



## **PREVALÊNCIA DE ENTEROTOXINAS EM LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* E MÉTODOS PARA SUA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA: REVISÃO<sup>1</sup>**

Marcos César Fernandes Pessoa<sup>2</sup>, Spartaco Astolfi-Filho<sup>3</sup>

**Submetido 16/04/2014 – Aceito 24/04/2014 – Publicado on-line 19/07/2014**

### **Resumo**

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva comumente utilizada no controle de vetores de doenças tropicais e pragas da agricultura. Apesar de seu uso tanto na agricultura quanto em saúde humana, esta bactéria pode ser produtora de enterotoxinas que estão presentes também em algumas linhagens de *Bacillus cereus*, destacando-se a enterotoxina não-hemolítica (NHE), a hemolisina BL (HBL) e a enterotoxina T (BceT), que têm sido relacionadas a surtos de intoxicação alimentar relatados na literatura. Esta revisão relata a prevalência destas enterotoxinas em linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas, Brasil.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus cereus*; enterotoxinas.

### **Abstract**

*Bacillus thuringiensis* is a Gram-positive bacterium commonly used in the tropical disease vectors and agriculture pragues control. Despite of its use both agriculture and human health, this bacterium can be enterotoxins producer that are also present in a few *Bacillus cereus* strains, emphasizing the non-haemolytic enterotoxin (NHE), haemolysin BL (HBL) and enterotoxin T (BceT) that have been related to food poisoning outbreaks reported in the literature. This review reports prevalence of the enterotoxins in *B. thuringiensis* strains isolated in Amazon State, Brazil.

**Key-words:** *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus cereus*; enterotoxins.

---

<sup>1</sup> Parte da dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>2</sup> Bolsista do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mail: mrpessoa@outlook.com.

<sup>3</sup> Professor Titular de Biotecnologia, diretor do Centro de Apoio Multidisciplinar e coordenador geral do Programa de Pós-Graduação da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

## 1. Introdução

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada no solo e desde a descoberta de sua atividade inseticida no início do século XX, esta bactéria tem sido usada mundialmente no controle de pragas da agricultura e de vetores transmissores de doenças tropicais como dengue e malária (PERANI et al., 1998).

Segundo Jensen e colaboradores (2002) existe uma estreita relação entre *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus*. Somente a presença de cristal intracelular com atividade inseticida em *B. thuringiensis* distingue as duas espécies. Estes cristais intracelulares são tóxicos para certas espécies de invertebrados, especialmente as larvas de insetos pertencentes às ordens *Coleoptera*, *Diptera* e *Lepidoptera*.

Entretanto, ambas as espécies de *Bacillus* são compostas por muitas linhagens com potencial variado que podem causar efeitos adversos em humanos, desde infecções gastrointestinais até infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, conforme relatado por Ghelardi e colaboradores (2007).

Devido a isso, linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de produzir uma variedade de substâncias tóxicas que são praticamente as mesmas expressas pelo patógeno oportunista *B. cereus*. Assim como este patógeno, *B. thuringiensis* ao produzir estas toxinas poderá apresentar algum risco para a saúde humana. Contudo, somente relatos esporádicos de casos clínicos foram reportados.

Na literatura tem-se referência que algumas linhagens de *B. thuringiensis* apresentam enterotoxinas que são compostas pela hemolisina BL (HBL), pela enterotoxina não hemolítica (NHE) e pela enterotoxina T (BceT ou bc-D-ENT), e que são codificadas pelos genes *hbl*, *nhe* e *bceT*, respectivamente.

Estas mesmas enterotoxinas são produzidas por linhagens de *B. cereus* e são relatadas por estarem envolvidas em surtos de intoxicação alimentar do tipo diarreico, notadamente as enterotoxinas NHE (LUND e GRANUM, 1996; GRANUM et al., 1999) e HBL (BEECHER e MACMILLAN, 1991; BEECHER et al., 1995) que apresentam muitos casos relatados na literatura e, por isso, são as que mais possuem estudos publicados.

A enterotoxina HBL é uma hemolisina tricomponente que consiste de dois componentes líticos, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> (codificados pelos genes *hblD* e *hblC*, respectivamente), e uma proteína de ligação B, codificada por *hblA*. NHE também é uma proteína tricomponente, porém sem atividade hemolítica, sendo codificada por três genes (*nheA*, *nheB* e *nheC*). Estas toxinas estão organizadas em um operon e seus genes são transcritos juntos e ordenadamente (THAENTHANE et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006). Enquanto isso, a toxina BceT é uma proteína simples que foi relatada por Agata e colaboradores (1995) por apresentar atividades biológicas típicas de enterotoxinas que estão envolvidas em surtos de intoxicação alimentar do tipo diarreica.

Em consequência disso, este artigo de revisão tem como objetivo abordar a prevalência dos genes codificadores destas enterotoxinas nas linhagens de *B. thuringiensis*, assim como destacar a importância das análises de PCR e o sequenciamento do DNA no estudo destes genes de enterotoxinas.

## 2. Metodologia

A revisão bibliográfica, para a elaboração do presente artigo foi realizada nos seguintes sítios de busca: *Scopus*, *Scirus*, *Science Direct*, *PubMed* e *PubMed Central* o período consultado foi de 1915 a 2014 e as palavras-chave “enterotoxin” ou “enterotoxin genes” foram associadas com as seguintes palavras: “isolation”, “characterization”, “genotypic characterization” e “biological activities” ou, ainda, com *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* ou *Bacillus cereus* group.

Nesta revisão serão abordados os estudos realizados com os genes de enterotoxinas do complexo HBL, complexo NHE e enterotoxina T (BceT) em isolados de *B. thuringiensis* encontrados no Estado do Amazonas e sua correlação com as linhagens de *B. cereus*, visto que estes dois bacilos pertencem ao mesmo grupo de bactérias e, basicamente, estas enterotoxinas são muito recorrentes nas duas espécies.

### 3. *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Família *Bacillaceae*) (Figura 1) é uma bactéria em forma de bastonete Gram-positivo, anaeróbico facultativo, dotado de flagelo peritríquio, células com aproximadamente 1 µm de largura por 3 a 5 µm de comprimento. É uma bactéria formadora de esporos cilíndricos a elípticos, não deformantes, com posição central a subterminal no esporângio. As células vegetativas ocorrem isoladas, aos pares e em cadeia (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

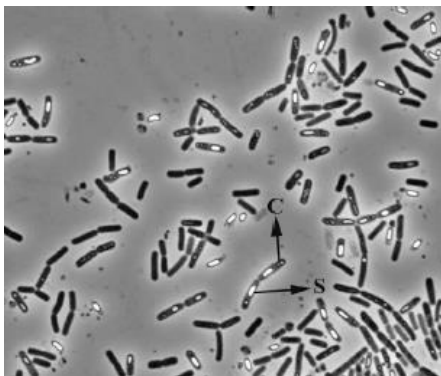


Figura 1: Cultura esporulada de *Bacillus thuringiensis* após 48 h de crescimento, observada por microscopia de contraste de fase. As setas indicam S- esporo; C- cristal.

Fonte: Molva et al. (2009).

Este bacilo apresenta como característica importante a síntese de cristal proteico entomopatogênico que aparece por ocasião do II ao III estágio da esporogênese e que representa cerca de 20 a 30% do peso seco da célula esporulada (ARONSON et al., 1986).

Em 1901, Ishiwata identificou um bacilo patogênico para larvas de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) denominando-o de *Bacillus sotto* que posteriormente foi classificado como *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* (ISHIWATA, 1901).

