre as 82 estirpes de *B. thuringiensis*, 75 cepas (91%) possuem os genes responsáveis pela codificação dos complexos de proteínas tóxicas (HBL e NHE) e 71 cepas (87%) expressaram a CytK-2 e todas as linhagens produziram a EntFM, evidenciando a prevalência desses genes nas amostras independente da fonte de isolamento (Tabelas 1 e 5).

Os produtos alimentícios tornam-se contaminados a partir do ambiente, e os esporos altamente resistentes podem suportar a pasteurização e a exposição à radiação gama (Koneman et al, 2008). Essa espécie já foi isolada de vários tipos de matrizes de alimentos, bem como, produtos lácteos e afins (Rosenquist et al, 2006; De Santis et al, 2008; Zhou et al, 2008; Bartoszewick et al, 2009).

Resultados similares foram encontrados por Ngamwongsatit et al. (2008) quando analisaram 411 cepas de *B. cereus* e 205 estirpes de *B. thuringiensis* provenientes de alimentos e amostras de solo quanto à presença dos complexos HBL, NHE, CytK e EntFM. Observou-se alta ocorrência desses genes em *B. thuringiensis*, sendo os genes codificadores de *hbl*, *nhe*, *cytK* e *entFM* mais comuns em linhagens de *B. thuringiensis* do que nas cepas de *B. cereus* analisadas.

Em outro estudo desenvolvido por Gaviria Rivera et al. (2000), a expressiva ocorrência desses genótipos foi evidenciada em 74 estirpes de *B. thuringiensis* de 25 sorovares diferentes. Todas as estirpes foram citotóxicas em ensaios biológicos (testes com células Vero) e apresentaram os genes *nheABC* (74 cepas) e *hblACD* (65 cepas).

Isto se torna particularmente relevante devido à utilização de produtos à base de *B. thuringiensis* em grandes quantidades no ambiente para o controle de insetos-vetores e pragas

agrícolas (Jensen et al, 2002). O envolvimento desse microrganismo em relatos de surtos alimentares é considerado esporádico, mesmo com pesquisas que evidenciam a produção das enterotoxinas por *B. thuringiensis*, existem somente dois estudos que descreveram surtos de gastroenterite associados ao *B. thuringiensis* (Jackson et al, 1995; McIntyre et al, 2008).

O fato das espécies de *B. thuringiensis* e *B. cereus* serem semelhantes morfológicamente entre si, pode justificar o número baixo de notificações de contaminação alimentar por *B. thuringiensis*, devido, principalmente, aos métodos utilizados para a detecção de *B. cereus* em amostras de alimentos e clínicas que não distinguem as células de *B. cereus* das células de *B. thuringiensis* (Swiecicka et al, 2006). Através da microscopia de contraste de fase é possível identificar os cristais proteicos imersos no citoplasma adjacentes ao esporo nos esporângios da espécie *B. thuringiensis*, o que nas outras espécies não é evidente (Koneman et al, 2008). Após a comercialização de formulações à base de *B. thuringiensis*, estudos tem mostrado que linhagens comerciais utilizadas para o controle de insetos são capazes de produzir enterotoxinas responsáveis pela síndrome diarreica (Scarano et al, 2009; Kim et al, 2014).

Kyei-Poku et al. (2007) examinaram amostras isoladas de quatro bioinseticidas comerciais à base de diferentes sorovares de *B. thuringiensis* (*kurstaki*, *israelensis*, *aizawai* e *tenebrionis*) quanto a presença de genes enterotóxicos e fatores de virulência. O gene *piplc* estava presente em todas as amostras; o gene *sph* foi detectado nas amostras dos sorovares *israelensis* e *aizawai*; a *entFM* somente no sorovar *israelensis* e *entS* nos sorovares *kurstaki*, *israelensis* e *tenebrionis*. A CytK presente nos produtos à base dos sorovares *kurstaki*, *israelensis* e *aizawai* pertence a variante CytK-2. Os autores sugerem que esses genes devem ser inativados em linhagens comerciais antecipando-se a ocorrência de riscos potenciais à saúde pública.

Recentemente, Kim et al. (2015) avaliaram 9 cepas comerciais e 12 cepas de referência de *B. thuringiensis* e 16 cepas de referência de *B. cereus* através da PCR para presença dos genes enterotóxicos e genes hemolíticos. Esses autores relataram que a maioria dos genes das enterotoxinas e hemolíticos encontram-se dispersos entre as duas espécies e em maior ocorrência nas cepas de *B. thuringiensis*; e a presença de genótipos que codificam os genes enterotoxigênicos e outras proteínas dos fatores de virulência fornecem atributos negativos, o que poderia levar a restringir o uso de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas em plantações agrícolas orgânicas.

Deve-se destacar ainda que apesar de linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas para a fabricação de produtos biotecnológicos possuírem os genes codificantes para os fatores de virulência aqui descritos, estes produtos antes de serem comercializados são rigorosamente avaliados pelos setores competentes, respeitando a legislação vigente, para que não tragam riscos à saúde humana e ao ambiente, garantindo assim a biossegurança dos produtos à base de *B. thuringiensis* (US-EPA, 2011).

No Brasil a história do controle biológico é relativamente recente. Há pouco mais de dezessete anos, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Ibama), do Ministério do Meio Ambiente (MMA), publicou o primeiro procedimento para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes biológicos empregados na defesa fitossanitária. Em 2006, foi aprovada a norma de registro de produtos para controle biológico (Instrução Normativa Conjunta nº 3, regulada pela Lei 7.802, de 1989; e o Decreto 4.074, de 2002). Atualmente, há mais de 50 produtos comerciais para controle biológico registrado, e, apesar da crescente evolução, é um número ainda incipiente, correspondendo a 5% dos defensivos registrados no Brasil.

Os surtos de intoxicação alimentar geralmente estão associados à falhas na conservação dos produtos mediante exposição a tempos e temperaturas inadequadas, propiciando, assim, que estes microrganismos se multipliquem até níveis significativos ($>10^5$ UFC/g ou mL), ressaltando-se que, neste caso, o microrganismo não é responsável pela patologia e sim as toxinas que o mesmo produz (Paiva et al, 2009).

Com relação às 36 estirpes de *B. cereus* isoladas de diversos tipos de alimentos, 27 cepas (75%) possuem os genes responsáveis pela codificação dos complexos de proteínas tóxicas (HBL e NHE) e 22 cepas (61%) expressaram a CytK-2 e todas produziram a EntFM, as quais são as principais exotoxinas responsáveis pela a síndrome diarreica (Tabela 5).

Resultados semelhantes foram observados por Aragon-Alegro et al. (2008) que constataram que mais da metade das amostras de *B. cereus* isoladas de alimentos nacionais possuíam os complexos proteicos NHE, HBL e CytK-2. No estudo realizado por Chaves et al. (2011) a maioria das estirpes de *B. cereus* (64%) isoladas de diferentes tipos de alimentos coletados a partir de produtos nacionais também apresentaram genótipos positivos para os genes *nhe*, *hbl*, *entFM* e *cytK-2*. Tais fatos relatam provavelmente a presença de esporos bacterianos em diferentes matrizes de

alimentos, e, portanto ações de fiscalização e inspeção das matérias-primas e afins tornam-se importante para reduzir a carga microbiana nos alimentos e conseqüentemente diminuir a incidência de possíveis surtos diarreicos.

Recentemente, Lopez et al. (2015) estudaram isolados de *B. cereus* proveniente de um alimento implicado em enfermidade severa, quando a vítima apresentou emese e diarreia concomitantes. A partir dos resultados obtidos em análises laboratoriais, os autores identificaram no alimento cepas produtoras de toxina emética como outras, produtoras de toxinas diarreicas, revelando a existência de diversidade bioquímica e de produção de toxinas por *B. cereus*, em um mesmo alimento.

A presença da EntFM em 100% das amostras analisadas, como a principal enterotoxina após a enterotoxina NHE (96%) já foi previamente registrada em outros estudos, os quais demonstraram elevada ocorrência dessa toxina entre as espécies que compõem o *B. cereus* l.s. (Kim et al, 2009; Lee et al, 2012; Forghani et al, 2014; Kim et al, 2015; Tewari et al, 2015).

A EntFM está envolvida com a aderência, formação de biofilmes e virulência (Tran et al, 2010), portanto deve ser considerada como uma das principais enterotoxinas de *B. cereus* e espécies correlacionadas, como os complexo proteicos HBL, NHE e CytK. Essa enterotoxina também induz uma vacuolização citoplasmática em macrófagos, sugerindo o envolvimento na virulência bacteriana, indicando que esta enterotoxina possui propriedades que podem facilitar o processo de infecção. Estudos de prevalência revelaram que a EntFM foi detectada na maioria dos *B. cereus* associados aos surtos de toxinfecção alimentar, bem como, em cepas de *B. thuringiensis* isolados de alimentos e amostras de solo (Ngamwongsatit et al, 2008; Molva et al, 2009; Forghani et al, 2014).

Embora o *B. cereus* seja geralmente associado com distúrbios gastrointestinais, também é um agente patogênico humano oportunista que pode causar algumas infecções sistêmicas e locais, como septicemia, periodontites, bacteremia nosocomial adquirida, endocardite, infecções necrotizantes, pneumonia e infecções oculares (Bottone, 2010). Estas infecções são pouco frequentes e, geralmente, estão associadas às hemolisinas, exotoxinas necrosantes e fosfolipases produzidas pelo microrganismo.

As análises de casos envolvendo infecções significativas por *Bacillus* indicam a participação da espécie *B. cereus* nas síndromes clínicas. Em virtude da natureza ubíqua no meio ambiente, o isolamento de espécies de *Bacillus* de amostras clínicas tem sido considerado mais frequentemente contaminação interveniente. Entretanto, a frequência crescente de casos publicados na literatura de espécies de *Bacillus* como agentes patológicos em hospedeiros imunocomprometidos sugere que esses microrganismos não devem ser desprezados como contaminantes em todos os casos. Relatos de infecções graves causadas por espécies de *Bacillus* foram associados a procedimentos cirúrgicos, imunossupressão, feridas traumáticas, queimaduras, hemodiálise e abuso de drogas parenterais (Koneman et al. 2008).

Na fase estacionária, o *B. cereus* produz diversos metabólitos além das toxinas associadas à infecção gastrointestinal, que podem contribuir para a virulência; e as doenças associadas a este organismo são provavelmente mediadas pelos efeitos sinérgicos desses produtos de virulência. Os genes codificantes para os fatores de virulência também já foram identificados em linhagens de *B. thuringiensis* (Zahner et al, 2005; Kyei-Poku et al, 2007; Kim et al, 2015).

Existem poucos estudos que relatam a presença desses fatores de virulência nas espécies do *B. cereus* l.s. (Zahner et al, 2005; Martinez-Blanch et al, 2009; Kim et al, 2015). O primeiro estudo que detectou esses determinantes de virulência em linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* foi realizado por Guttman & Ellar (2000). Os distintos perfis obtidos para as 23 estirpes analisadas forneceram um conjunto de diferentes genótipos, os quais poderiam auxiliar na identificação desses fatores envolvidos na patogenicidade das espécies do *B. cereus* l.s.

