



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLELTON APARECIDO DOS SANTOS

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE FATORES DE
VIRULÊNCIA EM ISOLADOS BRASILEIROS DE *BACILLUS*
CEREUS PROVENIENTES DE ALIMENTOS E DO SOLO**

Londrina
2009

CLELTON APARECIDO DOS SANTOS

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE FATORES DE
VIRULÊNCIA EM ISOLADOS BRASILEIROS DE *BACILLUS*
CEREUS PROVENIENTES DE ALIMENTOS E DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Olivia Marcia Nagy
Arantes

Co-orientador: Profa. Dra. Gislayne Trindade
Vilas-Bôas

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237o Santos, Clelton Aparecido dos.

Ocorrência e diversidade de fatores de virulência em isolados brasileiros de *Bacillus cereus* provenientes de alimentos e do solo / Clelton Aparecido dos Santos. – Londrina, 2009.
55 f. : il.

Orientador: Olívia Márcia Nagy Arantes.

Co-orientador: Gislayne Trindade Vilas-Bôas.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Bacillus cereus* – Teses. 2. Bactérias patogênicas – Teses. 3. Intoxicação alimentar – Teses. I. Arantes, Olívia Márcia Nagy. II. Vilas-Bôas, Gislayne Trindade. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 579.852.1

CLELTON APARECIDO DOS SANTOS

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
ISOLADOS BRASILEIROS DE *BACILLUS CEREUS* PROVENIENTES
DE ALIMENTOS E DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Olivia Marcia Nagy Arantes
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena
UNESP – São Paulo – SP

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
UEL - Londrina – PR

Londrina, 19 de fevereiro de 2009

DEDICATÓRIA

Aos Meus Pais,

Neusa Zambianco dos Santos

Felisberto Aparecido dos Santos

Aos Meus Irmãos,

Érica Camila dos Santos

Kater Vinícius dos Santos

Pelo amor que nos faz uma família feliz e pelos exemplos que me permitiram ser o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Olivia Marcia N. Arantes &

Profa. Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas

“Minhas Orientadoras”

Pela preocupação que tiveram em me ensinar, além dos conhecimentos científicos, conceitos éticos. Pela paciência e por sempre me motivarem.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, pela formação profissional e pessoal.

À Universidade Estadual de Londrina, pelo acolhimento nestes últimos sete anos. À Profa. Dra. Silvia Helena Sofia e Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, membros da banca examinadora, pela valiosa contribuição, simpatia e disposição em avaliar este trabalho.

À Profa. Dra. Leda M. K. Sodré, por todos os ensinamentos e conselhos.

À Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida, por toda ajuda com as análises estatísticas e pelas valiosas sugestões dadas na qualifica o.   Profa. Dra. Tereza C. R. M. Oliveira pelas orienta es para a melhoria deste trabalho. Ao Prof. Dr. José Eduardo Garcia, por ter colaborado, nos cedendo grande parte dos materiais utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario Sergio Mantovani, por abrir as portas do seu laboratório e colaborar com as rea es de amplifica o por PCR.

Ao Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza, sempre disposto a tirar minhas d vidas e por todos os conselhos.

Ao Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Bôas, por todos os conselhos e incentivos.

Ao Ms. Yudi, pelas sugestões, dicas e amizade. Ao meu fiel amigo Daniel M. Maroneze, por ouvir meus desabafos e sempre me motivar.

Aos meus eternos amigos da gradua o: Fran, Carina, Cibele, Taci, Mari, Fábio, Bruno, Murilo pelo carinho e por todos os momentos que dividimos.

À doutoranda Marcela S. F. Tsuboy, pela alegria de sempre e por todo carinho, apoio e amizade.

A todos que passaram por nosso laboratório (Elis, Kerley, Amanda, Nayara, Rita, Patricia) e de uma forma ou outra me ajudaram, ouviram meus desabafos, riram muito também, obrigado!

Ao pessoal do LAGEA/UEL, sempre disponíveis e atenciosos quando eu precisava corar um gelzinho, e por todas as outras coisas que me ajudaram.

À galera mais animada do mestrado em Genética: Kenia, Iara, Hellen, Lu, Kel, Ju, Fran, Rafa, Vitor, Marquinhos, por compartilharmos das alegrias e sonhos durante esses anos e por alcançarmos juntos o final deste processo.

Aos meus amigos da Rep AP-71, Jeres e Erik, pela alegre convivência e por todas as presepadas que aprontamos.

Ao técnico João de Godoi, pela agradável convivência e pelos momentos de descontração nestes últimos sete anos.

À secretária Sueli, do Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, pela simpatia e prontidão em sempre nos ajudar.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A Deus, por seu eterno amor que me faz ser melhor...

SANTOS, Clelton Aparecido dos. **Ocorrência e diversidade de fatores de virulência em isolados brasileiros de *Bacillus cereus* provenientes de alimentos e do solo.** 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)–Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Linhagens de *B. cereus* são isoladas de uma variedade de ambientes, incluindo alimentos e solo, e muitas linhagens causam dois tipos de intoxicação alimentar: vômito e diarreia. Diversos fatores de virulência, incluindo atividade hemolítica, produção de enterotoxina e lecitinase e motilidade, foram pesquisados em isolados brasileiros de *B. cereus* provenientes de amostras de alimentos contaminados, alimentos e solo. Em acréscimo, foi avaliada também a ocorrência e a diversidade genética dos genes *ces*, *plcR-papR*, *nheA*, *bceT*, *gyrB*, *cytK-2* e *plcA* por RE-PCR (Restriction Endonuclease-PCR). Os fatores de virulência apresentaram distribuição variável nos três grupos de isolados e os genes *plcR-papR* apresentaram a maior diversidade genética entre os três grupos. A análise de variância molecular (AMOVA) considerando todos os locos analisados evidenciou que a porcentagem de variação genética dentro de cada grupo de isolados foi significativamente maior (92,22%), que entre os grupos (7,78%). Os resultados obtidos demonstram que o conjunto gênico de *B. cereus* é a principal característica que permite a distribuição cosmopolita desta bactéria. Por outro lado, a expressão dos genes codificantes para os fatores de virulência é um fator determinante mais do comportamento que da presença desta bactéria no ambiente.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*. Alimentos. Solo. Fatores de virulência. RE-PCR.

SANTOS, Clelton Aparecido dos. **Occurrence and diversity of virulence factors in Brazilian *Bacillus cereus* strains isolated from food and soil.** 2009. 55 f. Dissertation (Master's degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Strains of *B. cereus* are isolated from a variety of environments, including food and soil, and many strains cause two types of food poisoning: emesis and diarrhea. Brazilian *B. cereus* strains from food-poisoning, food-borne and soil samples were screened for a broad range of virulence factors, including haemolytic activity, enterotoxin and lecithinase production and motility. In addition, the occurrence and the genetic diversity of the genes *ces*, *plcR-papR*, *nheA*, *bceT*, *gyrB*, *cytK-2* and *plcA* were also evaluated. The virulence factors showed variable distribution in the three groups of strains and the *plcR-papR* genes showed the highest genetic diversity among the three groups. The analysis of molecular variance (AMOVA) considering the loci analyzed in this study showed that the percentage of genetic variation intragroup of isolates was significantly higher (92.22%), than intergroup (7.78%). The obtained results demonstrate that the gene set of *B. cereus* is the main feature that allows its cosmopolitan distribution. Furthermore, the expression of its virulence genes is a more important aspect of the behavior than the presence of the bacterium in the environment.

Keywords: *Bacillus cereus*. Food-poisoning. Food-borne. Soil. Virulence factors. RE-PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes, iniciadores e condições de amplificação empregadas neste estudo	40
Tabela 2 – Características dos isolados de <i>B. cereus</i> associados com surtos de doenças transmitidas por alimento (FP), proveniente de alimentos não associados com intoxicações alimentares (F) e isolados a partir de amostras de solo (S). As linhagens de <i>B. cereus</i> ATCC 10987 e 14579 foram utilizadas como referência	41
Tabela 3 – Percentual de ocorrência das características fenotípicas e genéticas analisadas entre os isolados de <i>B. cereus</i>	42
Tabela 4 – Locos analisados, número de alelos identificados com as enzimas de restrição empregadas nas reações de RE-PCR, diversidade genética (h) e diversidade genética média (\bar{h}) para cada loco e para cada grupo de isolados de <i>B. cereus</i> avaliados.....	42
Tabela 5 – Valores de FST, distância genética (D) e identidade genética (I) entre os três grupos de isolados de <i>B. cereus</i> analisados par a par. FP: isolados provenientes de alimentos associados a surtos de DTA; F: isolados provenientes de alimentos não associados a surtos de DTA; S: isolados provenientes de amostras de solo.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>BACILLUS CEREUS</i> E DOENÇA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS	11
1.2 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>BACILLUS CEREUS</i>	14
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>BACILLUS CEREUS</i>	15
2 OBJETIVOS	20
3 ARTIGO	21
3.1 TOXIGENIC AND GENETIC PROFILES OF <i>BACILLUS CEREUS</i> STRAINS.....	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	52
ANEXO A – Blast sequenciamento do produto de amplificação por PCR do gene <i>plcR-papR</i>	53
ANEXO B – Blast sequenciamento do produto de amplificação por PCR do gene <i>gyrB</i>	54
ANEXO C – Blast sequenciamento do produto de amplificação por PCR do gene <i>ces</i>	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 *BACILLUS CEREUS* E DOENÇA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS

B. cereus é uma bactéria Gram-positiva, esporulante, aeróbia, com crescimento facultativo em anaerobiose, mesófila, com temperatura de crescimento variando de 10 a 48°C, mas com crescimento ótimo em temperaturas entre 28 e 35°C. Linhagens desta espécie apresentam células vegetativas em forma de bastonete e motilidade pela presença de flagelos peritríquios, forma colônias irregulares, utiliza glicose como fonte de carbono (mas não manitol, arabinose ou xilose), hidrolisa amido e gelatina, apresenta atividade hemolítica, resistência à ampicilina e forte produção de lecitinase (VILAS-BÔAS et al., 2007). Inúmeras linhagens de *B. cereus* são, reconhecidamente, agentes causadores de Doença Transmitida por Alimentos (DTA).

Doença Transmitida por Alimentos é uma síndrome de natureza infecciosa ou tóxica causada pela ingestão de alimentos que contenham agentes etiológicos de origem biológica ou química em quantidades que afetem a saúde do consumidor (SVS, 2005). Surto de DTA se caracteriza por episódios nos quais duas ou mais pessoas apresentam, num determinado período de tempo, sinais e sintomas semelhantes, após ingestão de um mesmo alimento considerado contaminado por evidência clínica, epidemiológica e ou laboratorial (OMS, 2008).

Os sintomas mais comuns de DTA de origem microbiana são manifestações gastrointestinais, tais como, diarreia e vômito. Contudo, dependendo da patogenicidade do microrganismo e das condições de saúde do indivíduo afetado, a doença pode ser grave. Neste caso, a doença, aguda ou crônica, pode afetar outros órgãos, causando distúrbios no sistema nervoso central, no sistema circulatório, nos pulmões, fígado, rins, olhos entre outros órgãos (KOTIRANTA et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, nos países em desenvolvimento, ocorra anualmente mais de um bilhão de casos de diarreia, principalmente em crianças menores de cinco anos. Destes, acredita-se que mais de cinco milhões evoluam para o óbito. Entretanto, apesar da comprovada relação entre várias doenças com a ingestão de alimentos contaminados e do elevado número de internações hospitalares causadas por

doenças deste escopo, pouco se conhece sobre a real magnitude do problema, devido à precariedade das informações disponíveis, sendo muito pequeno o número de casos relatados.

As DTA de origem microbiana podem ser divididas em duas categorias: intoxicações alimentares, cuja ocorrência é devida a ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas, durante a multiplicação do microrganismo patogênico no alimento e; toxi-infecções alimentares, que ocorre por consequência da ingestão de alimentos contendo células vegetativas de bactérias patogênicas. Estes microrganismos aderem à mucosa do intestino humano colonizando-o. Em seguida, pode ocorrer invasão da mucosa e penetração dos tecidos, e produção de toxinas (KRAMER & GILBERT, 1989).

Bacillus cereus se destaca como um dos agentes etiológicos de surtos de DTA (ARNESEN et al., 2008), por ser uma bactéria capaz de causar tanto intoxicações quanto toxi-infecções alimentares. As células vegetativas de *B. cereus* têm a capacidade de se multiplicar rapidamente em contato com alimentos, o que provoca alterações na textura e/ou no odor do alimento devido à produção de inúmeras toxinas que são responsáveis pelo processo de intoxicação alimentar (GRANUM & LUND, 1997).

Esta natureza oportunista de *B. cereus* como patógeno, é relacionada com a capacidade de produzir vários fatores de virulência não específicos, incluindo fosfolipases, hemolisinas e enterotoxinas (DROBNIEWSKI, 1993). A síndrome diarréica produzida por *B. cereus*, acontece em função do consumo de alimentos contendo células vegetativas que, no intestino podem se multiplicar passando a produzir enterotoxinas, como as dos complexos HBL (hemolisina BL) e NHE (enterotoxina não hemolítica), além de outras toxinas como CytK (citotoxina-K), bc-D-ENT (enterotoxina-T), entFM (enterotoxina FM) (ARNESEN et al., 2008). Já a síndrome emética (responsável por vômito), ocorre pela ingestão de alimento contaminado com a toxina emética cereulide produzida durante a multiplicação das células vegetativas nos alimentos (KRAMER & GILBERT, 1989).

