



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química



Evaluación de $tRNA^{Cys}$ - PCR como
método alternativo para la detección de
Bacillus cereus sensu lato

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de
Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

EHDL María de los Angeles Barrios Sánchez

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Codirector:

Dr. José Luis Hernández Flores

Santiago de Querétaro, Qro.

Abril 2022

Universidad Autónoma de Querétaro

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de concluir la maestría y enseñarme a disfrutar cada día de mi vida

A mis madres por su apoyo que me permitió seguir adelante con este sueño.

A mis amadas hijas por sus palabras, por su motivación y respaldo; por ser eje y motor en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco profundamente al Dr. Juan Campos por brindarme la posibilidad de trabajar bajo su tutela el proyecto de la maestría, junto con el Dr. José Luis y permitirme desarrollar otras habilidades mediante su asesoría, orientación y retroalimentación.
- Agradezco a todo mi comité, por su disposición, asesoría y retroalimentación constante; por sus observaciones y recomendaciones para formarme académicamente.
- A la M. en C. Erika Álvarez H. por su ayuda y disposición durante la fase experimental.
- A todos mis catedráticos de la Maestría en Química Clínica Diagnóstica de la Facultad de Química, por su paciencia, por compartir sus conocimientos y su apoyo durante el curso.
- Al M.I.M David Gustavo García Gutiérrez por escucharme y su respaldo constante para no claudicar.
- A la Universidad Autónoma de Querétaro por el financiamiento otorgado mediante el proyecto Del Fondo “Química Somos Todos” para la realización del presente proyecto.
- A la Universidad Autónoma de Querétaro por EDUCARME EN LA VERDAD Y EN EL HONOR.
- Al Dr. Adolfo Escamilla Esquivel y al Ing. Francisco Javier Escamilla López por su apoyo.
- Al Dr. Enrique Arturo García Tovar por su apoyo, respaldo y asesorías en el área de Matemáticas para mi examen CENEVAL.

Índice

Índice	- 4 -
Índice de figuras	- 6 -
Índice de tablas	- 7 -
Resumen	- 9 -
Abstract	- 10 -
I. Introducción	- 11 -
Justificación	- 13 -
II. Antecedentes	- 14 -
2.1. Taxonomía del grupo <i>B. cereus sensu lato</i>	- 14 -
2.1.1.1 <i>Bacillus cereus</i> s.s.....	- 15 -
2.1.1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	- 17 -
2.1.1.3 <i>Bacillus anthracis</i>	- 17 -
2.1.1.4 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	- 17 -
2.1.1.5 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	- 18 -
2.1.1.6 <i>Bacillus toyonensis</i>	- 18 -
2.1.1.7 <i>Bacillus mycoides</i>	- 18 -
2.1.1.8 <i>Bacillus wiedmannii</i>	- 19 -
2.1.1.9 <i>Bacillus clarus</i>	- 19 -
2.2. Relevancia e importancia clínica del grupo <i>B. cereus sensu lato</i>	- 20 -
2.2.1 Panorama infeccioso de <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	- 21 -
2.2.1.2 Enfermedades gastrointestinales.	- 23 -
2.2.1.3 Enfermedades no gastrointestinales.	- 24 -
2.2.1.4 Factores de virulencia del grupo <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	- 26 -
2.2.1.5 Mecanismos de patogenicidad y respuesta inmune.	- 30 -
2.2.1.6 Respuesta a antibióticos de <i>B. cereus sensu lato</i>	- 32 -
2.3. Detección de <i>Bacillus cereus</i> en muestras clínicas	- 33 -
2.3.1 Métodos de Identificación fenotípicos.....	- 34 -
2.3.1.1 Pruebas Fenotípicas Primarias/Secundarias.....	- 35 -
2.3.1.2 Métodos moleculares empleados para la identificación bacteriana.....	- 37 -
2.3.1.3 Relaciones filogenéticas.....	- 39 -
2.4 RNA de transferencia	- 40 -
2.4.1. Estructura de los <i>tRNA</i>	- 41 -
2.4.2. Funciones de los <i>tRNA</i>	- 44 -
2.4.3. Organización de los genes del <i>trna</i>	- 44 -
2.4.4 <i>trna-cys</i>	- 47 -
2.4.5 <i>tRNA</i> y filogenia	- 49 -

III. Hipótesis	- 51 -
IV. Objetivos	- 52 -
Objetivo General	- 52 -
Objetivos Específicos.....	- 52 -
V. Metodología	- 53 -
5.1 Diseño experimental.....	- 53 -
5.1.2. Universo.....	- 53 -
5.1.3. Tipo de Muestreo	- 53 -
5.1.4. Definición de las Unidades de Observación.....	- 53 -
Criterios de Inclusión.....	- 53 -
Criterios de Exclusión.....	- 54 -
Control.....	- 54 -
5.1.5 Descripción operacional de las variables de la hipótesis	- 54 -
5.2 Muestra y aislamiento.....	- 54 -
5.3 Análisis <i>in silico</i> de la región genómica asociada al gen <i>trna-cys</i>.....	- 55 -
5.3.1. Análisis <i>in silico</i> del número de isoaceptores.	- 55 -
5.3.2. Análisis <i>in silico</i> de genes presentes en la región genómica asociada al <i>trna-cys</i> río abajo.	- 55 -
5.4 Evaluación de la funcionalidad de la estrategia molecular de la PCR a partir de la región genómica asociada al gen <i>trna-cys</i>.....	- 56 -
5.4.1. Condiciones de amplificación	- 56 -
5.5 Análisis Filogenético	- 57 -
VI. Resultados y discusión.....	- 58 -
6.2 Determinación del número de genes <i>trna</i> en especies del género <i>Bacillus</i>-	58
6.3 Organización y estructura de la región genómica asociada al <i>trna-cys</i>...	- 59 -
6.4 Detección de la región genómica <i>trnacys</i> - <i>yebCIPmpR</i>.....	- 62 -
6.5 Filogenia de los aislados.....	- 64 -
VII. Conclusiones	- 66 -
VIII. Referencias	- 69 -

Índice de figuras

Figura 1 Mecanismos de patogenicidad de <i>Bacillus cereus</i> y respuesta inmune.	- 32 -
Figura 2 Esquema de la estructura del <i>tRNA</i>	- 41 -
Figura 3 Procesamiento del <i>tRNA</i>	- 43 -
Figura 4 Distribución de organismos con y sin unidades de matriz en diversos filos y específicamente <i>Firmicutes</i>	- 46 -
Figura 5 Localización del gen <i>trna-cys</i> en la cepa <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876.	- 47 -
Figura 6 Estructura típica y consenso de <i>trna-cys</i> presente en miembros del grupo <i>Bacillus cereus</i>	- 48 -
Figura 7 Distribución y número de copias de <i>trnas</i> presentes en diferentes genomas del género <i>Bacillus</i>	- 59 -
Figura 8 Esquema gráfico y árbol filogenético de la región genómica asociada al gen <i>trna-cys</i> en diferentes especies de <i>Bacillus</i>	- 60 -
Figura 9 Análisis de la región genómica asociada al <i>trna-cys</i> en <i>B. cereus</i> s.l.	- 61 -
Figura 10 Visualización de los amplicones obtenidos por electroforesis en gel de agarosa.....	- 63 -
Figura 11 Electroforesis de los productos de amplificación de DNA de los aislados bacterianos de análisis	- 63 -
Figura 12 Filograma circular que representa las relaciones filogenéticas de los amplicones obtenidos dentro del grupo de <i>B. cereus sensu lato</i>	- 65 -

Índice de tablas

Tabla 1 Características de los 7 grupos filogenéticos conforme a requerimientos de temperatura.	- 15 -
Tabla 2 Factores de virulencia identificados en <i>Bacillus</i>	- 26 -
Tabla 3 Producción de factores de virulencia por especies del grupo de <i>B. cereus s.l.</i>	- 28 -
Tabla 4 Características fenotípicas de algunos miembros del grupo de <i>B. cereus s.l.</i> -	- 35 -
Tabla 5 Variables	- 54 -

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Resumen

Los microorganismos pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus sensu lato* (*B. cereus s.l.*) se caracterizan por ser formadores de esporas altamente resistentes al calor, actividad lecitinasa y ausencia de fermentación de manitol; el medio ampliamente utilizado para su detección es el agar manitol egg yolk-polymixin (MYP) pero su selectividad es escasa. El diagnóstico microbiológico se basa en pruebas fenotípicas, sin embargo, existen diversas variantes atípicas, que dificultan la identificación, siendo esta solo a nivel presuntivo. Al considerar los factores de virulencia, pueden ser expresados o no; así, la identificación de toxinas tampoco es concluyente. Por lo cual es relevante contar con una prueba que confirme la presencia del agente etiológico de manera rápida y confiable. Considerando que los *tRNA* son moléculas esenciales en la traducción del código genético y qué filogenéticamente pueden ser usados para categorizaciones taxonómicas, en este trabajo se evaluó el gen *trna-cys* en una prueba de PCR para la detección y diferenciación de miembros del grupo *B. cereus sensu lato*. A partir de las bases de datos disponibles se evaluó *in silico* la región genómica asociada río abajo del gen *trna-cys*, encontrando que la mayoría de los miembros del grupo de *B. cereus s.l.* presenta una sola copia del isoceptor en su genoma y que la región de estudio difiere de otras especies del género *Bacillus*. El análisis por PCR punto final de los aislados bacterianos y de la cepa control *Bacillus cereus* ATCC 10876, demostró la efectividad de la estrategia molecular para la detección de colonias fenotípicamente sospechosas pertenecientes al grupo de *B. cereus s.l.* El análisis filogenético de las secuenciaciones de los amplicones obtenidos por PCR confirmó la relación taxonómica de las cepas presuntivas, por lo que el resultado permitió corroborar nuestra hipótesis que es posible utilizar la región genómica asociada al gen *trna-cys* del grupo *Bacillus cereus sensu lato* como un método molecular adicional para la detección de miembros del grupo de *B. cereus s.l.*

Palabras clave: *Bacillus cereus*, infecciones gastrointestinales y no gastrointestinales, patogenicidad, *trna-cys*, filogenia.

Abstract

The *Bacillus cereus sensu lato* group is characterized by being highly heat resistant spore formers, lecithinase activity and absence of mannitol fermentation; the medium used for its detection is egg yolk-polymyxin (MYP) agar, however its selectivity is low. The microbiological diagnosis is based on phenotypic test, however, there are several atypical variants, which make identification difficult, this being only at the presumptive level. When considering virulence factors, they may or not be expressed; thus, the identification of toxins is also not conclusive. Therefore, it is relevant to have a test that confirms the presence of the etiological agent quickly and reliably. Considering that tRNAs are essential during traduction of genetic code and that phylogenetically are used for taxonomic propose, in this work the *trna-cys* gene was evaluated for the identification and differentiation of the *B. cereus sensu lato* group. From the databases, the genomic region associated downstream of the *trna-cys* gene was evaluated in silico, finding that most of the available members of the *B. cereus s.l.* group present in their genome a single copy of the isoacceptor and that the study region differs from other *Bacillus* species. The analysis of bacterial isolates and control strain *B. cereus* ATCC 10876 by end-point PCR demonstrated the effectiveness of the molecular strategy for the identification of species belonging to *B. cereus s.l.* group. The phylogenetic analysis of the amplicons sequenced obtained by PCR confirmed the relevance of the presumptive strains, so the resulting corroborates our hypothesis that is possible to use the genomic region associated with the *trna-cys* gene of the *B. cereus s.l.* group as a complementary molecular method for the detection of the group *B. cereus s.l.*

Key words: *Bacillus cereus*, healthcare associated infections, pathogenicity, *trna-cys*, phylogeny

I. Introducción

El grupo de *Bacillus cereus sensu lato* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, es versátil en cuanto a requerimientos de oxígeno, temperatura y pH para su crecimiento (Ehling-Schulz et al., 2015). Morfológicamente son bacilos Gram positivos formadores de endosporas altamente resistentes al calor y a la desecación (Vilas-Bôas et al., 2007), lo que les permite sobrevivir a condiciones ambientales adversas. Vertebrados, insectos y nemátodos son hospederos de *B. cereus s.s.*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* (Méric et al., 2018); desarrollando relaciones simbióticas como microbiota intestinal de insectos y mamíferos; sin embargo, también es posible que generen patologías muy variables dependiendo de factores de virulencia del microorganismo y de la respuesta inmune del huésped (Ceuppens et al., 2013).

Las infecciones no gastrointestinales producidas por *B. cereus sensu stricto* se asocian a pacientes con antecedentes de heridas quirúrgicas o traumáticas, pacientes adictos, pacientes con leucemia o por catéteres intravasculares (Messelhäußer y Ehling-Schulz, 2018); las principales afecciones descritas son: bacteriemia (Akamatsu et al., 2019; Cheng et al., 2017; Hernaiz et al., 2003) endoftalmitis (Mursalin et al., 2020b), neumonía, endocarditis (Barraud y Tisné, 2019), meningitis, encefalitis (Drazin et al., 2010), infecciones de piel (Veysseyre et al., 2015), lesiones cutáneas tipo ántrax (Saikia et al., 2019), neumonía necrotizante (Leung et al., 2019); además de la posible correlación con bacteriemia posparto (Xaplanteri et al., 2019).

Existen pocos estudios sobre la incidencia real de las infecciones por *B. cereus* asociadas a la atención sanitaria, así como de las características genéticas y fenotípicas de las cepas. (Glasset et al., 2018). Es importante considerar a *B. cereus* como un patógeno emergente subestimado que puede estar implicado en enfermedades mortales asociadas a la atención sanitaria en neonatos prematuros (Lotte et al., 2017).

Las definiciones de especies actuales no contemplan incongruencias existentes entre especies y fenotipos lo que puede conducir a clasificaciones erróneas (Carroll et al., 2020) y diagnósticos equívocos. La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (Bou et al., 2011), enfatiza la relevancia de contar con muestras de calidad analítica; así como la aplicación de una metodología precisa, que permita

identificar microorganismos patógenos u oportunistas asociados a infecciones, de tal manera que el diagnóstico y tratamiento adecuado de una infección se basa en la identificación oportuna del agente etiológico que produce la patología.

La identificación fenotípica del grupo de *B. cereus s.l.* es solo a nivel presuntivo, en ocasiones existen cepas atípicas con gran variabilidad (Tallent et al., 2012), por lo que es necesario incrementar la batería de pruebas bioquímicas para su identificación lo que conlleva más tiempo, sin identificación a nivel de especie.

Es por ello por lo que se han implementado diversas metodologías moleculares para su identificación, dentro de ellas se encuentra la secuenciación del gen *16S rDNA*; sin embargo, debido a su alta similitud filogenética dentro del grupo se dificulta su diferenciación, por lo que se combina con secuenciación de genes de toxinas (que pueden variar o no siempre estar presentes). De igual manera se han hecho estudios con sistemas basados en espectrometría de masas MALDI-TOF; pero tampoco han permitido la identificación de microorganismos muy relacionados entre sí, como es el caso del grupo de *B. cereus s.l.* además, hay que considerar que el equipo es de alto costo. Existen pruebas automatizadas para la identificación de Bacterias Gram Positivas en hemocultivos, basadas en microarreglos, pero no incluyen en su panel al grupo de *B. cereus s.l.*

Por lo que en el presente proyecto se desarrolló un método molecular basado en el gen *trna-cys* como método alternativo para la detección de *Bacillus cereus s.l.* en el diagnóstico molecular. Considerando que es un gen altamente conservado y presenta una sola copia en el genoma de especies del grupo de *B. cereus s.l.*

A partir del análisis *in silico* de la región genómica asociada al gen *trna-cys* de copia única, se realizó la amplificación de la región de estudio en aislados bacterianos presuntivos usando como control la cepa *B. cereus* ATCC 10876, para posteriormente secuenciarlos. La comparación de las secuenciaciones obtenidas con genomas de referencia permitió realizar un análisis filogenético de las cepas positivas y establecer su relación taxonómica con el grupo de *B. cereus s.l.*

Justificación

Algunos miembros pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus* se han correlacionado a infecciones gastrointestinales y no gastrointestinales, de carácter local o sistémico (Khan et al., 2015), presentes principalmente en pacientes con antecedentes de heridas traumáticas, inmunocomprometidos o con adicciones (Messelhäußer y Ehling-Schulz 2018). Sin embargo son contados los estudios sobre la incidencia real de por *B. cereus* en IAAS; así como de las características genéticas y fenotípicas de las cepas (Glasset et al., 2018). Un estudio reciente demuestra la producción y el potencial trombolítico de una nueva proteasa fibrinolítica termoestable dependiente de tiol en *B. cereus* RSA1 (Sharma et al., 2019) ampliando los alcances patológicos descritos. Se han propuesto diferentes estrategias para la identificación y diferenciación del grupo de *B. cereus*, como son la secuenciación del gen *16S rDNA*, pero la resolución de los diferentes genes *16S rDNA* dentro del género *Bacillus sensu lato* está lejos de ser clara (Draganic et al., 2017). La estrecha similitud filogenética en el grupo de *B. cereus* dificulta su discriminación mediante secuencias de rRNA (Bavykin et al., 2004). Los sistemas basados en espectrometría de masas MALDI-TOF no permiten la identificación de microorganismos muy relacionados entre sí, además cultivos jóvenes o mixtos o inexistencia del microorganismo en la base de datos interfieren en el resultado de la señal del espectro; aunado a lo anterior el equipo es de alto costo (Mansilla et al., 2019) .