A mesma bactéria foi isolada por Berliner (1915) a partir de larvas doentes de traças da farinha (*Ephesthia kuniella*) da estação para processamento de grãos em Berlim. O nome *Bacillus thuringiensis* foi dado por Berliner em homenagem à cidade de Thuringen (Alemanha).

Taxonomicamente, *B. thuringiensis* pertence a um grupo denominado *B. cereus*. Este grupo inclui ainda *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (DAFFONCHIO et al.,

2000). O grupo *B. cereus* consiste de bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes, móveis e formadoras de esporos (BRILLARD e LERECLUS, 2004). No caso de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, estes microorganismos apresentam características bioquímicas similares, mas somente *B. thuringiensis* produz cristais entomotóxicos durante o início da esporulação, o qual diferencia esta espécie de *Bacillus* de *B. cereus* (POLANCZYK et al., 2004; EHLING-SCHULZ et al., 2005).

*B. thuringiensis* pode multiplicar-se em ambientes favoráveis como, por exemplo, insetos-alvo e solos ricos em nutrientes (ARONSON e SHAI, 2001). Diferentes isolados de *B. thuringiensis*, oriundos de várias partes do mundo demonstram um largo espectro de ação inseticida específico para diferentes ordens de insetos como *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* e *Hymenoptera* (BRAVO et al., 1998; KAO et al., 2003; SONG et al., 2003; KUBOTA et al., 2006).

No início da esporulação, *B. thuringiensis* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade entomocida. Estas proteínas, chamadas de proteínas Cry, vão se acumulando e formam uma inclusão paracristalina, também chamada de proteína cristal ou δ-endotoxina (ASANO et al., 1997; RICE, 1999).

As toxinas Cry são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto a porção C-terminal determina a forma da estrutura do cristal. Estes genes *cry* podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200 MDa) ou em ambos (POLANCZYK e ALVES, 2003).

Crickmore e colaboradores (1998) propuseram, pela primeira vez, uma classificação para as toxinas Cry expressas por *B. thuringiensis* baseada somente nas relações entre as sequências de aminoácidos. Por outro lado, Kao e colaboradores (2003) citam que o desenvolvimento de um sistema de classificação deve estar baseado na especificidade da toxina e na homologia das sequências de aminoácidos. Uma revisão destas classificações baseada na produção de δ-endotoxinas foi descrita nos trabalhos de Bravo e colaboradores (1998) e Rice (1999). Mais de 250 genes *cry* foram sequenciados e agrupados em 40 grupos de toxinas Cry. A

revisão da nomenclatura da toxina Cry está disponível em: [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html) (SONG et al., 2003).

O modo de ação inseticida das  $\delta$ -endotoxinas é sofisticado em termos moleculares, demonstrando alta especificidade e extrema toxicidade. As etapas no processo de ação bioinseticida estão bem relatadas nas revisões de Polanczyk e Alves (2003), Polanczyk et al. (2004) como descritas a seguir:

Após a ingestão do cristal, produzido por *B. thuringiensis*, pelo inseto-alvo, as  $\delta$ -endotoxinas, ainda sob a forma de protoxinas, são solubilizadas em pH alcalino do intestino médio e através da atuação de enzimas proteolíticas, as protoxinas são clivadas e transformam-se em frações tóxicas. Essas toxinas hidrolisadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no

gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical. No momento que essas toxinas se ligam aos receptores, ocorre uma provável mudança na conformação tridimensional do peptídeo. Consequentemente formam-se poros que aumentam a permeabilidade da membrana e que possibilitam o vazamento de íons. Adicionalmente, ocorre o aumento na absorção de água, causando turgescência e destruição das células do intestino médio. Devido a isso, o inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, o mesmo para de se alimentar. Estes mesmos dados corroboram com as informações descritas na revisão de outros autores (TOJO e AIZAWA, 1983; DU et al., 1994; KNOWLES, 1994; SANGADALA et al., 1994; GAZIT e SHAI, 1995; LIGHTWOOD et al., 2000; KAO et al., 2003;). O mecanismo de ação da proteína Cry é visto na Figura 2.

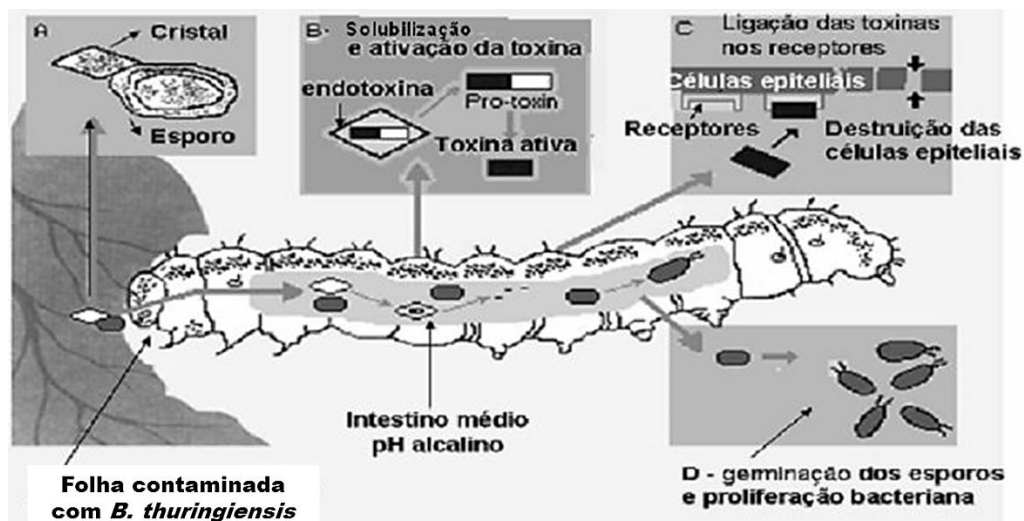


Figura 2: Esquema do mecanismo de ação da proteína cristal de *Bacillus thuringiensis* em larvas de inseto. Esquema adaptado a partir do site <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>>.

Os genes codificadores das toxinas de *B. thuringiensis* estão largamente empregados na engenharia de plantas transgênicas como o fumo, tomate e milho. Isto é compreensível, visto que milhões de hectares distribuídos pelo mundo abrangem culturas transgênicas que produzem toxinas inseticidas a partir desta bactéria (DANSON et al., 2006).

Os avanços recentes na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de

métodos baseados no DNA, capazes de diferenciação inter e intraespecífica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem diferenciar cepas e isolados e podem também ser empregados para determinar a presença ou ausência de determinados genes *cry*.

A reação de PCR no estudo de *B. thuringiensis* pode ser empregada com a finalidade de prever as atividades inseticidas (CAROZZI et al., 1991),

identificar os tipos de genes (CERON et al., 1995), determinar a distribuição dos genes (CHAK et al., 1994) e detectar novos genes, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (KUO e CHAK, 1996; BRAVO et al., 1998; PORCAR e JUÁREZ-PÉREZ, 2003).

A técnica de PCR descrita por Mullis e Faloona (1987) tem sido utilizada em combinação com a técnica de Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP), onde o produto de amplificação é clivado com enzimas de restrição e o padrão de bandas obtidos em géis, determina os tipos de genes *cry* presentes na linhagem ou identifica a ocorrência de novos tipos de genes (KUO e CHAK, 1996).

#### 4. *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete, formadora de esporos comumente encontrada no solo e que apresenta motilidade através de flagelos peritríquios (ASANO et al., 1997; CÂMARA, 2002; MENDES et al., 2004).