A confirmação laboratorial de uma doença de origem alimentar é realizada após a confirmação do agente etiológico no alimento e em material biológico do paciente. Tendo-se em mente o fato de a intoxicação por *B. cereus* ser causada por linhagens diferentes, o que leva a variação no tipo de enterotoxina e na quantidade de células vegetativas e esporos presentes nos alimentos, é consenso que a dose necessária para que um dado alimento seja considerado seguro para consumo humano, não deve ultrapassar 10^3 UFC de *B. cereus* por grama ou mililitro de alimento (GRANUM, 2002).

Linhagens de *B. cereus* têm sido frequentemente isoladas a partir de amostras de solo (PERUCA et al., 2008), leite, cereais, vegetais, entre outros alimentos (RAJKOVIC et al., 2006; REYES et al., 2007). No entanto, essa bactéria representa grande preocupação para a indústria de alimentos lácteos, pois seus esporos têm a capacidade de sobreviver ao tratamento térmico (KRAMER & GILBERT, 1989).

De acordo com Heyndrickx & Scheldeman (2002) a contaminação alimentar por *B. cereus* é fácil de ocorrer pelo fato dos seus esporos serem encontrados em todos os tipos de ambientes, o que torna praticamente impossível que estes não sejam detectados em alimentos crus ou frescos. Por esta razão, eventos que geram contaminação podem ocorrer após tratamento térmico insuficiente ou devido à recontaminação após o processamento. Tratamentos de calor como a pasteurização (ao menos 71,7°C durante 15 segundos) são eficientes para matar células vegetativas, mas não esporos. Como consequência, a ausência de células vegetativas de outros microrganismos no alimento, possibilita que esporos de *B. cereus*, que sobreviveram ao tratamento térmico se multipliquem com pouca ou nenhuma competição com outros microrganismos. Em acréscimo, esporos de *B. cereus* apresentam características adesivas que facilitam a sua fixação à superfície interna de equipamentos envolvidos com o processamento ou embalagem de alimentos, seguindo-se a formação de biofilmes.

Além de estarem envolvidas em casos de DTA, algumas linhagens de *B. cereus* também têm sido relacionadas a graves doenças como septicemias, endocardite, pneumonia, infecções cutâneas, infecções ortopédicas, meningite e infecções de feridas traumáticas (CALLEGAN et al., 2007). De modo geral, a patogenicidade é inicialmente relacionada com infecções em feridas que podem evoluir para infecções sistêmicas (HELGASON et al., 2000). Alguns estudos demonstram que linhagens de *B. cereus* fazem parte da microbiota fecal de indivíduos saudáveis, havendo algumas indicações que a sua presença é mais comum nos meses de verão, sendo, também, dependente dos hábitos alimentares. Entretanto, as células de *B. cereus* parecem não permanecer por longos períodos de tempo no corpo humano (MINNAARD et al., 2001).

1.2 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *BACILLUS CEREUS*

Algumas estratégias metodológicas têm sido desenvolvidas para detectar a presença de linhagens de *B. cereus* em diferentes alimentos. Muitos destes métodos baseiam-se na habilidade desta bactéria crescer na presença de polimixina B e apresentar reações positivas com lecitinase. Esses métodos convencionais requerem um teste de confirmação que pode levar até quatro dias, o que impede a liberação do diagnóstico antes disto, tornando-os demorados. Além disso, os meios seletivos utilizados propiciam o crescimento de outras bactérias, além de *B. cereus*, dificultando a sua identificação.

Existem métodos mais rápidos que vêm substituindo os convencionais, tais como os testes de detecção por ensaio imunológico ou, ainda, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os métodos imunológicos são capazes de identificar linhagens de *B. cereus* apenas pela presença de toxinas produzidas. Os métodos baseados em PCR, normalmente, têm como alvo a amplificação dos genes que codificam fatores de virulência como: hbl (enterotoxina HBL), nhe (enterotoxina não hemolítica NHE), bceT (enterotoxina T), ces (toxina emética cereulide), associados ao sequenciamento do gene do 16S RNAr para confirmação da correta identificação do microrganismo (MÄNTYNEN & LINDSTRÖM, 1998).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a produção de toxinas em isolados de *B. cereus* e identificar a presença de genes responsáveis por sua formação (MÄNTYNEN & LINDSTRÖM, 1998; HSIEH et al., 1999; PRÜß et al., 1999; GUTTMANN & ELLAR, 2000; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; EHLING-SCHULZ et al., 2006). Estes estudos são necessários, dado que nem todos os isolados desta bactéria têm os genes para codificar todas as toxinas conhecidas, e mesmo nas linhagens que possuem tais genes, a expressão dos mesmos não está sempre presente, sendo modulada por uma variedade de fatores (ROWAN et al., 2001). Deste modo, esses estudos se tornam cada vez mais importantes, visto a grande incidência de casos, de contaminação alimentar, produzidos por linhagens de *B. cereus*.

Apesar de alguns estudos identificarem a presença ou a ausência de genes codificantes para fatores de virulência entre isolados de *B. cereus*, são poucos os estudos que analisam o grau de polimorfismo na sequência de DNA desses genes.

Schraft et al. (1996), empregando a metodologia RE-PCR (Restriction Endonuclease-PCR), PCR seguida por digestão com enzima de restrição, caracterizaram

linhagens de *B. cereus* isoladas de alimentos quanto a ocorrência de diversidade genética na sequência de DNA do gene *cerAB*, que codifica a cereulicina AB, uma toxina com atividade de fosfolipase C e esfingomielinase. Neste trabalho eles, através da combinação do perfil de ácidos graxos e reações de RE-PCR, foram capazes de identificar agrupamentos específicos, nos quais isolados com características mesófilas e psicrófilas foram preferencialmente reunidos.

Jensen et al. (2005), utilizando-se da reação de RE-PCR caracterizaram linhagens do grupo *B. cereus*, quanto ao polimorfismo do gene *gyrB*, cujo produto de expressão codifica uma subunidade B da DNA girase, uma enzima que por participar do processo de replicação do DNA é essencial para a sobrevivência da célula bacteriana. Os resultados obtidos com esse estudo revelaram a ausência de poder discriminatório entre isolados de *B. cereus* e de *B. thuringiensis*, uma espécie que também compõe o grupo do *B. cereus*. Contudo, apesar da relação taxonômica, entre essas bactérias, ser confusa Vilas-Bôas et al. (2002), usando MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis) obteve a diferenciação genética entre isolados de *B. cereus* e *B. thuringiensis*.

Outros estudos de caracterização de linhagens de *B. cereus* são aqueles que se utilizam de marcadores tipo RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (NILSSON et al., 1998; SVENSSON et al., 1999) e REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic – PCR) (CHERIF et al., 2007; PERUCA et al., 2008), contudo, apesar desses marcadores serem boas ferramentas para analisar o grau de diversidade genética entre as linhagens estudadas, por si só, são incapazes de determinar o nível de polimorfismo dentro de genes específicos.

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA EM *BACILLUS CEREUS*

Os principais fatores de virulência de *B. cereus*, parecem ser aqueles envolvidos com sua capacidade de causar DTA. Enquanto a síndrome emética é causada por uma única toxina, designada cereulide (AGATA et al., 1994, 1995), até cinco enterotoxinas já foram correlacionadas com a síndrome diarréica.

A toxina emética cereulide é um duodecapeptídeo com estrutura: [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃ (AGATA et al., 1994). Essa toxina é produzida por uma peptídeo sintetase não ribossomal, codificada por um cluster de genes chamado *ces* de 2,4-kb

(EHLING-SCHULZ et al., 2005), localizado num megaplasmídeo relacionado ao plasmídeo pXO1 de *B. anthracis* (EHLING-SCHULZ et al., 2006). Esse plasmídeo foi originalmente nomeado de pBCE4810, mas também é referenciado como pCER270 (RASKO et al., 2007).

Devido ao fato da toxina emética cereulide ser resistente em condições ácidas, à proteólise e às altas temperaturas, ela não é destruída pelo suco gástrico, enzimas proteolíticas do trato intestinal ou aquecimento de alimentos, podendo conduzir a vômito poucas horas após sua ingestão (SHINAGAWA et al., 1996). O mecanismo pelo qual a toxina cereulide conduz à síndrome emética em humanos não é bem definido. Contudo, experimentos utilizando modelos animais parecem evidenciar um mecanismo mediado pela ligação da toxina a receptores específicos, presentes no duodeno. A ligação da toxina cereulide ao receptor 5-HT₃, presente no duodeno, seguida pela estimulação do nervo vago aferente causa vômito no mamífero *Suncus murinus*, um modelo animal utilizado nestes experimentos (AGATA et al., 1995).

Cinco principais enterotoxinas são correlacionadas com o desenvolvimento da síndrome diarreica, e são conhecidas como: hemolisina BL (HBL), enterotoxina não hemolítica (NHE), enterotoxina-T (bc-D-ENT), citotoxina-K (CytK) e enterotoxina FM (entFM). As mais comuns dessas enterotoxinas, HBL e NHE, são formadas por complexos protéicos codificadas por três genes localizados nos operons *hbl* e *nhe*, respectivamente (RYAN et al., 1997; GRANUM et al., 1999).

A enterotoxina HBL é formada por um complexo composto por três componentes, descrito por Beecher & Wong, (1994). Uma das proteínas do complexo é um componente de ligação de 35 kDa, designado componente B, os outros dois componentes, L1 (36 kDa) e L2 (45 kDa), são elementos líticos. Os três componentes (B, L1 e L2) são codificados pela expressão dos genes *hblA*, *hblD* e *hblC*, respectivamente. Esses genes estão organizados em um único operon (*hbl*), junto com o gene *hblB*, cuja expressão codifica uma proteína com função desconhecida, que parece não ser necessária para a atividade biológica da enterotoxina HBL (RYAN et al., 1997), a qual possui, além de atividade hemolítica, ação citotóxica e dermonecrótica (BEECHER; WONG, 1994; BEECHER et al., 1995).

A enterotoxina não hemolítica NHE, descrita por Lund & Granum (1996), é também formada por um complexo protéico constituído por três componentes, que difere do complexo HBL por sua atividade não hemolítica, apesar de um estudo recente ter demonstrado que o complexo NHE possui propriedades estruturais e funcionais semelhantes à família de hemolisinas ClyA (HlyE, SheA) que são sintetizadas durante o crescimento

anaeróbico de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* e *Salmonella* spp. (FAGERLUND et al., 2008).

O complexo NHE é composto pelos polipeptídeos NheA (41 kDa), NheB (39,8 kDa) e NheC (36,5 kDa) codificados pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente (LUND; GRANUM, 1996). A enterotoxina NHE apresenta citotoxicidade mesmo em concentrações muito baixas, sendo o máximo de atividade citotóxica observada na proporção NheA: NheB: NheC 10: 10: 1, determinada em ensaios de células Vero (LINDBÄCK et al., 2004). Os genes *nheA*, *nheB* e *nheC* já foram clonados e caracterizados e estão reunidos em um único operon (GRANUM et al., 1999; LINDBÄCK et al., 2004).

Os complexos HBL e NHE podem ser detectados por imunoenaios comerciais. O componente L2 da enterotoxina HBL é detectado por um kit de aglutinação de enterotoxina da Oxoid, designado BCET-RPLA (*B. cereus* Enterotoxin-Reversed Passive Latex Agglutination kit). Além disso, a proteína de 45 kDa do complexo NHE pode ser detectada pelo imunoensaio visual de enterotoxinas diarréicas de *Bacillus* da Tecra, BDE (*Bacillus* Diarrheal Enterotoxin Visual Immunoassay) (BEECHER; WONG, 1994).

As outras três enterotoxinas de *B. cereus* são monoméricas: bc-D-ENT codificada pelo gene *bceT* (AGATA et al., 1995; OMBUI et al., 1997), CytK produto da expressão do gene *cytK* (LUND et al., 2000), e a EntFM codificada pelo gene *entFM* (ASANO et al., 1997).

O gene *bceT*, que codifica a enterotoxina bc-D-ENT, já foi clonado e sequenciado e o produto de sua expressão é descrito como uma toxina que exibe citotoxicidade para células Vero, causa permeabilidade vascular, acumulação de fluidos no íleo de ratos e é letal para camundongos após injetada. No entanto, devido a dificuldades técnicas no processo de clonagem do gene desta toxina, alguns autores (CHOMA; GRANUM, 2002), questionam a classificação da mesma.

A citotoxina K, uma proteína de 34 kDa, foi isolada no ano 2000 (LUND et al., 2000). Essa toxina exibe habilidade de formar poros nas membranas celulares, além de atividade necrótica e hemolítica. Duas formas diferentes de CytK, designadas CytK-1 e CytK-2, foram descritas (FAGERLUND et al., 2004). Essas toxinas exibem 89% de homologia na sequência de aminoácidos, sendo que a maior diferença entre essas duas proteínas está no efeito biológico. Quando comparadas, CytK-1 apresentou maior grau de citotoxicidade contra células intestinais humanas do que CytK-2 (FAGERLUND et al., 2004).