También se han realizado análisis de longitud de fragmentos amplificados con fluorescencia y detección de genes de toxinas; pero ninguno conduce a una diferenciación concluyente de los miembros del grupo (Hernández et al., 2020). Considerando pautas internacionales: La Declaración de la Alianza Mundial contra la Resistencia a antibióticos en su acción 5 resalta la importancia del "...uso apropiado de pruebas diagnósticas existentes y el desarrollo e implementación de nuevas pruebas de diagnóstico... rápido para ayudar a los médicos a evitar tratamientos innecesarios, a elegir con rapidez terapias dirigidas adecuadas e informar de la duración del tratamiento" (Carlet, 2014). El gen del *trnA-cys* es un gen altamente conservado y presenta una sola copia en el genoma de diversas especies del grupo de *B. cereus*, por lo que podría ser un método alternativo para la detección de miembros del grupo de *B. cereus s. l.* en aislados bacterianos presuntivos con alto potencial para el diagnóstico clínico molecular.

II. Antecedentes

2.1. Taxonomía del grupo *B. cereus sensu lato*

El grupo de *Bacillus. cereus sensu lato* pertenece al género “*Bacillus*” dentro de la familia *Bacillaceae*, orden *Bacillales*, Clase *Bacilli*, Filo *Firmicutes*; son Gram positivos en forma de bastón, rectos o curvos individuales o en cadenas cortas, anaeróbicos facultativos (Patiño-Navarrete y Sanchis, 2017) y formadores de endosporas altamente resistentes al calor, con crecimiento en un amplio rango de pH y resistente a la desecación (Vilas-Bôas et al., 2007); también son capaces de soportar concentraciones de NaCl hasta del 7% (Sánchez et al., 2016). Dichas características le permiten a este grupo sobrevivir a condiciones ambientales adversas incluyendo procesos industriales como la pasteurización y la radiación gamma (Kotiranta et al., 2000); son multifacéticos con ciclos de vida saprófitos en el suelo (Ceuppens et al., 2013) y agua; por lo que su hábitat es muy amplio incluye suelo, sedimentos de agua, polvo, plantas, animales y ambientes de producción alimentaria (Chang et al., 2017).

El grupo de *B. cereus s.l.* actualmente contiene 19 especies (Méndez et al., 2020) publicadas, incluyendo las primeras especies descritas y reconocidas: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides*, *B. mycooides*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. wiedmannii* (Miller et al., 2016); otras especies nuevas propuestas son: *B. albus*, *B. luti*, *B. mobilis*, *B. nitratireducens*, *B. pacificus*, *B. paramycooides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. tropicus* (Liu et al., 2017b), además de las especies efectivas (Propuesto en una publicación revisada por pares como miembro potencial del grupo *B. cereus* pero no reconocido oficialmente como una especie publicada). *B. gaemokensis* (Jung et al., 2010), *B. manliponensis* (Jung et al., 2011) *B. bingmayonensis* (Liu et al., 2014) y *B. clarus* (Méndez et al., 2020).

Las temperaturas de crecimiento del grupo varía de 4°C a 48°C; con citotoxicidad igualmente variable (Tabla 1) (Guinebretière et al., 2008).

Tabla 1 Características de los 7 grupos filogenéticos conforme a requerimientos de temperatura.

Grupo	Especies incluidas	Clasificación bacteriana por temperatura de crecimiento	Rango de Temperatura de crecimiento	Citotoxicidad
I	<i>B. pseudomycooides</i>	Mesofílica	10 – 43°C	Negativa o débil
II	<i>B. thuringiensis II</i> <i>B. cereus II</i>	Mesofílica y psicotolerante	7 – 40°C	Citotoxicidad variable
III	<i>B. thuringiensis III</i> <i>B. anthracis</i>	Mesofílica	15 – 45°C	La mayoría alta citotoxicidad
IV	<i>B. thuringiensis IV</i> <i>B. cereus IV</i>	Mesofílica	10 – 45°C	La mayoría alta citotoxicidad
V	<i>B. thuringiensis V</i> <i>B. cereus V</i>	Intermedio	8 – 40°C	Pueden contener citotoxicidad
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. thuringiensis</i>	Psicotolerante	5 – 37°C	No citotóxico o débilmente
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	Termotolerante	20 – 50°C	Alta citotoxicidad

Guinebretiere et al., (2008, 2010).

Cepas de microorganismos mesofílicos del grupo de *B. cereus*, usan mecanismos de estrés para crecer a baja temperatura; la cepa BCG^T exhibió incremento en la asimilación de azufre, inducción de biosíntesis de glutatión y cisteína y la sobrerregulación en la biosíntesis de ácidos grasos en cepas sometidas a condiciones bajas de temperatura (Park et al., 2021).

2.1.1.1 *Bacillus cereus* s.s.

B. cereus s.s. comúnmente llamado *B. cereus* (Ramarao et al., 2020) posee las características de su grupo, es un microorganismo Gram positivo mesofílico, con rango de crecimiento de 10 a 48°C, posee flagelos peritricos, pili y una proteína de membrana externa llamada capa S que cubre toda la superficie del organismo (Mursalin et al., 2020) constituyendo la capa más externa de su pared celular (Bottone, 2010); crece en medio sólido como colonias irregulares, utiliza glucosa pero no manitol, hidroliza el almidón y la gelatina, muestra actividad hemolítica, es resistente a ampicilina con marcada actividad lecitinasa (Kotiranta et al., 2000).

Al considerar sus formas de vida, se puede encontrar como células vegetativas (expresan la proteína S) o esporas; como esporas facilitan la unión a células epiteliales humanas considerándose un posible mecanismo de virulencia (Kotiranta et al., 2000).

Al ser una bacteria ampliamente distribuida en el aire, agua, polvo, suelo y otros ambientes, exhibe un amplio rango de hospedadores y diferentes grados de virulencia (Guo et al., 2020); como microorganismo móvil, puede exhibir dos formas alternativas de motilidad: swimming (movimiento rotatorio individual) y swarming (movimiento organizado y colectivo de células) dependiendo si la bacteria se cultiva en medios líquidos o sólidos; sin embargo no exhiben la fase de consolidación como otras bacterias con motilidad swarming (Celandroni et al., 2002). Produce gran variedad de biopelículas como proceso adaptativo a diversos ambientes, secretando dentro de ellas metabolitos tensoactivos, bacteriocinas, enzimas y toxinas (Majed et al., 2016).

Existen diversos mecanismos mediante los cuales *B. cereus* s.s puede adaptarse a diversos ambientes; ante al estrés por frío y soluciones salinas aumenta la fluidez de la membrana al alterar la composición de ácidos grasos (Duport et al., 2016). Para crecer y producir factores de virulencia en el intestino debe adaptar su metabolismo y proteoma en respuesta a los cambios de disponibilidad de oxígeno; se enfrenta a condiciones oxigénicas en zonas adyacentes a la superficie de la mucosa y anóxicas en el lumen intestinal; el factor de transcripción Rex es regulador clave en la fermentación anaeróbica, respiración aeróbica, resistencia a especies reactivas de oxígeno (ROS) y toxinogénesis modulando el proteoma celular y extracelular (Laouami et al., 2014).

Respecto al estrés ácido del pH gástrico *B. cereus* s.s. se adapta a partir de cuatro respuestas: la primera es general a través del factor alternativo σ^B que promueve la expresión de 30 genes para proteger a la célula contra condiciones adversas; La segunda implica mantener la homeostasis de pH por el sistema *napA* para exportar H⁺ y la descarboxilasa de aminoácidos que consume protones y produce CO₂; la tercera son las modificaciones metabólicas principalmente arreglos en las rutas fermentativas con producción de álcali y finalmente el cuarto mecanismo es la respuesta secundaria al estrés oxidativo con producción de superóxido dismutasa, catalasa y tiorredoxinas. (Desriac et al., 2013).

2.1.1.2 *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis, es una bacteria ubicua, se ha aislado en todo el mundo de diversos ecosistemas como suelo, agua, insectos, polvos de silos, hojas de árbol, coníferas así como de tejidos humanos con necrosis grave; caracterizada por su capacidad de producir inclusiones cristalinas visibles durante su fase de esporulación, que contienen una o más endotoxinas δ con actividad insecticida, codificadas en genes *cry* y que son activas contra larvas de insectos; también produce proteínas Cyt codificadas principalmente en plásmidos, también con actividad insecticida y sinérgica con otras proteínas Bt (Palma et al., 2014), ocasionalmente este microorganismo se ha encontrado como causante de infecciones similares a *B. cereus* s.s. (Böhm et al., 2015). En placa presentan morfología de colonias circulares a irregulares con bordes enteros u ondulados, tienen texturas de superficie mate a granular (Fun et al., 2016).

2.1.1.3 *Bacillus anthracis*.

Por su parte *B. anthracis* es el agente etiológico del ántrax, enfermedad mortal aguda entre los mamíferos (Hoffmaster et al., 2004), la virulencia se desarrolla mediante una cápsula y dos toxinas tipo AB: el factor letal LF y el factor edema EF, además posee dos megaplásmidos que codifican las unidades proteicas que conforman la toxina del ántrax y la cápsula poli γ – D – glutámica (Sánchez et al., 2016).

2.1.1.4 *Bacillus cytotoxicus*

B. cytotoxicus se caracteriza por su termotolerancia (confiriendo ventaja de crecimiento en alimentos procesados), se vincula a casos fatales de enfermedad diarreica; de manera característica no hidroliza almidón, depende de triptófano para su crecimiento (Burtscher et al., 2021), el operón de hidroxifenilalanina está presente en la especie, pero ausente en todos los otros miembros del grupo de *B. cereus* s.l. (Stevens et al., 2018). Existe variabilidad de toxicidad entre diversas cepas, pudiendo ser nula, baja o alta (Burtscher et al., 2021); las altamente toxigénicas albergan la variante *cytK-1*

del gen que codifica la citotoxina K; es flexible en el intercambio de genes con adaptación rápida al medio ambiente (Stevens et al., 2018). La temperatura de crecimiento se correlaciona a nichos de temperatura cálida, posee alta actividad proteolítica y keratinolítica (Cavello et al., 2020). Sus ácidos grasos principales: C_{15:0}, C_{16:0}, C_{17:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, e iso-C_{13:0}, sustentan su filiación dentro del grupo de *B. cereus s.l.* agrupándose de manera definida y diferenciada en un grupo que se separa de otros miembros del grupo de *B. cereus s.l.* (Guinebretière et al., 2013).

2.1.1.5 *Bacillus weihenstephanensis*

B. weihenstephanensis se caracteriza por un crecimiento a bajas temperaturas 4-7°C, representando un riesgo para la salud por su capacidad de sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración; además algunas cepas albergan genes *hblA* y *hblD* (Thorsen et al., 2006); por otra parte, es productor de componentes antifúngicos y posible agente biopesticida, además posee la habilidad de producir cuerpos de inclusión o proteína cristalina (Mashtoly, 2019).

2.1.1.6 *Bacillus toyonensis*

La cepa BCT-7112 fue aislada en 1966 para uso probiótico utilizado en nutrición animal, Jiménez citado en Méndez (2020) propuso nombrar a esta cepa *B. toyonensis*; es aeróbico, móvil, con actividad hemolítica y crecimiento a bajas temperaturas (4°C) y a altas concentraciones de NaCl (8%); recientemente se ha reportado genes de virulencia en la cepa P18 de *B. toyonensis* proveniente de profundidades marinas con fuertes efectos citotóxicos en células de peces y mamíferos (Luo et al., 2021).

2.1.1.7 *Bacillus mycoides*

B. mycoides comúnmente es considerada una bacteria no patógena, sin embargo puede aislarse ocasionalmente de alimentos contaminados de forma cruzada (Yi et al., 2018b); comúnmente asociada a la rizosfera con actividad promotora del crecimiento de

las plantas, puede colonizar activamente las superficies de las raíces y formar una matriz similar a una biopelícula. Algunas cepas son capaces de ingresar a los tejidos de la raíz; tiene actividad de fijación al nitrógeno (Yi, et al., 2018b). muestra crecimiento filamentososo rizoide en placas de agar, con crecimiento óptimo entre 25°C y 30°C (Yi, et al., 2018); el estudio reciente de Miller citado en Rasigade (2018) describe citotoxicidad para células humanas HeLa; por otra parte, se ha observado que los exopolisacáridos microbianos producidos por *B. mycoides* ATCC 6462 exhiben efecto inhibitorio contra células cancerosas de carcinoma hepatocelular humano y células de adenocarcinoma colorrectal (Farang et al., 2020).

2.1.1.8 *Bacillus wiedmannii*

La caracterización fenotípica de *B. wiedmannii* identifica alto contenido de ácidos grasos, incapacidad de fermentar sacarosa o hidrolizar arginina, lecitina positiva, producción de fosfolipasa C, catalasa, prueba de oxidasa negativa, con hidrólisis de almidón y caseína, así como capacidad hemolítica y es psicotolerante; crece en un rango de temperatura de 5-40°C, produce Hbl y Nhe y es citotóxico en células Hela (Miller et al., 2016).

2.1.1.9 *Bacillus clarus*

El estudio reciente realizado por Méndez (2020), propone *B. mycoides* Flugge ATCC 21929 como una nueva especie; previamente fue asociada a la producción de antibiótico 60-6 activo contra patógenos Gram positivos (cerexin A). Fenotípicamente la cepa es hemolítica, no posee citocromo c oxidasa, hidroliza almidón y caseína, además de ser muy móvil, puede crecer en concentraciones salinas de 0 a 5% y un rango de pH de 6 a 9. Crece en un rango de temperatura de 15 a 43°C; a 32°C mostró débil producción de Hbl; pero estudios *in vitro* muestran que a temperatura corporal humana de 37° no hay producción de Hbl (Méndez et al., 2020).

2.2. Relevancia e importancia clínica del grupo *B. cereus sensu lato*

El grupo de *B. cereus s.l.* ha contribuido a la producción de enzimas, metabolitos, probióticos y a la eliminación de metales pesados y contaminantes orgánicos persistentes, sin embargo, es importante observar la epidemiología y patogénesis del grupo (Liu et al., 2017); el riesgo para la salud a nivel de consumo de alimentos depende del potencial patogénico de la cepa, la composición del propio alimento que puede afectar la producción de toxinas, así como al almacenamiento y manipulación de los productos alimenticios (EFSA BIOHAZ, 2016).

Por otro lado, en la clínica hay que considerar la vía de entrada y la respuesta inmune del paciente; la revisión de casos reportados de 2013 a 2018 por Messelhäußer y Ehling-Schulz (2018) permite visualizar a *B. cereus* como un patógeno potencial y agente causal de enfermedades no gastrointestinales en diversos continentes: Americano (USA), Asiático (China, Taiwan, Malaysia, Japón, India) Europeo (Dinamarca, Francia). Se ha reportado resistencia a β lactamasas tipo I, II y III (Kotiranta et al., 2000).