*B. cereus* pode multiplicar-se bem em uma faixa de temperatura de 10 °C a 48 °C, sendo que a temperatura ótima de crescimento está entre 28 °C a 35 °C. Todavia, Mäntynen e Lindström (1998) ressaltam que linhagens de *B. cereus* podem crescer em temperaturas que variam entre 4 °C e 37 °C, e que linhagens psicotróficas podem produzir enterotoxinas tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbica facultativa.

Esta bactéria é frequentemente isolada do leite cru e de seus derivados como um contaminante, a qual, como outras bactérias, produz uma grande quantidade de enzimas proteolíticas que digerem a caseína causando sabor anormal ou odor no leite (ASANO et al., 1997).

Além de degradar produtos lácteos, algumas amostras de *B. cereus* podem produzir enterotoxinas extracelulares que levam a surtos de intoxicação alimentar, ocasionando vômito e diarreia (GUAYCURUS et al., 1987; ASANO et al., 1997).

Esta espécie de *Bacillus* também é encontrada em outros ambientes causando contaminação como em vegetais, cereais, condimentos, carne bovina, suína e de frango, sopas, pratos à base de vegetais e arroz cozido (GUAYCURUS et al., 1983; MENDES et al., 2004). Este bacilo depende de características multifatoriais (MINNAARD et al., 2007), o qual, por meio da ingestão de alimentos contaminados, leva a dois tipos de síndromes de intoxicação alimentar: a emética e a diarreica (SAMAPUNDO et al., 2011).

Além disso, pode ocasionar infecções oculares, ceratite grave, endoftalmite e panoftalmite. Por outro lado, *B. cereus* também tem sido associado a infecções localizadas e infecções sistêmicas, incluindo endocardite, meningite e pneumonia. Além disso, pode provocar formação de abscessos, bacteremia, septicemia, infecções no rim e trato urinário e sepsia puerperal (BECHER e WONG, 1994, JAWETZ et al., 1998).

#### 5. ENTEROTOXINAS

As enterotoxinas (Figura 4) são proteínas de cadeia simples compostas por uma quantidade relativamente grande de lisina, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Os pesos moleculares oscilam entre 28.000 a 35.000 daltons.

As enterotoxinas afetam as células que revestem o trato gastrointestinal e como resultado as células epiteliais secretam grandes quantidades de líquidos e eletrólitos. Estas proteínas produzidas por algumas espécies bacterianas é a causa mais comum da intoxicação alimentar (TORTORA et al., 2000).

As enterotoxinas, diferente das endotoxinas, são toxinas liberadas por um determinado micro-organismo no intestino. Geralmente, as enterotoxinas são frequentemente citotóxicas e destroem tecidos pela alteração da permeabilidade das células epiteliais da parede intestinal. Elas são, na maioria das vezes, formadoras de poros, secretadas pelas bactérias, que se reúnem para formar poros nas membranas

celulares e, com isso, ocasionar a lise e morte celular.



Figura 3: Estrutura em cristalografia da enterotoxina B estafilocócica.

Fonte: Swaminathan et al. (1995).

A morte das células que formam uma barreira entre o lúmen intestinal e o tecido que as circundam, causa fluido intersticial, que é composto por água e eletrólitos sendo que o vazamento deste material para dentro do trato intestinal causa a diarreia. As contrações musculares normais são alteradas, levando a uma diarreia intensa que pode ser acompanhada de vômitos. As enterotoxinas que podem ocasionar vômitos são conhecidas como toxinas eméticas (EHLING-SCHULZ et al., 2005).

Alguns micro-organismos secretam enterotoxinas, tais como *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori* e algumas amostras de *Bacillus cereus* (MOSS, 1987; PINTO, 1996).

Cepas de *S. aureus* também produzem uma enterotoxina que afeta o intestino, causando vômitos e náusea quando ingerida e, por isso, é denominada de enterotoxina estafilocócica (vide Figura 3). Algumas estirpes de *S. aureus* produzem enterotoxinas que resultam nos sintomas associados à síndrome do choque térmico (TORTORA et al., 2000).

Do mesmo modo, *V. cholerae* produz uma enterotoxina denominada toxina colérica. Assim como a toxina diftérica, a toxina colérica consiste de dois polipetídeos, A (componente ativo) e B

(componente de ligação). A enterotoxina termolábil (mais sensível ao calor que a maioria das toxinas), produzidas por algumas linhagens de *E. coli*, tem uma ação idêntica à da toxina colérica (TORTORA et al., 2000).

As intoxicações alimentares produzidas pelas enterotoxinas constituem-se em um problema mundial e tem uma estreita relação com os hábitos alimentares regionais. Madegowda e colaboradores (2008) propuseram, por cristalografia de raio-X, o modelo estrutural do componente de ligação (B) da hemolisina BL (HBL) de *B. cereus* (Figura 4).

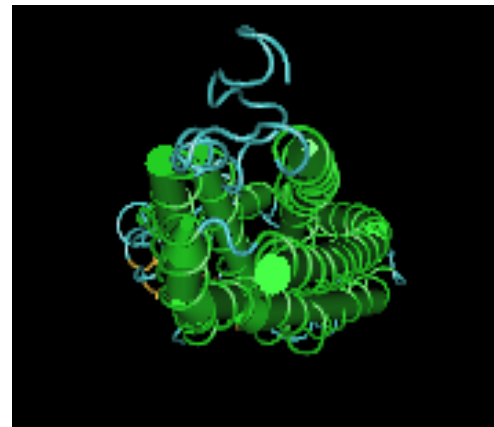


Figura 4: Estrutura em cristalografia do componente de ligação (B) da hemolisina BL de *B. cereus*.

Fonte: Madegowda et al. (2008).

Guaycurus e colaboradores (1993) descreveram, pela primeira vez no Brasil, a presença de proteínas extracelulares (classificadas como enterotoxinas) produzidas por *B. cereus* AL-42 e AL-15, cepas isoladas de surtos de intoxicação alimentar no Rio de Janeiro. Através do fracionamento por cromatografia em QAE-Sephadex e Sephadex G75 ficou demonstrado no último processo cromatográfico a presença de três picos. O pico principal apresentou atividade de permeabilidade vascular em coelhos, letalidade para camundongos e citotoxicidade para células Vero e Hela. Pela análise por SDS-PAGE, após ultracentrifugação, ficou confirmado que esta enterotoxina era um composto de massa molecular maior que 30.000 daltons.

Em algumas cepas de *B. cereus* as enterotoxinas estão relacionadas com toxinas conhecidas como hemolisina (HBL), enterotoxina não-hemolítica (NHE) e enterotoxina bc-D-ENT (BceT).

Resultados de imunoenaios com os kits Oxoid e Tecra Via realizados por Kim e colaboradores (2014), apontaram que doze isolados de *B. thuringiensis*, obtidos de áreas de produção de arroz na Coreia do Sul, mostraram a presença de enterotoxinas dos complexos HBL e NHE, enquanto em um isolado foi detectado apenas o complexo NHE. De acordo com os pesquisadores todos os isolados de *B. thuringiensis* apresentaram os genes codificadores das três subunidades de cada enterotoxina e, por isso, foram considerados do tipo diarréiogênico.

### 5.1 HEMOLISINA BL

As hemolisinas são substâncias que se enquadram no grupo das citolisinas e que fazem a degradação das hemácias (JAWETZ et al., 1998). As bactérias produzem hemolisinas que diferem em sua capacidade de lisar diferentes tipos de hemácias (humanas, de ovelhas e coelhos, por exemplo) e no tipo de lise que elas causam. Produtores importantes de hemolisinas são os estafilococos, *Clostridium perfringens* – agente etiológico mais comum da gangrena gasosa –, estreptococos e algumas cepas de *B. cereus* (TORTORA et al., 2000).