A enterotoxina FM, codificada pelo gene *entFM*, também é uma toxina monomérica, entretanto ela é relativamente pouco conhecida, e as informações a respeito de seus efeitos mostram que ela é hemolítica e citotóxica (ASANO et al., 1997).

Outra classe de toxinas expressas pelas linhagens de *B. cereus* são as fosfolipases, responsáveis por induzir a hemólise e iniciar a infecção (VILAS-BÔAS et al., 2007). As linhagens de *B. cereus* parecem produzir três tipos específicos de fosfolipases C: fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) e esfingomielinase (SPH) (POMERANTSEV et al., 2003). PC-PLC e SPH compreendem a unidade citolítica AB e são codificadas pelos genes *plcA* e *sph*, respectivamente. O papel dessas fosfolipases é pouco compreendido no processo de intoxicação alimentar, requerendo estudos adicionais.

Os genes codificantes para os diferentes fatores de virulência produzidos por *B. cereus* estão sob o controle de um regulador pleiotrópico conhecido como PlcR (GOHAR et al., 2008), descrito inicialmente por Lereclus et al. (1996) e detalhado por Agaisse et al. (1999) (Figura 1). A atividade do gene *plcR* depende da secreção de um peptídeo sinalizador designado PapR (SLAMTI; LERECLUS, 2002). O gene *papR*, codificador do peptídeo sinal PapR, está localizado 70 pb downstream do gene *plcR*. O produto de expressão do gene *papR*, um peptídeo de 48 aminoácidos é exportado pela célula bacteriana, processado e reimportado para dentro da célula bacteriana, como um heptapeptídeo (BOUILLAUT et al., 2008), pelo sistema Opp-oligopeptídeo permease, envolvido com a importação de pequenos peptídeos para a célula (SLAMTI; LERECLUS, 2002). Dentro da célula, PapR se liga especificamente a sequências alvo do PlcR e regulam a expressão de genes envolvidos com a produção de várias enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases e proteases (GOHAR et al., 2002). Por ter influência direta sobre a expressão de mais de cem genes diferentes, o regulador pleiotrópico PlcR constitui-se no mais importante regulador da patogenicidade desta bactéria.

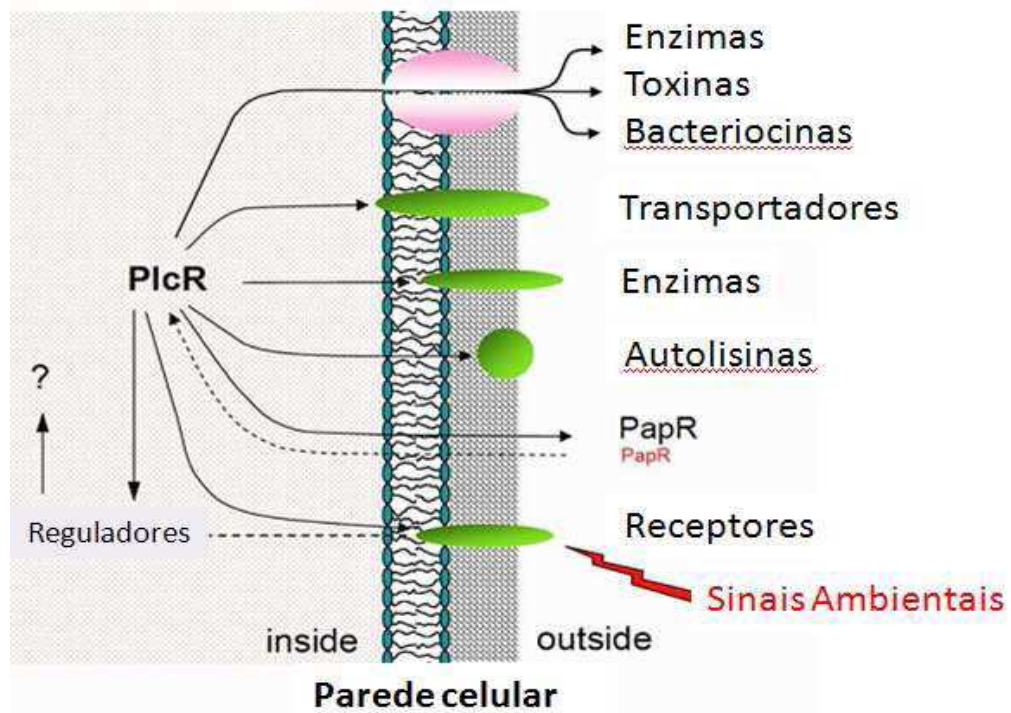


Figura 1 – Organização do Regulator Pleiotrópico PlcR. PlcR controla positivamente a transcrição de vários genes codificantes para proteínas localizadas na parede celular ou no espaço extracelular. Sinais ambientais são captados por receptores da parede celular e regulam um número indeterminado de genes ou proteínas. A ação do regulador PlcR depende do peptídeo sinal PapR (Gohar et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar isolados de *B. cereus* provenientes de três origens diferentes: (i) alimentos prontos para o consumo e comercializados por vendedores ambulantes, (ii) solo e (iii) alimentos associados a surtos de DTA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fenotipicamente os isolados de *B. cereus* quanto à motilidade, atividade hemolítica, produção de lecitinase e de enterotoxina;
- Identificar a possível ocorrência e a diversidade genética de sete genes (*ces*, *plcR-papR*, *nheA*, *bceT*, *gyrB*, *cytK-2* e *plcA*) envolvidos com a virulência de *B. cereus* nos três grupos de isolados investigados;
- Verificar a possível existência de perfis genéticos específicos para linhagens de *B. cereus* potencialmente causadoras de surtos de doenças transmitidas por alimentos.

3 ARTIGO

3.1 TOXIGENIC AND GENETIC PROFILES OF *BACILLUS CEREUS* STRAINS

Manuscrito a ser submetido à publicação no periódico International Journal of Food Microbiology

Santos, C.A¹; Guimarães, A.G²; Abrahão, W.¹; Senff, A. M.³; Arantes, OMN¹; Vilas-Bôas, G.T¹

Keywords *Bacillus cereus*; food poisoning; food borne; soil; virulence factors, RE-PCR

Running Title: Virulence factors of *Bacillus cereus*

¹ Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina/PR, Brazil. Phone: +55 (43) 3371-4527; Fax: +55 (43) 3328-4440; e-mail: gvboas@uel.br

² Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, Brazil

TOXIGENIC AND GENETIC PROFILES OF *BACILLUS CEREUS* STRAINS

Santos, C.A²; Guimarães, A.G³; Abrahão, W.⁴; Senff, A. M.³; Arantes, OMN¹; Vilas-Bôas, G.T¹

Keywords *Bacillus cereus*; food poisoning; food borne; soil; virulence factors, RE-PCR

Resumo

Linhagens de *Bacillus cereus* são isoladas de uma variedade de ambientes, inclusive alimentos e solo. Esta espécie é frequentemente associada a eventos de doença transmitida por alimento (DTA), podendo causar vômito e diarreia. Vinte três isolados brasileiros de *B. cereus* provenientes de alimentos envolvidos em surtos de síndrome diarreica, 14 isolados obtidos de alimentos não associados a intoxicação alimentar e 15 isolados provenientes de diferentes amostras de solo foram caracterizados fenotípica e molecularmente. Empregando-se RE-PCR comparou-se o grau de diversidade genética de seis locos codificantes para fatores de virulência, dentro e entre cada grupo de isolados. Apesar de amplamente distribuídas, tanto a ocorrência quanto a diversidade genética média dos genes codificantes para fatores de virulência analisados, foi maior no grupo de isolados associados a surtos de DTA ($\chi^2=0,8158$), demonstrando que linhagens de *B. cereus* potencialmente causadoras de surtos de intoxicação alimentar, não apresentam um perfil genético específico, com a presença de um gene obrigatório ou de um determinado alelo para um gene específico. Além disso, a análise de variância molecular (AMOVA) considerando todos os locos analisados evidenciou que a porcentagem de variação genética dentro de cada grupo de isolados foi maior (92,22%) que entre os grupos (7,78%) $P < 0,05$. Estes resultados demonstram que o conjunto gênico de *B. cereus* é a principal característica que permite a distribuição cosmopolita desta bactéria. Por outro lado, a expressão dos genes codificantes para os fatores de virulência é um fator determinante mais do comportamento que da presença desta bactéria no ambiente, como a habilidade da mesma provocar intoxicações alimentares.

INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é uma espécie cosmopolita, sendo considerada como saprófita de solo, mas também encontrada em alimentos de origem animal e vegetal (Arnesen et al., 2008). A presença e a multiplicação desta bactéria em alimentos podem provocar alterações na textura e/ou no odor dos mesmos ou resultar em eventos de intoxicação alimentar (Granum; Lund, 1997).

¹ Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN/PR, Curitiba/PR, Brazil

² Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina/PR, Brazil. Phone: +55 (43) 3371-4527; Fax: +55 (43) 3328-4440; e-mail: gvboas@uel.br

³ Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, Brazil

⁴ Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN/PR, Curitiba/PR, Brazil

A intoxicação alimentar causada por *B. cereus* pode provocar dois tipos de deflagrações no organismo humano: a síndrome emética e a diarréica (Vilas-Bôas et al., 2007). Um único polipeptídeo termo estável chamado de cereulide (Agata et al., 1994) é responsável pela forma emética, conduzindo a casos de vômito poucas horas após a ingestão de alimentos contaminados. A cereulide é codificada por um cluster de genes chamado *ces* de 2,4 kb (Ehling-Schulz et al., 2005).

A síndrome diarréica é causada por enterotoxinas produzidas durante a multiplicação bacteriana no intestino humano, sendo os sintomas observados de 8 a 16 horas após a ingestão de alimentos contendo células vegetativas de *B. cereus* (Granum & Lund, 1997). As enterotoxinas mais conhecidas são a hemolisina BL (HBL) (Beecher et al., 1995), enterotoxina não hemolítica (NHE) (Lindbäck et al., 2004) e a citotoxina-K (CytK) (Lund et al., 2000), a qual apresenta duas formas diferentes, designadas CytK-1 e CytK-2 (Fagerlund et al., 2004). As enterotoxinas HBL e NHE são formadas por complexos protéicos e codificadas por três genes localizados nos operons *hbl* e *nhe*, respectivamente (Ryan et al., 1997; Granum et al., 1999), enquanto que as duas formas de CytK são toxinas monoméricas codificadas pelos genes *cytK-1* e *cytK-2* (Fagerlund et al., 2004). Em acréscimo, linhagens de *B. cereus* apresentam também a produção de outros fatores de virulência, como fosfolipases, sendo a fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), codificada pelo gene *plcA* a primeira a ter sido descrita (Pomerantsev et al., 2003).

Diversos estudos têm identificado e caracterizado os principais fatores de virulência em isolados de *B. cereus* provenientes de diferentes fontes (Mäntynen & Lindström, 1998; Hsieh et al., 1999; Prüß et al., 1999; Guttman & Ellar, 2000; Hansen & Hendriksen, 2001; Ehling-Schulz et al., 2006). Entretanto, pouco tem sido feito com isolados de países tropicais, incluindo o Brasil (Aragon-Alegro et al., 2008), sendo desconhecidos dados tanto da presença destes fatores quanto da diversidade genética de seus genes.

Neste trabalho, isolados brasileiros de *B. cereus* foram avaliados quanto à expressão de quatro características fenotípicas, conhecidamente associadas com a virulência de *B. cereus*: motilidade, atividade hemolítica e produção de lecitinase e de enterotoxina. Em acréscimo, tais isolados foram avaliados também quanto à presença e diversidade genética de genes codificantes para fatores de virulência: *ces* (toxina emética cereulide), *plcR-papR* (regulador pleiotrópico PlcR e proteína PapR), *nheA* (enterotoxina NheA), *bceT* (enterotoxina bc-D-ENT), *cytK-2* (citotoxina K-2) e *plcA* (fosfolipase C específica para fosfatidilcolina), além do gene *gyrB* (subunidade B da DNA girase), considerado como controle neste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados de *B. cereus*

Foram utilizados neste trabalho 52 isolados de *B. cereus*. Vinte e três destes são provenientes de alimentos associados com surtos de intoxicação alimentar (síndrome diarréica) no Estado do Paraná, Brasil, entre os anos 2003 e 2006, os quais foram isolados e identificados pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Paraná (LACEN/PR), 14 isolados provenientes de alimentos prontos para o consumo comercializados por vendedores ambulantes na cidade de Salvador, no Estado da Bahia, não associados à intoxicação alimentar, foram isolados e identificados no Instituto de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Quinze isolados provenientes de diferentes amostras de solo do Estado do Paraná, foram isolados e identificados, através de microscopia óptica, neste trabalho. As linhagens de *B. cereus* ATCC 10987 e ATCC 14579 foram utilizadas como referência.

Caracterização fenotípica

Todos os isolados foram caracterizados fenotipicamente quanto à motilidade, atividade hemolítica, produção de lecitinase e de enterotoxina.

Os ensaios de motilidade, foram realizados em placas suplementadas com meio de cultura contendo 1% triptona, 0,5% NaCl, 0,3% agar, como descrito por Guttman & Ellar, (2000). As placas foram incubadas por 15 h a 30 °C. O isolado foi classificado como móvel quando a colônia formada foi capaz de se espalhar além do ponto de inoculação.