Com relação à classe de toxinas representadas pelas fosfolipases, as fosfolipases C são as mais conhecidas dentro desta família de proteínas expressas por linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e outras espécies correlacionadas. De acordo com a classe de fosfolipídios que atuam têm-se as PC-PLC (Callegan et al, 2002), PI-PLC (Ikezawa & Taguchi, 1981) e SPH (Pomerantsev et al, 2003). As fosfolipases clivam os lipídeos que servem para ancorar as proteínas de superfície celular, comprometem a integridade da membrana celular e anulam a capacidade regenerativa das células.

As fosfolipases são conhecidas por causar a degradação da célula e membranas de mucosas, os quais são ricos em fosfolipídeos, levando à necrose (Kotiranta et al, 2000). Os resultados encontrados nesse estudo mostraram ampla distribuição das fosfolipases entre as espécies analisadas (Tabela 1). O gene *pcplc* foi detectado em 73 cepas de *B. thuringiensis* (89%), 39 cepas

de *B. cereus* (56%) e 6 cepas de *B. mycoides* (40%) independente das fontes de isolamento (Tabela 5). Esses resultados reforçam o envolvimento desse genótipo na patogênese do grupo *B. cereus* como observado por Martinez-Blanch et al. (2009) que demonstraram ampla distribuição da molécula PC-PLC nas espécies desse grupo e em outras espécies do gênero *Bacillus*.

Zahner et al. (2005) também evidenciaram a presença e a distribuição do gene *pcplc* em 64% das cepas de *B. thuringiensis* isoladas de diferentes fontes (amostras clínicas, alimentos e ambientais). Para as cepas de *B. cereus* (63 cepas) somente duas amostras que foram isoladas no Brasil apresentaram esse gene. Esses resultados diferem dos obtidos nesse estudo, no qual 39 cepas de *B. cereus* originárias do Brasil apresentaram esse genótipo. Porém, no presente estudo o par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado difere do empregado por Zahner et al. (2005) onde foi relatado que a falta de amplificação poderia ser em consequência da variação da sequência na região selecionada para o anelamento dos iniciadores utilizados.

A molécula PC-PLC reforça a hemólise da hemolisina BL nas células que contêm quantidades significativas de fosfolipase C. Sabe-se que esta molécula, quando pura, apresenta toxicidade para o tecido da retina *in vitro* e provoca necrose. Esta enzima foi produzida em quantidade elevada por amostras testadas em modelo de endoftalmite séptica experimental em coelhos. A proporção excepcionalmente alta de fosfolipídios no tecido da retina pode explicar a acentuada toxicidade que a molécula PC-PLC exerce sobre esse tecido (Beecher et al, 2000). A endoftalmite por *B. cereus* ocorre após lesões penetrantes no tecido da retina em consequência da disseminação bacteriana durante episódios de bacteremia. Foram relatados casos raros de endoftalmite por *Bacillus* spp. após cirurgia de catarata (Roy et al, 1997). A evolução rapidamente destrutiva das infecções intra-oculares por *Bacillus* spp. tem sido atribuída à produção de toxinas e enzimas destrutivas, como as fosfolipases, hemolisinas, proteases e lipases, pelos microrganismos envolvidos (Callegan et al, 2003).

Em *B. cereus* e *B. thuringiensis*, as moléculas PC-PLC e SPH compõem a unidade citolítica cereolisina AB (CerAB), e tem sido implicadas na síndrome diarreica, atuando sobre a permeabilidade e viabilidade de células do epitélio intestinal (Hergenrother & Martin, 1997). Este complexo biológico ocorreu em 68 das 167 cepas analisadas, sendo 48 cepas de *B. thuringiensis* (59%) e 20 cepas de *B. cereus* (29%), evidenciando o potencial patogênico dessas espécies (Tabela 5).

Outro fator de virulência presente em *B. cereus* e *B. thuringiensis*, a enzima PI-PLC, é importante na transdução de sinal associada à membrana, agindo na superfície externa da célula para gerar um mensageiro para a transdução de sinal intracelular, clivando fosfatidilinositol e derivados. Esta molécula facilita a hidrólise entre o glicerol e a extremidade polar dos fosfolipídeos gerando fosfato-inositol e diacilglicerol, substratos importantes no metabolismo celular (Kuppe et al, 1989).

Por esta razão, a molécula PI-PLC é classificada como um fator de virulência extracelular. Entre as cepas analisadas, 112 (67%) amplificaram o gene *piplc*, sendo 65 cepas de *B. thuringiensis* (79%) e 47 cepas de *B. cereus* (67%). Esse gene revelou-se ubíquo entre os 30 sorotipos de *B. thuringiensis* investigados por Damgaard et al. (1996) e estava presente em 10 dos 11 sorotipos estudados por Guttman & Ellar (2000). Em *B. cereus*, Boonchai et al. (2008) analisaram a presença desse genótipo em cepas isoladas de seis diferentes matrizes de alimentos. Todas as amostras apresentaram genótipo positivo para esse gene, demonstrando como essa enzima encontra-se dispersa nessa espécie.

A segunda classe de toxinas expressas por linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, inclui as hemolisinas, as quais são responsáveis pela atividade hemolítica e consideradas importantes em processos infecciosos. As hemolisinas da família citolisinas colesterol-dependentes (CDC) são toxinas formadoras de poros em membranas plasmáticas, e não tem receptor específico em uma ampla gama de hemácias (Andreeva et al, 2006), e já foram identificadas nas espécies do grupo *B. cereus* (Ramarao & Sanchis, 2013).

A HlyII é uma toxina hemolítica que atua como toxina letal em camundongos, enquanto a HlyIII provoca lise osmótica dos eritrócitos por meio da formação de poros transmembrana (Baida & Kuzmin, 1996). Neste estudo, ambas as hemolisinas apresentaram maior ocorrência nas estirpes de *B. thuringiensis*, com 54 cepas (66%) amplificando *hlyII* e 72 cepas (88%) a *hlyIII*. Entre as estirpes de *B. cereus* estão 15 cepas (21%) que expressaram a *hlyII* e 57 cepas (81%) que amplificaram a *hlyIII*. Estes resultados demonstraram os diferentes padrões de patogenicidade observados entre as espécies que compõem o *B. cereus* l.s. Em um estudo realizado por Cadot et al. (2010) somente as estirpes de *B. cereus* potencialmente patogênicas expressaram a HlyII.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Budarina et al. (1994), que avaliaram a distribuição da HlyII em *B. cereus* e *B. thuringiensis* através da hibridização *in situ* utilizando uma sonda específica do gene *hlyII*. Somente 4 das 13 cepas de *B. cereus* mostraram resposta positiva nos experimentos de hibridização, enquanto 13 das 14 estirpes de *B. thuringiensis* responderam positivamente. Os resultados mostram claramente a distribuição limitada da HlyII entre cepas de *B. cereus* e evidencia que essa hemolisina é mais característica de linhagens de *B. thuringiensis*.

Para ambos os perfis, toxigênico e de virulência, a espécie *B. thuringiensis* revelou maior ocorrência dos genes em questão. Sabemos que quanto maior o número de genes de patogenicidade maior o potencial toxi-infeccioso dessas amostras (Figura 11). Considerando a ampla distribuição de cepas de *B. thuringiensis* na natureza, e o interesse crescente na aplicação como bioinseticida mundial (Lacey, 2007), ressalta a presença desses fatores de virulência amplamente dispersos em linhagens de *B. thuringiensis*.

Os mecanismos de adaptação das espécies desse grupo às condições ambientais são muito diversos e, portanto contribuem para a sobrevivência e disseminação dessas bactérias esporulantes no ambiente. Segundo Guinebretiere et al. (2008) os nichos térmicos associados aos grupos mesofílico e psicrotolerante podem atuar como separações micro-geográficas, prevenindo a competição entre cada tipo de população bacteriana. Estes autores determinaram sete grupos filogenéticos (I a VII), com base no crescimento microbiano em diferentes temperaturas.

No presente estudo, as 167 estirpes foram positivas somente para a assinatura do genótipo mesofílico (*cspF*) e provavelmente agrupam-se no grupo filogenético IV (Guinebretiere et al, 2008). Neste grupo encontram-se as cepas com genótipo positivo para os genes *hbl*, *nhe* e *cytK2* e que multiplicam-se na faixa de temperatura maior que 10°C e menor que 45°C. Com relação às estirpes estudadas, estão neste grupo filogenético IV, principalmente as linhagens do perfil toxigênico I (Tabela 2). Guinebretiere et al. (2010) demonstraram que a capacidade das espécies que compõem o *B. cereus* l.s. em causar intoxicação alimentar varia de acordo com a afiliação filogenética (Grupos I a VII) ao invés da afiliação da espécie. Para as espécies *B. thuringiensis* e *B. cereus*, torna-se difícil determinar o potencial de risco sem levar em consideração a afiliação filogenética, uma vez que essas espécies estão distribuídas entre os grupos filogenéticos II a VI e, assim, mostram vários níveis potenciais em causar toxi-infecção alimentar ou infecções oportunistas (Guinebretiere et al, 2010).

Além das linhagens positivas para todos os fatores de virulência e toxigênicos (20 cepas *B. thuringiensis* e 8 cepas de *B. cereus*), foram selecionadas randomicamente 12 cepas (3 *B. thuringiensis* e 9 *B. cereus*) entre as 167 cepas e submetidas à amplificação do gene de virulência cereolisina O (*clo*). Este gene, também conhecido como hemolisina I, assemelha-se à estreptolisina O por ser uma proteína termolábil, ativada por tióis e inibida pelo colesterol (Bernheimer & Grushoff, 1967).

Esse genótipo (*clo*) foi detectado em todas as 40 linhagens selecionadas; e a presença de mais uma hemolisina provavelmente está contribuindo para o efeito hemolítico e toxigênico das espécies desse grupo de bactérias. Em Martinez-Blanch et al. (2009) esse genótipo foi detectado em todas as espécies do grupo *B. cereus* analisadas, como também em 25% de outras espécies do gênero *Bacillus*, como por exemplo, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. pumilus* e *B. subtilis*.

Essas 40 linhagens também foram submetidas à amplificação e digestão enzimática do produto amplificado de assinatura específica do DNAr 16S do gene *rrs*, com intuito de identificar possíveis cepas psicrófilas. A capacidade de algumas linhagens do grupo *B. cereus* em crescer em baixas temperaturas (i.e., 4°C a 7°C) está correlacionada com a presença das assinaturas específicas para o comportamento psicrófilo, indicado por nucleotídeos específicos no gene *rrs*, os quais desempenham um papel importante na psicrotolerância (Pruss et al, 1999; Stenfors & Granum, 2001).

Cepas de *B. thuringiensis* de diferentes sorovares com características psicrotolerantes já foram identificadas por Soufiane & Cote (2010). Através da análise do MLST, estas estirpes de *B. thuringiensis* pertencentes aos sorovares *navarrensis*, *bolivia* e *vazensis*, foram agrupadas próximas às linhagens de *B. weihenstephanensis* revelando uma raiz filogenética comum (Soufiane & Cote, 2013). No presente estudo, nenhuma das 23 cepas de *B. thuringiensis* selecionadas apresentou assinaturas psicrófilas na região RNAr 16S do operon *rrs* provavelmente por serem pertencentes aos sorovares *israelensis*, *kurstaki*, *morrisoni*, *yunnanensis*, *shandongensis*, *oswaldocruzi*, *tohokuensis*, *aizawai* e *brasiliensis*.