O operon hemolisina BL (HBL) consiste de quatro genes, mas somente os produtos de três destes genes foram caracterizados (McKILLIP, 2000). Este complexo é composto por três proteínas, B, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>, transcritas pelos genes *hblC* (codificador de L<sub>2</sub>) *hblD* (codificador de L<sub>1</sub>) e *hblA* (codificador do componente B), e que estão organizados em um operon único junto com um quarto gene, o *hblB*, codificador da proteína B' (HEINRICHS et al., 1993; RYAN et al., 1997; GUINEBRETIERE et al., 2002). A toxina HBL possui atividade hemolítica, citotóxica, dermonecrótica e de permeabilidade vascular (SERGEEV et al., 2006). O componente B foi originalmente

isolado e purificado da cepa *B. cereus* F837/76 (BEECHER e MACMILLAN, 1991; JEBBERGER et al., 2014).

Em acordo com estes autores Kotiranta e colaboradores (2000) reportam que a toxina HBL é composta de um componente de ligação, B, e dois componentes líticos, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>, e ela requer todos os três componentes para a atividade máxima hemolítica, citotóxica, dermonecrótica e permeabilidade vascular, assim como acúmulo de fluidos em alça ileal ligada de coelhos.

Os tamanhos dos componentes da hemolisina BL foram relatados como tendo 35, 36 e 45 kDa para B, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>, respectivamente. De qualquer modo, o peso molecular varia consideravelmente de acordo com o sistema de expressão para a produção da proteína. O componente B do complexo HBL de *B. cereus*, em cultura de eritrócitos, sensibiliza lentamente estas células para que a ação lítica dos componentes L se dê mais rapidamente, porém o componente B em alta concentração diminui o efeito lítico dos componentes L, fato este pouco compreendido (BEECHER e WONG, 1994).

No estudo de Hansen e Hendriksen (2001), foram estudadas linhagens de *B. cereus*, das quais foram caracterizadas a hemolisina BL contendo os três componentes da proteína: o componente de ligação B e os dois componentes líticos (L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>), sendo estes os mesmos componentes descritos por Beecher e Wong (1994). Os três genes, *hblA*, *hblC* e *hblD*, foram detectados por PCR em 11 das 22 linhagens de *B. cereus* estudadas.

Segundo Pang e colaboradores (2010) de um total de 75 linhagens de *B. thuringiensis*, entre elas 65 isoladas de microbiota, foram selecionadas para estudos de detecção de genes, através de análise por PCR, e atividade da enterotoxina HBL, bem como atividade de citotoxicidade. Todas as linhagens foram positivas para os genes de HBL, tendo atividade citotóxica mediante ensaio com células de ovário de hamster chinês (células CHO).

Em outro estudo realizado por Araújo-Coutinho e colaboradores (2011) das linhagens de *B. thuringiensis* isoladas da biota de larvas de culicídeos, 19 destas foram testadas quanto à presença do componente L<sub>2</sub> da enterotoxina HBL, sendo que 15 linhagens foram positivas para este componente. Entretanto, como a toxina é composta por três subunidades, somente a presença do componente L<sub>2</sub> não é indicativo de que a enterotoxina tenha ação tóxica.

De acordo com Trabulsi e colaboradores (1999), hemolisinas também são recorrentes em *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*. Em *S. aureus* são caracterizadas pelo menos quatro hemolisinas. A mais comum, em amostras de origem humana, é a alfa, que é tóxica para plaquetas humanas e letal para animais, quando inoculadas por via sistêmica. A hemolisina beta (betalisina) é mais ativa sobre hemácias de carneiro e tem atividade de esfingomielinase. Em *L. monocytogenes*, as hemolisinas, juntamente com a fosfolipase C, rompem a membrana fagossomal, permitindo ao patógeno escapar para o citoplasma da célula hospedeira, onde se multiplica usando nutrientes celulares.

## 5.2 ENTEROTOXINA NHE

As enterotoxinas são proteínas que causam citotoxicidade, acúmulo de fluidos na alça ileal ligada de animais experimentais e dermonecroses, sendo letais para camundongos e citotóxicas em culturas de células Vero (MÄNTYNEN e LINDSTRÖM, 1998; NOTERMANS e BATT, 1998).

O complexo NHE é composto por três proteínas, NheA, NheB e NheC (Figura 5), com massa molecular de 45, 39 e 105 kDa, respectivamente, e são codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (HANSEN e HENDRIKSEN, 2001). Estes genes estão organizados em forma de operon (GUINEBRETIÈRE et al., 2002). Neste complexo estão identificados dois possíveis fatores líticos e um fator de ligação codificados pelo operon que abriga os genes codificadores desta enterotoxina (SERGEEV et al., 2006).

Em *B. cereus* a enterotoxina não-hemolítica (NHE) é uma das duas enterotoxinas tricomponentes responsável pela síndrome da intoxicação alimentar diarreica causada por esta espécie do gênero *Bacillus*. Esta enterotoxina foi originalmente identificada em uma linhagem de *B. cereus* responsável por um surto de intoxicação alimentar (BRILLARD e LERECLUS, 2004).

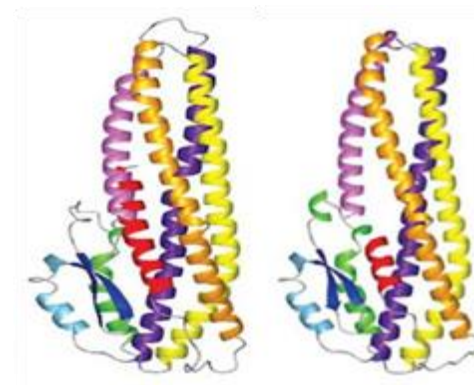


Figura 5: Modelos de homologia dos componentes NheB e NheC. Os modelos foram criados com base na estrutura cristal do componente B de HBL. As estruturas proteicas são mostradas no formato *ribbon* com as folhas- $\beta$  em azul marinho.

Fonte: Fagerlund et al. (2008).

Na Noruega, Lund e Granum (1996), identificaram a enterotoxina NHE na cepa *B. cereus* NVH 0075/95, sendo que esta amostra não continha os genes *hbl* e *cytK*, mas apresentava atividade citotóxica, permitindo, assim, a descoberta do gene *nhe*.

Os estudos posteriores, conduzidos por Ehling-Schulz et al. (2005) e Fagerlund et al. (2008), indicaram que esta enterotoxina não tinha atividade hemolítica. Segundo Kotiranta e colaboradores (2000) esta enterotoxina, que consiste de três proteínas, possui similaridade com a enterotoxina HBL. A enterotoxina NHE é codificada por três genes *nhe* (A, B e C), os quais são necessários para atuarem juntos, a fim de que a toxina NHE tenha sua atividade biológica máxima (LINDBÄCK et al., 2004; JEBBERGER et al., 2014).

Hansen e Hendriksen (2001) detectaram os genes desta enterotoxina em



13 de 22 linhagens de *B. cereus* estudadas. Neste mesmo estudo três linhagens portaram somente um gene e uma linhagem não apresentou nenhum dos três genes. Em outro estudo realizado por Pang e colaboradores (2010) de um total de 75 linhagens de *B. thuringiensis* analisadas 100 % delas foram positivas para os três genes do complexo NHE.

### 5.3 ENTEROTOXINA T

*B. cereus* é uma bactéria responsável por ocasionar dois diferentes tipos de gastroenterites em humanos. A capacidade de *B. cereus* em causar diarreia é atribuída pela produção de uma enterotoxina, a enterotoxina diarreica de *B. cereus* – denominada bc-D-ENT ou simplesmente BceT.