A atividade hemolítica de todos os isolados de *B. cereus* foi analisada em placas contendo meio de cultura Agar Nutriente (Biobras, Brasil), suplementado com sangue de ovelha a 5%, conforme descrito por Vilas-Bôas et al. (2002), e incubadas a 30 °C. A presença ou a ausência dos halos hemolíticos foi analisada após 12 e 24 h da inoculação dos isolados.

Os ensaios para detecção da produção de lecitinase foram realizados em placas contendo o meio de cultura *Bacillus cereus* agar base (HiMedia M833, Mumbai Índia), suplementado com emulsão de gema de ovo a 5%, contendo 1,8% de ágar, como descrito por Guttman & Ellar (2000). A produção de lecitinase foi determinada pela formação de zonas opacas ao redor das colônias após incubação a 30 °C por 12, 24 e 48 horas.

A avaliação da produção de enterotoxina pelos isolados *B. cereus* foi realizada utilizando o kit de detecção de toxinas BCET-RPLA (Oxoid, Inglaterra), o qual é específico para a detecção do componente L2 da enterotoxina HBL (Beecher & Wong, 1994). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

EXTRAÇÃO DE DNA E CONDIÇÕES DE PCR

Amostras de DNA genômico dos isolados de *B. cereus* foram extraídas pelo método de Hansen & Hendriksen, (2001). Os isolados foram cultivados por 15 h em placas contendo meio Luria-Bertani (LB). Com o auxílio de um palito estéril, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi transferida para microtubos contendo 200 µL de TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA, pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-maria em fervura por 10 min. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos e utilizado como amostra de DNA para as reações de amplificação por PCR.

A presença dos genes *ces*, *plcR-papR*, *nheA*, *gyrB*, *bceT*, *cytK-2* e *plcA* foi analisada por meio da técnica de PCR. Os iniciadores e as condições de amplificação utilizadas estão listados na Tabela 1. Para os genes *plcR-papR* e para o gene *gyrB* foram sintetizados iniciadores elaborados a partir das sequências destes genes das linhagens *B. cereus* ATCC 10987 ([AE017194](#)) e ATCC 14579 ([AE016877](#)), com o emprego do programa Gene Runner ver. 3.05 (www.generunner.net).

Para o genes *plcR-papR* o par de iniciadores gerados permitiu a amplificação de fragmentos com 902 pb, incluindo 68 pb da região 5' do gene *papR* e 764 pb da região 3' do gene *plcR*, além da região intergênica. Para o gene *gyrB*, o par de iniciadores gerado permitiu a amplificação de fragmentos com 644 pb amplificando a região central deste gene (a partir do nucleotídeo 334 ao 977). Produtos da amplificação por PCR de cinco isolados escolhidos ao acaso, incluindo as linhagens de *B. cereus* ATCC 10987 e ATCC 14579, foram submetidos à leitura em sequenciador do tipo “MegaBaceTM 1000 Molecular Dynamics” (Amershan, Pharmacia Biotech). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no “Banco de Dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia” (NCBI), com o auxílio da ferramenta “BLAST Search” (Altschul et al., 1990), para confirmar a especificidade dos iniciadores gerados neste estudo.

A amplificação do DNA foi realizada em Termociclador Endurance TC-412. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de reação de 25 μL , contendo: 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 2,5 μL de tampão 10 \times (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl_2 , 0,25 mM de dNTP, 0,5 μM de cada iniciador, 2 μL do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada (qsp 25 μL). As únicas exceções a este protocolo, correspondem aos genes *gyrB* e *cytK-2*, onde se utilizou 2,5 mM de MgCl_2 , e o gene *ces*, cuja reação teve volume final de 50 μL , contendo 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 5 μL de tampão 10 \times (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM de KCl), 2 mM de MgCl_2 , 0,8 mM de dNTP, 1,25 μM de cada iniciador, 2 μL do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada (qsp 50 μL).

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,4% em tampão TEB (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) usando marcador de 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Inglaterra).

RE-PCR

Os produtos obtidos pela amplificação por PCR dos genes *plcR-papR*, *nheA*, *gyrB*, *bceT*, *cytK-2* e *plcA*, foram digeridos com enzimas de restrição para verificar a existência de variabilidade genética nas sequências de DNA destes genes entre os isolados de *B. cereus* analisados. Foram utilizadas até quatro enzimas diferentes para a restrição do amplicon de cada gene (Tabela 4). A escolha das enzimas e a determinação dos tamanhos dos fragmentos esperados após a restrição do material amplificado foi realizada através da análise da sequência de DNA de cada gene para as linhagens padrão de *B. cereus* empregadas neste estudo, utilizando o programa Gene Runner ver. 3.05 (www.generunner.net).

As reações de restrição foram realizadas utilizando-se de uma alíquota de 15 μL de DNA amplificado, a qual foi digerida por 4 h com 1U da enzima selecionada, segundo as condições sugeridas pelos fabricantes das enzimas. Após a restrição foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,4–2,0%, dependendo do tamanho dos fragmentos esperados para o material amplificado, utilizando marcador de 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Inglaterra).

Isolados que apresentaram diferentes perfis de bandas geradas pelas reações de restrição de cada gene foram classificados como apresentando diferentes variantes alélicas e identificados através da construção de uma matriz binária única, na qual a presença de uma

determinada banda de DNA foi representada pelo algarismo 1 e a ausência da mesma representada pelo algarismo 0.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A matriz binária única gerada com os dados provenientes das reações de restrição dos amplicons dos seis genes avaliados foi utilizada para a realização dos diferentes testes estatísticos. A ocorrência de diferenças significativas das frequências das características genéticas e fenotípicas avaliadas entre os três grupos de isolados de *B. cereus* foi analisada através do teste de Qui-quadrado. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

A diversidade genética entre os isolados, para cada loco, foi calculada pela fórmula $h = 1 - \sum xi^2 [n / (n-1)]$, onde xi é a frequência do alelo i no loco analisado e n é o número de isolados. A diversidade genética média (\bar{H}) para cada loco e para cada grupo de isolado, foi calculada pela média aritmética dos valores de h de cada loco nos três grupos e pela média dos valores de h de todos os locos em cada grupo, respectivamente, como descrito por Vilas-Bôas et al. (2002).

A variabilidade genética dentro e entre os grupos de isolados associados com surtos de DTA, provenientes de amostras de alimentos não associados a surtos de DTA e de amostras de solo, foi determinada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o programa Arlequin ver. 3.0 (Excoffier et al., 2005). Com o auxílio deste mesmo programa, calculou-se também a diferenciação genética (FST) entre os pares de populações. Em acréscimo, utilizando o programa TFPGA ver. 1.3 (Miller, 1997), foi calculada a distância genética e a identidade genética, com base na ocorrência dos diferentes alelos, entre as populações segundo Nei (1978).

RESULTADOS

Caracterização Fenotípica

Isolados de *B. cereus* provenientes de amostras de alimentos associados a surtos de DTA, de alimentos não associados a surtos de DTA e de solo foram caracterizados fenotipicamente quanto à motilidade, atividade hemolítica e produção de lecitinase e enterotoxina. As Tabelas 2 e 3, resumizam os resultados desta caracterização fenotípica. As

linhagens de *B. cereus* ATCC 10987 e ATCC 14579 foram utilizadas como controle nestes ensaios, sendo positivas para todas as características fenotípicas avaliadas.

A maior proporção de isolados positivos para quase todas as características avaliadas, foi encontrada no grupo composto por isolados de *B. cereus* associados a surtos de DTA. Neste grupo, composto por 23 isolados, todos apresentaram motilidade, apenas um isolado não apresentou atividade hemolítica, outro não apresentou produção de lecitinase e dois foram negativos para a detecção da produção de enterotoxina (Tabelas 2 e 3) nas condições testadas.

Entre os isolados de *B. cereus* provenientes de alimentos não associados à surtos de DTA, foram constatados resultados positivos para as características motilidade, atividade hemolítica e produção de lecitinase em 12 (85,7%) dos 14 isolados. Já quanto à produção de enterotoxina, esse grupo apresentou a menor proporção de isolados positivos nestes ensaios (21,4%), sendo detectado em apenas três dos 14 isolados. Entre os 15 isolados obtidos a partir de amostras de solo a produção de lecitinase foi a característica encontrada no menor número de isolados (60%), presente em apenas nove isolados, enquanto que a produção de enterotoxina foi encontrada em 100% dos isolados (Tabelas 2 e 3).

Os resultados de Qui-quadrado, das frequências de ocorrência das características fenotípicas avaliadas nos três grupos demonstram que não houve diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos para a motilidade e a atividade hemolítica. No entanto, para a produção de lecitinase (χ^2 ; 0,05 = 8,19) e de enterotoxina (χ^2 ; 0,05 = 29,69), foram observadas diferenças significativas entre os três grupos de isolados avaliados. A produção de lecitinase foi detectada em menor percentual entre os isolados provenientes do solo, enquanto que a produção de enterotoxinas foi detectada em menor percentual entre os isolados obtidos de alimentos não associados a surtos de DTA.

DETECÇÃO DOS GENES CODIFICANTES PARA FATORES DE VIRULÊNCIA

A ocorrência dos genes *ces* (toxina emética cereulide), *plcR-papR* (regulador pleiotrópico PlcR e proteína PapR), *nheA* (enterotoxina NheA), *bceT* (enterotoxina bc-D-ENT), *gyrB* (subunidade B da DNA girase), *cytK-2* (citotoxina K-2) e *plcA* (fosfolipase C específica para fosfatidilcolina) foi avaliada por PCR, entre os isolados de *B. cereus* analisados neste estudo. As Figuras 1 e 2 apresentam os produtos de amplificação positiva obtidos através da PCR para os sete pares de iniciadores empregados.

Os resultados do sequenciamento dos produtos de amplificação utilizando os iniciadores para os genes *plcR-papR* e *gyrB*, desenvolvidos neste trabalho, mostraram alta identidade com a sequência desses genes de outras linhagens de *B. cereus* depositadas no GenBank (Anexo 1 e 2). As sequências obtidas estão em preparação para serem depositadas no NCBI.

Os genes *plcR-papR*, *nheA*, *gyrB* e *plcA* foram encontrados em 100% dos isolados dos três grupos avaliados. A ocorrência do gene *bceT* variou entre 57,1% e 73,9% nos três grupos. Da mesma forma, a ocorrência do gene *cytK-2* variou de 42,9% a 78,3% (Tabelas 2 e 3). Em ambos os casos os maiores percentuais de ocorrência, foram apresentados pelo grupo de isolados provenientes de alimentos envolvidos em surtos de DTA. Com exceção do gene *ces*, todos esses genes foram identificados nos três grupos de isolados avaliados. As linhagens de *B. cereus* ATCC 10987 e ATCC 14579, foram utilizadas como referência também nas reações de PCR, apresentando resultados positivos para todos os genes analisados com exceção do gene *ces* e da linhagem ATCC 10987 que não apresenta o gene *bceT* (Ivanova et al., 2003; Rasko et al., 2004).

O gene *ces* foi detectado em apenas dois isolados de *B. cereus* (14,3%) provenientes de amostras de alimentos não associados a surtos de DTA (Tabela 2 e 3). Pelo fato de não ter sido empregado controle positivo nestas reações, os produtos de amplificação obtidos para este gene (Figura 2) foram submetidos ao sequenciamento, para verificar a especificidade da reação de PCR. Os resultados mostraram que os amplicons obtidos para os dois isolados positivos, apresentaram 94 e 96% de identidade com o gene condificante para a toxina cereulide sintetase B, presente no plasmídio pCER270 da linhagens de *B. cereus* AH 187 (Rasko et al., 2007) (Anexo 3).

ANÁLISE DE RE-PCR

A diversidade genética nos amplicons dos genes *plcR-papR*, *nheA*, *bceT*, *gyrB*, *cytK-2* e *plcA* foi investigada por meio de amplificação por PCR, seguida de digestão com endonucleases de restrição (RE-PCR). Pelo fato do gene *ces* ter sido encontrado em baixa frequência entre os isolados de *B. cereus* analisados, não foi empregado nas análises de diversidade genética por RE-PCR.

Após a confecção de uma matriz binária única contendo os resultados obtidos com todos os genes, foram identificados os diferentes alelos entre os isolados analisados. A tabela 4 apresenta o número de alelos identificados em cada grupo, a diversidade genética (h) e a diversidade genética média (\bar{h}) para cada loco e entre os grupos

de isolados de *B. cereus* analisados. O loco que apresentou o maior valor de diversidade genética média foi o *plcR-papR* ($\overline{H_i} = 0,9026$) e o com o menor valor foi o *nheA* ($\overline{H_i} = 0,4346$). Quanto aos grupos de isolados, considerando todos os locos avaliados, o grupo de isolados associados a surtos de DTA foi o que apresentou o maior valor ($\overline{H_i} = 0,8158$), enquanto que os outros dois grupos apresentaram valores semelhantes ($\overline{H_i} = 0,5767$ e $0,5948$).