Comúnmente, las manifestaciones clínicas de intoxicaciones alimentarias por *B. cereus s.s.* son leves y con remisión; sin embargo, se ha observado un incremento en el número de intoxicaciones graves que conlleva a insuficiencia hepática aguda y encefalopatía por las toxinas que produce, con resultados fatales (Messelhäußer y Ehling-Schulz, 2018).

Debido al incremento de *B. cereus* como agente causal en intoxicaciones alimentarias e infecciones nosocomiales es mayor el interés en su estudio (Kotiranta et al., 2000). Al considerar las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema de salud pública a nivel mundial por su incidencia, las graves secuelas y la tasa de mortalidad; dentro de los agentes causales más frecuentes se ha encontrado a *Bacillus cereus s.s.* (Díaz et al., 2018).

Respecto a las infecciones nosocomiales, también conocidas como infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAS), en México se calcula 450,000 casos de infección relacionados con la atención sanitaria, causando 32 muertes por cada millón de habitantes por año; son un problema importante de salud pública con repercusiones en la morbilidad, la mortalidad y la calidad de vida de las personas, hasta un 7% de los pacientes de los países desarrollados y el 10% de los de los países en desarrollo contraen una IAAS.

En países en vías de desarrollo la falta de apoyo financiero, inadecuada capacitación del personal involucrado en el control de infecciones, unidades hospitalarias con poco personal e insuficiente equipo y suministro; dificultan la implementación de prácticas óptimas en el control de infecciones (World Health Organization, 2016); lo cual repercute la identificación del agente etiológico y por ende el diagnóstico. Uno de los agentes involucrados en las IAAS es *B. cereus* (Khan et al., 2015).

Existen pocos estudios sobre la incidencia de las infecciones por *B. cereus s.l.* asociadas a la atención sanitaria. Es importante no perder de vista que es un grupo de microorganismos capaces de formar esporas y de persistir en el entorno hospitalario; por lo cual, es fuente de infección para los pacientes hospitalizados, de manera particular los inmunocomprometidos o inmunosuprimidos con mayor riesgo de desarrollar procesos infecciosos graves (Glasset et al., 2018). Además, la formación de biopelículas por las especies de *Bacillus* pueden contribuir a su existencia en el medio ambiente hospitalario (Kuroki et al., 2009). Por lo cual es necesario reconocer su importancia clínica para una atención terapéutica adecuada (Tran et al., 2011).

2.2.1 Panorama infeccioso de *Bacillus cereus sensu lato*.

Los procesos infecciosos por *B. cereus s.l.* son muy variables, dependiendo de diversos factores relacionados con el huésped (edad, dieta, fisiología, inmunología) y con las características de la bacteria (forma celular, genes y expresión de toxinas) (Ceuppens

et al., 2013). La patogenicidad en infecciones gastrointestinales y no gastrointestinales se ha asociado a toxinas de origen plasmídico o cromosómico; por lo que el potencial patogénico es extremadamente variable con algunas cepas inofensivas y otras letales (Kavanaugh et al., 2021) Comúnmente se correlaciona a *B. cereus* s.s con intoxicaciones alimentarias y algunas enfermedades no gastrointestinales, sin embargo *B. thuringiensis* también se ha aislado de gastroenteritis; de manera común se descarta tanto a *B. cereus* s.s como a *B. thuringiensis* cuando provienen de aislados de material clínico distinto de heces o vómito (Kuroki et al., 2009).

Si bien *B. cereus* s.s. es asociado a infecciones locales o sistémicas e intoxicación alimentaria, existen cepas llamadas tipo *B. anthracis* que producen toxina tripartita causando enfermedad tipo ántrax en humanos y animales (Baldwin, 2020); respecto a *B. anthracis* es altamente virulento en mamíferos y agente etiológico del ántrax; los humanos adquieren la enfermedad por contacto con animales infectados o exposición a productos animales; las manifestaciones clínicas varían dependiendo la ruta de infección que puede ser cutánea, gastrointestinal o pulmonar. La virulencia se desarrolla mediante una cápsula y dos toxinas tipo AB: el factor letal LF y el factor edema EF, ambas toxinas se translocan a la célula huésped mediante el antígeno protector AP; el mecanismo en conjunto provoca que la terapia a infecciones por este microorganismo sea tardía e ineficiente (Pilo y Frey, 2018).

En el caso de *B. thuringiensis* comúnmente se correlaciona con propiedades entomopatogénicas y como agente de control en biopesticidas industriales (Carroll et al., 2020), sin embargo también se ha asociado a bacteriemia (Kuroki, 2009), y a endoftalmitis (Mursalin et al., 2020b); considerando a *B. citotoxicus* es un microorganismo ligado a casos fatales de enfermedad diarreica (Stevens et al., 2019) y finalmente *B. toyonensis* a pesar de ser usado como probiótico, la cepa P18 es capaz de diseminar e inducir infección aguda y mortalidad en peces y ratones (Luo et al., 2021).

La patogenicidad en infecciones gastrointestinales y no gastrointestinales se ha asociado a toxinas de origen plasmídico o cromosómico; a la producción de

betalactamasas y la producción de otras enzimas como colagenasas, hemolisinas, proteasas y proteína de superficie paracristalina (SLP) (Mursalin et al., 2020).

2.2.1.2 Enfermedades gastrointestinales.

El número de intoxicaciones alimentarias causadas por *B. cereus* en diferentes países no se conoce porque no es una enfermedad de notificación obligatoria y no siempre se diagnóstica (Kotiranta et al., 2000). Representantes de la FERG (The Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group) implementaron un programa para evaluar la incidencia de enfermedades transmitidas por los alimentos (2007-2015).

Los resultados clínicos por intoxicación con *B. cereus* fue gastroenteritis aguda con una duración de 0.25 a 2.5 días en los siguientes rangos de edad: 3% <5 años, 14% 5-14 años, 53% 15-54 años, 30% ≥ 55 años; las toxinas bacterianas ocupan el segundo lugar entre agentes causales de brotes transmitidos por alimentos en un 17.7%, incluidas las toxinas eméticas y diarreicas de *B. cereus* (Messelhäußer y Ehling-Schulz, 2018). Sin embargo no fue considerado dentro de la carga mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos en 2010 debido a la falta de datos para la estimación global (World Health Organization, 2015).

Es probable que el impacto de *B. cereus* en brotes de transmisión alimentaria se subestime debido a la falta de vigilancia sistemática y a menudo se diagnostica erróneamente como infecciones por *S. aureus* o *Clostridium perfringens* (Ramarao et al., 2020). En 2016, el panel de la EFSA BIOHAZ (European Food Safety Authority – Scientific Opinion of the panel on Biological Hazards) realizó un análisis sobre los riesgos para la salud pública relacionada con la presencia de *B. cereus* s.s y otras especies de *Bacillus*, incluyendo a *B. thuringiensis* en productos alimenticios; el panel confirma que la mayoría de los casos de intoxicación alimentaria causados por el grupo de *B. cereus* se asocia a concentraciones bacterianas superiores a 10^5 UFC/g de alimento.

B. cereus s.s posee varios mecanismos de virulencia, en el tracto gastrointestinal las células viables o esporas ingeridas producen y secretan enterotoxinas termolábiles como: complejo enterotoxigénico no hemolítico (Nhe), complejo enterotoxigénico hemolítico (Hbl) y proteína citotóxica K (CytK) e inducen el síndrome diarreico; la sintomatología incluye dolor abdominal y diarrea acuosa (Messelhäußer and Ehling-Schulz, 2018).

Mientras que la toxina cereulide que se produce en los alimentos es termoestable ya que no pierde su actividad a 121°C, es tolerante a variaciones de pH entre 2 y 11 y estable al tratamiento con pepsina y tripsina (Kotiranta et al., 2000), tras su ingesta produce el síndrome emético (Bottone, 2010). La sintomatología del síndrome emético incluye náusea o vómito con remisión y gastroenteritis, se han descrito posibles complicaciones por intoxicación con cereulide como falla hepática o necrosis de la mucosa del colon (Beisl et al., 2020).

2.2.1.3 Enfermedades no gastrointestinales.

Es importante reconocer la diversidad de infecciones correlacionadas a *B. cereus*, así como el espectro de evolución de estas; es extenso el número de informes correlacionados a enfermedades no gastrointestinales especialmente en entornos clínicos, por lo que cada día se vincula más a infecciones nosocomiales. (Messelhäußer y Ehling-Schulz, 2018).

La investigación exhaustiva realizada por Bottone (2010) de diversos artículos correlacionados a infecciones nosocomiales o IAAS reportan como reservorios: equipos de broncoscopia, soluciones de lavado de manos a base de alcohol, tubos de recolección de muestras, catéteres, toallas reutilizadas secas, lavadoras en salas de ropa de hospital, nutrición vía catéter central, gasas y algodón no estéril usado para la desinfección de la piel entre otros. También se han observado como fuentes de infección equipo de filtración/ventilación, ropa de cama, dispositivos médicos y manos del personal (Glasset,

et al., 2018). Incluso a partir del estudio de caso de bacteriemia en un neonato se pudo correlacionar a la leche materna extraída como fuente de transmisión de *B. cereus* de una madre sana a su bebe prematuro (Liao y Tsai, 2021).

B. cereus s.s es capaz de producir bacteriemia (Akamatsu et al., 2019; Cheng et al., 2017; Hernaiz et al., 2003) a pesar de la acumulación de células inflamatorias (Tran y Ramarao, 2013); la bacteriemia por *B. cereus* puede tener una evolución complicada principalmente en pacientes con neoplasias hematológicas; de manera particular en el caso de infecciones a partir de catéteres se observan complicaciones neurológicas frecuentemente (Tusgul et al., 2016).

También es capaz de generar endoftalmitis (Mursalin et al., 2020b), siendo uno de los microorganismos más importantes encontrados en infecciones oculares severas (Kotiranta et al., 2000); aunque las infecciones intraoculares por *Bacillus* son raras se ha informado significativa pérdida de visión en la mayoría de los casos de endoftalmitis. *B. cereus* y *B. thuringiensis* han sido reportados como agentes causantes de infección intraocular (Abfalter et al., 2016).

Otras afecciones descritas son: neumonía (Chang et al., 2017), endocarditis (Barraud y Tisné 2019), meningitis, encefalitis (Drazin et al., 2010), infecciones de piel (Veysseyre et al., 2015) o de tejido blando (Tabassum et al., 2017), lesiones cutáneas tipo ántrax (Saikia et al., 2019), infecciones de heridas traumáticas y postoperatorias así como de quemaduras correlacionadas a lisis celular por HBL (Kotiranta et al., 2000), septicemia (Ruiz-Giardin et al., 2019); endocarditis o septicemia en neonatos prematuros (Lotte, et al., 2017; Shah et al., 2015); neumonía necrotizante (Leung et al., 2019); peritonitis (Zablullah et al., 2020) y posiblemente bacteriemia posparto (Xaplanteri et al., 2019).

Strauss (2001) plantea la posibilidad de la colonización de la cavidad oral por *B. cereus* en placa periodontal, como una primera etapa subestimada en la patogénesis de infecciones pulmonares y sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. El estudio epidemiológico de Ramarao (2020) y la alerta lanzada por hospitales de Paris

demuestran que el número de casos de infecciones graves por *B. cereus* son en gran medida subestimados y poco documentados; además de que el tratamiento de primera línea no siempre es el adecuado por lo que recién nacidos mueren por bacteriemia o meningitis relacionada con *B. cereus*.

2.2.1.4 Factores de virulencia del grupo *Bacillus cereus sensu lato*.

Para que *B. cereus* sea patógeno requiere tener la capacidad de colonizar su hospedero, degradar tejidos específicos y evitar el sistema inmunitario del huésped (Guillemet et al., 2010). Los miembros del grupo de *B. cereus s.l.* se caracterizan por una importante reserva extracromosómica, vinculada a virulencia y propiedades de adaptación de las diferentes especies pertenecientes al grupo (Patiño-Navarrete y Sanchis, 2017); la síntesis de toxinas (Tabla 2) en el grupo de *B. cereus s.l.* es variable; sin embargo, las toxinas ALO y Ántrax se observan en *B. anthracis* mientras que Certhrax está presente en algunas cepas de *B. cereus s.s.*

Tabla 2 Factores de virulencia identificados en *Bacillus*

Toxina	Genes relacionados	Características de la estructura	Funciones
ALO (Anthrolisina O)	<i>BAS3109</i>	Citolisina dependiente del colesterol (CDC) las toxinas formadoras de poros en barril beta que requieren colesterol de membrana para formar poros con un mecanismo no claro, se sabe que los monómeros se oligomerizan en un complejo preporo, seguido de un gran cambio conformacional en cada oligómero resultando en la inserción en la membrana.	Actividad lítica contra fagocitos y decrece la función de barrera de células epiteliales polarizadas.
Ántrax	<i>cya; lef; pagA</i>	Toxina tipo A-B; <i>atxA</i> , un gen de pOX1 necesario para la transcripción de los tres genes de la toxina, también de encapsulación regulada positivamente Pertenece a la familia de toxinas AB, compuesta por AP, EF y LF	La combinación de PA y EF es la toxina edema (EdTx) PA y LF es la toxina letal (LeTx) EF: adenilato ciclasa; LF: proteasa
Cereulide	<i>cesA, cesB, cesC, cesD, cesH, cesP, cesT</i>	Sintetizada por una NRPS llamada Ces NRPS, los genes se encuentran localizados en un megaplásmido conocido como Pcer270, es una toxina pequeña, altamente resistente al calor y al ácido.	Toxina peptídica emética de gran potencia (ionóforo de potasio). Causa disrupción en el potencial de transmembrana en la mitocondria.
Certhrax	<i>cer</i>	Promueve el crecimiento y propagación bacteriana	Toxina bacteriana intracelular ADP-ribosiltransferasa que agrega una modificación postraducciona para interrumpir la función de la vinculina, requiere PA2 contribuye a la evasión del sistema inmune innato del huésped. ¹
CytK (citocina K,	<i>cytK</i>	En forma soluble se convierte en un poro transmembrana mediante el ensamblaje de un barril β oligomérico, con los residuos hidrófobos	Actividad hemolítica y citotóxica, secretada

hemolisina IV)		frente a los lípidos y los hidrófilos frente al lumen del canal.	
Hbl**	<i>hblA</i> , <i>hblD</i>	<i>hblC</i> ,	Toxina tripartita, compuesta por 3 proteínas B, L1, L2. Tóxica solo como complejo ternario.
Nhe**	<i>nheA</i> , <i>nheC</i>	<i>nheB</i> ,	Toxina formadora de poro tripartita, se requiere la presencia de las 3 proteínas para actividad biológica máxima.

Nota:¹Ribosila Arg-433 de vinculina (coordina el citoesqueleto de actina y las interacciones de la matriz extracelular) lo cual interrumpe los complejos de adhesión focal y redistribuye la vinculina al citoplasma. **HBL y NHE comparten de 23 -40% de identidad de secuencia.

Algunos miembros del grupo de *B. cereus* albergan uno o varios genes de enterotoxina que producen las enterotoxinas correspondientes: Hbl, Nhe, CytK y EntFM; las cuales de manera especulativa juegan un papel importante en el síndrome diarreico (Li et al., 2016). Los factores de virulencia Hbl, Nhe, CytK, proteasas, fosfatidil inositol fosfolipasa C, fosfatidil colina fosfolipasa C y esfingomielinasa son regulados por PlcR (regulador pleiotrópico del factor de virulencia extracelular) a través de una secuencia palindrómica conservada en las regiones promotoras de sus genes diana (Abfalter et al., 2016; Doll et al., 2013).

La hemolisina Hbl (factor de permeabilidad vascular dermonecrótico) y la enterotoxina no hemolítica (Nhe), son toxinas tripartitas formadoras de poros que requieren la acción combinada de sus complejos proteicos para inducir la lisis celular (Sastalla et al., 2013) con destrucción de tejido (Kotiranta et al., 2000). Son producidas después de la germinación de esporas bacterianas en el intestino.