Agata e colaboradores (1995) informaram que a bc-D-ENT provocou, em condições experimentais, acúmulo de fluidos na alça ileal ligada de coelhos, alterou a permeabilidade vascular da epiderme de porquinhos-da-índia, levando o tecido a sofrer necrose, e mostrou citotoxicidade em cultura de células Vero. Estes dados foram anteriormente observados no estudo desenvolvido por Shinagawa e colaboradores (1991).

De acordo com Agata e colaboradores (1995), o produto do gene é uma proteína simples, sendo que o DNA correspondente para este gene foi detectado por PCR em todas as linhagens de *B. cereus* examinadas e, com base nestes resultados, seria possível que *B. cereus* isolados de alimentos ou do solo pudessem ser agentes causadores da intoxicação alimentar do tipo diarreica.

A BceT, como uma proteína simples, é responsável pelos efeitos enterotóxicos de *B. cereus* e esta proteína possui peso molecular de 45 kDa com atividade biológica típica de enterotoxinas (KOTIRANTA et al., 2000).

O gene da toxina (*bceT*) presente em um fragmento genômico da cepa *B. cereus* B-4ac com tamanho de 2,9 kb foi clonado e expresso em *E. coli*, sendo determinada a sua sequência de nucleotídeos. O fragmento de DNA apresentou uma fase de leitura aberta (ORF) capaz de codificar um

polipeptídeo de 336 aminoácidos com massa molecular de 41.039 Da. A proteína traduzida demonstrou citotoxicidade em cultura de células Vero e foi positiva no ensaio de permeabilidade vascular. Também causou acúmulo de fluidos na alça ileal ligada de ratos e foi letal para camundongos submetidos à injeção intraperitoneal. Estas atividades biológicas são consideradas características de enterotoxinas diarreicas.

Portanto, de acordo com o estudo de Agata e colaboradores (1995) este gene, denominado *bceT*, codificava uma das proteínas enterotóxicas de *B. cereus* que causa diarreia em síndromes decorrentes de intoxicação alimentar.

Entretanto, Granum e colaboradores (1996) relataram que o gene *bceT* foi detectado somente em duas de sete linhagens de *B. cereus* isoladas de casos de intoxicação alimentar e é incerto se esta proteína possui um papel nas infecções transportadas por alimentos. Isto foi sustentado por Ombui e colaboradores (1997) que não encontraram nenhuma correlação entre a produção da enterotoxina testada imunologicamente e a presença do gene *bceT* em linhagens de *B. cereus* (GRANUM et al., 1996; KOTIRANTA et al., 2000).

### 6. Síndromes transmitidas por alimentos relacionadas com as enterotoxinas

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* são microrganismos ubíquos do solo e são considerados geralmente como contaminantes inofensivos. Contudo, algumas espécies são conhecidas como produtoras de toxinas, incluindo o patógeno de alimentos *B. cereus*. A presença de isolados naturais de *Bacillus* spp. que abrigam um ou mais genes enterotóxicos e a subsequente demonstração das condições que podem levar à expressão da toxina, detêm uma importância crucial na área de segurança de alimentos (McKILLIP, 2000).

Os fatores de virulência de *B. cereus* estão relacionados com a produção de

várias toxinas extracelulares, entre elas uma toxina diarreica, mais precisamente um grupo de proteínas termolábeis, que é inativada em cinco minutos a 56 °C e uma toxina caracterizada por um pequeno peptídeo termoestável de ação emética que se mantém inalterado após uma hora a 120 °C (CÂMARA, 2002).

A toxina do tipo emético é pré-formada no alimento, enquanto a do tipo diarreico é, provavelmente, produzida no trato intestinal, sendo que os fatores de virulência ainda não estão completamente caracterizados (GRANUM, 1994; MINNAARD et al., 2001; GHELARDI et al., 2002).

Este bacilo tem sido responsável por até 23 % dos casos relatados na literatura de enfermidades oriundas de infecções alimentares (CÂMARA, 2002). Muitas linhagens de *B. cereus* causam dois tipos principais de intoxicação alimentar, a emética e a diarreica (HANSEN e HENDRIKSEN, 2001).

A síndrome diarreica caracteriza-se por um período de incubação que varia de oito a dezesseis horas (NOTERMANS e BATT, 1998; MINNAARD et al., 2001; SANTOS et al., 2011). Seus principais sintomas são diarreia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, raramente ocorrem náuseas e vômitos. A duração da doença é de doze a vinte e quatro horas, geralmente está associada ao consumo de alimentos de composição proteica contaminados, com aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/g (unidades formadoras de colônias/grama). Estes micro-organismos podem fazer parte da flora fecal, dependendo do tipo de alimento e da sazonalidade, principalmente no verão, entretanto não coloniza o intestino e não persiste por longos períodos (CÂMARA, 2002).

A síndrome diarreica é aparentemente causada por várias enterotoxinas. A enterotoxina melhor investigada é a HBL, uma hemolisina tricompente que consiste de duas proteínas líticas e um componente de ligação (BEECHER e MACMILLAN, 1991; SAMAPUNDO et al., 2011). Esta toxina, que possui atividades hemolíticas e dermonecróticas e aumenta a

permeabilidade vascular, é considerada o fator de virulência primário em casos de diarreia por sua capacidade em causar acúmulo de fluidos na alça do íleo em coelhos sob condições experimentais (GHELARDI et al., 2002). Outra causa da síndrome diarreica é a citotoxina K, uma toxina hemolítica monomérica, podendo esta apresentar-se sob duas formas: cyt K-1 e cyt K-2 (SAMAPUNDO et al., 2011).

Conforme relatado por Ehling-Schulz e colaboradores (2006), enquanto a síndrome diarreica estaria relacionada com a enterotoxina não hemolítica (NHE), enterotoxina hemolítica (HBL) e com a citotoxina K (CytK), a síndrome emética seria ocasionada pela ação da toxina cereulida.

A síndrome emética caracteriza-se por um período de incubação curto, de uma a cinco horas, causando, em geral, mal-estar, vômitos e náuseas, sendo que o tempo de duração pode ser de seis a vinte e quatro horas de duração. A toxina cereulida é um dodecapsídeo termoestável codificado por um grupo de genes de 2,4 kb denominado *ces* (SAMAPUNDO et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

A síndrome emética está associada a alimentos com alto teor de amido e que contenham número elevado de micro-organismos viáveis de *B. cereus* (maior ou igual a 10<sup>6</sup> UFC/g) (CÂMARA, 2002; MENDES et al., 2004). Quando grandes quantidades de arroz são cozidas e esfriadas lentamente, os esporos de *B. cereus* germinam, e os esporângios produzem a toxina durante a fase logarítmica de crescimento e algumas vezes durante a esporulação (JAWETZ et al., 1998).

No que se refere a *B. thuringiensis* tem sido verificado que algumas estirpes deste bacilo possuem diversos fatores de virulência em comum com *B. cereus*, dentre estes destacam-se um complexo hemolítico e diferentes enterotoxinas. Muitos destes fatores de virulência são regulados pela mesma proteína em ambas as espécies. O gene *entS* codifica, por exemplo, uma enterotoxina de 45 kDa que foi originalmente encontrada em *B. cereus*. Entretanto, a maioria dos isolados de *B.*

*thuringiensis* estudados foram positivos para *entS* (GUTTMANN e ELLAR, 2000).