Com relação aos *B. cereus*, as cepas a LFB-FIOCRUZ 803 (AL/1991) e 1669 (FA/2012) pertencentes aos perfis toxigênico e de virulência I foram definidas como cepas intermediárias, pois apresentaram simultaneamente as assinaturas mesófilas e psicrófilas na região DNAr 16S, ou

seja, essas estirpes podem expressar esse genótipo de acordo com as condições climáticas a que são expostas (Figura 12) (Von et al, 1999).

Alguns estudos já relataram a produção de enterotoxinas e fatores de virulência por linhagens psicrotrófica de *B. cereus* (Watanuki et al, 2008; Zhou et al, 2010; Bartoszewicz et al, 2013). No estudo desenvolvido por Bartoszewicz et al. (2013) relatou-se que cepas eméticas de *B. cereus* com assinaturas mesofílicas e psicrotróficas poderiam constituir um risco para indústria de laticínios, e que a habilidade em germinar em faixas de temperaturas extremas (< 10°C e > 45°C) pode ser influenciada pela relação dessas duas assinaturas presentes.

Em 1997, Fermanian et al. conferiram a capacidade de estirpes de *B. cereus* em produzirem toxinas diarreicas em baixas temperaturas e verificaram que todas as estirpes toxigênicas que cresceram na temperatura de 32°C foram também toxigênicas a 10°C. A presença de estirpes patogênicas capazes de se multiplicar em baixas temperaturas (~10°C) representa um risco à saúde do consumidor para produtos alimentícios armazenados nestas faixas de temperatura.

Com o intuito de determinar o grau de similaridade intraespecífica através do polimorfismo de elementos repetitivos altamente conservados, foi utilizado nesse estudo o método rep-PCR, buscando avaliar as relações genéticas das populações em questão.

O rep-PCR é um método altamente discriminativo para diferenciar estirpes, podendo também ser utilizado para construir iniciadores específicos em níveis taxonômicos intraespecíficos como, por exemplo, sorovares e sorotipos (Reyes-Ramirez & Ibarra, 2005). Nesse estudo, foram utilizados iniciadores especificamente desenhados para sequência Bc-rep encontrados nas espécies do *B. cereus* l.s. descrito por Reyes-Ramirez & Ibarra (2005). Segundo esses autores, o rep-PCR foi capaz de identificar sorovares e sorotipos, incluindo estirpes auto-aglutinantes e não-flageladas.

Para o *B. cereus* l.s. inúmeros estudos já foram realizados utilizando esta técnica para diversas finalidades, a exemplo da caracterização de estirpes de *B. cereus* e *B. anthracis* (Daffonchio et al, 2006), relação genética entre grupos de *B. cereus* e *B. anthracis* (Cherif et al, 2003), caracterização molecular de *B.cereus* (Lopez & Alippi, 2007), relação genética entre populações de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Manzano et al, 2009), entre outros.

A análise do dendrograma das relações de similaridade genética determinaram 20 perfis eletroforéticos no conjunto das 40 estirpes selecionadas (23 *B. thuringiensis* e 17 *B. cereus*). Entre as estirpes analisadas, 6 foram alocadas fora do limite de 80% de similaridade com relação as demais estirpes analisadas, considerado para a inclusão em um *cluster* [4 *B. cereus* (LFB-FIOCRUZ 540, 196, 1606, 766) e 2 *B. thuringiensis* (LFB-FIOCRUZ 1619 e 1561)]. Para as estirpes analisadas o dendrograma de similaridade genética demonstrou uma evidente divisão entre as duas espécies (Figura 15).

Na análise computacional dos perfis de rep-PCR, quatro *clusters* (1-4) cujas cepas apresentaram mais de 80% de similaridade foram identificados. O *cluster* 4 foi o predominante, com 21 cepas de *B. thuringiensis* e dois perfis rep-PCR definidos [10 *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, 10 *B. thuringiensis* não sorotipados (perfil rep-PCR 4a) e LFB-FIOCRUZ 156 *B. thuringiensis* sorovar *morrisoni* (perfil rep-PCR 4b)], que incluiu estirpes isoladas das três fontes e de períodos distintos. Duas cepas de *B. thuringiensis* não agruparam nesse *cluster* principal, a LFB-FIOCRUZ 1619 que foi mais similar as cepas de *B. cereus*, agrupando entre os *clusters* 1 e 2, e a LFB-FIOCRUZ 1561 agrupou próxima ao *cluster* 4, com 60% de similaridade com relação ao *cluster* principal (Figuras 14 e 15).

O polimorfismo de DNA obtido mediante à amplificação pelo rep-PCR revelou expressiva similaridade entre as linhagens de *B. thuringiensis*, demonstrando um elevado grau de clonalidade, sugerindo uma estrutura genética populacional clonal. Em populações clonais, a maioria das estirpes pertencem a *clusters* restritos de genótipos altamente relacionados (Tourasse et al, 2006). A partir da análise dos perfis rep-PCR observa-se um perfil padrão típico (perfil rep-PCR 4a) para as linhagens de *B. thuringiensis* que possuem perfil de proteínas totais e atividade biológica semelhante a cepa de referência *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* H:14 (LFB-FIOCRUZ 584), como demonstrado por Reyes-Ramirez & Ibarra (2005) (Figura 15).

Os distintos perfis de rep-PCR apresentados pelas cepas de *B. cereus*, houve a identificação de 16 perfis eletroforéticos, sugerem que as linhagens desta espécie possuam um genoma relativamente variável, o que indica a ocorrência de transferência genética tanto intra-específica como inter-específica (Figuras 13 e 15) (Vilas-Boas et al, 2002; Peruca et al, 2008). Ao utilizarem o rep-PCR, Chaves et al. (2011) demonstraram elevado grau de diversidade genética entre as estirpes de *B. cereus* proveniente de diferentes matrizes de alimentos e épocas distintas.

Uma aplicação desse método foi efetuado por Peruca et al. (2008), ao avaliar as similaridades genéticas e a estrutura genética de populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* através do rep-PCR. Os autores demonstraram que as relações genéticas deduzidas a partir dos perfis rep-PCR indicaram, a despeito da grande similaridade genética existente entre estas espécies, que as mesmas apresentaram estruturas populacionais distintas, sugerindo que elas devem permanecer como unidades taxonômicas separadas.

Ainda que as estirpes de *B. thuringiensis* tenham sido agrupadas em 4 perfis eletroforéticos similares, esse método rep-PCR já foi utilizado anteriormente para *B. thuringiensis* (Cherif et al, 2007; Samapundo et al, 2011; Sauka et al, 2011), sendo considerado discriminativo, como observado para as cepas de *B. thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 156, 1561 e 1619, e evidencia as diferenças entre os tipos de estrutura genética apresentado pelas duas espécies em questão (Figuras 14 e 15).

Através do rep-PCR e ERIC-PCR, Katara et al. (2012) analisaram amostras de *B. thuringiensis* nativas de diversos habitats da Índia. Os perfis observados através desses métodos de tipagem molecular foram discriminatórios e revelaram diferentes perfis eletroforéticos, bem como apresentaram um alto grau de diversidade genética entre as amostras isoladas.

Considerando que as cepas agrupadas dentro do mesmo perfil rep-PCR possam ser relacionadas como prováveis clones, entre as linhagens de *B. thuringiensis* a distribuição das sequências rep-PCR tendem a ser menos variáveis, havendo portanto uma propensão para o agrupamento dos perfis eletroforéticos específicos das estirpes de *B. thuringiensis* não sendo o mesmo observado pelas estirpes de *B. cereus*, e tais fatos podem indicar uma diferença comportamental de como essas espécies respondem aos fatores ambientais. Tais padrões devem ser levados em consideração para a manutenção da atual classificação taxonômica como duas espécies distintas.

Além da tipagem por rep-PCR, estas estirpes também foram submetidas à caracterização genotípica através do MLST, com intuito de avaliar as relações filogenéticas e populacionais das linhagens em questão. Esta tipagem foi realizada com as 40 estirpes previamente selecionadas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, sendo 16 amostras de fonte ambiental, 19 amostras de alimentos e 5 amostras de larvas de insetos isoladas em períodos distintos.

Diversos métodos de tipagem genotípica têm sido usados e aplicados nas espécies que compõem o *B. cereus* l.s. com objetivo de avaliar a afinidade filogenética entre as espécies desse grupo (Cherif et al, 2003; Hill et al, 2004; Valjevac et al, 2005; Vassileva et al, 2007). Nos últimos anos inúmeras técnicas moleculares baseadas no estudo da similaridade dos cromossomos foram desenvolvidas, dentre estas se destaca a tipagem de sequências de multilocus (MLST), a qual se define como método molecular altamente discriminatório, que se baseia na análise do polimorfismo de nucleotídeos nas sequências de genes essenciais que codificam enzimas de manutenção celular.

Tourasse & Helgason (2006) validaram um total de 155 STs no estudo realizado com 226 estirpes do grupo *B. cereus* l.s. e acessível em <http://mlstoslo.uio.no/bcereus>. Em 2008, Tourasse & Kolsto desenvolveram um banco de dados designado *SuperCAT*, que compila e integra todos os dados do MLST a partir dos cinco esquemas publicados para o grupo *B. cereus*. Coeficientes filogenéticos foram usados para combinar as informações filogenéticas a partir da análise de todos os esquemas e banco de dados, a fim de produzir uma visão integrada da estrutura populacional do *B. cereus* l.s.

No presente estudo, cada sequência de alelos foi comparada com a sequência já definida na *Home Page* e quando as sequências foram as mesmas, estas foram classificadas com o número ST já determinado (Tourasse & Helgason, 2006). Porém, 17 cepas (13 *B. cereus* e 4 *B. thuringiensis*) apresentaram novas sequências, e geraram 17 novos STs (ST 156 a ST 170). As cepas analisadas distribuíram-se em 20 STs. Dezesete dos 20 STs definidos incluíram apenas uma única cepa, e os outros dois STs, que são os ST 33 (2 cepas) e o ST 136 (19 cepas), o mais representativo, incluíram o maior número de cepas (18 *B. thuringiensis* e 1 *B. cereus*) (Tabela 5). Interessante notar que a cepa LFB-FIOCRUZ 1606, caracterizada através das propriedades citomorfológicas, bioquímicas e moleculares como *B. cereus* e que foi isolada de leite integral em 2011, apresentou o mesmo ST 136 das amostras agrupadas no *cluster* 4, onde estão 21 cepas de *B. thuringiensis*, porém seu perfil rep-PCR foi diferente daquele apresentado pelas demais cepas incluídas nesse *cluster*. Estudos indicam que as espécies *B. thuringiensis* e *B. cereus* podem adquirir plasmídeos por troca horizontal, que consiste na transferência de genes entre bactérias não descendentes por conjugação, transdução ou transformação, ou perde-los (Cardazzo et al, 2008; Didelot et al, 2009).

Para duas estirpes de *B. cereus* isoladas de alimentos [LFB-FIOCRUZ 541 (ST 33) e 1599 (ST 33)], o rep-PCR foi mais discriminatório do que o MLST (Figura 15). Já as estirpes de *B.*

thuringiensis [LFB-FIOCRUZ 1414 (ST 157) e 1588 (ST 158)], ambas isoladas de amostras de alimentos em períodos distintos, e as cepas de *B. cereus* [LFB-FIOCRUZ 821 (ST 169) e 1687 (ST 158)] coletadas de amostras de alimentos (1993) e larvas de insetos (2008), respectivamente, pertencem a diferentes perfis alélicos e foram agrupadas pelo rep-PCR, demonstrando que o MLST foi mais discriminatório do que o rep-PCR. Para as amostras do *cluster* 1, as quatro linhagens de *B. cereus* possuem perfis rep-PCR (1a – 1d) e perfis alélicos distintos (ST 156, 167, 168 e 170), mostrando que ambas as técnicas de tipagem apresentaram o mesmo poder discriminativo e portanto podem auxiliar na filogenia do *B. cereus* l.s. (Figura 15).