Hbl es un sistema lítico de membrana constituido por tres proteínas antigénicas distintas (B, L1 y L2), codificadas por genes *hblC*, *hblD*, *hblA* y *hblB*. La secreción del componente L2 se produce durante la diferenciación de células en swarming (en medios sólidos) y la generación de este al igual que la quimiotaxis depende de FlhN/FlhY (proteínas del interruptor del motor flagelar) lo que sugiere que existe relación entre la expresión de factores de virulencia y la diferenciación de células en swarming (Celandroni et al., 2002).

Nhe o toxina no enterohemolítica, fue nombrada así ya que en los hallazgos iniciales de Lund y Granum (1996) no mostraba efectos hemolíticos, sin embargo, se encontró que la actividad hemolítica es también detectable en NHE y está ligada a la

formación de poros (Ramm et al., 2020). Estudios previos *in vivo* e *in vitro* sugieren que la esfingomielinasa (SMasa) puede contribuir a la severidad de las patologías producidas por *B. cereus* al interactuar sinérgicamente con NHE y HBL (Messelhäußer y Ehling-Schulz, 2018).

Otro factor de virulencia es la toxina cereulide con alta afinidad a K⁺, la cual puede alterar el gradiente electroquímico en lípidos de membranas e inhibir la actividad mitocondrial (Ehling-Schulz et al., 2015); causando insuficiencia hepática debido a esteatosis microvesicular y alteración de la beta oxidación en las mitocondrias hepáticas por la despolarización de la membrana mitocondrial, el deterioro de la síntesis de ATP así como formación de aductos con el K⁺ (Beisl et al., 2020).

También la fosfolipasa C es un factor de virulencia (Chang et al., 2017) que se cree contribuye al daño de tejido induciendo la degranulación de neutrófilos (Kotiranta et al., 2000); PC-PLC (fosfatidil colina específica fosfolipasa) es una zinc – metalofosfolipasa C que hidroliza fosfolípidos que contienen fosfocolina (Cronin y Wilkinson, 2008). Se ha observado que miembros del grupo de *B. cereus* pueden expresar colagenasas dependientes de zinc y posiblemente es inducida por iones de calcio (Abfalter et al., 2016), así como hemolisina HlyII (Tran et al., 2011).

Dentro de *B. cereus s.l.* existe intercambio frecuente de los factores de patogenicidad como genes *hbl*, *cytK* y *plcR*. Se conoce que es posible la transferencia horizontal de genes de la toxina emética mediada por plásmidos. Como ejemplo *pXO1* y *pXO2*, plásmidos asociados al ántrax se han encontrado en algunas cepas como *B. cereus* G9241 (Böhm et al., 2015). Las toxinas pueden estar presentes o no en diversos miembros del grupo (Tabla 3); la producción de dichas toxinas puede ser variable en miembros donde la toxina es considerada característica en la especie, Hbl es característica en *B. cereus s.s.*; sin embargo, no se encuentra presente en todas las cepas (Glasset et al., 2021).

Tabla 3 Producción de factores de virulencia por especies del grupo de *B. cereus s.l.*

Especies	Cereulide (cesABCD)	Hbl	Nhe	CytK	δ toxinas	Toxina ántrax	Proteasas ¹	Referencia
<i>B. cereus s.s.</i>	Si	Si	Si	Si		Si (pXO1 y tipo pXO1)	Si	Abfalter et al., 2016; Bladwin, 2020; Peña et al., 2018
<i>B. thuringiensis</i>	Si	Si	Si		Si	Si (pXO1 y tipo pXO1)	Si	Abfalter et al., 2016; Messelhäußer y Ehling-Schulz 2018; Palma et al., 2014;
<i>B. anthracis</i>	Si ²					Si	Si	Abfalter et al., 2016; Peña et al., 2018; Premkrishnan, et al., 2021)
<i>B. weihenstephanensis</i>	Si	Si	Si				Si	Abfalter et al., 2016; Messelhäußer y Ehling-Schulz 2018; Thorsen et al., 2006
<i>B. mycoides</i>	*	*	*	*	*	*	Si	Abfalter et al., 2016
<i>B. pseudomycoides</i>	*	*	*	*	*	*	Si	Abfalter et al., 2016
<i>B. cytotoxicus</i>				Si			Si	Abfalter et al., 2016; Messelhäußer y Ehling-Schulz 2018)
<i>B. wiedmannii sp. Nov (FSL W8-0169)</i>		Si	Si					Miller et al., 2016

Nota: ¹Las proteasas son del tipo Colagenolítica y gelatinolítica. ²La presencia de la toxina cereulide de manera específica en dos cepas, una de muestra clínica y otra de contaminación de alimento. *En *B. mycoides* y *B. pseudomycoides* solo se ha observado la presencia de proteasas.

La mayoría de las cepas de *B. cereus s.s* producen la enterotoxina no hemolítica (Nhe), mientras que solo la mitad pueden producir la enterotoxina hemolisina BL (Hbl) y proteínas de la sintetasa de la toxina cereulide o emética, además de otras hemolisinas; observándose que Hbl y Nhe son más abundantes en cepas de origen clínico o de intoxicación alimentaria que en cepas provenientes de origen ambiental (Guinebretière et al., 2002) se ha reportado la existencia de cepas de *B. cereus* con genes de cápsula de tipo *B. anthracis* en cepas nosocomiales y del suelo (Okutani et al., 2019).

En *B. weihenstephanensis* se observa la capacidad de producir complejos de enterotoxinas NHE y algunas cepas producen la toxina cereulide (Messelhäußer and Ehling-Schulz, 2018); *B. thuringiensis* produce proteínas cristalinas bioinsecticidas, además puede producir ambas enterotoxinas la NHE y la HBL; *B. thuringiensis kurstaki* posee pOX2 y tipo pOX1 (Palma et al., 2014). Característicamente *B. anthracis* produce la toxina ántrax y proteínas capsulares, sin embargo, cultivos emergentes de *B. cereus*

s. s. se han asociado a enfermedades tipo ántrax en mamíferos, incluyendo a los humanos (Bladwin, 2020).

Además de la producción de toxinas o la presencia de plásmidos que codifican toxinas específicamente activas contra invertebrados o mamíferos; *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* son capaces de producir biopelículas (Majed et al., 2016). Frecuentemente el género *Bacillus* es uno de los más reportados como productor de proteasas queratinolíticas (Cavello et al., 2020), las proteasas pueden ser o no factor de virulencia, dependiendo la especie, el entorno y la aplicación.

2.2.1.5 Mecanismos de patogenicidad y respuesta inmune.

Los procesos infecciosos pueden ser originados por microorganismos provenientes del medio ambiente, el grupo de *B. cereus s.l.* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, por lo que puede ingresar al organismo por diversas vías. Las enfermedades causadas por *B. cereus s.l.* son muy variables, dependiendo de diversos factores relacionados con el huésped (edad, dieta, fisiología, inmunología) y con las características de la bacteria (forma celular, genes y expresión de toxinas) (Ceuppens et al., 2013); por lo cual la patogenicidad de *B. cereus* a nivel gastrointestinal o no gastrointestinal es asociada con la destrucción del tejido y producción de exoenzimas (Bottone, 2010); por ejemplo *la expresión de* colagenasas podrían facilitar la invasión en el cristalino promoviendo la endoftalmitis bacteriana (Abfalter et al., 2016).

Las infecciones producidas por *B. cereus* se caracterizan por bacteriemia a pesar de la presencia de células inflamatorias en el sitio de infección; las esporas sobreviven, germinan y se multiplican en los macrófagos, liberando sus toxinas. La primera línea de defensa dentro de la respuesta inmune es el sistema innato que reconoce patrones codificados en la línea germinal de receptores (PRP) expresados en células inmunes y no inmunes, la interacción del patógeno con el receptor desencadena una cascada intracelular que induce la reorganización de la maquinaria de actina con la consecuente

formación de pseudópodos para la endocitosis del patógeno. El fagosoma por fusión con el endosoma y lisosoma genera el fagolisosoma degradativo (contiene ambiente ácido, oxidativo y nitrativo, enzimas digestivas y péptidos antimicrobianos). (Tran y Ramarao, 2013).

La inflamación causada por infecciones con Bacillos Gram positivos es típicamente iniciada por la interacción con los TLR2 (receptores tipo Toll), la señalización mediada por estos receptores en las células presentadoras de antígeno ayuda a la interacción de la respuesta inmune innata y adaptativa. La consecuencia de dicha interacción es el infiltrado de polimorfonucleares y la síntesis de mediadores proinflamatorios lo que activa las caspasas inflamatorias y citocinas IL-1, (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) que pueden llevar a la muerte de la célula huésped. Las infecciones por *B. cereus* activan el inflamosoma en macrófagos y monocitos en un lapso de 3 h; HBL y NHE son detectados por el sensor NLRP3 debido a la salida de potasio a través de los poros de la membrana plasmática formados por cualquiera de las toxinas (Marthur et al., 2019).

Los mecanismos por los cuales *B. cereus s.l.* evade al sistema inmune son diversos, en forma esporulada puede sobrevivir al ambiente intracelular de los macrófagos y escapar de la fagocitosis (Tran y Ramarao, 2013). En su forma vegetativa produce la metaloproteasa InhA1 que escinde componentes de tejido como: fibronectina, la lámina y colágenos tipo I y IV (Guillemet et al., 2010), además del reconocimiento mediante ácidos lipoteicoicos; así puede contrarrestar el sistema inmune y proliferar en el huésped.

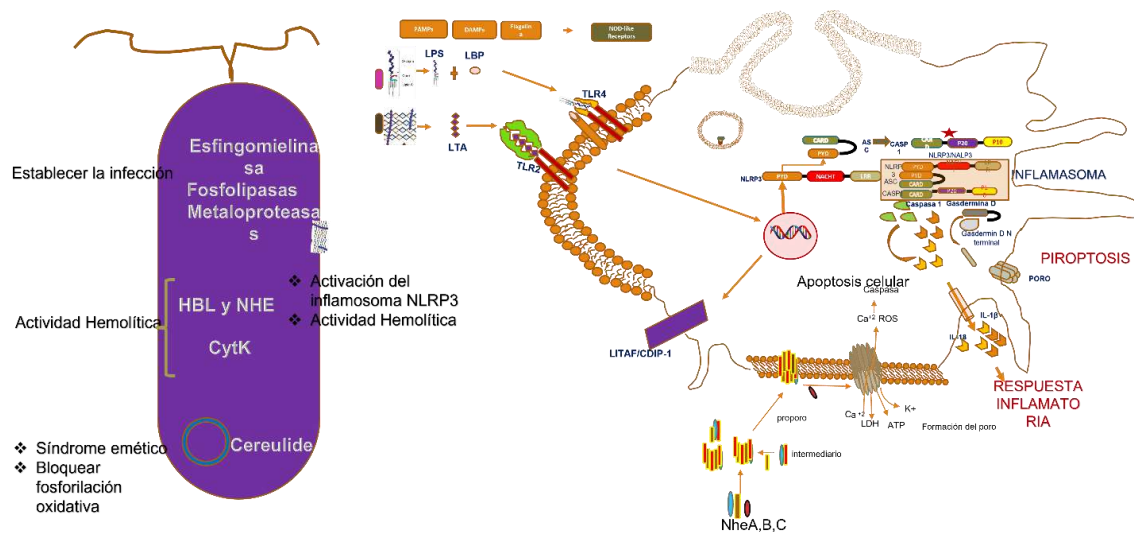


Figura 1 Mecanismos de patogenicidad de *Bacillus cereus* y respuesta inmune. El sistema innato que reconoce patrones codificados en la línea germinal de receptores (PRP); dentro de los cuales se encuentran los TLR y el inflammasoma, la inflamación causada por infecciones con Bacilos Gram Positivos es típicamente iniciada por los TLR2 sin embargo es posible que exista algún factor de virulencia de *B. cereus* que desencadene la señalización de TLR4. El inflammasoma es un complejo proteico citosólico donde NLRP3 se oligomeriza lo que conduce a la agrupación de PYD (dominio piridina) y el reclutamiento de la proteína adaptadora (ASC), lo que conlleva a la activación de caspasas y citocina IL-1; provocando la muerte de la célula huésped. Los poros de membrana ensamblados por HBL y NHE podrían conducir a una rápida salida de potasio y la activación del inflammasoma.

La hemolisina HlyII, en altas concentraciones inducen la formación de poros y apoptosis en los macrófagos al inducir la activación de caspasa 3 y 8, razón por la cual existe acumulación bacteriana a pesar del reclutamiento de células fagocíticas (Tran et al., 2011). Finalmente la proteína de superficie paracristalina (SLP) actúa como barrera protegiendo a la bacteria de la fagocitosis mediada por el complemento (Mursalin et al., 2020). Por su parte la toxina cereulide tiene efecto sobre células NK induciendo apoptosis e inhibición de la producción de interferón gama (Beisl et al., 2020).

2.2.1.6 Respuesta a antibióticos de *B. cereus sensu lato*.

B. cereus s.s y *B. thuringiensis* son generalmente resistentes a las penicilinas y cefalosporinas por producción de β -lactamasas de amplio espectro; generalmente sensibles a vancomicina, aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas; pero algunas cepas presentan resistencia adquirida a cloranfenicol, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol. Glasset (2018), sugiere que *B. cereus* adquiere resistencia a rifampicina a través del tiempo. La resistencia a los antibióticos puede ser intrínseca o adquirida como estrategia

evolutiva, asociada con la transferencia horizontal de genes; hay cepas de *B. cereus* altamente resistente a ampicilina, lincomicina, sulfametoxazol y eritromicina (Guo et al., 2020).

Las pruebas de susceptibilidad, comúnmente se indican cuando la terapia está justificada por una infección causada por un organismo cuyo perfil de susceptibilidad no puede predecirse de manera confiable. Los criterios para la prueba de sensibilidad para *Bacillus spp.* y géneros relacionados se encuentra en el manual M45 y se limitan a los aislamientos recuperados de sitios estériles como muestras de sangre, LCR, articulaciones, huesos, dispositivos protésicos o catéteres permanentes a largo plazo o infecciones graves de heridas. (National Committee for Clinical Laboratory Standards CLSI 2020).

2.3. Detección de *Bacillus cereus* en muestras clínicas

A pesar de ser reconocida la frecuencia de especies de *Bacillus* por microbiólogos hospitalarios, comúnmente es descartado por carecer de importancia (Turnbull et al., 1979), la detección de *B. cereus* en muestras clínicas es principalmente en hemocultivos (Tumbul y Kramer 1983); sin embargo, el mayor obstáculo para evaluar la presencia de *B. cereus* en aislados clínicos, es el estigma de ser clasificado como “posible contaminante” (Bottone, 2010; Tabassum et al., 2017; Zabiullah et al., 2020; Samarasekara et al., 2020; Cormontagne et al., 2021) lo que retrasa el diagnóstico y la elección del tratamiento adecuado (Acosta, et al., 2019). Existen reportes de casos clínicos en los que se ha considerado a *B. cereus* como agente contaminante y confirmado posteriormente como agente etiológico de infecciones sistémicas.

Algunos aspectos relevantes durante la revisión documental de casos clínicos citados por los autores son: en infecciones como endocarditis es importante la interpretación cuidadosa de los hemocultivos, especialmente en pacientes con prótesis cardíacas (Barraud y Tisné 2019); en el caso de infecciones musculoesqueléticas se ha

sugerido una detección sistemática de *B. cereus* como parte del abordaje en el momento de ingreso en pacientes con fracturas y lesiones asociadas con contaminación terrestre (Gálvez et al., 2020). También se ha reportado como un factor de riesgo para la infección por *B. cereus*, el uso de esteroides al producir inmunosupresión (Osakwe et al., 2020).

De manera particular el resumen presentado por Cormontagne (2021) señala que en el 40% de los casos de infección por *B. cereus* resulta en la muerte del neonato y Liao (2021) pretende generar una alerta hacia los neonatólogos en casos de sepsis inexplicable o intolerancia alimentaria, considerar la leche materna como fuente de transmisión de *B. cereus* a bebés prematuros.