Han e colaboradores (2006), estudando genes de virulência cromossomicamente codificados nas linhagens *B. thuringiensis* 97-27 e *B. cereus* E33L, indicaram em seus resultados que ambas as linhagens compartilham um grupo de fatores de virulência comum aos membros do grupo *B. cereus*. Estes genes de virulência comuns incluem os três genes da enterotoxina não-hemolítica (*nheABC*), além de duas hemolisinas do tipo III formadoras de canal, uma perfringolisina O, uma fosfatidilinositol-específica e uma fosfatidilcolina, um fator sigma-B da RNA polimerase e uma protease extracelular da família p60. Estes últimos cinco genes são homólogos aos genes de virulência codificados pelo patógeno Gram-positivo *L. monocytogenes*. *B. thuringiensis* 97-27 e *B. cereus* E33L possuem também um gene codificador da citotoxina K, que foi anteriormente identificada na cepa *B. cereus* ATCC 14579.

## 7. Técnicas moleculares aplicadas a *B. cereus* e *B. thuringiensis*

### 7.1 A técnica de PCR na detecção de genes de enterotoxinas expressas por *B. cereus* e *B. thuringiensis*

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes, desde que pelo menos parte de sua sequência nucleotídica já seja conhecida. Primeiro, a parte conhecida da sequência é utilizada para projetar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos, cada um complementar a uma das fitas da dupla hélice de DNA e posicionados em lados opostos da região a ser amplificada. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores para a síntese de DNA *in vitro* e determinam as extremidades do fragmento de DNA que é finalmente obtido (ALBERTS et al., 1997).

A reação de PCR tem sido cada vez mais usada para a detecção de genes codificadores de enterotoxinas e tem provado ser um método rápido e sensível

para a detecção destas linhagens bacterianas (HANSEN e HENDRIKSEN, 2001; GHELARDI et al., 2002; GUINEBRETIERE et al., 2002; AL-KHATIB et al., 2007).

Hansen e Hendriksen (2001), descreveram em seus trabalhos que *B. thuringiensis* estaria envolvido em surtos de doenças gastrointestinais, e através de diferentes técnicas aplicadas, como a PCR e kits de diagnóstico molecular como Oxoid (para o componente L<sub>2</sub> de HBL) e Tecra Via (para a proteína NheA de NHE), ficou demonstrado que algumas linhagens eram capazes de produzir enterotoxinas e de possuírem genes que estão envolvidos em enteropatogêneses provocadas por *B. cereus*.

Análises de PCR mostraram que linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* isoladas de amostras de queijo na Turquia, continham os genes *nheA*, *nheB*, *nheC* e *hblD*. Os genes *hblA* e *hblC* estiveram presentes em duas e quatro linhagens de *B. thuringiensis*, respectivamente. O gene *bceT* foi detectado em um isolado de *B. cereus* e nove de *B. thuringiensis* (MOLVA et al., 2009).

Um estudo com 29 espécies de bacilos do grupo *B. cereus* isoladas de sorvete mostrou por análise de PCR que todas elas indicaram a presença de genes de enterotoxinas (*nheA*, *hblC*, *cytK* e *ces*). O gene *nheA* foi o mais encontrado em todas elas, sendo detectado em 13 linhagens (44,8 % - 10 de *B. cereus*, 2 de *B. thuringiensis* e 1 de *B. anthracis*). Além do mais, cinco (17,2 %) isolados de *B. cereus* foram positivos para o gene *hblC* e somente quatro (13,8 %) dos 29 isolados apresentaram tanto o gene *hblC* quanto o gene *nheA*. Contudo, os genes *cytK* e *ces* não foram detectados em nenhum dos isolados (ARSLAN et al., 2014).

### 7.2 Sequenciamento de DNA e aplicação em *B. cereus* e *B. thuringiensis*

Uma das técnicas mais importantes na biologia molecular é o sequenciamento de DNA, pelo qual a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA

pode ser determinada. Duas tecnologias diferentes foram desenvolvidas quase que simultaneamente – o método de terminação de cadeia por F. Sanger, no Reino Unido, e o método de degradação química por A. Maxam e W. Gilbert, nos Estados Unidos (BROWN, 2003).

Maxam e Gilbert (1977) desenvolveram uma técnica para o sequenciamento em que o DNA pode ser sequenciado por um procedimento químico que quebra parcialmente uma molécula de DNA terminalmente marcada em cada repetição de base. Os comprimentos dos fragmentos marcados então identificavam a posição dessas bases. As reações clivavam o DNA preferencialmente em adeninas, guaninas, citosinas e timinas de modo igual ou em citosinas somente. Quando os produtos destas quatro reações eram determinados pelo tamanho, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, a sequência de DNA era lida em bandas radioativas. A técnica na época permitiu o sequenciamento de pelo menos 100 bases a partir do ponto de marcação com  $^{32}\text{P}$ .

Na metodologia tradicional de Sanger e colaboradores (1977) as moléculas com as cadeias terminadas que são sintetizadas mostram-se radioativamente marcadas e a sequência de DNA é lida de uma autoradiografia. A primeira molécula de DNA a ser completamente sequenciada foi o genoma de 5.386 nucleotídeos do bacteriófago  $\Phi\text{X174}$ , sendo seguida pelas sequências do vírus SV40 (5.243 pb), em 1977, e do plasmídeo pBR322 (4.363 pb), em 1978. O grupo de Sanger publicou a sequência do genoma mitocondrial humano (16,6 kb) em 1981 e a do bacteriófago  $\lambda$  (49 kb) em 1982.

Diversos autores têm realizado estudos de sequenciamento entre as bactérias do grupo *B. cereus* que expressam genes de virulência e que muitas vezes são codificados pelos mesmos genes em ambas as espécies estudadas. Estes trabalhos incluem, rotineiramente, estudos com *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*, a fim de verificar o grau de homologia que tais bacilos podem apresentar quanto aos genes de virulência expressos.

Deste modo, o trabalho de Granum e colaboradores (1999) estabeleceu que o complexo NHE é codificado por um operon e os genes para cada subunidade foram clonados e sequenciados. Os pesos moleculares e os genes para este complexo foram estabelecidos pelos autores como sendo o gene *nheA*, codificador da subunidade  $L_2$  com 41 kDa, e o gene *nheB*, codificador da subunidade  $L_1$  com 39,8 kDa. Semelhante ao panorama da hemolisina BL existe um gene adicional no operon NHE com função de ligação (gene *nheC*). Este gene, afinal, codifica uma proteína de 36,5 kDa que pode vir a ser um homólogo de *hbla*.

Segundo McKillip (2000) existe ainda uma similaridade significativa entre as sequências de aminoácidos das proteínas HBL e NHE. De acordo com Granum e colaboradores (1999), foi então proposto que a proteína NheC seja um componente de ligação, tal como o componente B da hemolisina BL (HBL).

No trabalho de Hansen e Hendriksen (2001) o gene *bceT* foi clonado e sequenciado a partir da cepa *B. cereus* B-4ac. Pela técnica de PCR, ficou estabelecido que este gene está amplamente distribuído entre as linhagens bacterianas. No entanto, o gene *bceT* variou na sequência entre as linhagens estudadas, como ficou evidenciado por PCR, ao serem usados diferentes pares de iniciadores. E, das 22 linhagens de *B. cereus* estudadas, 10 não apresentaram o gene codificador da proteína BceT.

## 8. Conclusões

Atualmente, existem muitos trabalhos que fazem referência da estrita relação de *B. cereus* com *B. thuringiensis*, não apenas porque estas duas bactérias fazem parte do mesmo grupo de bactérias (grupo *B. cereus*), mas porque são produtoras de enterotoxinas que são frequentemente recorrentes em surtos de intoxicação alimentar.