Nesse estudo, o MLST demonstrou um maior poder discriminatório para as 23 cepas de *B. thuringiensis* (seis STs distintos) em comparação ao rep-PCR (quatro perfis rep-PCR definidos). Com relação às 17 estirpes de *B. cereus* isoladas de diversas origens e períodos, 16 perfis rep-PCR, bem como, 16 STs foram definidos e esses diferem um dos outros por 2 a 7 *loci*, sugerindo alta variabilidade genética entre as amostras correspondentes. Assim, o MLST pode contribuir na identificação da diversidade genômica obtida pelo rep-PCR para algumas linhagens.

A topologia da árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos 20 STs definidos demonstrou que as estirpes de *B. cereus* e *B. thuringiensis* originárias do Brasil possuem estrutura genética populacional clonal com as amostras provenientes de distintas fontes emergindo de diferentes grupos filogenéticos. Ambas as espécies compartilham distintos grupos e possuem STs relacionados (Figura 16).

Através do MLST examinamos a diversidade filogenética e o parentesco das 40 amostras de *B. thuringiensis* e *B. cereus* de diversas fontes. Ao analisar a diversidade alélica entre as amostras selecionadas o número médio de alelos por *locus* foi de 10,71; relativamente menor quando comparado com outros valores já descritos. Este valor baixo pode estar relacionado com as 18 cepas (ST 136) de *B. thuringiensis*, sendo 10 cepas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e 8 cepas de *B. thuringiensis* não sorotipados, os quais possuem perfil de proteínas totais e atividade biológica semelhante ao da linhagem de referência *B. thuringiensis* sorovar *israelenses* H:14 (ST 136).

Previamente, Helgason et al. (2004) encontraram um valor médio de 33,6 alelos por *locus* e 53 STs em 67 amostras pertencentes ao grupo *B. cereus* e Priest et al. (2004) demonstraram um valor médio de 30,5 alelos por *locus* e 59 STs em 105 amostras nesse grupo de bactérias. Em 2008,

Hoffmaster et al. determinaram um valor de 19,9 de alelos por *locus* com 38 STs em 55 cepas *B. cereus* associadas com diferentes casos clínicos. Zahner et al. (2013) obtiveram um valor médio de alelos por *locus* de 14,8 e 29 STs quando analisaram 29 linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* provenientes de diversas fontes através do MLST. Estes autores relataram que dado o fato que as cepas foram obtidas de diferentes fontes, os valores observados indicaram o aspecto clonal de evolução entre as espécies que compõem o grupo *B. cereus*.

Neste estudo das 23 estirpes de *B. thuringiensis*, 18 estirpes (10 linhagens de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, 3 cepas de *B. thuringiensis* autoaglutinantes, 5 cepas de *B. thuringiensis* não sorotipadas, as quais compartilharam na análise das proteínas totais o mesmo perfil protéico da linhagem *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82) pertenceram ao ST 136 e apresentaram perfil toxigênico e de virulência I, e foram alocadas no grupo filogenético IV (Tabela 6) (Guinebretiere et al, 2008). Estudos prévios indicaram que a estrutura populacional do *B. cereus* l.s. pode ou apresentar uma recombinação extensa (população panmítica) ou uma estrutura epidêmica contendo complexos clonais, dependendo da sub-população considerada (Ankarloo et al, 2000; Helgason et al, 2000).

Evidências de uma população clonal foram encontradas para as linhagens de *B. anthracis*, *B. cereus* eméticos e *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (Ankarloo et al, 2000; Priest et al, 2004; Erling-Schulz et al, 2005). Vários estudos prévios concluíram que o grupo *B. cereus*, em geral, expõem algum grau de clonalidade (Helgason et al, 2004; Ticknor et al, 2001; Ko et al, 2004; Priest et al, 2004; Tourasse et al, 2006). Helgason et al. (2004) e Priest et al. (2004) concluíram que o *B. cereus* l.s. tem uma estrutura populacional clonal a fracamente clonal com mudanças evolutivas ocorrendo através de mutações pontuais. Sorokin et al. (2006) analisaram uma coleção de cepas do *B. cereus* l.s. de origem ambiental (amostras de solo) e sugeriram que as estirpes de *B. cereus* e *B. thuringiensis* mostraram-se clonais. Zahner et al. (2013) aplicaram o MLST em linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* e evidenciaram que as espécies não foram monofiléticas e que nenhuma associação com relação a fonte de isolamento ou perfil genotípico pode ser identificado. Esses concluíram que o MLST foi incapaz de fornecer esclarecimentos com base na patogenicidade entre as espécies do *B. cereus* l.s.

A ocorrência de todos os genes que codificam os fatores toxigênicos e de virulência foi observada em 18% das linhagens estudadas (20 das 82 cepas de *B. thuringiensis* e 8 das 70 cepas de

B. cereus). A maioria das 82 cepas de *B. thuringiensis* analisadas estão agrupadas nos principais perfis toxigênicos e de virulência. Para ambos os perfis, a espécie *B. thuringiensis* apresentou alta prevalência dos fenótipos e genótipos analisados.

Apesar de vários estudos confirmarem a similaridade genética entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*, o nicho ecológico do *B. thuringiensis* parece ser diferente daquele do *B. cereus*. Acredita-se que os aspectos ecológicos como o nicho da bactéria no ambiente, o vínculo entre a resposta aos fatores ambientais, a origem da bactéria e a manutenção da variabilidade genética também são importantes. Santos et al. (2010) demonstraram que linhagens de *B. thuringiensis* são mais adaptadas à germinação dos esporos e multiplicação das células vegetativas em larvas de insetos, quando comparadas a linhagens de *B. cereus*. Somente as estirpes de *B. thuringiensis* mantiveram a germinação dos esporos por pelo menos 24h nas larvas de *Bombyx mori*. Uma vez ocorrida a germinação dos esporos, fatores de virulência, dentre os citados, passam a ser expressos e contribuem para a colonização do hospedeiro.

Em um estudo da genética de populações, Vilas-Bôas et al. (2002) demonstraram através do MLEE que linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* compartilham alelos, porém a taxa de fluxo gênico foi maior entre as cepas da mesma espécie do que entre as duas espécies. Os resultados sugeriram que existia uma maior oportunidade para conjugação entre linhagens da mesma espécie, pois cepas de *B. thuringiensis* e *B. cereus* não compartilham o mesmo nicho ecológico.

Fedhila et al. (2010) sugerem que a presença de fatores de virulência específicos para adaptação no intestino de insetos que existem em *B. thuringiensis* e *B. cereus* podem ter co-evoluídos entre o hospedeiro e o patógeno. Contudo, ressalta-se que a modulação da expressão destes fatores de virulência, pode sofrer influências ambientais e estão relacionados com o nicho ecológico destas bactérias. Entre as 22 cepas de *B. thuringiensis* e *B. cereus* isoladas de amostras de larvas de insetos observa-se a ocorrência expressiva desses fenótipos e genótipos distribuídos entre as espécies citadas, e é provável que a contribuição desses determinantes de virulência tenham funções biológicas distintas entre as espécies do *B. cereus* l.s.

Estudos recentes atestam a diversidade genotípica de *B. cereus* e de *B. thuringiensis* através das inúmeras técnicas baseadas em biologia molecular, bem como, a ocorrência de genes codificadores das enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases e enzimas extracelulares, refletindo na

diversidade genética presente nas espécies do grupo *B. cereus*. Acredita-se que a variabilidade genotípica favoreça a persistência desses microrganismos nos mais diferentes ambientes (Flores-Urban et al, 2014; Forghani et al, 2014; Tewari et al, 2015).

No presente estudo, a distribuição expressiva dos determinantes de virulência e toxigênicos observada entre as cepas de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e de *B. mycoides* atesta o dinamismo e o alto potencial toxigênico das linhagens isoladas de diferentes origens e períodos distintos, fatos que provavelmente contribuem para entender a epidemiologia e a biodiversidade das espécies que compõem o *B. cereus* l.s.

Estudos numéricos aliados a cálculos de coeficiente de similaridade, ilustrados em dendrogramas, são importantes ferramentas como base da classificação das espécies que compõem o grupo *B. cereus* particularmente quando associados aos métodos moleculares. Com relação aos resultados obtidos através do rep-PCR, assim como do MLST, podemos demonstrar, com respeito a diversidade genética entre as cepas de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, que as mesmas distinguem em relação a estrutura populacional, com a espécie *B. thuringiensis* apresentado um aspecto clonal, não sendo a mesma tendência evidenciada em estirpes de *B. cereus*, e tais resultados podem indicar diferenças comportamentais de como essas espécies respondem aos fatores ambientais. Embora compartilhem características genéticas, as espécies do *B. cereus* l.s. podem evoluir para formar complexos clonais, possivelmente adaptados a um hospedeiro e/ou ambientes específicos, e que eventualmente exibem fenótipos distintos. E, portanto, esses distintos aspectos populacionais devem ser considerados como evidências para a manutenção da atual classificação como duas espécies separadas.