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA), para os grupos de isolados de *B. cereus* demonstraram que a maior proporção de variação genética deu-se dentro dos grupos de isolados (92,22%), enquanto que o valor entre os grupos foi de 7,78%. Igualmente, quando os grupos foram analisados par a par, a maior proporção de variação genética foi encontrada dentro dos grupos (dados não mostrados). O valor de F_{ST} para todos os grupos avaliados foi de 0,0778.

Os resultados de F_{ST} par a par, ou seja, confrontando os grupos dois a dois, são mostrados na Tabela 5. A comparação entre o grupo de isolados provenientes de amostras de alimentos não associados a surtos de DTA e o de isolados obtidos de amostras do solo revelou $F_{ST} (F \times S) = 0,13035$, já entre os isolados provenientes de amostras de alimentos associados a surtos de DTA e os isolados provenientes de alimentos não associados a surtos de DTA $F_{ST} (FP \times F)$ foi 0,09844. Por outro lado, a comparação entre os grupos de isolados provenientes de alimentos associados a surtos de DTA e provenientes de amostras de solo o valor de $F_{ST} (FP \times S)$ foi 0,02470.

A identidade e a distância genética (Tabela 5) são medidas baseadas na quantidade de alelos em comum ou diferentes, respectivamente, entre os grupos avaliados.

Quanto maior o compartilhamento de alelos entre os isolados de dois grupos, maior a identidade genética entre os mesmos. A comparação entre o grupo de isolados de *B. cereus* associados a surtos de DTA e o grupo de isolados provenientes de amostras do solo ($FP \times S$), apresentou o menor valor de distância genética (0,1104) e, conseqüentemente, o maior valor de identidade genética (0,8955). A comparação entre o grupo de isolados associados a surtos de DTA e provenientes de alimentos não envolvidos em surtos de DTA ($FP \times F$) apresentou, respectivamente, os valores de 0,2275 e 0,7965 de distância e identidade genética. E por último, comparando-se os isolados provenientes de alimentos não associados a surtos de DTA e os obtidos de amostras de solo ($F \times S$), foi observado o maior valor de distância genética (0,3149) e menor valor de identidade genética (0,7299).

DISCUSSÃO

A Distribuição dos Fatores de Virulência em *B. cereus* Independe da Origem dos Isolados

Neste estudo foram avaliadas quatro características fenotípicas, capacidade de motilidade, atividade hemolítica e produção de lecitinase e enterotoxina, além da presença e diversidade genética de seis genes codificantes para fatores de virulência: *plcR*-*papR*, *ces*, *nheA*, *bceT*, *cytK-2* e *plcA*. Estes genes estão diretamente envolvidos com a expressão dos diferentes fenótipos avaliados. O gene *plcR* codifica a proteína PlcR, a qual é um regulador pleiotrópico de mais de uma centena de genes envolvidos com a virulência e a patogenicidade de linhagens de *B. cereus* (Gohar et al., 2008). Este gene tem a expressão modulada pela proteína PapR, codificada por um gene localizado 70 pb downstream ao gene *plcR*, o gene *papR*. Estes genes regulam a expressão dos genes envolvidos com as quatro características fenotípicas avaliadas neste trabalho. Os genes *nheA*, *bceT* e *cytK-2* codificam para a formação de diferentes enterotoxinas, o gene *ces* codifica para a formação de uma toxina emética (característica não avaliada fenotipicamente), enquanto que o gene *plcA* codifica para a formação de uma fosfolipase C, estando envolvido na produção de lecitinases e na atividade hemolítica de muitas linhagens.

Entre as quatro características fenotípicas avaliadas neste estudo, ou seja, capacidade de motilidade, atividade hemolítica e produção de lecitinase e enterotoxina, as duas primeiras estiveram presentes em proporções semelhantes nos três grupos, enquanto que a produção de lecitinase e de enterotoxina apresentou proporção de isolados significativamente menor nos grupos de isolados provenientes de amostras de solo e de alimentos não envolvidos em surtos de DTA, respectivamente. Analisando os resultados de outros autores (Guttman & Ellar, 2000, Guinebretière et al., 2002), pode-se notar que estas características estão presentes na grande maioria dos isolados desta bactéria, porém o percentual de ocorrência delas, entre os isolados de *B. cereus*, pode variar em consequência da metodologia empregada.

A produção de lecitinase, por exemplo, é determinada, entre outros, pelo gene *plcA*, (Granum & Lund, 1997), o qual foi encontrado em todos os isolados investigados neste trabalho. Em oposição a este resultado, a produção de lecitinase, foi observada em frequências mais baixas (Tabelas 2 e 3). Guttman & Ellar (2000) sugerem que componentes presentes nos meios de cultura podem modular a expressão deste gene, sendo este fato também relatado para a detecção de enterotoxina de *B. cereus* (Mäntynen & Lindström, 1998;

Pirttijarvi et al., 1999), cuja ocorrência variou entre os três grupos de isolados analisados neste estudo.

Neste trabalho foi avaliada a presença de seis genes codificantes para fatores de virulência, bem como do gene *gyrB*, o qual codifica a subunidade B da DNA girase. A utilização deste gene neste estudo serviu como controle positivo da qualidade das amostras de DNA empregadas. O amplicon do gene *gyrB* foi observado em 100% dos isolados avaliados.

Entre os seis genes codificantes para fatores de virulência pesquisados, três foram encontrados em todos os isolados: *plcR-papR*, *nheA* e *plcA*, enquanto os outros apresentaram ocorrência variável, dependendo do grupo de isolados avaliado. Diversos trabalhos investigaram a presença destes genes em diferentes grupos de isolados de *B. cereus*, encontrando frequências variáveis, mas sempre altas, independentemente da origem de isolamento (Hansen & Hendriksen, 2001; Guinebretière et al., 2002, 2006). A importância dos genes *plcR* e *papR* na expressão de mais de uma centena de genes codificantes para fatores de virulência explica a detecção destes genes em todos os isolados investigados neste estudo. Além disso, o par de iniciadores direcionados para a amplificação de parte de tais genes, aqui desenvolvido, permite acessar a variabilidade genética de ambos os genes numa única reação, contrastando com iniciadores presentes na literatura, os quais, na sua maioria, amplificam somente um dos genes (Slamti & Lereclus, 2002; Easterday et al., 2005, Ross & Koehler, 2006).

O gene que codifica a toxina emética cereulide (*ces*), ao contrário dos três genes anteriormente citados, foi detectado em baixa frequência, em apenas dois isolados do grupo proveniente de alimentos não associados a surtos de DTA. A detecção deste gene, bem como da toxina cereulide, é rara (Altayar & Sutherland, et al., 2006, Aragon-Alegro et al., 2008). Estudos fenotípicos e moleculares têm demonstrado que linhagens de *B. cereus* produtoras de cereulide podem ter emergido recentemente, dentro da população de *Bacillus* (Ehling-Schulz et al., 2005; Vassileva et al., 2007), justificando a baixa frequência deste gene dentro da espécie. Este é o primeiro trabalho, no qual o gene que codifica a toxina emética cereulide foi detectado em isolados brasileiros de *B. cereus* provenientes de amostras de alimentos.

Nosso trabalho é o primeiro que investiga a ocorrência e diversidade de genes codificantes para fatores de virulência em isolados de *B. cereus* provenientes de amostras de alimentos associados a surtos de DTA, de alimentos não envolvidos com DTA e de amostras de solo coletadas no Brasil. Os resultados obtidos vão ao encontro aos resultados obtidos por outros autores utilizando grupos de isolados provenientes de amostras coletadas

em outros países (Guttman & Ellar, 2000; Hansen & Hendriksen, 2001; Guinebretière et al., 2002). Como bem enfatizado por Aragon-Alegro et al. (2008), a presença dos genes codificantes para estas toxinas (HBL, NHE, CytK, enterotoxina bc-D-ENT, fosfolipase C específica para fosfatidilcolina) não indica que as toxinas serão necessariamente produzidas, mas evidencia o potencial destas linhagens para causar doença.

Isolados de *B. cereus* Apresentam Grande Diversidade Genética nos Genes Codificantes para Fatores de Virulência

Diversos estudos analisando isolados de *B. cereus* provenientes de diferentes ambientes demonstraram que esta bactéria apresenta alta variabilidade genética (Barker et al., 2005; Cherif et al., 2007), mesmo em análise de isolados simpátricos (Vilas-Bôas et al., 2002; Peruca et al., 2008).

Neste trabalho os resultados da análise de variância molecular (AMOVA), demonstraram maior proporção de variação genética dentro dos grupos de isolados (92,22%), do que entre os diferentes grupos avaliados. Desta forma, os isolados de *B. cereus* de cada um dos três grupos apresentam diversas variantes alélicas para cada loco e muitas dessas variantes estão presentes nos isolados dos três grupos avaliados.

Wright (1978), sugeriu que o índice de fixação alélica (FST), pode ser interpretado qualitativamente em termos de diferenciação genética como segue: valores de 0 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética entre as populações analisadas; valores de 0,05 a 0,15 moderada diferenciação genética; de 0,15 a 0,25 alta; e acima de 0,25 diferenciação muito alta. Os resultados de FST par a par para os três grupos demonstraram baixa ou moderada diferenciação genética entre os mesmos. Em acréscimo, os dados de identidade genética entre os três grupos variaram de 0,7299 a 0,8955, demonstrando a grande semelhança entre os grupos trabalhados e confirmando os resultados apresentados pelo índice de fixação alélica.

Em um estudo publicado no ano (2007) Van der Auwera et al., demonstraram que uma linhagem emética de *B. cereus*, isolada de um caso fatal de intoxicação alimentar (Deirick et al., 2005) foi apta tanto a transferir genes, como a responder como receptora, em produtos lácteos, numa frequência cem vezes maior que em meio LB. Assim, a transferência horizontal de genes provavelmente tem papel importante na disseminação dos fatores de virulência em *B. cereus*.

CONCLUSÃO

Os três grupos de isolados de *B. cereus* analisados, ou seja, isolados provenientes de alimentos associados a surtos de DTA, de alimentos não associados à intoxicação alimentar e obtidos a partir de amostras de solo, apresentaram alta identidade genética, bem como os valores de FST demonstraram baixa ou moderada diferenciação genética entre os grupos. Estes resultados apontam para o fato de que o conjunto gênico de *B. cereus* é o principal fator determinante da presença desta bactéria nos diferentes ambientes, enquanto que a expressão dos genes codificantes para os fatores de virulência (os quais não são essenciais ao metabolismo bacteriano, mas trazem habilidades adaptativas para as linhagens que os possuem), é um fator determinante mais do comportamento que da presença desta bactéria no ambiente, como a habilidade da mesma provocar intoxicações alimentares.

Neste trabalho as maiores frequências de ocorrência e diversidade genética dos genes, foram encontradas no grupo de isolados associados a surtos de DTA. Desta forma, pode-se concluir que linhagens de *B. cereus* potencialmente causadoras de surtos de intoxicação alimentar, não apresentam um perfil genético específico, com a presença de um gene obrigatório ou de um determinado alelo para um gene específico. Ao contrário, diferentes combinações genéticas de genes codificantes para fatores de virulência podem estar presentes em linhagens causadoras de eventos de intoxicação alimentar. Assim, tais eventos são resultantes de um conjunto de fatores, incluindo as condições ambientais e a habilidade da linhagem bacteriana em colonizar o ambiente, que pode depender de outros genes ainda não identificados para a função.

Para se trazer mais luz a esta questão, além de determinar a distribuição e diversidade dos genes codificantes para fatores de virulência entre os isolados de *B. cereus*, são necessários estudos adicionais, visando avaliar e quantificar a expressão destes genes, in vivo e em diferentes condições ambientais. Os resultados irão contribuir para o entendimento tanto das condições que estimulam a expressão destes genes quanto das interações entre os mesmos.

REFERÊNCIAS

- 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.*, 121: 31–34, 1994.
- Altayar, M.; Sutherland, A. D. *Bacillus cereus* is common in environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 7–14, 2006.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403–410, 1990.
- Aragon-Alegro, L. C.; Palcich, G.; Lopes, G. V.; Ribeiro, V. B.; Landgraf, M.; Destro, M. T. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. *J. Food Prot.*, 71: 2115–2118, 2008.
- Arnesen, L. P. S.; Fagerlund, A.; Granum, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 579–606, 2008.
- Barker, M.; Thakker, B.; Priest, F. G. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 245: 179–184, 2005.
- Beecher, D.J., Schoeni, J.L., and Wong, A.C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, 63: 4423–4428, 1995.
- Beecher, D. J.; Wong, A. C. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, 62: 980–986, 1994.
- 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.*, 53: 343–350, 2007.
- Damgaard, P. H.; Larsen, H. D.; Hansen, B. W.; Bresciani, J.; Jorgensen, K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 146–150, 1996.
- Damgaard, P. H. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 12: 245–250, 1995.