En la clínica también se ha incluido para la detección de *B. cereus* la identificación de toxinas como Nhe y Hbl (Glasset et al., 2018; Lotte et al., 2017) mediante pruebas inmunológicas como BDE VIA (Tecra), BCET-RPLA (Oxoid) y Dupath sin embargo no tienen la capacidad para detectar todas las enterotoxinas (Ceuppens et al., 2012); por lo que dos de los tres kits ya no están disponibles comercialmente (Ramarao et al., 2020). Otra técnica molecular implementada es MALDI-TOF en busca de identificación o confirmación de la presencia de *B. cereus* (Mansilla et al., 2019; Manzulli et al., 2021; Ulrich et al., 2019).

2.3.1 Métodos de Identificación fenotípicos

Los protocolos para el procesamiento son acorde al tipo de muestra, en el caso de sangre comúnmente se extraen 20cc de sangre de forma aséptica para hemocultivo, actualmente se utilizan sistemas automáticos, dentro de ellos los de monitorización continua; en caso de hemocultivos positivos se realiza tinción de Gram y especiales (si fuera necesario) así como subcultivos (agar sangre, agar chocolate y agar sangre enriquecido) y acorde a la morfología microscópica y macroscópica se realiza el análisis bioquímico.

Uno de los sistemas utilizados para el análisis bioquímico es el kit de API 50 CHB (para especies de *Bacillus*), con el software ATBPlus; sin embargo, diversos estudios muestran que la identificación de especies de *B. cereus* fue errónea, no fueron identificados o solo reportados como *B. cereus* group (Celandroni et al., 2016b; Guinebretiere et al., 2001). Otro sistema es el BBL Crystal Gram-Positive ID kit, el cual identifica *Bacillus cereus* dentro de su panel sin diferenciar la especie.

2.3.1.1 Pruebas Fenotípicas Primarias/Secundarias

La identificación fenotípica del grupo de *B. cereus s.l.*, tradicionalmente se realiza a partir de pruebas fenotípicas: primarias y secundarias (Tabla 4); las primeras incluyen tinción de Gram, morfología celular, presencia de esporas, hemólisis y pruebas de metabolismo (oxidativo- fermentativo) O/F de carbohidratos. Las secundarias incluyen actividad lecitinasa, utilización de manitol, citrato, hemólisis, producción de cristal parasporal, reducción de nitratos a nitritos, hidrólisis de urea, VP y crecimiento rizoide (Sánchez et al., 2016); sin embargo hay algunas cepas atípicas como en el caso de *B. thuringiensis* que no contienen genes *cry* por lo que no es adecuado utilizar la formación de cristal parasporal como criterio de diferenciación (Liu et al., 2017).

Tabla 4 Características fenotípicas de algunos miembros del grupo de *B. cereus s.l.*

	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. pseudomycooides</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. citotoxicus</i>
Temperatura de crecimiento*	M, P	M, P	M	M, P	M	P	T
Gram	BGP	BGP	BGP	BGP	BGP	BGP	BGP
Crecimiento rizoidal	-	-	-	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Cristal parasporal	-	+/-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	-	-	-	+	+
Hemólisis	+	+	-	+	ND	ND	+
Actividad lecitinasa (MYP, Baccara)	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	+/-	+	-	+/-	+	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	ND	+	+
Resistencia a penicilina	+	+	-	+	?	?	?

*M= mesofílico, P= psicrotolerante, T= termotolerante

Nota: Elaborada a partir de: Cavello et al., (2020); Frenzel et al., (2018); Guinebretiere et al., (2008, 2010); Liu et al., (2020); Sánchez et al., (2016); Yi Frenzel et al., (2018).

La norma ISO 7932:2004 e ISO 21871:2006 establecen para la identificación de *B. cereus* la realización de recuento en placa con medio de Manitol Yema de Huevo Polimixina (MYP) y Agar Polimixina Piruvato Yema de Huevo Manitol Bromotimol azul (PEMBA). El método recomendado en el Manual de Análisis Bacteriológico de la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (BAM;2001) incluye el crecimiento en MYP y caracterización bioquímica. Sin embargo la pérdida de la morfología colonial característica y el enmascaramiento por presencia de microbiota acompañante como otras especies de *Bacillus* y *Staphylococcus aureus* dificulta la identificación (Tallent et al., 2012b). Actualmente existen dos métodos basados en NF EN ISO 7932 para la enumeración de *B. cereus* presuntivos, AFNOR BKR 23-06-02-10 (COMPASS) y AES-10/10-07/10 (BACARA) que utilizan medio cromogénico selectivo (Ramarao et al., 2020).

Si bien dentro de la microbiología clínica es posible identificar el microorganismo causante de la patología de una enfermedad a partir de la identificación fenotípica, también es cierto, que existen cepas atípicas con gran variabilidad por lo que pueden ser necesarias más pruebas para identificar los aislamientos (Tallent et al., 2012b). Fenotípicamente la identificación de *B. cereus* s.s., es solo a nivel presuntivo, la taxonomía del grupo de *B. cereus* es compleja, la identificación fenotípica considera criterios morfológicos, de temperatura, metabolismo y producción de toxinas; sin embargo, existen cepas atípicas que varían por lo que pudiera ser errónea la identificación en el Laboratorio (Carrol et al., 2020) incluso con el abordaje mediante estrategias de biología molecular.

2.3.1.2 Métodos moleculares empleados para la identificación bacteriana.

Se han desarrollado múltiples estrategias moleculares para la identificación y diferenciación entre miembros del grupo de *Bacillus cereus s.l.* mediante PCR, RT-PCR, q-PCR, m-PCR; basadas en amplificación de genes; el estándar de oro para la identificación microbiológica y taxonomía ha sido la secuenciación del gen 16S *rDNA* que es un gen altamente conservado, un equipo utilizado es Micro SEQ (Raza y Ameen, 2016) en cultivos ambientales y clínicos (Gomaa y Momtaz, 2007); comúnmente las primeras 500 bp son suficientes para identificación de rutina (región hipervariable V1 a V3) pero en ocasiones no son suficientes; y requieren una lectura del gen completo (MicroSEQ ID., Microbial Identification System. ThermoFisher) lo que no siempre es práctico para uso rutinario por el costo (Celandroni et al., 2016).

Los resultados muestran que además la identificación es a nivel de grupo (Sharma et al., 2019) debido a que las secuencias del gen tienen 99 a 100% de similitud entre *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. thuringiensis* (Kotiranta et al., 2000; Bavykin et al., 2004) concluyendo que es difícil discriminar entre dichos miembros del grupo (Chen y Tsen 2002 ; Ibal 2019; Liu et al., 2015).

También se ha utilizado la amplificación de genes constitutivos como *rpoB* permitiendo la identificación del grupo de *B. cereus s.l.* (Barraud y Tisné 2019; Nakano, 2020), pero no la diferenciación entre sus miembros; otro gen utilizado es *gyrB* sin embargo los resultados de los autores concluyen que es difícil discriminar *B. cereus* de *B. thuringiensis* usándolo como estrategia molecular (Chen y Tsen, 2002).

Las mismas metodologías moleculares han sido utilizadas para la identificación de genes que codifican toxinas como *cytK-1*, *cytK-2*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hlyII* and *ces* (Celandroni et al., 2019; Chen y Tsen, 2002; Draganic et al. 2017; Liu et al., 2015); sin embargo pueden observarse discrepancias cuando se combinan estrategias moleculares existiendo la probabilidad que se deba a polimorfismos más que a la falta de un gen dentro de un operón de *hbl* o *nhe* (Guinebretière et al., 2002).

Respecto a diseños moleculares dirigidos a la amplificación del gen *ces*, el estudio de Glasset (2018) sugiere que puede existir falta de reconocimiento de los cebadores en cepas específicas, o puede de ser debido a la pérdida o transferencia de plásmidos; por lo que la clasificación basada en plásmidos de virulencia es inviable (Ceuppens et al., 2013; Liu et al., 2015). La técnica de Western blotting también se ha utilizado para evaluar la expresión de las toxinas; sin embargo, se ha observado variabilidad en la expresión de NheA, NheC, INhA, PC-PLC, y Col A; cuando las cepas tienen bajo potencial patogénico no expresan o es mínimo el nivel de para NheB y SMasa (Jessberger et al., 2019b); por lo que con fines epidemiológicos es útil pero no para fines de identificación.

Otra técnica utilizada es la espectrometría de masas MALDI-TOF, considerado un método eficaz para identificar toxinas con alta sensibilidad y si bien permite la identificación de cereulide (Ulrich et al., 2019); no hay que perder de vista que las toxinas codificadas en plásmidos de virulencia pueden no estar presentes. MALDI-TOF tiene el potencial de identificar casi cualquier especie bacteriana en un hemocultivo, pero no es aplicable en todos los casos; situación visible en el caso clínico reportado por Samarasekara (2019) donde hemocultivos iniciales fueron identificados como *Bacillus anthracis* y posteriormente como *Bacillus thuringiensis* mediante MALDITOF, de manera similar Osakwe (2020) describe un caso en el cual se identificó como *Bacillus cereus/thuringiensis* el agente etiológico del proceso infeccioso. Lo cual es lógico considerando la alta similitud filogenética de las especies.

También se han utilizado técnicas moleculares basadas en microarreglos como Verigene (BC-GP) para la identificación de Bacterias Gram Positivas en hemocultivos (Buchan et al., 2013), sin embargo no incluye en su panel al grupo de *B. cereus*.

En los últimos años se han desarrollado diversos enfoques como tipificación de secuencias multilocus (MLST), sin embargo, a pesar de su mayor resolución los resultados obtenidos son inconsistentes (Liu et al., 2015) o la calidad de discriminación muy pobre para el análisis de aislamientos de origen alimentario asociados a enfermedad

emética (Hoffmaster et al., 2008). Otros enfoques empleados para clasificar y diferenciar taxonómicamente *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis* son: electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), análisis de longitud de fragmentos amplificados con fluorescencia (AFLP) y detección de genes de toxinas; sin embargo ninguno conduce a una diferenciación concluyente de los miembros del grupo (Hernández et al., 2020).

2.3.1.3 Relaciones filogenéticas.

El “genoma central”, es el conjunto de genes compartidos por todas las cepas de una sola especie bacteriana (o al menos el 99%). La clasificación y separación taxonómica de *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* ha sido causa de controversia entre expertos en el área, distinguir entre estas especies es difícil aún mediante herramientas moleculares (Rasko et al., 2005). Se han realizado diversos estudios filogenéticos, la inspección visual de la reconstrucción filogenética del genoma central de especies de *Bacillus* en el estudio de Hernández (2018) revela nueve clados principales; el más grande agrupa a los miembros del grupo de *B. cereus*: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. toyonensis* y *B. cytotoxicus*. Acorde al estudio pangenómico de Bazinet (2017) el genoma típico de *B. cereus s.l.* contiene 59,391 genes aproximadamente de los cuales 32,324 fueron genes accesorios y 27,057 genes únicos en un taxón; respecto al genoma central ~598 son genes centrales; la filogenia del estudio revela tres clados y 7 grupos.

El sistema de clasificación más extendido del grupo de *B. cereus s.l.* se basa en la secuenciación del gen de mantenimiento *panC*; mediante esta clasificación se han determinado siete grupos filogenéticos considerando su rango de temperaturas de crecimiento; *B. cereus s.s.* se encuentra en varios grupos; de manera particular el III y VII comprende especies asociadas con alta toxicidad (Ramarao et al., 2020).

Existe similitud dentro del grupo de *B. cereus s.l.* en la secuencia de nucleótidos y la organización de genes y operones por lo que las relaciones son muy cercanas entre los miembros de este grupo bacteriano (Patiño-Navarrete y Sanchis, 2017). La diferenciación entre *B. cereus s.s.* y especies relacionadas es complicada por las similitudes en su fenotipo y propiedades genéticas (Kotiranta et al. 2000). Las características fenotípicas utilizadas para la asignación taxonómica de especies del grupo de *B. cereus s.l.* como la motilidad y hemólisis varían dentro y entre las especies, a menudo cepas del grupo no coinciden con la relación filogenética, (Böhm et al., 2015; (Rasigade et al., 2018; Vilas-Boas et al., 2007).

Los determinantes genómicos responsables de algunos fenotipos se encuentran a nivel cromosómico y plasmídico, la evolución de los plásmidos dentro del grupo es altamente dinámica con transferencias y reordenamientos continuos (Patiño-Navarrete y Sanchis, 2017); lo que indica que pueden perderse naturalmente en el medio ambiente (Ceuppens et al., 2013); por lo tanto, su presencia es heterogénea dentro de una especie o múltiples especies (Carroll et al., 2020).

La adaptación a huéspedes animales ya sea como patógeno, saprófito o simbiote es la principal fuerza impulsora de la evolución del grupo de *B. cereus* (Rasigade et al., 2018). La caracterización molecular de cepas hospitalarias es relevante ya que permite visualizar la capacidad de *B. cereus* de persistir en ambientes hospitalarios a pesar de procedimientos de limpieza y puede seguir siendo fuente de infección para pacientes hospitalizados. (Glasset et al., 2018)

2.4 tRNA

Los RNA de transferencia o tRNA son ácidos ribonucleicos no codificantes presentes en todos los dominios, actúan como moléculas adaptadoras que transfieren aminoácidos activados, vinculándolos con los codones en los mRNA (Novoa et al., 2012). En el ribosoma, se utilizan dichos aminoácidos para la síntesis de proteínas guiada por

mRNA (Katz et al., 2016); para efectuar su rol canónico en la síntesis de proteínas debe estar cargado con un aminoácido por su aminoacil-tRNA-sintetasa (aaRS), (Raina e Ibba, 2014), las aaRS reconocen y activan un aminoácido en particular y lo transfieren al tRNA específico (Katz et al., 2016). Además de su rol como adaptadores, los tRNA participan en múltiples redes reguladoras (Schimmel, 2018).

2.4.1. Estructura de los tRNA.

Los tRNA maduros, presentan una estructura secundaria y terciaria característica; la secundaria presenta una estructura bidimensional en forma de hoja de trébol (Figura 2) descrita en 1965 por Holley, con formación de tallos debido al emparejamiento de bases internas (Berg y Brandl, 2021) y cinco regiones no apareadas: bucle D, bucle anticodón, bucle variable, bucle T y la cola 3'CCA (Gebetsberger y Polacek, 2013); químicamente el anticodón forma puentes de hidrógeno con el mRNA, mientras que el receptor 3'CCA forma enlaces ésteres con aminoácidos (Hopper y Phizicky, 2003).

Los tRNA se pliegan aún más en una estructura terciaria en forma de L invertida, mediante el apilamiento coaxial de los bucles T (facilita la interacción con el ribosoma) y D (responsable de estabilizar la estructura terciaria) (Berg y Brandl, 2021).

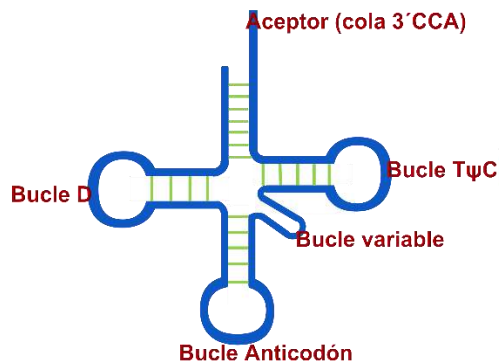


Figura 2 Esquema de la estructura del *tRNA*. Estructura secundaria que representa la formación de 4 tallos, 4 bucles y la región aceptora del aminoácido en el extremo 3'.

La interacción del tRNA con la subunidad ribosomal, es mediante su brazo T ψ C (Brown 2008); mientras que la unión al mRNA es a través de su brazo anticodón, interaccionando mediante emparejamiento de tres bases de manera complementaria y antiparalela (Bavykin et al., 2004). Las tRNA-aminoacil sintetetas interaccionan con el brazo D del tRNA (Englert et al., 2013).

Los tRNA se sintetizan como precursores y presentan modificaciones postranscripcionales presentes en toda la estructura del tRNA. Las modificaciones de nucleótidos ubicadas en la región monocatenaria del brazo aceptor, el bucle D y el bucle T ψ C están involucradas en la estabilización estructural; además de servir como elementos de identificación (Edwards et al., 2020). Las modificaciones van desde simples metilaciones hasta especies más complejas hipermodificadas; en el brazo D se encuentra una dihidrouridina; en el brazo T o T ψ C timidina, pseudouridina y citidina (Marck y Grosjean, 2002); en el bucle anticodón se encuentra el triplete codificante y es el responsable de la interacción con el codón en el mRNA (Schimmel, 2018); las modificaciones específicas en el anticodón influyen en la precisión y/o eficiencia de la traducción (Edwards, et al., 2020).