6 CONCLUSÕES

- A maioria das estirpes produziram enzimas extracelulares, tais como, amilase e lecitinases, o que ressalta o potencial deteriorante dessas espécies. A atividade hemolítica foi amplamente difundida apresentando β -hemólise, bem como, a capacidade de motilidade entre as linhagens analisadas.
- Com relação aos fatores toxigênico e de virulência, os genes que codificam esses determinantes estão amplamente distribuídos entre as estirpes estudadas, e a expressiva prevalência de genes de virulência nessas linhagens de origens diversas reforça o potencial das mesmas causarem distúrbios gastrointestinais, bem como, infecções sistêmicas e locais.
- Para ambos os perfis, toxigênico e de virulência, a espécie *B. thuringiensis* revelou maior ocorrência dos genes em questão, demonstrando expressivo potencial toxi-infeccioso dessas amostras.
- As cepas analisadas apresentaram genótipo predominantemente mesófilo (gene *cspF*) e provavelmente agrupam-se no grupo filogenético IV, onde estão as linhagens do perfil toxigênico I. Para assinatura específica do gene *rrs*, duas cepas apresentaram simultaneamente as assinaturas mesófilas e psicrotróficas nessa região, ou seja, essas estirpes podem expressar esse genótipo de acordo com a temperatura a que são expostas.
- Observa-se que polimorfismo obtido através do rep-PCR demonstrou expressiva similaridade entre as estirpes de *B. thuringiensis*, evidenciando um elevado grau de clonalidade, sugerindo uma estrutura populacional clonal, não sendo o mesmo observado para as cepas de *B. cereus*, que apresentam perfis de fragmentos altamente polimórficos e tais padrões comportamentais devem ser considerados para a manutenção da atual classificação taxonômica como duas espécies separadas.
- A análise por MLST mostrou que as estirpes selecionadas de distintas fontes e períodos compartilham origens clonais comuns surgindo de diferentes grupos filogenéticos. Através do MLST, essas estirpes distribuíram-se em 20 STs, com 17 dos STs apresentando perfis alélicos novos (ST 156 a ST 170), sendo o ST 136, o mais representativo, o qual agrupou 19 linhagens, sendo 10 cepas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, 3 cepas de *B. thuringiensis* autoaglutinantes, 5 cepas de *B. thuringiensis* não sorotipadas e 1 cepa de *B. cereus*, as quais se encontram no perfil toxigênico e de virulência I.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, van der V. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol.* 2011;28:199-208.
- Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol.* 1999;32:1043-53.
- Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;121:31-4.
- Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;129:17-20.
- Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:1117-25.
- Aires GS, Walter EH, Junqueira VC, Roig SM, Faria JA. *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. *J Food Prot.* 2009;72:1301-5.
- Al-Abri SS, Al-Jardani AK, Al-Hosni MS, Kurup PJ, Al-Busaidi S, Beeching NJ. A hospital acquired outbreak of *Bacillus cereus* gastroenteritis, Oman. *J Infect Public Health.* 2011;4:180-6.
- Alouf JE, Billington SJ, Jost BH. Repertoire and General Features of the Family of Cholesterol-Dependent Cytolysins. In: Alouf JEPMR, editors. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins.* London, UK, Academic Press; 2005. p 643-58.
- Andreeva ZI, Nesterenko VF, Yurkov IS, Budarina ZI, Sineva EV, Solonin AS. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expr Purif.* 2006;47:186-93.
- Ankarloo J, Caugant DA, Hansen BM, Berg A, Kolsto AB, Lövgren A. Genome stability of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* isolates. *Curr Microbiol.* 2000; 40: 51-56.
- Ankolekar C, Rahmati T, Labbe RG. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int J Food Microbiol.* 2009;128:460-6.
- Aragon-Alegro LC, Palcich G, Lopes GV, Ribeiro VB, Landgraf M, Destro MT. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil. *J Food Prot.* 2008;71:2115-8.
- Araújo EA, Bernardes PC, Andrade NJ, Fernandes PE, Sá JPN. Gibbs free energy of adhesion of *Bacillus cereus* isolated from dairy plants on different food processing surfaces evaluated by the hydrophobicity. *International Journal of Food Science & Technology.* 2009;44:2519-25.
- Arslan S, Eyi A, Kucuksari R. Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. *Anaerobe.* 2014;25:42-6.
- Asano SI, Nukumizu Y, Bando H, Iizuka T, Yamamoto T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:1054-7.

- Ash C & Collins MD. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. FEMS Microbiol Lett. 1992;73:75-80.
- Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins MD. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. Int J Syst Bacteriol. 1991;41:343-6.
- Baida GE & Kuzmin NP. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. Biochim Biophys Acta. 1995;1264:151-4.
- Baida GE & Kuzmin NP. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. Biochim Biophys Acta. 1996;1284:122-4.
- Barker M, Thakker B, Priest FG. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. FEMS Microbiol Lett. 2005;245:179-84.
- Baron F, Cochet MF, Grosset N, Madec MN, Briandet R, Dessaigne S, Chevalier S, Gautier M, Jan S. Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products. J Food Prot. 2007;70:2782-91.
- Bartoszewicz M, Bideshi DK, Kraszewska A, Modzelewska E, Swiecicka I. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. J Appl Microbiol. 2009;106:1967-75.
- Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol. 2008;25:588-96.
- Bartoszewicz M, Krotten MA, Swiecicka I. Germination and proliferation of emetic *Bacillus cereus* sensu lato strains in milk. Folia Microbiol (Praha). 2013;58:529-35.
- Batchoun R, Al-Sha'er AI, Khabour OF. Molecular characterization of *Bacillus cereus* toxigenic strains isolated from different food matrices in Jordan. Foodborne Pathog Dis. 2011;8:1153-8.
- Beecher DJ & Macmillan JD. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect Immun. 1991;59:1778-84.
- Beecher DJ, Olsen TW, Somers EB, Wong AC. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. Infect Immun. 2000;68:5269-76.
- Beecher DJ & Wong AC. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. Appl Environ Microbiol. 1994;60:1646-51.
- Beecher DJ & Wong AC. Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. Microbiology 2000;146 (6):1371-80.
- Bernheimer AW & Grushoff P. Extracellular hemolysins of aerobic sporogenic *Bacilli*. J Bacteriol. 1967;93:1541-3.
- Beuchat LR, Clavero MR, Jaquette CB. Effects of nisin and temperature on survival, growth, and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. Appl Environ Microbiol. 1997;63:1953-8.

- Bhunia AK. Introduction to foodborne pathogens. In: Bhunia AK, editors. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. New York, 2008. p 1-16.
- Boonchai N, Asano SI, Bando H, Wiwat C. Study on cytotoxicity and nucleotide sequences of enterotoxin FM of *Bacillus cereus* isolated from various food sources. J Med Assoc Thai. 2008;91:1425-32.
- Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2010;23:382-98.
- Bouillaut L, Perchat S, Arold S, Zorrilla S, Slamti L, Henry C, Gohar M, Declerck N, Lereclus D. Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. Nucleic Acids Res. 2008;36:3791-801.
- Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Roberts B, Horstick O. *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* for the control of dengue vectors: systematic literature review. Trop Med Int Health. 2013;18:564-77.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica - Brasília : Editora do Ministério da Saúde. 2010;-158.
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberon M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem Mol Biol. 2011;41:423-31.
- Brumlik MJ, Szymajda U, Zakowska D, Liang X, Redkar RJ, Patra G, Del Vecchio VG. Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 2001 Jul;67(7):3021-8.
- Budarina ZI, Nikitin DV, Zenkin N, Zakharova M, Semenova E, Shlyapnikov MG, Rodikova EA, Masyukova S, Ogarkov O, Baida GE, Solonin AS, Severinov K. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of B. cereus haemolysin II. Microbiology. 2004;150:3691-701.
- Budarina ZI, Sinev MA, Mayorov SG, Tomashevski AY, Shmelev IV, Kuzmin NP. Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*. Arch Microbiol. 1994;161:252-7.
- Cadot C, Tran SL, Vignaud ML, De Buyser ML, Kolsto AB, Brisabois A, Nguyen-the C, Lereclus D, Guinebretiere MH, Ramarao N. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. J Clin Microbiol. 2010;48:1358-65.
- Callegan MC, Cochran DC, Kane ST, Gilmore MS, Gominet M, Lereclus D. Contribution of membrane-damaging toxins to *Bacillus* endophthalmitis pathogenesis. Infect Immun. 2002;70:5381-9.
- Callegan MC, Kane ST, Cochran DC, Gilmore MS, Gominet M, Lereclus D. Relationship of plcR-regulated factors to *Bacillus* endophthalmitis virulence. Infect Immun. 2003;71:3116-24.
- Candelon B, Guilloux K, Ehrlich SD, Sorokin A. Two distinct types of rRNA operons in the *Bacillus cereus* group. Microbiology. 2004;150:601-11.
- Cardazzo B, Negrisolo E, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. Appl Environ Microbiol. 2008a;74:850-60.

- Carlin F, Brillard J, Broussolle V, Clavel T, Duport C, Jobin M, Guinebretière MH, Auger S, Sorokine A, Nguyen-thé C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*. 2010;43:1885-94.
- Carlson CR, Caugant DA, Kolsto AB. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:1719-25.
- Celandroni F, Salvetti S, Senesi S, Ghelardi E. *Bacillus thuringiensis* membrane-damaging toxins acting on mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;361:95-103.
- Ceuppens S, Boon N, Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013;84:433-50.
- Ceuppens S, Rajkovic A, Heyndrickx M, Tsilia V, Van de Wiele T, Boon N, Uyttendaele M. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37:188-213.
- Charles JF & Nielsen-LeRoux C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95 Suppl 1:201-6.
- Chaves JQ, Pires ES, Vivoni AM. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *Int J Food Microbiol*. 2011;147:12-6.
- Cherif A, Brusetti L, Borin S, Rizzi A, Boudabous A, Khyami-Horani H, Daffonchio D. Genetic relationship in the 'Bacillus cereus group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J Appl Microbiol*. 2003;94:1108-19.
- Cherif A, Ettoumi B, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A. Genomic diversity and relationship of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by multi-REP-PCR fingerprinting. *Can J Microbiol*. 2007;53:343-50.
- Chon JW, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Seo KH. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiol*. 2012a;32:217-22.
- Chon JW, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Song KY, Park C, Seo KH. Prevalence, phenotypic traits and molecular characterization of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains isolated from human stools in Korea. *J Appl Microbiol*. 2012b;112:1042-9.
- Claus D & Berkeley RCW. Genus *Bacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt J, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams&Wilkins; 1986. vol 2, p 1104-41.
- Connor N, Sikorski J, Rooney AP, Kopac S, Koepfel AF, Burger A, Cole SG, Perry EB, Krizanc D, Field NC, Slaton M, Cohan FM. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:1349-58.
- Coolbaugh JC & Williams RP. Production and characterization of two hemolysins of *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol*. 1978;24:1289-95.
- Crickmore N. Beyond the spore-past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticides. *J Appl Microbiol*. 2006;101:616-9.
- Cronin UP & Wilkinson MG. *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. *Food Microbiol*. 2008;25:235-43.

- Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, Cherif A, Carmagnola L, Brusetti L, Rizzi A, Chanishvili N, Visca P, Sharp R, Borin S. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:1295-301.
- Damgaard PH. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1995;12:245-50.
- Damgaard PH, Larsen HD, Hansen BM, Bresciani J, Jorgensen K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett Appl Microbiol*. 1996;23:146-50.
- Da Silva RB & Valicente FH. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR. *Springerplus* 2013;2 (641):1-6.
- De Barjac H, Frachon, E. Classification *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 1990;35:233-40.
- De Jonghe V, Coorevits A, De BJ, Van CE, Grijspeerd K, Herman L, De VP, Heyndrickx M. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int J Food Microbiol*. 2010;136:318-25.
- Decousser JW, Ramarao N, Duport C, Dorval M, Bourgeois-Nicolaos N, Guinebretiere MH, Razafimahefa H, Doucet-Populaire F. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: Putative role of pooled breast milk. *Am J Infect Control*. 2013;41:918-21.
- Delbrassinne L, Botteldoorn N, Andjelkovic M, Dierick K, Denayer S. An emetic *Bacillus cereus* outbreak in a kindergarten: detection and quantification of critical levels of cereulide toxin. *Foodborne Pathog Dis*. 2015;12:84-7.
- Didelot X, Barker M, Falush D, Priest FG. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst Appl Microbiol*. 2009;32:81-90.
- Dierick K, Van CE, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, Hoedemaekers G, Fourie L, Heyndrickx M, Mahillon J. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4277-9.
- Dohmae S, Okubo T, Higuchi W, Takano T, Isobe H, Baranovich T, Kobayashi S, Uchiyama M, Tanabe Y, Itoh M, Yamamoto T. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. *J Hosp Infect*. 2008;69:361-7.
- Dolan SA, Littlehorn C, Glodé MP, Dowell E, Xavier K, Nyquist AC, Todd JK. Association of *Bacillus cereus* infection with contaminated alcohol prep pads. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012;33(7):666-71.
- Drewnowska JM & Swiecicka I. Eco-genetic structure of *Bacillus cereus* sensu lato populations from different environments in northeastern Poland. *PLoS One*. 2013;8:e80175.
- Drobniowski FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6:324-38.
- Dufrenne J, Bijwaard M, te GM, Beumer R, Notermans S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int J Food Microbiol*. 1995;27:175-83.
- EFSA. The European Union summary report on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*. 2013a;11:3129-250.
- Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;232:189-95.