Dada a importância que *B. thuringiensis* oferece para o controle de pragas e vetores de doenças tropicais, o que é facilmente observado na vastidão de



referências bibliográficas específicas, abrangendo campos que medeiam desde a taxonomia até a biologia molecular, é que foi direcionado o levantamento bibliográfico para esta espécie.

Além disso, o método de PCR é extremamente sensível. Ele pode detectar uma única molécula de DNA numa amostra. Mesmo traços de RNA podem ser analisados da mesma maneira, desde que sejam previamente transcritos para DNA com transcriptase reversa. Devido a isso, este método tem sido muito utilizado para a detecção dos genes de enterotoxinas em linhagens de *Bacillus* que portam estes genes.

Outro método que vem sendo muito utilizado nos estudos dos genes de enterotoxinas de linhagens de *Bacillus* é o sequenciamento de DNA, de modo a determinar a homologia que as sequências de nucleotídeos destes *Bacillus* apresentam com sequências já conhecidas. Segundo Alberts e colaboradores (1997), este método permite a determinação, de forma simples e rápida, da sequência nucleotídica de qualquer fragmento de DNA purificado.

Vale ressaltar, no entanto, que na produção de um bioinseticida a base de *B. thuringiensis*, o que se utiliza é o cristal proteico e este é liberado após lise celular, ou seja, no último estágio da esporogênese. Já as enterotoxinas são produzidas durante a fase exponencial de crescimento, nos estágios iniciais da esporulação.

Portanto, esta pesquisa revelou a prevalência nos isolados amazônicos de *B. thuringiensis* dos genes *bceT*, *hblA*, *hblD*, *hblC*, *nheA*, *nheB* e *nheC*, codificadores das enterotoxinas BceT, HBL e NHE, respectivamente.

## 9. Agradecimentos

Os autores são gratos aos Professores Doutores: Patrícia Puccinelli Orlandi e Wanderli Pedro Tadei membros ordinários que compuseram a Banca de Defesa de Dissertação de Mestrado de Marcos César Fernandes Pessoa, por suas sugestões à forma final deste texto.

## 10. Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

## 11. Referências

AGATA, N., OHTA, M., ARAKAWA, Y., MORI, M. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. ***Microbiology***, 141: 983-988, 1995.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. ***Biologia Molecular da Célula***. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed. 1997. 1294p.

AL-KHATIB, M. S., KHYAMI-HORANI, H., BADRAN, E., SHEHABI, A. A. Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates associated with diarrhea. ***Diagnostic Microbiology and Infectious Disease***, 59: 383-387, 2007.

ARAUJO-COUTINHO, C. J. P. C., BERNARDINO, T. C., PIRES, E. S., ESCH, L. V. S., VIVIANI, A. B. P., CAVADOS, C. F. G. Investigation of biota associated and natural infection by sporulated bacteria in Culicidae larvae from São Paulo state, Brazil. ***Journal of Invertebrate Pathology***, 107: 11-15, 2011.

ARONSON, A.I., BECKMAN, W., DUNN, P. *B. thuringiensis* and related insect pathogens. ***Microbiol. Rev.***, 50 (1): 1-24, 1986.

ARONSON, A. I., SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. ***FEMS Microbiology Letters***, 195 (1): 1-8, 2001.

ARSLAN, S., EYI, A., KÜÇÜKSARI, R. Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. ***Anaerobe***, 25: 42-46, 2014.



- ASANO, S. I. *et al.* Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (3): 1054-1057, 1997.
- BEECHER, D. J., MacMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, 59: 1778-1784, 1991.
- BEECHER, D. J., WONG, A, C. L. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, 62 (3): 980-986, 1994.
- BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L., WONG, A. C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infec. Immun.**, 63: 4423-4428, 1995.
- BERLINER, E. Ueber die schlafsucht der *Ephestia kuhniella* und *Bac. thuringiensis* n. sp. **Z. Angew. Entomol.**, 2: 21-56, 1915.
- BRAVO *et al.* Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (12): 4965-4972, 1998.
- BRILLARD, J., LERECLUS, D. Comparison of cytotoxin *cytK* promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *B. cereus* food-poisoning strain. **Microbiology**, 150: 2699-2705, 2004.
- BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.
- BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 8ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins (eds.), 1974. 1246p.
- CÂMARA, Sônia Aparecida Viana. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado do Mato Grosso do Sul, no período de 1998-2001**. 2002. 79 f. Monografia de Especialização em Gestão em Saúde. Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande.
- CAROZZI, N. B., KRAMER, V.C., WARREN, G. W., EVOLAS, S., KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *B. thuringiensis* strains by polymerase chain reaction profiles. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 3057-3061, 1991.
- CERON, J., ORTIZ, A., QUINTERO, R., GUERECIA, L., BRAVO, A. Specific PCR primers direct to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *B. thuringiensis* collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: 3826-3831, 1995.
- CHAK, K. F., CHOW, C. D., KAO, K. K., FENG, T. Y. Determination and distribution of *cry*-type genes of *B. thuringiensis* isolate from Taiwan. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 2415-2420, 1994.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62 (3): 807-813, 1998.
- DAFFONCHIO, D., CHERIF, A., BORIN, S. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers described genetic relationships in the *Bacillus cereus* group. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66: 5460-5468, 2000.
- DANSON, J. W., KIMANI, M., MBOGORI, M. Detection of *Bacillus thuringiensis* genes in transgenic maize by the PCR method and FTA paper technology. **African Journal of Biotechnology**, 5 (22): 2345-2349, 2006.
- DU, C., MARTIN, P. A. W., NICKERSON, K. W. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and non-insecticidal *B. thuringiensis* protein crystal. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 3847-3853, 1994.
- EHLING-SCHULZ *et al.* Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. **Microbiology**, 151: 183-197, 2005.
- EHLING-SCHULZ, M., GUINEBRETIERE, M. H., MONTHAN, A., BERG, O., FRICKER, M., SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxin and emetic *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 60: 232-240, 2006.



- 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**, 154: 693-704, 2008.
- GAZIT, E., SHAI, Y. The assembly and organization of the organization of the  $\alpha$ -5 and  $\alpha$ -7 helices from pore-forming domain of *B. thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. **J. Biol. Chem.**, 270: 2571-2578, 1995.
- GHELARDI, E., CELANDRONI, F., SALVETTI, S., BARSOTTI, C., BAGGIANI, A., SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, 208: 129-134, 2002.
- GHELARDI, E., CELANDRONI, F., SALVETTI, S., FISCARELLI, E., SENESI, S. *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. **Microbes and Infection**, 9: 591-598, 2007.
- GRANUM, P. E., ANDERSSON, A., GAYTHER, C., TEGIFFEL, M., LARSEN, H., LUND, T., O'SULLIVAN, K. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 141: 145-149, 1996.
- GRANUM, P. E., O'SULLIVAN, K., LUND, T. The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, 177: 225-229, 1999.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. Symposium Series - **Society for Applied Bacteriology**. 61S-66S, 1994.
- GUAYCURUS; T. V., FREITAS J. P., RABINOVITCH, L., VICENTE. M. M. A. Resultados preliminares sobre a incidência de *Bacillus cereus* em alimentos industrializados. **Ciência & Cultura, supl.** 35: 3-4, 1983.
- GUAYCURUS; T. V., SIMONE S. G., RABINOVITCH L. Isolamento parcial de enterotoxinas de sobrenadantes de cultura de *Bacillus cereus*. **Ciência & Cultura, supl.**, 34 (7): 7-8, 1987.
- GUAYCURUS, T. V., RABINOVITVH, L., VAECK, M., BARJAC, H. de. Isolamento de *B.thuringiensis* de solos brasileiros. **IN: Anais do 1º Simpósio de Controle Biológico**, Rio de Janeiro, 1988.
- GUINEBRETIERE, M.-H., BROUSSOLLE, V., NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 40 (8): 3053-3056, 2002.
- GUTTMANN, D. M., ELLAR, D. J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. **FEMS Microbiology Letters**, 188: 7-13, 2000.
- HAN et al. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, 188 (9): 3382-3390, 2006.
- HANSEN, B. M., HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 (1): 185-189, 2001.
- HEINRICH, J. H., BEECHER, D. J., MACMILLAN, J. D., ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, 175: 6760-6766, 1993.
- ISHIWATA, S. On a type of severe flacherie (sotto disease). **Dainihon Sanshi Kaiho**, 114: 1-5, 1901 (Original in Japanese).
- JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.
- JEßBERGER, N., DIETRICH, R., BOCK, S., DIDIER, A., MÄRTLBAUER, E. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. **Toxicon**, 77: 49-57, 2014.
- JENSEN, G. B., LARSEN, P., JACOBSEN, B. L., MADSEN, B., WILCKS, A., SMIDT, L., ANDRUP, L. Isolation and characterization of *Bacillus cereus*-like bacteria from faecal samples from greenhouse workers who are using *Bacillus thuringiensis*-based