La maduración del tRNA (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) incluye: eliminación de la porción 5' del transcrito primario (RNasa P), eliminación del extremo 3' (RNasa D) con adición del trinucleótido CCA en el extremo 3' en los tRNA que carecen de este triplete codificado y edición de nucleótidos. El triplete CCA es el sitio de unión del aminoácido, con reacciones de aminoacilación y transpeptidación (Campos-Guillén et al., 2010); la incorporación de aminoácidos a la adenosina del 3'CCA en la posición 3'OH o 2'OH del tRNA es mediante esterificación por las aaRS (Englert et al., 2013) que pueden ser del tipo I o II, con motivos de secuencia mutuamente excluyente con distinta topología del sitio activo (Ibba y Söll, 2000).

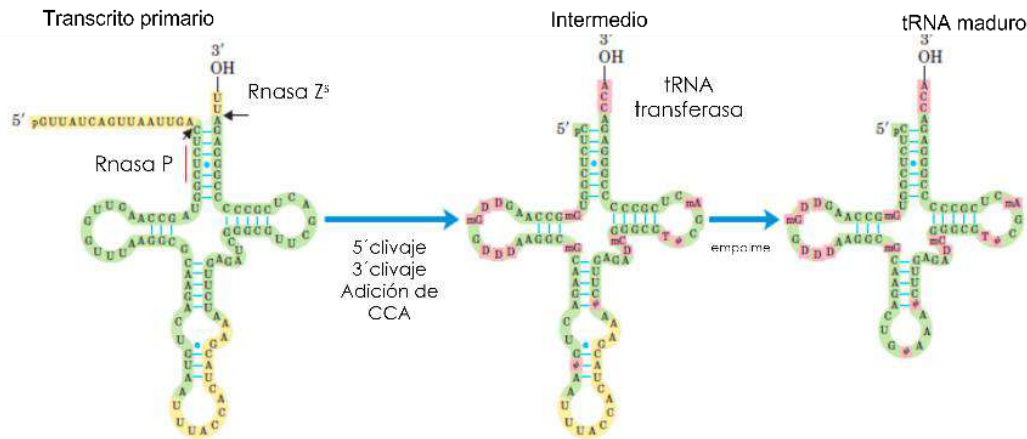


Figura 3 Procesamiento del tRNA. La eliminación de la porción 5´del transcrito (amarillo) es realizado por la RNAasa P, la eliminación del extremo 3´ es mediante la RNAasa D (en el esquema RNAasa Z. El triplete CCA remarcado en rosa.

Las secuencias que permiten el reconocimiento del tRNA por las aaRS se denominan elementos de identidad, hay nucleótidos específicos en el tallo aceptor que proporcionan estructuras esenciales características para el reconocimiento; en particular la base 73 es discriminadora (Berg y Brandl, 2021). Acorde a su aminoacilación los tRNA se subdividen en 20 grupos de isoaceptores (Ibba y Söll, 2000) con una longitud de 73 a 90 nucleótidos, la variabilidad de su longitud puede ser debida a la presencia o ausencia del trinucleótido terminal CCA; que se puede agregar durante el procesamiento y que no aparece en los genes de *tRNA* (Michel, 2013).

A pesar de cualquier diferencia en secuencia o longitud, funcionalmente los tRNA llevan un aminoácido único para la síntesis de proteínas (Katz et al., 2016)) y sus regiones monocatenarias (anticodón y extremo 3´) son clave para la traducción (Berg y Brandl, 2021). La traducción es el proceso mediante el cual la información genética en forma de mRNA se utiliza para sintetizar la secuencia de aminoácidos que originan una proteína; la fidelidad de la síntesis proteica depende del reconocimiento codón – anticodón y la síntesis de aminoacil tRNA (Katz et al., 2016).

Por lo que los tRNA evitan ser mal acilados (Demongeot y Seligmann, 2019); sin embargo cuando un organismo carece del conjunto de aaRS, los tRNA son aminoacilados en una vía indirecta con un precursor del aminoácido correcto, el cual es modificado posteriormente al aminoácido específico en el tRNA (Katz et al., 2016;

Sheppard et al., 2008), en bacterias los aminoacil resultantes son transportados por el factor de elongación EF-Tu al ribosoma (Englert et al., 2013) para la síntesis proteica.

2.4.2. Funciones de los tRNA

La mayoría de los tRNA son empleados en la síntesis proteica pero también desempeñan otros roles:

a) interacciones genómicas como replicación del genoma viral, inserción de elementos móviles e inserción viral.

b) regulaciones dependientes del tRNA como síntesis de nucleótidos alarmona, regulación de fragmentos tRNA y control de la velocidad de traducción.

c) funciones biosintéticas (Banerjee et al., 2010) como aminoacil tRNA en síntesis de aminoácidos, modificaciones peptídicas, síntesis de tetrapirroles (Katz et al., 2016).

d) modificaciones lipídicas “de manera particular la adición de aminoácidos dependiente de tRNA a los lípidos en la superficie externa de la membrana bacteriana, confieren resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos (Fields y Roy 2018).

e) biosíntesis de peptidoglucanos; además están relacionados con la inhibición apoptótica correlacionada al citocromo c (Raina e Ibbá 2014; Shepherd e Ibbá, 2015).

Otras funciones son el etiquetado de proteínas para degradación y la síntesis de proteínas adaptativas.

2.4.3. Organización de los genes *trna*

Los *trna* son genes antiguos y elementales para la síntesis proteica (Widmann et al., 2021). Mientras que en los genes *trna* de eucariotas y arqueas es común encontrar intrones, en cianobacterias se ha encontrado un intrón del grupo I de autoempalme en las cianobacterias en la misma posición del mismo gen que codifica el *trna*-Leu (Reinhold y Shub, 1992); sin embargo, en la mayoría los genes *trna* bacterianos no se encuentran presentes; por lo que codifican una secuencia ininterrumpida (Pettersson, 2009). La secuenciación de más de 40,000 diferentes tRNA maduros y genes de *trna*, ha permitido

conocer el número y organización de los genes del *trna* a nivel del genoma (Marck y Grosjean, 2002).

En comparación con las eucariotas, las bacterias tienen un conjunto de genes de *trna* reducido que codifica entre 30 y 220 tRNA (Santamaría et al., 2021), se ha observado una amplia variabilidad de organización de genes entre linajes, con evolución de las familias de genes a través de duplicación y pérdida; situación contrastante con el alto nivel de conservación en la secuencia de genes *trna*, con frecuencia se ubican en la misma cadena del cromosoma bacteriano comúnmente en la líder (Tremblay-Savard et al., 2015).

Los genes de *trna* están presentes en múltiples copias intercaladas dentro del genoma en la mayoría de los organismos, en diversas especies tienden a agruparse formando matrices cortas (que se constituyen en operones), con variabilidad en el número de genes *trna* de una especie a otra; la variación puede ser por la transferencia de genes horizontal, la duplicación de genes principalmente en eucariotas y la selección del conjunto de genes para mantener la traducción (Santamaría, et al., 2021; Tran et al., 2015; Welsh y McClelland, 1991).

En algunas especies el operón de genes de *trna* se encuentran cerca de los operones de *rrna* ubicados río abajo de estos y podrían transcribirse de forma independiente debido a un promotor ubicado entre los genes 23S y 5S (Tremblay-Savard et al., 2015), o que ambos operones representen una sola unidad transcripcional (Tran, et al., 2015). Su transcripción puede ser entonces a partir de un promotor común como transcripciones policistrónicas; pero también puede ser como precursores monocistrónicos (Pettersson, 2009).

Los genes de *trna* en especies del Filo *Firmicutes* se agrupan en un número reducido de matrices¹ u operones largos con distancias intergénicas cortas (**¡Error! No**

¹ Matriz: Regiones genómicas que contienen al menos 20 genes de tRNA con una densidad mínima de genes de tRNA, dos genes de tRNA por kilobase.

se encuentra el origen de la referencia.) observándose una baja distribución de genes de *trna* independientes o no agrupados con otros genes de *trna* (Tran et al., 2015); lo cual es indicativo de una organización de los genes en operones (Santamaría et al., 2021). La organización genómica de los genes de *trna* en matrices es una de las principales características distintivas de las clases taxonómicas de *Bacilli* y *Clostridia*, (Tran et al., 2015). De manera particular en *B. thuringiensis* Bt407 las matrices fueron localizadas en plásmidos y cromosomas (Tran et al., 2015).

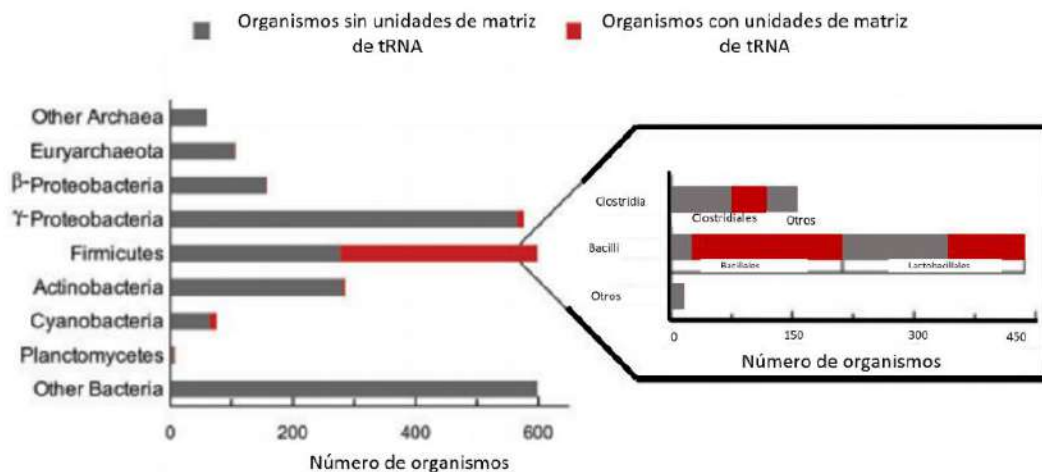


Figura 4 Distribución de organismos con y sin unidades de matriz en diversos filos y específicamente *Firmicutes*. Casi en todas las bacterias están presentes matrices u operones de tRNA (rojo) con una proporción variable; sin embargo, predomina en el filo Firmicutes la alta presencia de organismos con matrices de tRNA y más en el orden Bacillales

La presencia de dos clases de operones de *rna* en el grupo de *Bacillus cereus* es característico, la clase I incluye operones *rnaA, B, D, F, G, H, I* y *J*; la clase II incluye operones *rnaC, E, K, L, M*. La clase II exhibe múltiples genes *trna* río abajo del gen 5S *rna*, una secuencia de promotor putativo en la región intergénica 23S-5S y sin estructura obvia del terminador de transcripción río abajo del gen 5S lo que sugiere que el operón de *trna* y 5S*rna* pueden ser transcritos independientemente de los genes 16S y 23S (Candelon et al., 2004).

2.4.4 *trna-cys*

El gen *trna-cys* presenta longitudes de 74, 71 y 75 bp, predominando 74 bp en células procariotas y 72 en eucariotas (Michel, 2013); algunos miembros del Filo *Firmicutes*, presentan una sola copia de *trna-cys* en su genoma (Andrade *et al.* 2019); de manera particular dentro del grupo de *B. cereus s.l.*, se observan isoaceptores con un número de copias bajo como *tRNA^{Cys}*, *tRNA^{His}* y *tRNA^{Trp}* (Hernández Flores *et al.*, 2020). El gen (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) *trna-cys* en *Bacillus cereus* ATCC 10876 se encuentra dentro de un operón de genes *trna*; flanqueado por los genes de *trna-gly* y *trna-leu*; tiene una longitud de 71 bp y es de copia única en su genoma.

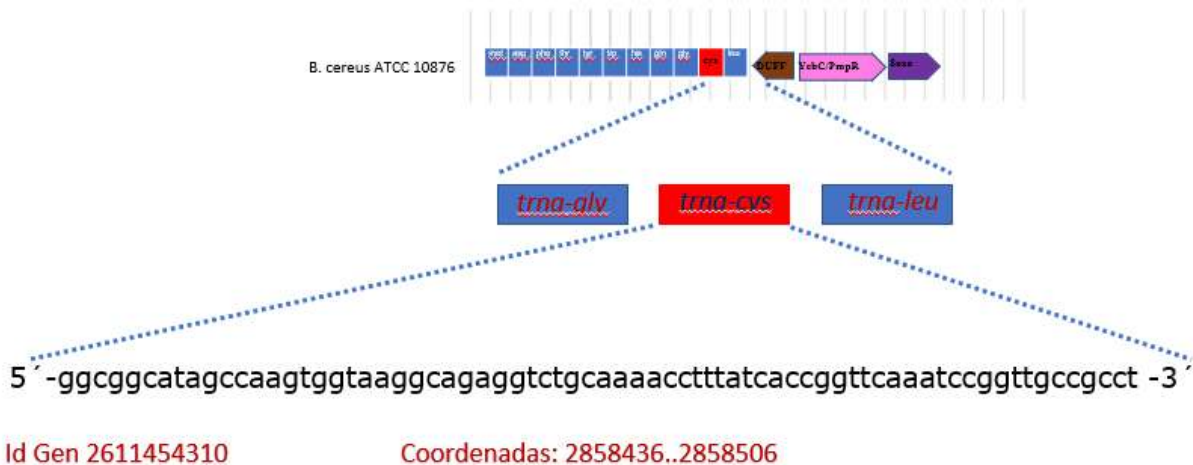
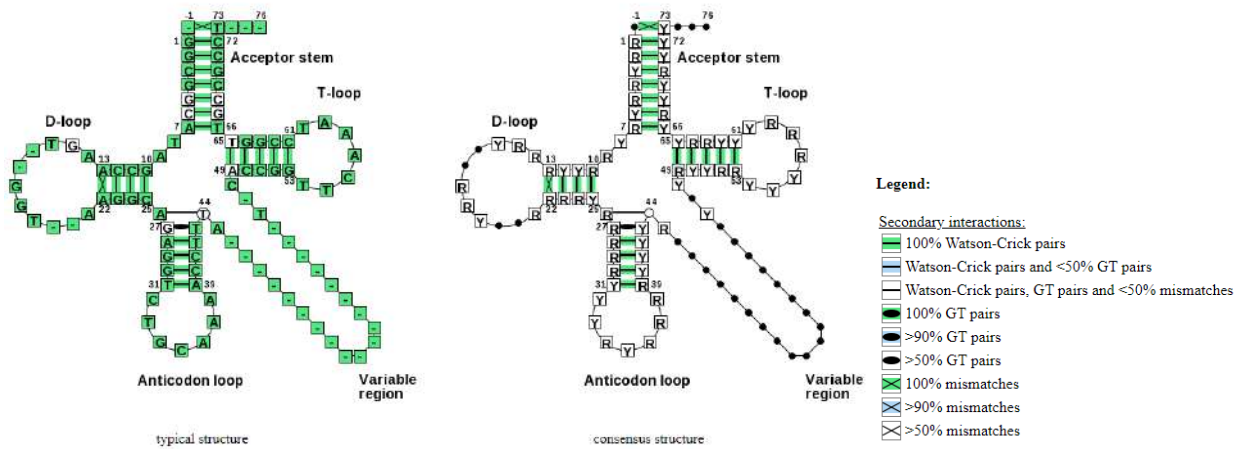


Figura 5 Localización del gen *trna-cys* en la cepa *Bacillus cereus* ATCC 10876. El clúster de genes tRNA en *B. cereus* ATCC 10876 está constituido por 11 genes de tRNA, el gen *trna-cys* se encuentra ubicado entre el gen de *trna-gly* y *trna-leu*; río abajo del clúster se encuentran genes que codifican proteínas hipotéticas DUFF 3884 y YebC/PmpR. Secuencia generada a partir de los datos obtenidos en IMG.