- Ehling-Schulz M, Knutsson R, Scherer S. "*Bacillus cereus*" in Genomes of Food and Water Borne Pathogens. In: Kathariou P, Fratamico P, Liu Y, editors. 2011. p 147-64.
- Ehling-Schulz M & Messelhäuser U. *Bacillus* "next generation" diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front Microbiol.* 2013;22:32.
- Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindback T, Andersson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, Martlbauer E, Nguyen-The C, Salkinoja-Salonen M, Scherer S. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology.* 2005;151:183-97.
- Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology.* 1999;7(12):482-87.
- EPA (Environmental Protection Agency), 2011. Biopesticide Registration Tools. Disponível em <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/regtools>>. Acesso 12/07/2013.
- Fagerlund A, Brillard J, Furst R, Guinebretiere MH, Granum PE. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiol.* 2007;7:43.
- Fagerlund A, Lindback T, Storset AK, Granum PE, Hardy SP. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology.* 2008;154:693-704.
- Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy SP, Granum PE. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology.* 2004a;150:2689-97.
- Fangio MF, Roura SI, Fritz R. Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods. *J Food Sci.* 2010;75:M218-M221.
- Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serror P, Glomski IJ, Liehl P, Lereclus D, Nielsen-LeRoux C. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* 2010;103:24-9.
- Fermanian C, Lapeyre C, Fremy JM, Claisse M. Diarrhoeal toxin production at low temperature by selected strains of *Bacillus cereus*. *J Dairy Res.* 1997;64:551-9.
- Fletcher P & Logan NA. Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Lett Appl Microbiol.* 1999;28:394-400.
- Flores-Urban KA, Natividad-Bonifacio I, Vazquez-Quinones CR, Vazquez-Salinas C, Quinones-Ramirez EI. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* strains isolated from vegetables in Mexico City. *J Food Prot.* 2014;77:2144-7.
- Forghani F, Kim JB, Oh DH. Enterotoxigenic profiling of emetic toxin- and enterotoxin-producing *Bacillus cereus*, Isolated from food, environmental, and clinical samples by multiplex PCR. *J Food Sci.* 2014;79:M2288-M2293.
- Fortina MG, Pukall R, Schumann P, Mora D, Parini C, Manachini PL, Stackebrandt E. *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:447-55.
- Francis KP, Mayr R, von SF, Stewart GS, Scherer S. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3525-9.

- Franco BDGM, Landgraf M: Microbiologia de Alimentos. São Paulo, Atheneu, 2002.
- Frederiksen K, Rosenquist H, Jorgensen K, Wilcks A. Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:3435-40.
- Fricke M, Messelhauser U, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1892-8.
- García-Armesto MR & Sutherland AD. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *Journal of Dairy Research.* 1997;64:261-70.
- Gaviria Rivera AM, Granum PE, Priest FG. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;190:151-5.
- Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Beecher DJ, Gominet M, Lereclus D, Wong AC, Senesi S. Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol.* 2002;184:6424-33.
- Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Ceragioli M, Beecher DJ, Senesi S, Wong AC. Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4089-93.
- Godoy SN, Matushima ER, Chaves JQ, Cavados CFG, Rabinovitch L, Teixeira RH, Nunes AL, Melville P, Gattamorta MA, Vivoni AM. *Bacillus cereus* infection outbreak in captive psittacines. *Vet Microbiol.* 2012;161(1-2):213-7.
- Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Okstad OA, Gominet M, Kolsto AB, Lereclus D. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One.* 2008;3:e2793.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C., Pang, C.N.: The Genus *Bacillus*. Agricultural Handbook U.S. Department Agriculture, Washington, DC, 1973.
- Granum PE. *Bacillus cereus* and its toxins. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1994;23:61S-6S.
- Granum PE. *Bacillus cereus*. In: Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL, editors. Foodborne Pathogens - Microbiology and Molecular Biology. 2005. p 409-19.
- Granum PE, Brynestad S, Kramer JM. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol.* 1993;17:269-79.
- Granum PE & Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;157:223-8.
- Gray J, George RH, Durbin GM, Ewer AK, Hocking MD, Morgan ME. An outbreak of *Bacillus cereus* respiratory tract infections on a neonatal unit due to contaminated ventilator circuits. *J Hosp Infect.* 1999;41:19-22.
- Guaycurus TV, Vicente AC, de Simone SG, Rabinovitch L. Partial isolation and some properties of enterotoxin produced by *Bacillus cereus* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993;88:131-4.
- Guinebretiere MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, de SB, De Buyser ML, Lamberet G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De VP, Nguyen-the C, Sorokin A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013a;63:31-40.

- Guinebretiere MH, Broussolle V, Nguyen-the C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3053-6.
- Guinebretiere MH, Fagerlund A, Granum PE, Nguyen-the C. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;259:74-80.
- Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-the C, Heyndrickx M, De VP. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol*. 2008;10:851-65.
- Guinebretiere MH, Velge P, Couvert O, Carlin F, Debuyser ML, Nguyen-the C. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3388-91.
- Guttmann DM & Ellar DJ. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;188:7-13.
- Hansen BM & Hendriksen NB. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:185-9.
- Hansen BM, Leser TD, Hendriksen NB. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;202:209-13.
- Hardy SP, Lund T, Granum PE. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;197:47-51.
- Hariram U & Labbe R. Spore prevalence and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates from U.S. retail spices. *J Food Prot*. 2015;78:590-6.
- Helgason E, Caugant DA, Lecadet MM, Chen Y, Mahillon J, Lovgren A, Hegna I, Kvaloy K, Kolsto AB. Genetic diversity of *Bacillus cereus/B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol*. 1998;37:80-7.
- Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolsto AB. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:2627-30.
- Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, Caugant DA, Kolsto AB. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:191-201.
- Hendriksen NB & Hansen BM. Detection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 on cabbage for human consumption. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;257:106-11.
- Hendriksen NB, Hansen BM, Johansen JE. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;89:239-49.
- Hergenrother PJ & Martin SF. Determination of the kinetic parameters for phospholipase C (*Bacillus cereus*) on different phospholipid substrates using a chromogenic assay based on the quantitation of inorganic phosphate. *Anal Biochem*. 1997;251:45-9.

- Heyndrickx M, Lebbe L, Kersters K, De Vos P, Forsyth G, Logan NA. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:99-106.
- Heyndrickx M, Lebbe L, Kersters K, Hoste B, De WR, De VP, Forsyth G, Logan NA. Proposal of *Virgibacillus proomii* sp. nov. and emended description of *Virgibacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950) Heyndrickx et al. 1998. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 3:1083-90.
- Higgins DF, McLaren RS, Newbury SF. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? A review. *Gene.* 1988; 72: 3-14.
- Hill KK, Ticknor LO, Okinaka RT, Asay M, Blair H, Bliss KA, Laker M, Pardington PE, Richardson AP, Tonks M, Beecher DJ, Kemp JD, Kolsto AB, Wong AC, Keim P, Jackson PJ. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:1068-80.
- Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, Marston CK, De BK, Popovic T, Sue D, Wilkins PP, Avashia SB, Drumgoole R, Helma CH, Ticknor LO, Okinaka RT, Jackson PJ. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3352-60.
- Hoffmaster AR, Novak RT, Marston CK, Gee JE, Hesel L, Pruckler JM, Wilkins PP. Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiol.* 2008;8:191.
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, De BK, Sacchi CT, Fitzgerald C, Mayer LW, Maiden MC, Priest FG, Barker M, Jiang L, Cer RZ, Rilstone J, Peterson SN, Weyant RS, Galloway DR, Read TD, Popovic T, Fraser CM. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:8449-54.
- Hoornstra D, Andersson MA, Mikkola R, Salkino-Salonen MS. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicology In Vitro.* 2003;17:745-51.
- Horii T, Notake S, Tamai K, Yanagisawa H. *Bacillus cereus* from blood cultures: virulence genes, antimicrobial susceptibility and risk factors for blood stream infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63:202-9.
- Hsieh YM, Sheu SJ, Chen YL, Tsen HY. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *J Appl Microbiol.* 1999;87:481-90.
- Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. Eric sequences a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol.* 1991;5(4):825-34.
- Ikezawa H & Taguchi R. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Methods in Enzymology.* 1981;71:731-41.
- In 't Veld PH, Ritmeester WS, Delfgou-van Asch EH, Dufrenne JB, Wernars K, Smit E, van Leusden FM. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *Int J Food Microbiol.* 2001;64:63-70.
- Ishii S & Sadowsky MJ. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ. Microbiol.* 2009;11:733-740

- Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R, Kasatiya S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett Appl Microbiol*. 1995;21:103-5.
- Jebberger N, Dietrich R, Bock S, Didier A, Martlbauer E. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*. 2014;77:49-57.
- Jensen GB, Larsen P, Jacobsen BL, Madsen B, Smidt L, Andrup L. *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:4900-5.
- Kalpoë JS, Hogenbirk K, van Maarseveen NM, Gesink-Van der Veer BJ, Kraakman ME, Maarleveld JJ, van der Reyden TJ, Dijkshoorn L, Bernards AT. Dissemination of *Bacillus cereus* in a paediatric intensive care unit traced to insufficient disinfection of reusable ventilator air-flow sensors. *J Hosp Infect*. 2008;68:341-7.
- Kamar R, Gohar M, Jehanno I, Rejasse A, Kallassy M, Lereclus D, Sanchis V, Ramarao N. Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. *J Clin Microbiol*. 2013;51:320-3.
- Katara J, Deshmukh R, K.Singh N, Kaur S. Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis. *J Gen Appl Microbiol*. 2012;58:83-94.
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2000;182:2928-36.
- Kim B, Bang J, Kim H, Kim Y, Kim BS, Beuchat LR, Ryu JH. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. *Food Microbiol*. 2014;42:89-94.
- Kim MJ, Han JK, Park JS, Lee JS, Lee SH, Cho JI, Kim KS. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *J Microbiol Biotechnol*. 2015.
- Kim SK, Kim KP, Jang SS, Shin EM, Kim MJ, Oh S, Ryu S. Prevalence and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from dried red peppers, rice, and Sunsik in Korea. *J Food Prot*. 2009;72:578-82.
- Ko KS, Kim JW, Kim JM, Kim W, Chung SI, Kim IJ, Kook YH. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* Gene. *Infect Immun*. 2004;72:5253-61.
- Kolsto AB, Tourasse NJ, Okstad OA. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:451-76.
- Komine Y, Adachi T, Inokuchi H, Ozeki H. Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol*. 1990;212: 579-98.
- Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Bacilos Gram-Positivos Aeróxicos e Facultativos*. In: Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL, editors. *Diagnóstico Microbiológico*. Guanabara Koogan; 2008. p 759-851.
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect*. 2000;2:189-98.
- Kramer JM & Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle MP, editors. *Foodborne bacterial pathogens*. 1989. p 21-69.
- Kumar A, Kumar A, Pratush A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. *Springerplus* 2014;3(312):1-11.