- Dierick, K.; Van Coillie, E.; 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.*, 43: 4277–4279, 2005.
- Easterday, W. R.; Van Ert, M. N.; Simonson, T. S.; Wagner, D. M.; Kenefic, L. J.; Allender, C. J.; Keim, P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 1995–1997, 2005.
- Ehling-Schulz, M.; Guinebretière, M. H.; Monthán, A.; Berge, O.; Fricker, M.; Svensson, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 260: 232–240, 2006.
- Ehling-Schulz, M.; Svensson, B.; Guinebretiere, M. H.; Lindback, T.; Andersson, M.; Schulz, A.; Fricker, M.; Christiansson, A.; Granum, P. E.; 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. *Microbiol.*, 151: 183–197, 2005.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online.*, 1: 45–50. 2005.
- Fagerlund, A.; Ween, O.; Lund, T.; Hardy, S. P.; Granum, P. E. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 150: 2689–2697, 2004.
- Gohar, M.; Faegri, K.; Perchat, S.; Ravnum, S.; Økstad, O. A.; Gominetl, M.; Kolstø, A-B.; Lereclus, D. The *PlcR* Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 3(7):e2793, 2008.
- Granum, P. E.; O’Sullivan, K.; & Lund, T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177: 225–229, 1999.
- Granum, P. E.; Lund, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 157: 223–228, 1997.
- Guinebretière, M. H.; Fagerlund, A.; Granum, P. E.; 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.*, 259: 74–80, 2006.

- Guinebretière, M. H.; Broussolle, V.; Nguyen-The, C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3053–3056, 2002.
- Guttmann, D. M.; Ellar, D. J. Phenotypic and genotypic comparison of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *Bacillus thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, 188: 7–13, 2000.
- Hansen, B. M.; Hendriksen, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 185–189, 2001.
- Hsieh, Y. M.; Sheu, S. J.; Chen, Y.L.; Tsen, H. Y. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and foodborne outbreaks. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 481–490, 1999.
- Ivanova, N.; Sorokin, A.; Anderson, I.; et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423: 87–91, 2003.
- Lindbäck, T.; Fagerlund, A.; Rodland, M. S.; Granum, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150: 3959–3967, 2004.
- Lund, T.; De Buyser, M.-L.; Granum, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.*, 38: 254–261, 2000.
- Mäntynen, V.; Lindström, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1634–1639, 1998.
- Miller, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computed software distributes by author, 1997.
- Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, 89: 583–590, 1978.
- Peruca, A-P.; Vilas-Boas, G. T.; Arantes, O. M. N. Genetic relationships between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103: 497–500, 2008.
- Pirttijarvi, T. S. M.; Andersson, M. A. A.; Scoging, C.; Salkinoja-Salonen, M. S. Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22: 133–144, 1999.

- Pomerantsev, A. P.; Kalnin, K. V.; Osorio, M.; Leppla, S. H. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect. Immun.*, 71: 6591–6606, 2003.
- Prüß, B. M.; Dietrich, R.; Nibler, B.; Märtlbauer, E.; Scherer, S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5436–5442, 1999.
- Rasko, D. A.; Rosovitz, M. J.; Økstad, O. A.; Fouts, D. E.; Jiang, L.; Cer, R. Z.; Kolstø, A. B.; Gill, S. R.; Ravel, J. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol.*, 189: 52–64, 2007.
- Rasko, D. A.; Ravel, J.; Økstad, O. A.; et al. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res.*, 32: 977–988, 2004.
- Rivera, A. M. G.; Granum, P. E.; Priest, F. G. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 190: 151–155, 2000.
- Ross, C. L.; Koehler, T. M. plcR papR-Independent Expression of Anthrolysin O by *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, 188: 7823–7829, 2006.
- Ryan, P. A.; MacMillan, J. D.; Zilinskas, B. A. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 179: 2551–2556, 1997.
- Santos, C. A.; et al. Em elaboração.
- Slamti, L.; Lereclus, D. A cell–cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.*, 21: 4550–4559, 2002.
- Suzuki, M.; Lereclus, D.; Arantes, O. M. N. Fate of *Bacillus thuringiensis* in different insect larvae. *Can. J. Microbiol.*, 50: 973–975, 2004.
- Thomas, D. J. I.; Morgan, J. A. W.; Whipps, J. M.; Saunders, J. R. Transfer of plasmid pBC16 between *Bacillus thuringiensis* strains in non-susceptible larval. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 40: 181–190, 2002.

- Van der Auwera, G.A.; Timmery, S.; Hoton, F.; Mahillon, J. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.*, 113: 164–72, 2007.
- 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.*, 45: 1274–1277, 2007.
- Vilas-Bôas, G. T.; Peruca, A. P. S.; Arantes, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.*, 53: 673–687, 2007.
- Vilas-Bôas, G.; Sanchis, V.; Lereclus, D.; Lemos, M. V. F.; Bourguet, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1414–1424, 2002.
- Zhou, G.; Yan, J.; Dasheng Z.; Zhou, X.; Yuan, Z. The residual occurrences of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in food and beverages. *Int. J. Food Microbiol.*, 127: 68–72, 2008.
- Wright, S. *Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL, 1978.
- Yuan, Y. M.; Hu, X. M.; Liu, H. Z.; Hansen, B. M.; Yan, J. P.; Yuan, Z. M. Kinetics of plasmid transfer among *Bacillus cereus* group strains within lepidopteran larvae. *Arch. Microbiol.*, 187: 425–431, 2007.

Tabela 1 – Genes, iniciadores e condições de amplificação empregadas neste estudo.

Genes	Nome Iniciador	Produto (pb)	Sequência (5' - 3')	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Fonte
<i>ces^a</i>	CESF1 CESR2	1271	GGTGACACATTATCATATAAGGTG GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	30	45 s, 94°C	60 s, 54°C	60 s, 72°C	[1]
<i>plcR-papR^b</i>	PPRF PPRR	902	CCATGCCATTGCTAACGT CGGAAGTAAGCAGAATTGAAT	30	60 s, 94°C	60 s, 54°C	60 s, 72°C	Neste estudo
<i>nheA^c</i>	NAF NAR	755	GTTAGGATCACAATCACCGC ACGAATGTAATTTGAGTCGC	30	60 s, 94°C	60 s, 54°C	60 s, 72°C	[2]
<i>bceI^d</i>	BCET1 BCET3	662	CGTATCGGTCGTTCACTCGG GTTGATTTCCGTAGCCTGGG	30	45 s, 94°C	45 s, 57°C	60 s, 72°C	[3]
<i>gyrB^e</i>	GYRBF GYRBR	644	GGCGGTTATAAAGTTTCTG GTTAAACCTTCACGAAGAT	30	60 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	Neste estudo
<i>cytK-2^f</i>	CK2F CK2R	585	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA GTGIAGCCTGGACGAAGTTGG	30	15 s, 94°C	30 s, 57°C	30 s, 72°C	[4]
<i>plcA^g</i>	Bt/cPCPLC1 Bt/cPCPLC2	405	AACGGTATTTATGCTGCTGACTAT CGCTACTACTGCCGCTCCAT	30	60 s, 94°C	60 s, 52°C	60 s, 72°C	[5]

Todas as reações tiveram um passo inicial de desnaturação a 94oC por 2 min e um passo final de extensão de 5 min a 72 oC. atoxima emética cereulide; bregulador pleiotropico PlcR; centerotoxina NheA; denterotoxina bc-D-ENT; esubunidade B da DNA girase; fcitotoxina K-2; gfosfolipase C especifica para fosfatidilcolina. [1] Ehling-Schulz et al., 2005; [2] Guinebretiere et al., 2002; [3] Hansen & Hendriksen, 2001; [4] Guinebretiere et al., 2006; [5] Guttmann & Ellar, 2000.

Tabela 2 – Características dos isolados de *B. cereus* associados com surtos de doenças transmitidas por alimento (FP), proveniente de alimentos não associados com intoxicações alimentares (F) e isolados a partir de amostras de solo (S). As linhagens de *B. cereus* ATCC 10987 e 14579 foram utilizadas como referência.

Isolado	Características Fenotípicas				Características Genéticas							Isolado	Características Fenotípicas				Características Genéticas						
	M	PL	AH	PE	<i>ces</i> ^a	<i>plcR-papR</i> ^b	<i>nheA</i> ^c	<i>bceT</i> ^d	<i>gvrB</i> ^e	<i>cytK-2</i> ^f	<i>plcA</i> ^g		M	PL	AH	PL	<i>ces</i> ^a	<i>plcR-papR</i> ^b	<i>nheA</i> ^c	<i>bceT</i> ^d	<i>gvrB</i> ^e	<i>cytK-2</i> ^f	<i>plcA</i> ^g
ATCC 10987	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	F3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
ATCC 14579	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	F4	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
FP1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	F5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
FP2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	F6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
FP3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	F7	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
FP4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	F8	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
FP5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	F9	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
FP6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	F10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
FP7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	F11	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
FP8	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	F12	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
FP9	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	F13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
FP10	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	F14	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
FP11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S1	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
FP12	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S2	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
FP13	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	S3	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
FP14	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
FP15	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	S5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
FP16	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	S6	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
FP17	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
FP18	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	S8	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
FP19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S9	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
FP20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S10	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
FP21	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
FP22	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S12	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
FP23	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S13	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
F1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	S14	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
F2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S15	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

M: Motilidade; PL.: Produção de lecitinase; AH: Atividade hemolítica; PE.: Produção de enterotoxina; +: positivo para o caráter; -: negativo para o caráter; atoxina emética cereulide; bregulador pleiotropico PlcR e proteína PapR; centerotoxina NheA; denterotoxina bc-D-ENT; esubunidade B da DNA girase; feitotoxina K-2; gfsfolipase C específica para fosfatidilcolina

Tabela 3 – Percentual de ocorrência das características fenotípicas e genéticas analisadas entre os isolados de *B. cereus*.

Característica	Isolados FP	Isolados F	Isolados S
Motilidade	100	85,7	80
Atividade Hemolítica	95,7	85,7	93,3
Produção de Lecitinasase	95,7	85,7	60
Produção de Enterotoxinas	91,3	21,4	100
<i>ces</i>	0	14,3	0
<i>plcR-papR</i>	100	100	100
<i>nheA</i>	100	100	100
<i>bceT</i>	73,9	57,1	66,7
<i>gyrB</i>	100	100	100
<i>cytK-2</i>	78,3	42,9	66,7
<i>plcA</i>	100	100	100

FP: isolados provenientes de alimentos envolvidos em surtos de DTA; F: isolados provenientes de alimentos não associados a surtos de DTA; S: isolados provenientes de amostras de solo

Tabela 4 – Locos analisados, numero de alelos identificados com as enzimas de restrição empregadas nas reações de RE-PCR, diversidade genética (h) e diversidade genética média (\bar{H}) para cada loco e para cada grupo de isolados de *B. cereus* avaliados.

Locos	Enzimas de restrição utilizadas	Alelos identificados	h			\bar{H} /locos
			Isolados de <i>B. cereus</i>			
			FP	F	S	
<i>plcR-papR</i>	<i>SspI, FokI, HinfI</i>	36	0,9111	0,8681	0,9286	0,9026
<i>nheA</i>	<i>ApoI, AseI</i>	5	0,7983	0,5056	0,0000	0,4346
<i>bceT</i>	<i>ApoI, SspI, FokI, HaeIII</i>	5	0,6619	0,4507	0,4059	0,5062
<i>gyrB</i>	<i>ApoI, SspI, FokI, HinfI</i>	21	0,8676	0,7294	0,7575	0,7848
<i>cytK-2</i>	<i>HaeIII, HindI, HinfI, HhaI</i>	12	0,8911	0,5879	0,7674	0,7488
<i>plcA</i>	<i>FokI, SspI, SphI, DraI</i>	13	0,7648	0,3187	0,7095	0,5977
\bar{H} / grupo			0,8158	0,5767	0,5948	0,6625

FP: isolados provenientes de alimentos associados a surtos de DTA; F: isolados provenientes de alimentos não associados a surtos de DTA; S: isolados provenientes de amostras de solo.

Tabela 5 – Valores de F_{ST} , distancia genética (D) e identidade genética (I) entre os três grupos de isolados de *B. cereus* analisados par a par. FP: isolados provenientes de alimentos associados a surtos de DTA; F: isolados provenientes de alimentos não associados a surtos de DTA; S: isolados provenientes de amostras de solo.

Grupos	F_{ST}	D	I
FP × F	0,09844	0,2275	0,7965
FP × S	0,02470	0,1104	0,8955
F × S	0,13035	0,3149	0,7299

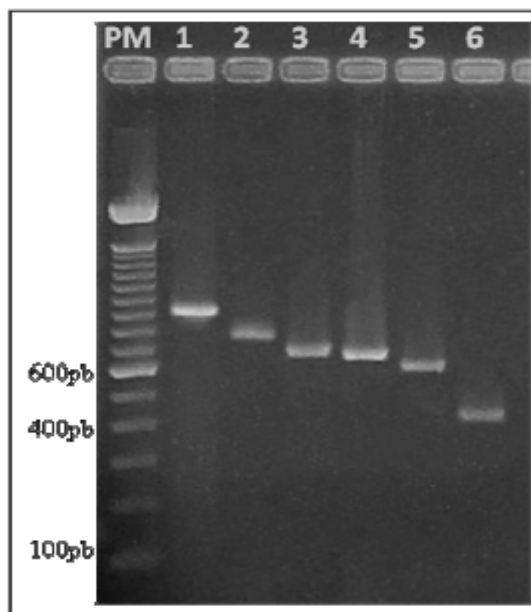


Figura 1 – Produtos de amplificação obtidos por meio da PCR realizada com as linhagens de *B. cereus*, para a detecção dos genes codificadores para fatores de virulência. PM: marcador de peso molecular (100 pb ladder, Invitrogen); 1: positivo para o gene *plcR-papR* (902pb); 2: positivo para o gene *nheA* (755pb); 3: positivo para o gene *bceT* (662pb); 4: positivo para o gene *gyrB* (644pb); 5: positivo para o gene *cytK-2* (585pb); 6: positivo para o gene *plcA* (405bp).