En la estructura típica del *trna-cys* el apareo entre bases mantiene la estructura secundaria, observándose predominantemente entre bases A-U y G-C; dentro de la (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) es posible observar que existen bases púricas y pirimidínicas 100% conservadas en la secuencia de *trna-cys* consenso dentro del grupo de *B. cereus*; así como huecos en la región variable.



Nucleotides in typical tRNAs:

- 100% conserved
- >90% conserved
- >50% conserved
- 100% purine or 100% pyrimidine
- purine and pyrimidine
- <50% (no dominant nucleotide)
- 100% gaps

Nucleotides in consensus tRNAs:

- 100% conserved
- 100% purine
- 100% pyrimidine
- <50% (no dominant nucleotide)
- 100% gaps

Figura 6 Estructura típica y consenso de *trna-cys* presente en miembros del grupo *Bacillus cereus*. Dentro de la figura se puede apreciar el apareo entre bases complementarias (Watson y Crick) pero también se pueden encontrar (no Watson y Crick) como se aprecia en el brazo D, de igual manera es posible observar desapareos o “mismatches” entre la posición -1 y 73.

El ribosoma debe asociar correctamente el aminoácido unido al tRNA con el trinucleótido en el marco de lectura (codón) del mRNA; debe decodificar solo codones sucesivos y no trinucleótidos en marcos desplazados; existen conjuntos de trinucleotidos llamados códigos circulares que están enmarcando códigos (propiedad de recuperación sincronización y mantenimiento del marco de lectura). Se ha observado la presencia de motivos de código circular en las regiones de los extremos 5’y/o 3’ de varios *trna*. Específicamente los *tra-cys* en procariontas presentan motivos de código circular en el extremo 3’ lo que sugiere que las regiones 3’ de los *trna* tienen una estructura primaria similar a la estructura primaria de los genes con un “marco” a partir del anticodón (Michel, 2013).

2.4.5 *trna* y filogenia

La estructura terciaria de los *tRNA* permite un alto grado de conservación estructural, por lo que las moléculas de *tRNA* son de los *RNA* más estables en una célula y son considerados más robustos² que los *mRNA* (Raina e Ibba, 2014).

Acorde a Cedergreen citado en Widmann (2021) los *trna* fueron las primeras secuencias de ácido nucleico utilizadas para reconstrucción filogenética. Estudios realizados muestran que el patrón general de similitudes y diferencias en los grupos de *trna* recuperan la filogenia universal de manera notable y equiparable a la filogenia de *rna* coincidiendo ambas filogenias (Widmann, 2010); por lo que pueden ser utilizados como marcadores filogenéticos para resolver relaciones entre los taxones microbianos (Schwartz, 2018).

De manera particular Tremblay-Savard (2015) basó su estudio de evolución de repertorios de *trna* en especies de *Bacillus*, considerando que los genes de *trna* se encuentran separados por pocos eventos evolutivos; el resultado de su estudio muestra que los eventos de duplicación y delección son prevalentes sobre las inversiones o transposiciones, pero en bajo número (generalmente de uno a dos) (Tremblay-Savard et al., 2015).

La distribución filogenética de estas especies sugiere que las largas matrices se diseminan por transferencia horizontal de genes sustentado en la observación de matrices similares en plásmidos, elementos conjugativos y el genoma de bacteriófagos (Santamaría et al., 2021).

Los *trna* han sido utilizados en diversas estrategias moleculares, para la identificación de especies bacterianas; Welsh y Michael McClelland (1991) utilizaron una estrategia molecular basada en motivos de secuencia compartidos de genes *trna*, para identificar especies de *Staphylococcus* donde el diseño de los cebadores consideró una

² La robustez biológica o genética es su capacidad para retener su funcionalidad a pesar de la introducción de errores aleatorios. Bertolaso, Marta y Cerezo, María. 2017. "Robustez biológica". En Diccionario Interdisciplinar Austral, editado por Claudia E. Vanney, Ignacio Silva y Juan F. Franck. URL=http://dia.austral.edu.ar/Robustez_biológica

combinación perfecta de cinco bases entre el extremo 3' del cebador y muchos genes de *trna* y homología extensa en el resto del cebador con varios genes de *trna* en varias secuencias de la especie; concluyendo que sería posible desarrollar cebadores consenso de *trna* con aplicación en epidemiología; de igual manera se han utilizado en el análisis de polimorfismos de longitud espaciadora intergenica de *trna* para la identificación de aislados estreptocócicos de mastitis bovina (Zschöck et al., 2005)

Diversos estudios han utilizado cebadores consenso de *trna* para el diseño de estrategias basadas en huellas genéticas de regiones espaciadoras o secuencias de *trna* para la diferenciación de especies como *Acinetobacter*, *Streptococcus* (Baele et al., 2001; Ehrenstein et al., 1995; Welsh y Michael McClelland 1991). Andrade (2019) evaluó la presencia de *Paenibacillus larvae* en polen usando la amplificación del gen *trna-cys* concluyendo que al ser combinado con otros métodos moleculares puede ser útil para la identificación del microorganismo.

Los *trna* pueden ser utilizados con enfoque diferente a la identificación como la evaluación de procesamientos de maduración, a través de la participación de RNAsas en la maduración de *trna-cys* (Campos et al., 2010), o bajo condiciones de estrés (Hernández et al., 2021). Por su parte Masuda (2019) demuestra que la metilación de m1G37-tRNA en la traducción específica de codones controla el desarrollo de resistencia en bacterias Gram negativas.

III. Hipótesis

La región genómica donde está localizado el gen *trna-cys* del grupo de *B. cereus sensu lato* es estructuralmente diferente en miembros del género *Bacillus*, por lo que puede ser empleada en estrategias moleculares y filogenéticas para su identificación a partir de aislados bacterianos esporulados presuntivos.

IV. Objetivos

Objetivo General

Evaluar la región genómica asociada al gen *trna-cys* a través de PCR como método alternativo para la detección de *Bacillus cereus sensu lato* a partir de aislados bacterianos esporulados.

Objetivos Específicos

1. Analizar *in silico* la región genómica asociada al gen *trna-cys* de miembros pertenecientes al grupo de *B. cereus sensu lato*.
2. Evaluar la funcionalidad de la estrategia molecular de la PCR a partir de la región genómica del *trna-cys* en la cepa *B. cereus* ATCC 10876 y aislados bacterianos esporulados presuntivos.
3. Realizar el análisis filogenético a partir de la correlación de los amplicones obtenidos de la región genómica del *trna-cys* con secuencias obtenidas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

V. Metodología

5.1 Diseño experimental

El diseño de este proyecto de investigación consistió en evaluar la región genómica asociada al gen *trna-cys* mediante PCR punto final como un método alternativo para la detección de *B. cereus sensu lato* en aislados bacterianos esporulados usando como control una cepa de referencia *Bacillus cereus* ATCC 10876. A partir del análisis *in silico* de la región genómica asociada al gen *trna-cys* de copia única, se realizó amplificación y secuenciación de los amplicones obtenidos para el análisis filogenético de las cepas seleccionadas para el estudio.

5.1.2. Universo

Se trabajó con aislados bacterianos esporulados de muestras de polen europeo y mexicano, así como con la cepa de referencia *Bacillus cereus* ATCC 10876.

5.1.3. Tipo de Muestreo

El muestreo fue no probabilístico intencional con un tamaño de muestra acorde al número de aislados bacterianos esporulados.

5.1.4. Definición de las Unidades de Observación

La selección primaria consideró la resistencia de las endosporas a temperaturas elevadas para el aislamiento bacteriano, con capacidad de crecimiento en medio Agar Soya Tripticasa. Las colonias obtenidas a partir de la selección primaria fueron utilizadas para detectar la presencia de la región genómica del gen *trna-cys* y genes asociados para la detección de *Bacillus cereus s.l.*

Criterios de Inclusión

- Aislamientos de bacilos Gram positivos esporulados con crecimiento en resiembra y características citomorfológicas en medio de cultivo AST.

Criterios de Exclusión

- Aislamientos de bacilos Gram positivos esporulados sin crecimiento en resiembra o sin características citomorfológicas en medio de cultivo.

Control

Cepa de referencia *Bacillus cereus* ATCC 10876.

5.1.5 Descripción operacional de las variables de la hipótesis

A partir de la hipótesis se establecieron como variables la región genómica de *trna-cys* del grupo de *B. cereus s.l.*, aislado bacteriano sospechoso y el análisis filogenético realizando una descripción operacional y definiendo de cada tipo de variable (Tabla 5).

Tabla 5 Variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional
Región genómica de <i>trna-cys</i> del grupo <i>Bacillus cereus s.l.</i>	Dependiente	Zona del DNA cromosómico que contiene grupo de genes tRNA y tres genes específicos ubicados río abajo del <i>trna-cys</i>	Detección por electroforesis de los fragmentos de amplificación por PCR de la región genómica del <i>trna-cys</i> . Positivo – negativo con base al marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher)
Aislado bacteriano presutivo	Independiente	Microorganismo aislado de la población natural con características fenotípicas del género a investigar	Aislamiento bacteriano a partir de diluciones de muestras de polen sometidas a shock térmico con viabilidad solo de microorganismos capaces de formar endosporas
Análisis filogenético	Dependiente	Comparación de secuencia de nucleótidos para establecer la similitud de genes de las muestras analizadas	Agrupamiento de las secuencias obtenidas con la estrategia molecular en clados dentro de la filogenia del grupo de <i>B. cereus s.l.</i> (asociaciones del árbol consenso considerando número de repeticiones de asociación)

5.2 Muestra y aislamiento

Se realizaron diluciones decimales seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-7} de las muestras de polen, homogenizando 1g de muestra en 10 ml de peptona; para la obtención de bacterias esporuladas, las diluciones fueron sometidas a calentamiento (80°C por 10 minutos) para inactivación térmica de células vegetativas acorde a la estrategia citada en Andrade *et al.* (2019). Esta técnica es importante para establecer el origen de algunos brotes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria causados por

este microorganismo, de tal forma que solo los microorganismos capaces de formar esporas sobreviven. Por otra parte, estudios previos han demostrado la presencia de cantidades significativas de tRNA en esporas inactivas, representando un reservorio esencial. (Arvizu et al., 2020).

Para el aislamiento se inocularon las diluciones en placas de agar soya tripticasa (TSA) medio (Difco Laboratories; Detroit, MI. USA) con incubación a 37°C por 24 hrs. Se realizó resiembra por extensión en placa e incubación a 37°C por 24 hrs.

Fueron seleccionadas 13 colonias (grandes, planas, secas) de diversas placas (de cultivos puros) para evaluar la estrategia molecular de la región genómica río abajo del gen *trna-cys* mediante PCR punto final.

5.3 Análisis *in silico* de la región genómica asociada al gen *trna-cys*

5.3.1. Análisis *in silico* del número de isoaceptores.

Como primer paso se verificó el número de copias de genes *trna* en 250 especies diferentes del género *Bacillus*, mediante la base de tRNAscan-S; el resultado obtenido del número de isoaceptores presentes en cada una de las especies fue procesado en el software R versión 3.0.2., para comparar el número de copias presentes de cada isoaceptor en las diferentes especies del género *Bacillus spp.*

5.3.2. Análisis *in silico* de genes presentes en la región genómica asociada al *trna-cys* río abajo.

Se obtuvo el mapa genómico de diversas especies de *Bacillus* y en particular de *B. cereus s.l.*, en la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (Kanehisa et al., 2021); así como, de la base de datos GenBank para el análisis de los genes presentes en la región genómica asociada al *trna-cys* río abajo. Además, dentro de las bases de datos seleccionamos 18 secuencias de cepas de referencia considerando 1300 bp río abajo del

gen *trna-cys* para elaborar el árbol filogenético utilizando el software MEGA versión X (Kumar et al., 2018).

5.4 Evaluación de la funcionalidad de la estrategia molecular de la PCR a partir de la región genómica asociada al gen *trna-cys*

5.4.1. Condiciones de amplificación

Siguiendo la metodología previamente publicada por el grupo de trabajo, se evaluó la funcionalidad de la estrategia molecular mediante PCR punto final, para la identificación de *B. cereus s.l.* Se utilizaron los cebadores 1517: 5'- GGC GGC ATA GCC AAG TGG TAA GGC -3' (forward) y 1518: 5'- GCTGCCACATAAATTTTCACGCCC -3' (reverse) específicos para la región de estudio *tRNA^{Cys} - YebC/PmpR* con una longitud de 1160 bp (Hernández et al., 2020).

La estrategia fue evaluada en 13 colonias junto con cepas de: *B. cereus ATCC 10876* (control positivo), *B. subtilis* (control negativo), *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. altitudinalis*, *B. sonorensis* y *B. thuringiensis* provenientes de la colección del laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Una colonia individual de cada cepa fue suspendida en 50 µL de agua destilada grado biología molecular para preparar la mezcla de reacción utilizando el mix para PCR (Thermo Scientific™ Phusion Flash PCR Master Mix: Waltham, MA, USA); la amplificación se realizó en Termociclador (Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler Type 5020). Las condiciones para PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 60 seg, 35 ciclos a 58°C por 30s; 72°C por 30s y una extensión final a 72°C por 1 min.

A los productos de la amplificación se les adicionó Red Gel (Biotium) para su visualización y sometidos a electroforesis (Power Pac Basic Power Supply de Biorad) utilizando gel de agarosa al 1 %, (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) a 70 volts por 40 min y visualizados con transiluminador UV.

5.5 Análisis Filogenético

Siete de los amplicones obtenidos fueron enviados a secuenciar en MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea), los datos de secuenciación de los amplicones se descargaron en formato FASTA y se compararon con secuencias de la base de datos del GenBank mediante BLAST (Basic Local Alignment Search) (Altschul, S.F *et al.* 1990) considerando como algoritmo de selección megablast y los parámetros preestablecidos. De las secuencias resultantes en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (O'Leary *et al.*, 2016) fueron seleccionadas aquellas con 100% de cobertura y >95% de identidad y descargadas en formato FASTA para la realización del análisis filogenético utilizando MEGA versión X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz y Tamura 2018) y el método Neighbor-Joining con 1000 repeticiones.

VI. Resultados y discusión

6.1 Determinación del número de genes *trna* en especies del género *Bacillus*

El número de genes *trna* varía considerablemente entre los diversos reinos (Pettersson, 2009), comúnmente se encuentran intercalados dentro del genoma de la mayoría de los organismos (Santa María et al., 2021); de manera particular en las bacterias se observa el isoceptor tRNA^{Met} con el mayor número de copias (Novoa et al., 2013). En el presente estudio en primera instancia se cuantificó y representó de manera gráfica el número de copias de los isoceptores tRNA presentes en 250 especies del género *Bacillus*.