- Kuppe A, Evans LM, McMillen DA, Griffith OH. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases. *J Bacteriol.* 1989;171:6077-83.
- Kuroda M, Serizawa M, Okutsni A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S. Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of *Bacillus anthracis* species and strains among *B. cereus* group species. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2821-9.
- Kuroki R, Kawakami K, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Kimura Y, Ishiguro C, Tanimura S, Tsuchiya Y, Hamaguchi I, Sakakura M, Sakabe S, Tsuji K, Inoue M, Watanabe H. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern Med.* 2009;48:791-6.
- Kyei-Poku G, Gauthier D, Pang A, van FK. Detection of *Bacillus cereus* virulence factors in commercial products of *Bacillus thuringiensis* and expression of diarrheal enterotoxins in a target insect. *Can J Microbiol.* 2007;53:1283-90.
- Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23:133-63.
- Larsen HD & Jorgensen K. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *Int J Food Microbiol.* 1999;46:173-6.
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Pruss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48 Pt 4:1373-82.
- Lee N, Sun JM, Kwon KY, Kim HJ, Koo M, Chun HS. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from Sunsik. *J Food Prot.* 2012;75:225-30.
- Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, Aguilar C, Kolper R. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. In: Tony Romeo editor. *Bacterial Biofilms*. Springer Science + Business Media; 2008. p 1-14.
- Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Salamitou S, Sanchis V. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol.* 1996;178:2749-56.
- Lindback T, Fagerlund A, Rodland MS, Granum PE. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology.* 2004;150:3959-67.
- Liu PY, Ke SC, Chen SL. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1533-5.
- Logan NA & De Vos P. Genus I. *Bacillus*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainley FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, Springer Science + Business Media; 2009. p 21-108.
- Logan NA & Turnbull PCB. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Murray PR, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 2003. p 445-7.
- Lopez AC & Alippi AM. Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. *Int J Food Microbiol.* 2007;117:175-84.
- Lopez AC, Minnaard J, Perez PF, Alippi AM. A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. *Food Microbiol.* 2015;46:195-9.

- Luna VA, King DS, Peak KK, Reeves F, Heberlein-Larson L, Veguilla W, Heller L, Duncan KE, Cannons AC, Amuso P, Cattani J. *Bacillus anthracis* virulent plasmid pX02 genes found in large plasmids of two other *Bacillus* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2367-77.
- Lund T, De Buyser ML, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol.* 2000;38:254-61.
- Lund T & Granum PE. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett.* 1996;141:151-6.
- Madegowda M, Eswaramoorthy S, Burley SK, Swaminathan S. X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins.* 2008;71:534-40.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Epidemiologia. In: Madigan MT, Martinko JM, Parker J, editors. *Microbiologia de Brock.* 2004. vol Volume Eletrônico, p -608.
- Mahler H, Pasi A, Kramer JM, Schulte P, Scoging AC, Bar W, Krahenbuhl S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N Engl J Med.* 1997;336:1142-8.
- Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:561-88.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3140-5.
- Malek F, Moussa Boudjemaa B, Aouar-Métri A, Kihal M. Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Sci & Technol.* 2013;93:73-82.
- Mantynen V & Lindstrom K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:1634-9.
- Manzano M, Giusto C, Iacumin L, Cantoni C, Comi G. Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. *Food Microbiol.* 2009;26:259-64.
- Markland SM, Farkas DF, Kniel KE, Hoover DG. Pathogenic psychrotolerant sporeformers: an emerging challenge for low-temperature storage of minimally processed foods. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10:413-9.
- Martinez-Blanch JF, Sanchez G, Garay E, Aznar R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int J Food Microbiol.* 2009;135:15-21.
- Martinez-Blanch JF, Sanchez G, Garay E, Aznar R. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011;99:697-709.
- Matta H & Pung V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, sporeforming bacteria from raw. *International Journal of Dairy Technology.* 1999;52:59-62.
- Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:4384-8.
- McIntyre L, Bernard K, Beniac D, Isaac-Renton JL, Naseby DC. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:7451-3.
- McKillip JL. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000;77:393-9.

- Mendes RA, Coelho AI, de Azeredo RM. Contamination by *Bacillus cereus* on equipment and utensil surfaces in a food and nutrition service unit. *Cien Saude Colet*. 2011;16:3933-8.
- Merzougui S, Lkhider M, Grosset N, Gautier M, Cohen N. Prevalence, PFGE typing, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11:145-9.
- Messelhauser U, Frenzel E, Blochinger C, Zucker R, Kampf P, Ehling-Schulz M. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007-2013). *Biomed Res Int*. 2014;2014:465603.
- Mikkola R, Kolari M, Andersson MA, Helin J, Salkinoja-Salonen MS. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. *Eur J Biochem*. 2000;267:4068-74.
- Mikkola R, Saris NE, Grigoriev PA, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *Eur J Biochem*. 1999;263:112-7.
- Miles G, Bayley H, Cheley S. Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: A heptameric transmembrane pore. *Protein Sci*. 2006;11:1813-24.
- Minnaard J, Delfederico L, Vasseur V, Hollmann A, Rolny I, Semorile L, Perez PF. Virulence of *Bacillus cereus*: a multivariate analysis. *Int J Food Microbiol*. 2007;116:197-206.
- Molva C, Sudagidan, M., Okuklu B. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control*. 2009;20:829-34.
- Montanhini MTM, Pinto JPAN, Bersot LS. Ocorrência de *Bacillus cereus* em Leite Comercializado nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 2012;14:155-8.
- Nakamura LK. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48 Pt 3:1031-5.
- Nakamura S& Jackson MA. Clarification of the Taxonomy of *Bacillus mycooides*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995;45:46-9.
- Naranjo M, Denayer S, Botteldoorn N, Delbrassinne L, Veys J, Waegenare J, Sirtaine N, Driesen RB, Sipido KR, Mahillon J, Dierick K. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4379-81.
- Nazina TN, Tourova, T.P., Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Bacteriol*. 2001;51:433-46.
- Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, Panbangred W. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int J Food Microbiol*. 2008;121:352-6.
- Nielsen P, Rainey FA, Outtrup H, Priest FG, Fritze D. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;117:16-65.
- Niimura Y, Koh E, Yanagida F, Suzuki KI, Komagata K, Kozaki M. *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *Int J Syst Bacteriol*. 1990;40:297-301.
- Oda M, Takahashi M, Matsuno T, Uoo K, Nagahama M, Sakurai J. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1798:1073-80.

- Oh MH, Ham JS, Cox JM. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol.* 2012;152:1-8.
- Oh SY, Budzik JM, Garufi G, Schneewind O. Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. *Mol Microbiol.* 2011;80:455-70.
- Ohsaki Y, Koyano S, Tachibana M, Shibukawa K, Kuroki M, Yoshida I, Ito Y. Undetected *Bacillus* pseudo-outbreak after renovation work in a teaching hospital. *J Infect.* 2007;54:617-22.
- Oltuzak-Walczak E & Walczak P. PCR detection of *cytK* gene in *Bacillus cereus* group strains isolated from food samples. *J Microbiol Methods.* 2013;95:295-301.
- OPAS. Guía veta: guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias; 2001.
- Paiva EP, Fai AEC, Soares DS, Stamford TLM. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. *Higiene Alimentar.* 2009;23:87-92.
- Palmer M. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon.* 2001;39:1681-9.
- Pang JC, Chen ML, Ho YC, Yang CY, Tzeng CC, Kao SS, Tsen HY. Effect of fermentation conditions on the enterotoxigenicity, cytotoxicity and pesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Taiwan. *Bioresour Technol.* 2010;101:1871-6.
- Park YB, Kim JB, Shin SW, Kim JC, Cho SH, Lee BK, Ahn J, Kim JM, Oh DH. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *J Food Prot.* 2009;72:612-7.
- Persing DH, Tenover FC: *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice.* ed Universidade de Michigan/ASM Press, 2004.
- Peruca AP, Vilas-Boas GT, Arantes OM. Genetic relationships between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:497-500.
- Pettersson B, Rippere KE, Yousten AA, Priest FG. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov, and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:631-40.
- Pirhonen TI, Andersson MA, Jääskeläinen EL, Salkinoja-Salonen MS, Honkanen-Buzalski T, Johansson TML. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiology.* 2005;22:87-91.
- Planchon S, Dargaignaratz C, Levy C, Ginies C, Broussolle V, Carlin F. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiol.* 2011;28:291-7.
- Pomerantsev AP, Kalnin KV, Osorio M, Leppla SH. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect Immun.* 2003;71:6591-606.
- Posfay-Barbe KM, Schrenzel J, Frey J, Studer R, Korff C, Belli DC, Parvex P, Rimensberger PC, Schappi MG. Food poisoning as a cause of acute liver failure. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:846-7.
- Priest FG, Barker M, Baillie LW, Holmes EC, Maiden MC. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol.* 2004;186:7959-70.
- Pruss BM, Dietrich R, Nibler B, Martlbauer E, Scherer S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:5436-42.

- Quoba LI, Parkouda C, Diawara B, Scotti C, Varnam AH. Identification of *Bacillus* spp. from Bilkalga, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization. *J Appl Microbiol*. 2008;104:122-31.
- Rabinovitch L, Araújo-Coutinho CJPC, Silva CMB, Alves RSA, Alves LFA, Cavados CF. Bioprodutos à base de *Bacillus* entomopatogênicos em programas de controle de vetores na América Latina. In: Alves SB & Lopes RB, editors. *Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios*. Piracicaba, São Paulo, 2008. p 137-70.
- Rabinovitch L, Mastro NL, Silva CM, Santos BS, Rezende MC, Vivoni AM, Alves RSA. Selective inactivation of spores maintaining larvicidal activity in *Bt* serovar *israelensis* irradiated with gamma rays. *Neotropical Biology and Conservation*. 2014;9:120-4.
- Rabinovitch L, Vicente MM, Guaycurus TV, de Freitas JP, de Mesquita RP. Evaluation of the incidence and toxicity of samples of *Bacillus cereus* in various classes of foods sold and consumed in the State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985;80:1-9.
- Radnedge L, Agron PG, Hill KK, Jackson PJ, Ticknor LO, Keim P, Andersen GL. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:2755-64.
- Rahimi E, Abdos F, Momtaz H, Baghbadorani ZT, Jalali M. *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:292571.
- Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, V, Denon Q, Verhe R, Debevere J. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46:536-41.
- Ramarao N, Belotti L, Deboscker S, Ennahar-Vuillemin M, de LJ, Lavigne T, Koebel C, Escande B, Guinebretiere MH. Two unrelated episodes of *Bacillus cereus* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2014;42:694-5.
- Ramarao N & Lereclus D. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes Infect*. 2006;8:1483-91.
- Ramarao N & Sanchis V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel)*. 2013;5:1119-39.
- Raymond B, Wyres KL, Sheppard SK, Ellis RJ, Bonsall MB. Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000905.
- Rejasse A, Gilois N, Barbosa I, Huillet E, Bevilacqua C, Tran S, Ramarao N, Stenfors Arnesen LP, Sanchis V. Temperature-dependent production of various PlcR-controlled virulence factors in *Bacillus weihenstephanensis* strain KBAB4. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:2553-61.
- Reyes-Ramirez A & Ibarra JE. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:1346-55.
- Rezende-Lago NCM, Rossi JR. OD, Vidal-Martins AMC, Amaral LA. Ocorrência de *Bacillus cereus* em Leite Integral e Capacidade Enterotoxigênica das Cepas Isoladas. *Aquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2007;59:1563-9.
- Rohlf FJ. NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.1. Setauked, NY, Exeter Publishing Ltd.; 2002.
- Rosenquist H, Smidt L, Andersen SR, Jensen GB, Wilcks A. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;250:129-36.
- Rowan NJ & Anderson JG. Diarrhoeal enterotoxin production by psychrotrophic *Bacillus cereus* present in reconstituted milk-based infant formulae (MIF). *Lett Appl Microbiol*. 1998;26:161-5.