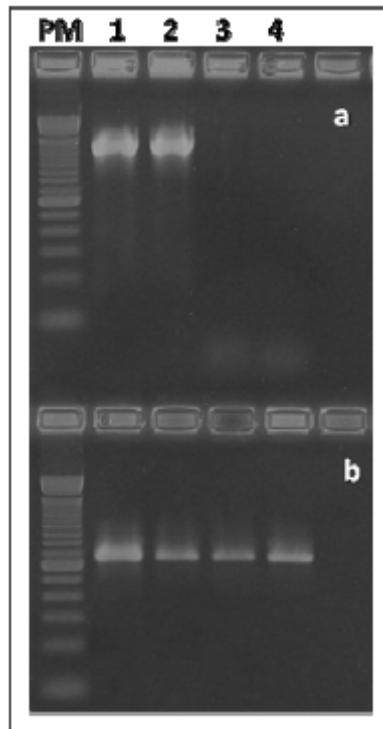


Figura 2 – (a) Ensaio por PCR para a detecção específica do amplicon de 1271 bp, do gene *ces* que codifica a toxina emética de *B. cereus*, (b) juntamente com teste controle da reação de PCR, utilizando as mesmas amostras de DNA para amplificação do gene *gyrB*. PM: marcador de peso molecular (100 pb ladder, Invitrogen); 1: linhagens F10 cereulide produtora; 2: linhagem F13 cereulide produtora; 3: linhagem ATCC 10987 e 4: linhagem ATCC 14579 não cereulide produtora.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fatores de virulência investigados, ou seja, a capacidade de motilidade, atividade hemolítica e produção de lecitinase e de enterotoxina, assim como os sete genes investigados neste estudo foram amplamente distribuídos entre os isolados de *B. cereus* provenientes de alimentos envolvidos em surtos de DTA, obtidos de alimentos não associados a intoxicação alimentar e isolados provenientes de diferentes amostras de solo.

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstram maior variação genética dentro dos grupos de isolados de *B. cereus* (92,22%), sendo baixa a variação genética entre os grupos.

A comparação par a par entre os grupos de isolados mostra baixa e moderada diferenciação genética entre os grupos com valores de identidade genética variando de 0,8955 a 0,7299.

O loco *plcR-papR* e o grupos de isolados provenientes de alimentos envolvidos com DTA apresentaram, respectivamente, maior diversidade genética média por loco e maior diversidade genética média por grupo de isolado.

Linhagens de *B. cereus* potencialmente causadoras de surtos de DTA não apresentam um perfil genético específico. Eventos que geram intoxicação alimentar dependem de um conjunto de fatores, tais como as condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- AGAISSE, H.; GOMINET, M.; ØKSTAD, O. A.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.*, v. 32, p. 1043-1053, 1999.
- AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology*, v. 141, p. 983-988, 1995.
- 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.*, v. 121, p. 31-34, 1994.
- ALTAYAR, M.; SUTHERLAND, A. D. *Bacillus cereus* is common in environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J. Appl. Microbiol.*, v. 100, p. 7-14, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; PALCICH, G.; LOPES, G. V.; RIBEIRO, V. B.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. *J. Food Prot.*, v. 71, p. 2115-2118, 2008.
- ARNESEN, L. P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 32, p. 579-606, 2008.
- ASANO, S-I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUKA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 1054-1057, 1997.
- BARKER, M.; THAKKER, B.; PRIEST, F. G. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 245, p. 179-184, 2005.
- BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 4423-4428, 1995.
- BEECHER, D. J.; WONG, A. C. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 980-986, 1994.
- 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.*, v. 36, p. 3791-3801, 2008.
- CALLEGAN, M. C.; GILMORE, M.; GREGORY, M.; RAMADAN, R.; WISKUR, B.; MOYER, A.; HUNT, J.; NOVOSAD, B. Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host-pathogen interactions. *Prog. Retin. Eye Res.*, v. 26, p. 189-203, 2007.

CHERIF, A.; ETTUOMI, 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.*, v. 53, p. 343–350, 2007.

CHOMA, C.; GRANUM, P. E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 217, p. 115–119, 2002.

DAMGAARD, P. H.; LARSEN, H. D.; HANSEN, B. W.; BRESCIANI, J.; JORGENSEN, K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 23, p. 146–150, 1996.

DAMGAARD, P. H. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 12, p. 245–250, 1995.

DIERICK, K.; VAN COILLIE, E.; SWIECICKA, I.; MEYFROIDT, G.; DEVLIEGER, H.; MEULEMANS, A.; HOEDEMAEKERS, G.; FOURIE, L.; HEYNDRIKX, M.; MAHILLON, J. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 4277–4279, 2005.

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, p. 324–338, 1993.

EASTERDAY, W. R.; VAN ERT, M. N.; SIMONSON, T. S.; WAGNER, D. M.; KENEFIC, L. J.; ALLENDER, C. J.; KEIM, P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 1995–1997, 2005.

EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHÁN, A.; BERGE, O.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 260, p. 232–240, 2006.

EHLING-SCHULZ, M.; VUKOV, N.; SCHULZ, A.; SHAHEEN, R.; ANDERSSON, M.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, p. 105–113, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online.*, v. 1, p. 45–50, 2005.

FAGERLUND, A.; LINDBÄCK, T.; STORSET, A. K.; GRANUM, P. E.; HARDY, S. P. *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*, v. 154, p. 693–704, 2008.

FAGERLUND, A.; WEEN, O.; LUND, T.; HARDY, S. P.; GRANUM, P. E. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, v. 150, p. 2689–2697, 2004.

- GOHAR, M.; FAEGRI, K.; PERCHAT, S.; RAVNUM, S.; ØKSTAD, O. A.; GOMINETL, M.; KOLSTØ, A-B.; LERECLUS, D. The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*, v. 3(7), p. e2793, 2008.
- GOHAR, M.; ØKSTAD, O. A.; GILOIS, N.; SANCHIS, V.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. Two-Dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, v. 2, p. 784–791, 2002.
- GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and food poisoning. In: BERKELEY, R.; HEYNDRICKX, M.N.; DE VOS, P. (Ed.). *Applications and systematics of Bacillus and relatives*. Blackwell Publishing, 1^a ed., p. 37–46, 2002.
- GRANUM P. E.; O’SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 177, p. 225–229, 1999.
- GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 157, p. 223–228, 1997.
- GUINEBRETIERE, M. H.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; 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.*, v. 259, p. 74–80, 2006.
- GUINEBRETIERE, M. H.; BROUSSOLLE, V.; NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 3053–3056, 2002.
- GUTTMANN, D. M.; ELLAR, D. J. Phenotypic and genotypic comparison of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *Bacillus thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 188, p. 7–13, 2000.
- HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 185–189, 2001.
- HELGASON, E.; CAUGANT, D. A.; OLSEN, I.; KOLSTØ, A-B. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 1615–1622, 2000.
- HEYNDRICKX, M.; SCHELDEMAN, P. Bacilli Associated with Spoilage in Dairy Products and Other Food. In: Berkeley, R.; Heyndrickx, M.N.; De Vos, P. (Ed.). *Applications and systematics of Bacillus and relatives*. Blackwell Publishing, 1^a ed., p. 64–82, 2002.
- HSIEH, Y. M.; SHEU, S. J.; CHEN, Y.L.; TSEN, H. Y. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and foodborne outbreaks. *J. Appl. Microbiol.*, v. 87, p. 481–490, 1999.
- IVANOVA, N.; SOROKIN, A.; ANDERSON, I.; et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, v. 423, p. 87–91, 2003.
- JENSEN, G. B.; FISKER, N.; SPARSØ, T.; ANDRUP, L. The possibility of discriminating within the *Bacillus cereus* group using gyrB sequencing and PCR-RFLP. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 104, p. 113–120, 2005.

- KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M. P. (Ed.). *Foodborne bacterial pathogens*, Marcel Dekker, New York, p. 21-70, 1989.
- KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.*, v. 2, p. 189–198, 2000.
- 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.*, v. 178, p. 2749–2756, 1996.
- LINDBÄCK, T.; FAGERLUND, A.; RØDLAND, M. S.; GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, v. 150, p. 3959–3967, 2004.
- LUND, T.; DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.*, v. 38, p. 254–261, 2000.
- LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a nonhaemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 141, p. 151–156, 1996.
- MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 1634–1639, 1998.
- MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computed software distributes by author, 1997.
- MINNAARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P. F. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cells. *J. Food Protec.*, v. 64, p. 1535–1541, 2001.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, v. 89, p. 583–590, 1978.
- NILSSON, J.; SVENSSON, B.; EKELUND, K.; CHRISTIANSSON, A. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Let. Appl. Microbiol.*, v. 27, p. 168–172, 1998.
- OMBUI, J. N.; SCHMIEGER, H.; KAGIKO, M. M.; ARIMI, S. M. *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 149, p. 245–248, 1997.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. Disponível no site <http://www.opas.org.br/> acessado em 10/11/2008.
- PERUCA, A-P.; VILAS-BOAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. Genetic relationships between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 497–500, 2008.
- PIRTTIJARVI, T. S. M.; ANDERSSON, M. A. A.; SCOGING, C.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 22, p. 133–144, 1999.

- POMERANTSEV, A. P.; KALNIN, K. V.; OSORIO, M.; LEPPLA, S. H. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 6591–6606, 2003.
- PRÜß, B. M.; DIETRICH, R.; NIBLER, B.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 5436–5442, 1999.
- RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M.; COURTENS, T.; HEYNDRICKX, M.; DEBEVERE, J. Prevalence *Bacillus cereus* and characterisation of in vacuum packed potato puree. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v. 41, p. 878 – 884, 2006.
- RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; ØKSTAD, O. A.; FOUTS, D. E.; JIANG, L.; CER, R. Z.; KOLSTØ, A. B.; GILL, S. R.; RAVEL, J. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 52–64, 2007.
- RASKO, D. A.; RAVEL, J.; ØKSTAD, O. A.; et al. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res.*, v. 32, p. 977–988, 2004.
- REYES, J. E.; BASTÍAS, J. M.; GUTIÉRREZ, M. R.; RODRÍGUEZ, M. O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by chilean school feeding program. *Food Microbiol.*, v. 24, p. 1–6, 2007.
- RIVERA, A. M. G.; GRANUM, P. E.; PRIEST, F. G. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 190, p. 151–155, 2000.
- ROSS, C. L.; KOEHLER, T. M. plcR papR-Independent Expression of Anthrolysin O by *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, v. 188, p. 7823–7829, 2006.
- ROWAN, N. J.; DEANS, K.; ANDERSON, J. G.; GEMMELL, C. G.; HUNTER, I. S.; CHAITHONG, T. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 3873–3881, 2001.
- RYAN, P. A.; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, v. 179, p. 2551–2556, 1997.
- SANTOS, C. A.; et al. Em elaboração.
- SCHRAFT, H.; STEELE, M.; MCNAB, B.; ODUMERU, J.; GRIFFITHS, M. W. Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 4229–4232, 1996.
- SHINAGAWA, K.; UENO, Y.; HU, D.; UEDA, S.; SUGII, S. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58, p. 1027–1029, 1996.