- insecticides. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, 75: 191-196, 2002.
- KAO, S. S., HSIEH, F. C., TZENG, C. C., TSAI, Y. S. Cloning and expression of the insecticidal crystal protein gene *cry1Ca9* of *Bacillus thuringiensis* G10-01A from Taiwan granaries. **Current Microbiology**, 47: 295-299, 2003.
- KIM, B., BANG, J., KIM, H., KIM, B-S., BEUCHAT, L. R., RYU, J-H. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: Prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. **Food Microbiology**, 42: 89-94, 2014.
- KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *B.thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.**, 24: 275-308, 1994.
- KOTIRANTA, A., LOUNATMAA, K., HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, 2: 189-198, 2000.
- KUBOTA, Y., OHGUSHI, A., UEMORI, A., MIZUKI, E., OHBA, M. Identification of two haemolysins in larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the bean bug, *Riptortus clavatus*. **J. Appl. Entomol.**, 130 (3): 183-189, 2006.
- KUO, W.-S., CHAK, K.-F. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-Amplified DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (4): 1369-1377, 1996.
- LIGHTWOOD, D. J., ELLAR, D. J., JARRETT, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66 (12): 5174-5181, 2000.
- LINDBÄCK, T., FAGERLUND, A., RODLANDT, M. S., GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. **Microbiology**, 150: 3959-3967, 2004.
- LUND, T., GRANUM, P. E. Characterization of a nonhaemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiol. Lett.**, 141: 151-156, 1996.
- MADEGOWDA, M., ESWARAMOORTHY, S., BURLEY, S. K., SWAMINATHAN, S. X-ray crystal structure of the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Proteins**, 71 (2): 534-540, 2008.
- MÄNTYNEN, V., LINDSTRÖM, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (5): 1634-1639, 1998.
- MAXAM, A. M., GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74 (2): 560-564, 1977.
- McKILLIP, J. L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. **Antonie van Leeuwenhoek**, 77: 393-399, 2000.
- MENDES, R. A., AZEREDO, R. M. C., COELHO, A. I. M., OLIVEIRA, S. S., COELHO, M. do S. L. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição**, 17 (2): 255-261, 2004.
- MINNAARD, J., HUMEN, M., PÉREZ, P. F. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cells. **J. Food Protec.**, 64 (10): 1535-1541, 2001.
- MINNAARD, J., DELFEDERICO, L., VASSEUR, V., HOLLMANN, A., ROLNY, I., SEMORILE, L., PÉREZ, P. F. Virulence of *Bacillus cereus*: a multivariate analysis. **International Journal of Food Microbiology**, 116: 197-206, 2007.
- MOLVA, C., SUDAGIDAN, M., OKUKLU, B. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. **Food Control**, 20: 829-834, 2009.
- MOSS, M. O. Microbial Food Poisoning. *In: Assays in agricultural and food microbiology*. Norris, J. R. & Pettipher, G. L. (eds): New York, 369-399, 1987.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, 155: 335-350, 1987.





- NOTERMANS, S., BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.**, 84: 51S-61S, 1998.
- OMBUI, J. N., SCHMIEGER, H., KAGIKO, M. M., ARIMI, S. M. *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. **FEMS Microbiology Letters**, 149: 245-248, 1997.
- PANG, J-C., CHEN, M-L., HO, Y-C., YANG, C-Y., TZENG, C-C., KAO, S-S., TSEN, H-Y. Effect of fermentation conditions on the enterotoxigenicity, cytotoxicity and pesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Taiwan. **Bioresource Technology**, 101: 1871-1876, 2010.
- PERANI, M., BISHOP, A. H., VAID, A. Prevalence of  $\beta$ -exotoxin, diarrhoeal toxin and specific  $\delta$ -endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 160: 55-60, 1998.
- PINTO, A. F. M. A. Papel dos microrganismos na produção e na transformação de alimentos. **Terra Fértil**, 1: 55-61, 1996.
- POLANCZYK, R. A., ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Agrociência**, 7 (2): 1-10, 2003.
- POLANCZYK, R. A., SILVA, R. F. P. da; FIUZA, L. M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solo e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista Brasileira de Agrociência**, 10 (2): 209-214, 2004.
- PORCAR, M., JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, 26 (5): 419-432, 2003.
- RICE, W. C. Specific primers for the detection of *vip3A* insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. **Letters in Applied Microbiology**, 28: 378-382, 1999.
- RYAN, P. A., MACMILLAN, J. D., ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, 179: 2551-2556, 1997.
- SAMAPUNDO, S., HEYNDRICKXS, M., XHAFERY, R., DEVLIEGHIERE, F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, 150: 34-41, 2011.
- SANGADALA, S. F., ENGLISH, L. H., ADANG, M. J. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *B. thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, 269: 10088-10092, 1994.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74 (12) 5463-5467, 1977.
- SANTOS, C. A., ALMEIDA, F. S., GUIMARÃES, A. G., ABRAHÃO, W. M., ARANTES, O. M. N., VILAS-BÔAS, G. T. RE-PCR variability and toxigenic profile of food poisoning, foodborne and soil-associated *Bacillus cereus* isolated from Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 151: 277-283, 2011.
- SERGEEV, N., DISTLER, M., VARGAS, M., CHIZHIKOV, V., HEROLD, K. E., RASOOLY, A. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. **Journal of Microbiological Methods**, 65: 488-502, 2006.
- SHINAGAWA, K., SUGIYAMA, J., TERADA, T., MATSUSAKA, N., SUGII, N. Improved methods for purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, 80: 1-6, 1991.
- SONG, F. et al. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (9): 5207-5211, 2003.
- SWAMINATHAN, S., FUREY, W., PLETCHER, J., SAX, M. Residues defining V beta specificity in staphylococcal enterotoxins. **Nat. Struct. Biol.**, 2 (8): 680-686, 1995.



THAENTHANE, S., WONG, A. C. L., PANBANGRED, W. Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, 105: 203-212, 2005.

TOJO, A., AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by gut juice protease of the

silkworm *Bombyx mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, 45 (2): 576-580, 1983.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2000, 827 p.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, 586 p.