- Roy M, Chen JC, Miller M, et al. Epidemic *Bacillus* endophthalmitis after cataract surgery: I. Acute presentation and outcome. *Ophthalmology*. 1997;104:1768-72.
- Ruiz-Arguello MB, Goni FM, Alonso A. Phospholipase C hydrolysis of phospholipids in bilayers of mixed lipid compositions. *Biochemistry*. 1998;37:11621-8.
- Samapundo S, Devlieghere F, Xhaferi R, Heyndrickx M. Incidence, diversity and characteristics of spores of psychrotolerant spore formers in various REPFEDS produced in Belgium. *Food Microbiol*. 2014;44:288-95.
- Samapundo S, Heyndrickx M, Xhaferi R, Devlieghere F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int J Food Microbiol*. 2011;150:34-41.
- Sankararaman S & Velayuthan S. *Bacillus cereus*. *Pediatr Rev*. 2013;34:196-7.
- Santos CA, Almeida FS, Guimaraes AG, Abrahao WM, Arantes OM, Vilas-Boas GT. RE-PCR variability and toxigenic profile of food poisoning, foodborne and soil-associated *Bacillus cereus* isolates from Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2011;151:277-83.
- Santos CA, Vilas-Boas GT, Lereclus D, Suzuki MT, Angelo EA, Arantes OM. Conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains is not directly correlated with growth of recipient strains. *J Invertebr Pathol*. 2010;105:171-5.
- Sasahara T, Hayashi S, Morisawa Y, Sakihama T, Yoshimura A, Hirai Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:219-26.
- Sauka DH, Basile JJ, Benintende G. Evidence of *Bacillus thuringiensis* intra-serovar diversity revealed by *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR genomic fingerprinting. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2011;21:184-90.
- Scarano C, Viridis S, Cossu F, Frongia R, De Santis EP, Cosseddu AM. The pattern of toxin genes and expression of diarrheal enterotoxins in *Bacillus thuringiensis* strains isolated from commercial bioinsecticides. *Vet Res Commun*. 2009;33:257-60.
- Schlesner H, Lawson PA, Collins MD, Weiss N, Wehmeyer U, Volker H, Thomm M. *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:425-31.
- Schnepf E, Crickmore N, Van RJ, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:775-806.
- Schwartz DC & Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel. *Cell*. 1984;37:67-75.
- Senesi S & Ghelardi E. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2010;2:1690-703.
- Seminara A, Angelini TE, Wilking JN, Vlamakis H, Ebrahim S, Kolter R, Weitz DA, Brenner MP. Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1116-21.
- Shannon JG, Ross CL, Koehler TM, Rest RF. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect Immun*. 2003;71:3183-9.
- Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46:939-46.

- Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Nakamura LK, Komagata K. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlandolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:289-98.
- Shiota M, Saitou K, Mizumoto H, Matsusaka M, Agata N, Nakayama M, Kage M, Tatsumi S, Okamoto A, Yamaguchi S, Ohta M, Hata D. Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatrics.* 2010;125:e951-e955.
- Silva SM, Rabinovitch L, Robbs PG. Quantification and behavioral characterization of *Bacillus cereus* in formulated infant foods. I generation time. *Revista de Microbiologia.* 1993;24:125-31.
- Sinev MA, Budarina Z, Gavrilenko IV, Tomashevskii AI, Kuz'min NP. Evidence of the existence of hemolysin II from *Bacillus cereus*: cloning the genetic determinant of hemolysin II. *Mol Biol (Mosk).* 1993;27:1218-29.
- Sineva E, Shadrin A, Rodikova EA, Andreeva-Kovalevskaya ZI, Protsenko AS, Mayorov SG, Galaktionova DY, Magelky E, Solonin AS. Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur. *J Bacteriol.* 2012;194:3327-35.
- Slamti L & Lereclus D. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* 2002;21:4550-9.
- Slamti L, Perchat S, Gominet M, Vilas-Boas G, Fouet A, Mock M, Sanchis V, Chaufaux J, Gohar M, Lereclus D. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol.* 2004;186:3531-8.
- Sorokin A, Candelon B, Guilloux K, Galleron N, Wackerow-Kouzova N, Ehrlich SD, Bourguet D, Sanchis V. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:1569-78.
- Soufiane B & Cote JC. *Bacillus thuringiensis* serovars *bolivia*, *vazensis* and *navarrensis* meet the description of *Bacillus weihenstephanensis*. *Curr Microbiol.* 2010;60:343-9.
- Soufiane B & Cote JC. *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2013a;341:127-37.
- Spring S, Ludwig W, Marquez MC, Ventosa A, Schleifer KH. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov., and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46:492-6.
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32:579-606.
- Stenfors AL, Granum PE, Buisson C, Bohlin J, Nielsen-LeRoux C. Using an insect model to assess correlation between temperature and virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;317:196-202.
- Stenfors LP & Granum PE. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;197:223-8.
- Stenfors LP, Mayr R, Scherer S, Granum PE. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;215:47-51.
- Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell.* 1984;37:1015-1026.

- Suribabu K, Lalitha Govardhan T, Hemalatha KPJ. Optimization of various Nitrogen sources for the production of α -Amylase using *Brevibacillus borstelensis* R1 by Submerged fermentation. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3:791-800.
- Svensson B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal*. 2004;14:17-27.
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, Lukinmaa S, Kam KM, Rolando S. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3:36-50.
- Swiecicka I. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in eukaryotic organisms: a case for symbiosis. *Biocontrol Sci Tech*. 2008;18:221-39.
- Swiecicka I & Mahillon J. Diversity of commensal *Bacillus cereus* sensu lato isolated from the common sow bug (Porcellio scaber, Isopoda). *FEMS Microbiol Ecol*. 2006;56:132-40.
- Swiecicka I, Van der Auwera GA, Mahillon J. Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microb Ecol*. 2006;52:544-51.
- Tamura K, Dudley J, Nei Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596-99.
- Tewari A, Singh SP, Singh R. Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India. *J Food Sci Technol*. 2015;52:1796-801.
- Thorsen L, Budde BB, Henrichsen L, Martinussen T, Jakobsen M. Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *Int J Food Microbiol*. 2009;134:133-9.
- Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:5118-21.
- Ticknor LO, Kolsto AB, Hill KK, Keim P, Laker MT, Tonks M, Jackson PJ. Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:4863-73.
- Tourasse NJ, Helgason E, Klevan A, Sylvestre P, Moya M, Haustant M, Okstad OA, Fouet A, Mock M, Kolsto AB. Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiol*. 2011a;28:236-44.
- Tourasse NJ, Helgason E, Okstad OA, Hegna IK, Kolsto AB. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J Appl Microbiol*. 2006;101:579-93.
- Tourasse NJ & Kolsto AB. SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*). *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D461-D468.
- Tourasse NJ, Okstad OA, Kolsto AB. HyperCAT: an extension of the SuperCAT database for global multi-scheme and multi-datatype phylogenetic analysis of the *Bacillus cereus* group population. *Database (Oxford)*. 2010:baq017.
- Tourasse NJ, Stabell FB, Kolsto AB. Diversity, mobility, and structural and functional evolution of group II introns carrying an unusual 3' extension. *BMC Res Notes*. 2011;4:564.
- Tran SL, Guillemet E, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J Bacteriol*. 2010;192:2638-42.

- Tran SL, Guillemet E, Ngo-Camus M, Clybouw C, Puhar A, Moris A, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell Microbiol.* 2011;13:92-108.
- Tran SL & Ramarao N. *Bacillus cereus* immune escape: a journey within macrophages. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;347:1-6.
- Valjevac S, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse F, Hernandez E, Cavallo JD, Pourcel C, Vergnaud G. Comparison of minisatellite polymorphisms in the *Bacillus cereus* complex: a simple assay for large-scale screening and identification of strains most closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:6613-23.
- Van Der Zwet WC, Parlevliet GA, Savelkoul PH, Stoof J, Kaiser AM, Van Furth AM, Vandenbroucke-Grauls CM. Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4131-6.
- Vasconcellos FJM & Rabinovitch L. A New Formula for an Alternative Culture Medium, without Antibiotics, for Isolation and Presumptive Quantification of *Bacillus cereus* in Food. *J Food Prot.* 1995;58:235-8.
- Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K, Hasegawa T, Ohta M. Phylogenetic analysis of *Bacillus cereus* isolates from severe systemic infections using multilocus sequence typing scheme. *Microbiol Immunol.* 2006;50:743-9.
- Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K, Hasegawa T, Ohta M. A new phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1274-7.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:6823-31.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 1994;5: 25-40.
- Vilas-Boas G, Sanchis V, Lereclus D, Lemos MV, Bourguet D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:1414-24.
- Vithanage NR, Yeager TR, Jadhav SR, Palombo EA, Datta N. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *Int J Food Microbiol.* 2014;189:26-38.
- Vivoni AM, Diep BA, Goveia Magalhães AC, Santos KR, Riley LM, Sensabaugh GF, Moreira BM. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1686-91.
- Von SF, Mayr R, Scherer S. Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ Microbiol.* 1999;1:503-15.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijers M, van der Lee, T., Homes M, Frijers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4407-14.
- Waino M, Tindall BJ, Schumann P, Ingvorsen K. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 2:821-31.
- Watanuki MM, Gallo, C.R. Detecção de *Bacillus cereus* em Leite e Avaliação da Germinação dos Esporos Após Tratamento Térmico. *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* 2008;67:202-7.

- Wisotzkey JD, Jurtshuk PJr, Fox GE, Deinhard G, Poralla K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42:263-9.
- Yang IC, Shih DY, Huang TP, Huang YP, Wang JY, Pan TM. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J Food Prot.* 2005;68:2123-30.
- Yoon JH, Weiss N, Lee KC, Lee IS, Kang KH, Park YH. *Jeotgalibacillus alimentarius* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell wall, and reclassification of *Bacillus marinus* Ruger 1983 as *Marinibacillus marinus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:2087-93.
- Zahner V, Cabral DA, Regua-Mangia AH, Rabinovitch L, Moreau G, McIntosh D. Distribution of genes encoding putative virulence factors and fragment length polymorphisms in the *vrA* gene among Brazilian isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8107-14.
- Zahner V, Silva ACTC, Moraes GP, McIntosh D, Filippis I. Extended genetic analysis of Brazilian isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 2013;108 (1):65-72.
- Zhang J, van HP, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:307-15.
- Zhang MY, Lovgren A, Low MG, Landen R. Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* - reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infect Immun.* 1993;61:4947-54.
- Zhou G, Bester K, Liao B, Yang Z, Jiang R, Hendriksen NB. Characterization of three *Bacillus cereus* strains involved in a major outbreak of food poisoning after consumption of fermented black beans (Douchi) in Yunan, China. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11:769-74.
- Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Int J Food Microbiol.* 2008;121:195-200.
- Zhou G, Zheng D, Dou L, Cai Q, Yuan Z. Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *Int J Food Microbiol.* 2010;137:143-6.

8 ANEXO