- SLAMTI, L.; LERECLUS, D. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.*, v. 21, p. 4550–4559, 2002.
- SUZUKI, M.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. Fate of *Bacillus thuringiensis* in different insect larvae. *Can. J. Microbiol.*, v. 50, p. 973–975, 2004.
- SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDENHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *Int. Dairy J.*, v. 9, p. 903–912, 1999.
- SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999–2004. *Boletim eletrônico Epidemiológico*, v. 6, p. 1–7, 2005.
- THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Transfer of plasmid pBC16 between *Bacillus thuringiensis* strains in non-susceptible larval. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 40, p. 181–190, 2002.
- VAN der AUWERA, G. A.; TIMMERY, S.; HOTON, F.; MAHILLON, J. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 113, p. 164–72, 2007.
- 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.*, v. 45, p. 1274–1277, 2007.
- VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.*, v. 53, p. 673–687, 2007.
- VILAS-BÔAS, G.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; LEMOS, M. V. F.; BOURGUET, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 1414–1424, 2002.
- ZHOU, G.; YAN, J.; DASHENG Z.; ZHOU, X.; YUAN, Z. The residual occurrences of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in food and beverages. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 127, p. 68–72, 2008.
- WRIGHT, S. *Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL, 1978.
- YUAN, Y. M.; HU, X. M.; LIU, H. Z.; HANSEN, B. M.; YAN, J. P.; YUAN, Z. M. Kinetics of plasmid transfer among *Bacillus cereus* group strains within lepidopteran larvae. *Arch. Microbiol.*, v. 187, p. 425–431, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Blast sequenciamento do produto de amplificação por PCR do gene *plcR*-papR

```

>ref|NC_004722.1| D Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome
gb|AE016877.1| D Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome
Length=5411809

Features in this part of subject sequence:
  PapR protein
  transcriptional activator plcR

Score = 1023 bits (1134), Expect = 0.0
Identities = 725/825 (87%), Gaps = 4/825 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  5          GTATAGGAGGAGAGATTACAAGTCCCATGGAGTCATTGTGATGAGGTA
Sbjct  5261023      GTATCGCAGCAAAAATTACAAGTTCCTATTATTCATTTTATGAGGTA
Query  65          ATAT-GAGAGAAAAAAGCAGTTTAAAGATCAAGTCATTACGCTATGTA
Sbjct  5260963      ATATTGAAAGAAAAAACAGTTTAAAGATCAAATCATTATGCTTTGTA
Query  124         ATAAAGAGATTTATAATAGAGTATGGAATGAGCTGAAAAAGGAAGA
Sbjct  5260903      ATAAAGAAATTTATAATAAAGTATGGAATGAGCTGAAAAAGGAAGA
Query  184         TCCAGCAGTTTCTTCAATGGCAATATCATGTAGCAGCTTACATGTTG
Sbjct  5260843      TCCAGCAATTTCTTCAATGGCAATATCATGTAGCAGCTTACATATT
Query  244         ACGAATATTGTATTTAGAAATGAAAAAATGGTTAAACCAACAATT
Sbjct  5260783      ACGAATATTGTATTTAGAAATGAAAAAATGGTTAAATCAACAGTT
Query  304         TATACCAAAACCTCTATATAGAAAATGCAATCGCAAAATATTTAT
Sbjct  5260723      TATACCAAAATCTTATATAGAAAATGCGAATGCAAAATATTTAT
Query  364         TTAAGAAGAGTATTGAGTTATTTGAAGGTATATTGAAACAATTAG
Sbjct  5260663      TTAAGAAGAGTATTGAGTTATTTGAAGATATATTTAAACAATTAG
Query  424         ATGAAGAATTCGACGTGAAGGTAAGATATAATCATGCAAAAGCATT
Sbjct  5260603      ATGAAGAATTTGAAGTGAAGGTAAGATATAATCATGCGAAAGCAT
Query  484         AATATGAACAAGCCTTATATCAAGTGAATAAGGCGATTGAAATAT
Sbjct  5260543      AATATGAAGAGTCACTTTATCAAGTAAATAAAGCGATTGAAATAT
Query  544         GTATGGCATTAAATGGGCAGCTGTACTATCAAAGAGGTGAATGTCT
Sbjct  5260483      GTATGGCATTAAATGGGCAGCTATATTTATCAAAGAGGTGAATGC
Query  604         ATGATGAGGCAGAGATTGAAGATACATATAAAGAAAGCAAGTATC
Sbjct  5260423      ACGATGGGGCAGAGGTTGAAGATGCATATAAAGAAAGCAAGCTC
Query  664         AAATGCATGCATATAAAGAGGCAATCGTAAATAAATCAATCAATG
Sbjct  5260363      AAATGCATACATATAAAGAAGCTCTCGTAAATAAATCAGTAGATA
Query  724         ATGGATATGCATAATTGCATACCGGCTGGGTAATTTTCATGATAT
Sbjct  5260304      ATGGGTATGCATAATTGCATATAATAGAGATAAATTTTCATGAT
Query  784         TGTGGGTGATGGAATATG-ACACAATACTTATCGGTAG-TTATTA
Sbjct  5260244      TGTGGGTGATGGAATATGAAGAAATTACTTATTGGTAGTTTATTA

```

ANEXO B

Blast sequenciamento do produto de amplificação por PCR do gene *gyrB*

```

>ref|NC_003909.8| D Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome
gb|AE017194.1| D Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome
Length=5224283

Features in this part of subject sequence:
  DNA gyrase subunit B

Score = 1002 bits (1110), Expect = 0.0
Identities = 593/607 (97%), Gaps = 12/607 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TGTCTGCATCTTT--AAATACTATTT--ACGTCCATAATCGTTA-TCACACGAGTTAAAG 55
Sbjct 5523 TGTCTGCATCTTTTAAAATACTATTTTACGTCCATAATCGTTAATCACACGAGTTAAAG 5464

Query 56 CTGTTTAA-CCCTACTTCATGTGT--CACCT-CATACGTATGAATGTTATTTCGTAATG 111
Sbjct 5463 CTGTTTAAACCCTACTTCATGTGTTCCACCTTCATACGTATGAATGTTATTTCGTAATG 5404

Query 112 AGTAAATATTATT TGTATATCCTATCGTTATACTGTAAGAGAAACCTCAACTTGAATACC 171
Sbjct 5403 AGTAAATATTATT TGTATATCCT-TCGTTATACTGTAAG-GAAACCTCAACTTGAATACC 5346

Query 172 ATCTTTTGATCCTTCTACATATACAGGTTCTTCATGGATAGGTTGTTTTGAGCGATTTAA 231
Sbjct 5345 ATCTTTTGATCCTTCTACATATACAGGTTCTTCATGGATAGGTTGTTTTGAGCGATTTAA 5286

Query 232 ATGCTCGACGTATGATTTAATCCACCTTCATAATGGAATTCTTTCTTTTGCTTATGTTTC 291
Sbjct 5285 ATGCTCGACGTATGATTTAATCCACCTTCATAATGGAATTCTTTCTTTTGCTTATGTTTC 5226

Query 292 ACGTTTATCTTCAATTGTTAATTTAATATTACGATTTAAAAATGCTAATTCACGCATACG 351
Sbjct 5225 ACGTTTATCTTCAATTGTTAATTTAATATTACGATTTAAAAATGCTAATTCACGCATACG 5166

Query 352 AGTTGCGAGCGTATCAAATTCGTATACTGTTGTTTCCTGAAAAATTTCTGGATCTGGTTT 411
Sbjct 5165 AGTTGCGAGCGTATCAAATTCGTATACTGTTGTTTCCTGAAAAATTTCTGGATCTGGTTT 5106

Query 412 AAATCGAGTTATCGTTCCTGTTTGATCTGTGTCACCAATGACTTTTAAATCCGCAACCGG 471
Sbjct 5105 AAATCGAGTTATCGTTCCTGTTTGATCTGTGTCACCAATGACTTTTAAATCCGCAACCGG 5046

Query 472 AATACCTCTTTTCGTATTTT TGATAATGGATTTTACCTTCACGATGTACAAATACCTCTAG 531
Sbjct 5045 AATACCTCTTTTCGTATTTT TGATAATGGATTTTACCTTCACGATGTACAAATACCTCTAG 4986

Query 532 TTCTGTTGATAGGGCATTACTACAGATGCCCCAACACCATGCAAAACACCAGAACTTT 591
Sbjct 4985 TTCTGTTGATAGGGCATTACTACAGATGCCCCAACACCATGCAAAACACCAGAACTTT 4926

Query 592 A-AACCG 597
Sbjct 4925 ATAACCG 4919

```

ANEXO C

Blast sequenciamento do produto de amplificação por PCR do gene ces

```

Query 664 TTTT TAGAGAAACGAAGATAAAGCATCAAGCAAAACTAGCAATTACGTACAAAGATAGAA 723
Sbjct 19497 TTTT TAGAGAAACGAAGATAAAGCATCAAGCAAAACTAGCAATTACGTACAAAGATAGAA 19438
>ref|NC_010924.1| D Bacillus cereus plasmid pCER270, complete sequence
gb|DQ889676.1| D Bacillus cereus strain AH187 plasmid pCER270, complete sequence
length=270082

Features in this part of subject sequence:
  hypothetical protein
  cereulide synthetase B, CesB

Score = 1914 bits (2122), Expect = 0.0
Identities = 1119/1141 (98%), Gaps = 15/1141 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 8 TGGT GTAACGATGTTTATGACGCTATTAACGGCGTATAATATTATGTCTGAATA-GTTA- 65
Sbjct 20153 TGGT GTAACGATGTTTATGACGCTATTAACGGCGTATAATATTATGT-TGAATAAGTTAA 20095

Query 66 CAAATGAAACAGCACAT-GTTGTCTGGCTCCCCTGTAGCAGGTAGAAATGAACCAGAATC 124
Sbjct 20094 CAAATGAAACAG-ACATTGTTGT-TGGCTCCCCTGTAGCAGGTAGAAATGAACCAGAATC 20037

Query 125 AAAAGATTTAATCGGGATGTT-GTGAATACGTAGCGTTACGTTTCGCATTTAGGAGATAA 183
Sbjct 20036 AAAAGATTTAATCGGGATGTTTGTGAATACGTAGCGTTACGTTTCGCATTTAGGAGATAA 19977

Query 184 TCCGACCGGTGATGGTTTTATTA AAAACAAATAAAAACAGAATACTTTAGAAGCATACAATC 243
Sbjct 19976 TCCGACAGTTGATG-TCTTATTA AAAACAAATAAAAACAGAATACTTTAGAAGCATACAATC 19918

Query 244 ATCAAGATTATCCATTTGATAAGTGGGTTGATGACTTGGATCCACATCGAGATTTAAGTA 303
Sbjct 19917 ATCAAGATTATCCATTTGATAAGTTGGTTGATGACTTGGATCCACATCGAGATTTAAGTA 19858

Query 304 GGACACCAATTTTCCAAGTGATGATGGGATATATGAATATGCCATTGATGGTTGCATTTTC 363
Sbjct 19857 GGACACCAATTTTCCAAGTGATGATGGGATATATGAATATGCCATTGATGGTTGCATTTTC 19798

Query 364 GTGAAGCAGAGGTTTCGCGAACGATTTGTTTCGACATAAAAGTCGCAAGGTTTGATTTAACAC 423
Sbjct 19797 GTGAAGCAGAGGTTTCGCGAACGATTTGTTTCGACATAAAAGTCGCAAGGTTTGATTTAACAC 19738

Query 424 TTCATGTGTTTGAAGATGAAGATCAGATGAAAATATTC TTTGAGTATAATACAGATTTAT 483
Sbjct 19737 TTCATGTGTTTGAAGATGAAGATCAGATGAAAATATTC TTTGAGTATAATACAGATTTAT 19678

Query 484 TTGATGAATCAACGATTATGCGTTGGCAGAATCATTTTCGAAACGCTATTACAGGAAATTG 543
Sbjct 19677 TTGATGAATCAACGATTATGCGTTGGCAGAATCATTTTCGAAACGCTATTACAGGAAATTG 19618

Query 544 TATCGAATCCGACAAAACGTATTTTCGGAATTGAATATACTTACAAATGAGGAGAAATATG 603
Sbjct 19617 TATCGAATCCGACAAAACGTATTTTCGGAATTGAATATACTTACAAATGAGGAGAAATATG 19558

Query 604 AAATCTAGAGATGAACAATAATTC AACGGAGTATCCTCAGCATGAATCTGTTCGGGAGA 663
Sbjct 19557 AAATCTAGAGATGAACAATAATTC AACGGAGTATCCTCAGCATGAATCTGTTCGGGAGA 19498

```

```

Query 724      AGTTAACGATATGCAGAGT T GAGTGA AAAAAGCA AATGCGT TGGCACATACATTGAAAACGTC 783
Sbjct 19437    AGTTAACGATATGCAGAGT T GAGTGA AAAAAGCA AATGCGT TGGCACATACATTGAAAACGTC 19378
Query 784      GAGGTGTTGCGCAGCATGATGTTGT TGGRAATT STCGCAGAGCSTT CGCCTGAAACAATTA 843
Sbjct 19377    GAGGTGTTGCGCAGCATGATGTTGT TGGRAATT STCGCAGAGCSTT CGCCTGAAACAATTA 19319
Query 844      TTGGAACTACTCGCAATCT TAAAAGTAGGAGCA ATTTAT T TGGCCAA TTGATCCAAAACCTAC 903
Sbjct 19317    TTGGAACTACTCGCAATCT TAAAAGTAGGAGCA ATTTAT T TGGCCAA TTGATCCAAAACCTAC 19258
Query 904      CGCAATTAACACTGCAAC ACATTTGGCGGAGAT AGCGGTGCARAAGTCCTCCTAGGGAAAA 963
Sbjct 19257    CGCAATTAACACTGCAAC ACATTTGGCGGAGAT AGCGGTGCARAAGTCCTCCTAGGGAAAA 19198
Query 964      ATGAARCAACTGTAGAAATTTGGCCAGGAAAG TTCCGT T TGTGGACATCGAAGGGGATTA 1023
Sbjct 19197    ATGAARCAACTGTAGAAATTTGGCCAGGAAAG TTCCGT T TGTGGACATCGAAGGGGATTA 19140
Query 1024     AGGGAAAC-AGAAGGATTTAGTGTGT CCACCTTA STCCAGAGATACGGCATATATTATGTA 1082
Sbjct 19139     AGGGAAAC-AGAAGGATTTAGTGTGT CCACCTTA STCCAGAGATACGGCATATATTATGTA 19080
Query 1083     TACGTCAG--CGTACTGCAAAAC- AAACGGG TTATGGTGACACATAG-AATATTGTTCC 1139
Sbjct 19079     TACGTCAGGCGAGTACTGCAAAACCAAAAGGG TTATGGTGACACATAGAAATATTGTTCC 19020
Query 1139     T 1139
Sbjct 19019     T 19019

```