Los resultados obtenidos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) muestran que tRNA^{Met} es el isoceptor con mayor número de copias, congruente con la observación de Novoa (2013) y que existe un bajo número de copias de los isoceptores tRNA^{Cys} , tRNA^{Trp} y tRNA^{His} dentro de los genomas analizados. De manera puntual el número de copias de tRNA^{Cys} dentro del grupo de *B. cereus s.l.*, es de 1 a 3 isoceptores; predominando la presencia de un solo isoceptor en 97 de las 106 especies analizadas del género *B. cereus s.l.* concordante con lo reportado previamente (Andrade et al., 2019; Campos Guillén et al., 2010). Por lo que se decidió usar el gen *trna-cys* para el desarrollo de una estrategia molecular para la identificación del género *B. cereus s.l.*

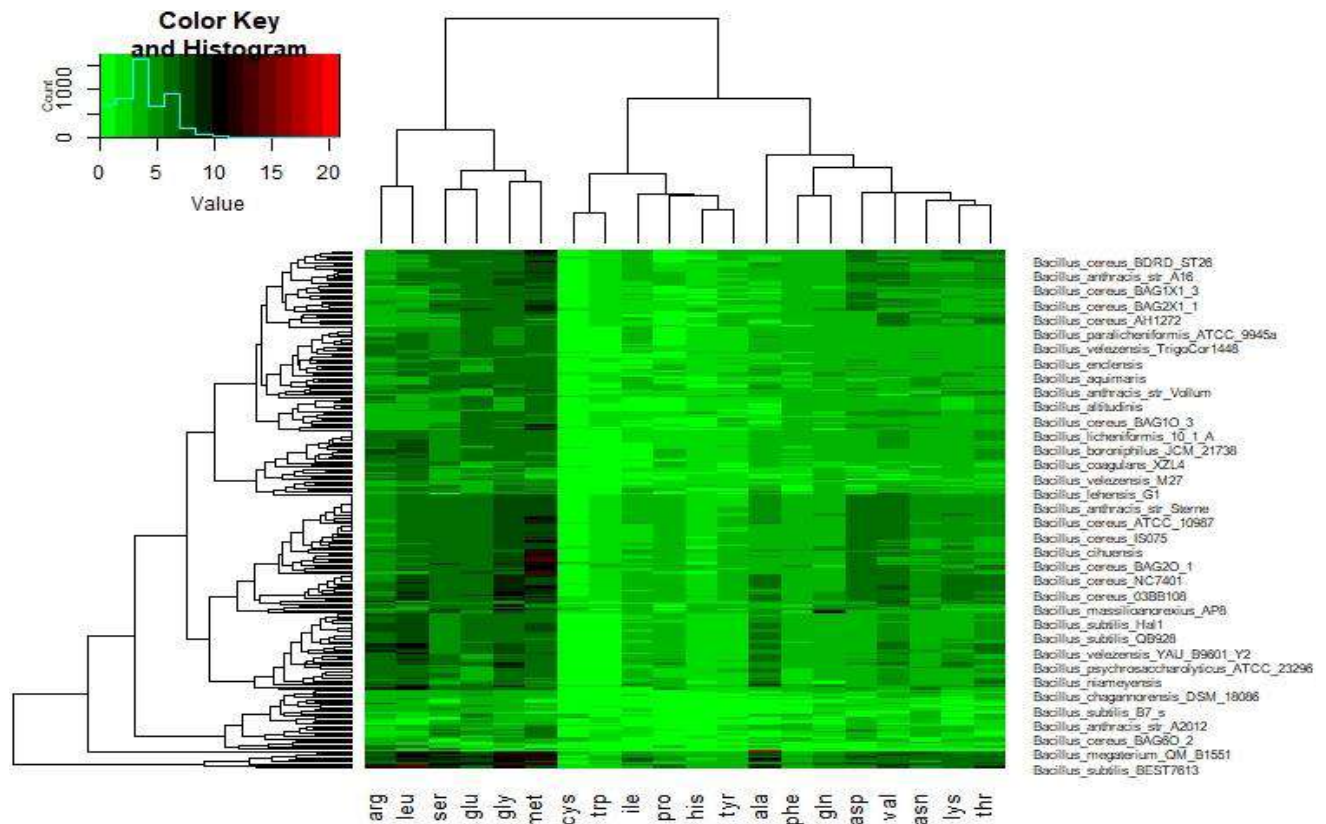


Figura 7 Distribución y número de copias de *trnas* presentes en diferentes genomas del género *Bacillus*. El histograma muestra diferencias significativas en el número de copias de cada isoceptor de tRNA presente en los genomas de las especies del Género *Bacillus* revisadas. La clave de colores, indica el número de copias presentes bajo un gradiente de color que va desde el verde (menor número de copias) al color rojo (mayor número de copias). El isoceptor tRNA^{Cys} presenta el número más bajo (recuadro rojo). El número de copias de cada isoceptor de tRNA fue mapeado y extraído usando el programa tRNAscan-SE. A partir de los datos obtenidos, el recuento y el análisis del agrupamiento fue realizado usando el Software R.

6.2 Organización y estructura de la región genómica asociada al *trna-cys*

La organización de *trnas* en matrices u operones se limita a unos pocos Filos y principalmente en bacterias Gram positivas; dentro de los *Firmicutes* predomina la alta presencia de organismos con operones de *trna* y más en el orden *Bacillales* (Tran et al., 2015), frecuentemente el clúster se localiza río debajo de un operón *rna*; (Candelon et al., 2004). El esquema gráfico (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) de la región genómica de estudio en las 17 secuencias de cepas de referencia de diferentes especies de *Bacillus*, muestra que se mantiene la sintenia en el operón *rrna* río arriba del clúster de *trna*, concordante con Tremblay-Savard (2015) y Santamaría (2021). En

pertenecientes al Filo *Firmicutes*; a diferencia existen genes conservados en la región río abajo del clúster de *trnas* en cuatro de las cinco especies seleccionadas del grupo *B. cereus s.l.*

A partir de los datos anteriores se realizó el análisis de la región genómica de manera específica en cepas representativas de miembros del grupo de *B. cereus s.l.* El análisis *in silico* de las regiones genómicas de estudio (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.b**), ubica al *trna-cys* dentro de una matriz de 15 o 16 *trnas*; comúnmente precedido por *trna-gly* y seguido por *trna-leu*; por lo que es evidente que el número y organización de los genes de *trnas* dentro del grupo de *B. cereus s.l.* es altamente conservado y es pertinente con lo descrito previamente por Tremblay-Savard (2015).

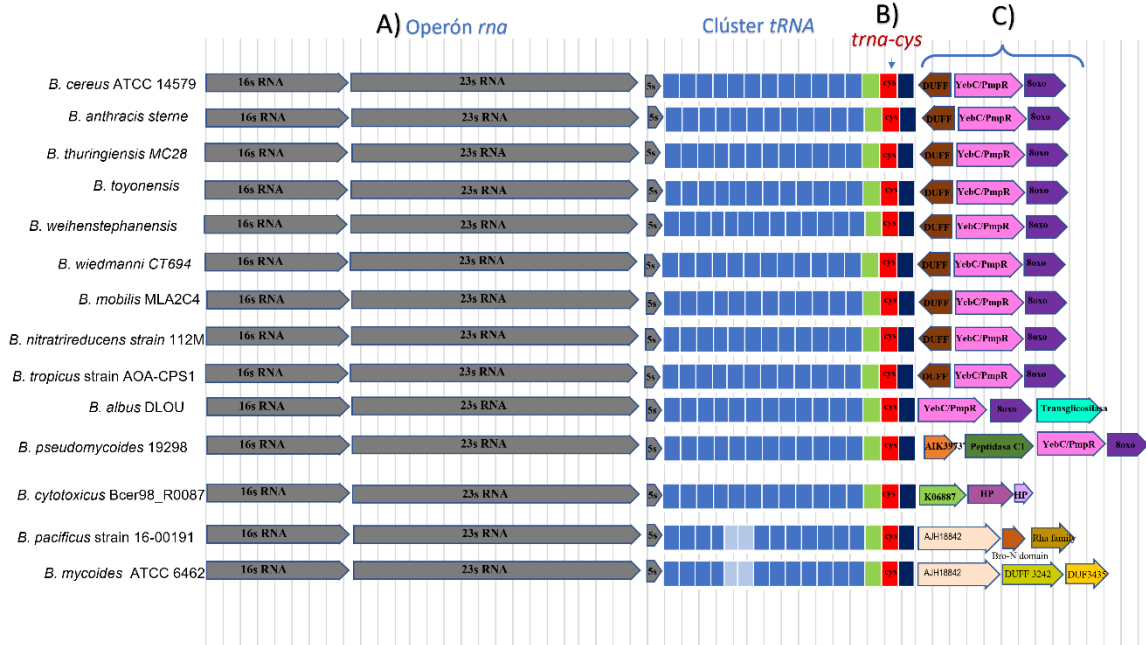


Figura 9 Análisis de la región genómica asociada al *trna-cys* en *B. cereus s.l.* En la representación gráfica de la región genómica de especies pertenecientes al grupo *B. cereus s.l.* se aprecia A) Río arriba del clúster de *trnas* se encuentra el operón de *rna* presente en todas las especies de estudio. B) La ubicación del *trna-cys* dentro del clúster, precedido por *trna-gly* (verde) y *trna-leu* (azul). C) Río abajo del clúster de *trnas* los genes codificantes para DUF (café) YebC/PmpR (rosa) y *mutT* (morado). DUF se encuentra presente en 9 secuencias, mientras que YebC/PmpR y *mutT* en once de las catorce secuencias de cepas de referencia seleccionadas para el análisis. Se observa que los genes presentes en *B. cytotoxicus*, *B. pacificus* y *B. mycoloides* son diferentes en la región.

Río abajo del clúster de *trnas* (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.c**) se observa de manera consistente la presencia de tres genes en: *B. cereus*,

B. anthracis, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. wiedmanni*, *B. mobilis*, *B. nitratireducens* y *B. tropicus*. Dichos genes codifican para las siguientes proteínas (genoma.jp):

- 1) DUF. Familia de proteínas presentes en bacterias, funcionalmente no caracterizadas, pero muchas de ellas son anotadas como Tagatosa 1,6-difosfatasa aldolasa.
- 2) YebC/PmpR. Familia de reguladores transcripcionales, en bacterias regula negativamente la expresión de genes en función de la densidad celular a través de moléculas de señal denominadas “autoinductores”.
- 3) *mutT*. Proteínas de reparación de DNA y recombinación.

Por otra parte *B. albus* y *B. pseudomycooides* carecen de DUF, pero se encuentran presentes los genes que codifican para YebC/PmpR y *mutT*. De manera específica *B. pseudomycooides* presenta dos genes previos a Yeb/PmpR ausentes en las otras especies.

A partir de la presencia de un solo gen de *trna-cys* y la consistencia de genes río abajo del mismo, la estrategia molecular para la identificación de miembros del grupo de *B. cereus s.l.* contempla la región genómica *trnacys - yebC/PmpR*

6.3 Detección de la región genómica *trnacys - yebC/PmpR*

Como primera aproximación se evaluó la estrategia en cepas de *B. cereus* ATCC 10876 (control positivo), *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. altitudinalis*, *B. sonorensis* y *B. thuringiensis*; previamente identificadas y provenientes de la colección del laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Querétaro. La separación de los productos de los amplicones de la región *trnacys - yebC/PmpR* por electroforesis en gel de agarosa (Figura 10; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), se visualizaron bandas de manera específica en *B. cereus* ATCC 10876, *B. thuringiensis* y

B. cereus, por la presencia de la región genómica de estudio en dichas especies pertenecientes al grupo *B. cereus s.l.* Por lo que consideramos que la estrategia molecular basada en la región *trnacys - yebC/PmpR* permite diferenciar a estas especies del grupo. *B. cereus s.l.* de otros *Bacillus*.

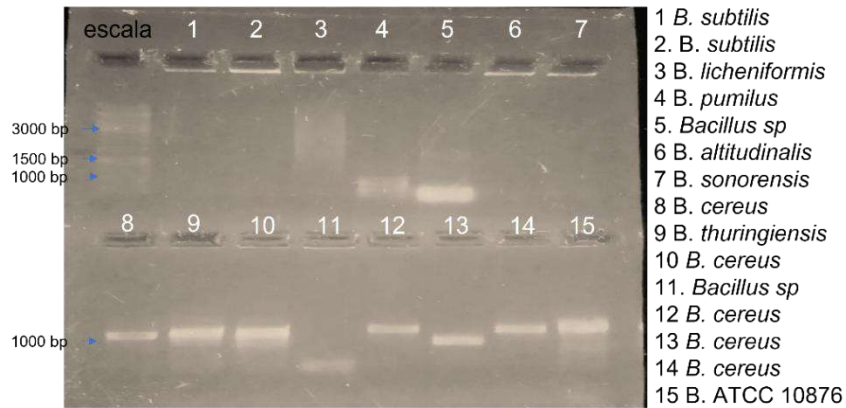


Figura 10 Visualización de los amplicones obtenidos por electroforesis en gel de agarosa apreciándose bandas muy claras en los carriles 5,12, 13, 14 con un tamaño cercano a las 1000 bp y la banda del carril 11 con un tamaño marcadamente inferior.

La estrategia fue evaluada en trece de los 50 aislamientos obtenidos a partir de las muestras de polen de donde se aislaron colonias sospechosas, doce de los trece amplicones visualizados por electroforesis (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.B**) muestran la presencia de bandas en la región próxima a 1000 bp; sin embargo, la banda del amplicon C6 se localiza próxima a las 750 bp. Estos resultados indican que los microorganismos de los trece aislados presentan dentro de su genoma la región de estudio *trnacys- yebC/PmpR* (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.A**).

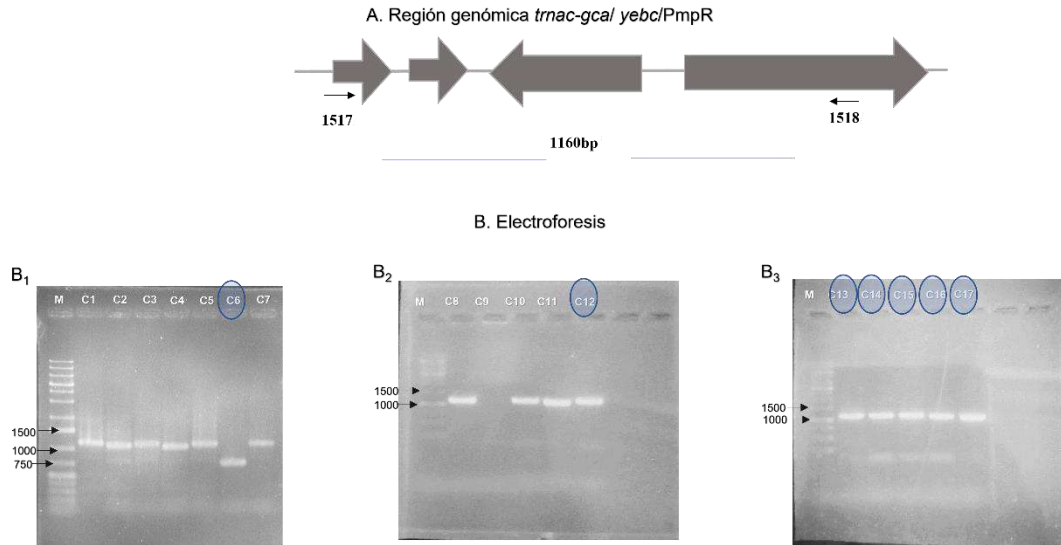


Figura 11 Electroforesis de los productos de amplificación de los aislados bacterianos de análisis. Se detectan fragmentos de amplificación en la región próxima a 1000 bp correspondiente al tamaño de la región genómica en la cepa de referencia *B. cereus* ATCC 10876. Las siglas para B₁: Marcador (M), Control positivo (C1), Aislados presuntivos (C2, C3, C4, C5, C6, C7); B₂: Marcador (M), Control positivo (C8), control negativo *B. subtilis*/M/7KGYs (C9), Aislados presuntivos (C10, C11, C12); B₃: Marcador (M), Control positivo (C13), Aislados presuntivos (C14, C15, C16, C17).

6.4 Filogenia de los aislados.

El diseño molecular que utiliza cebadores para amplificar regiones específicas permite distinguir perfiles que difieran a nivel de especie o género y, por lo tanto, ser una medida de la relación Filogenética (Ehrenstein et al., 1996); para confirmar la clasificación filogenética de los aislamientos C12, C13, C14, C15, C16, C17 y C6 con amplificación positiva, fueron enviados a secuenciación para su análisis.

Nuestro análisis filogenético (Figura 12) confirma los resultados obtenidos mediante *trnacs*-PCR de que las colonias bacterianas identificadas son miembros del grupo de *B. cereus*. El agrupamiento de las secuencias de la región genómica *trnacs*-*yebC*/*pmpR* revelan tres clados, de manera concordante con Bazinet (2017) y 11 grupos de especies. El clado I está constituido por especies de *B. albus*, *B. mobilis*, *B. nitratireducens*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. wiedmannii*, *B. tropicus* y *B. anthracis*; es el clado más grande y forma ocho grupos. Dentro del grupo cinco observamos exclusivamente especies que estaban estrechamente relacionadas con *B. anthracis* congruente a la

filogenia construida por Patiño (2017) y ninguno de nuestros aislados se agrupo en el mismo; los grupos 6, 7, 8 y 9 contienen especies filogenéticamente relacionadas con *B. cereus* y *B. thuringiensis* y es donde se agruparon nuestros aislados C13, C17 y C6 en los grupos 9, 6 y 7 respectivamente.

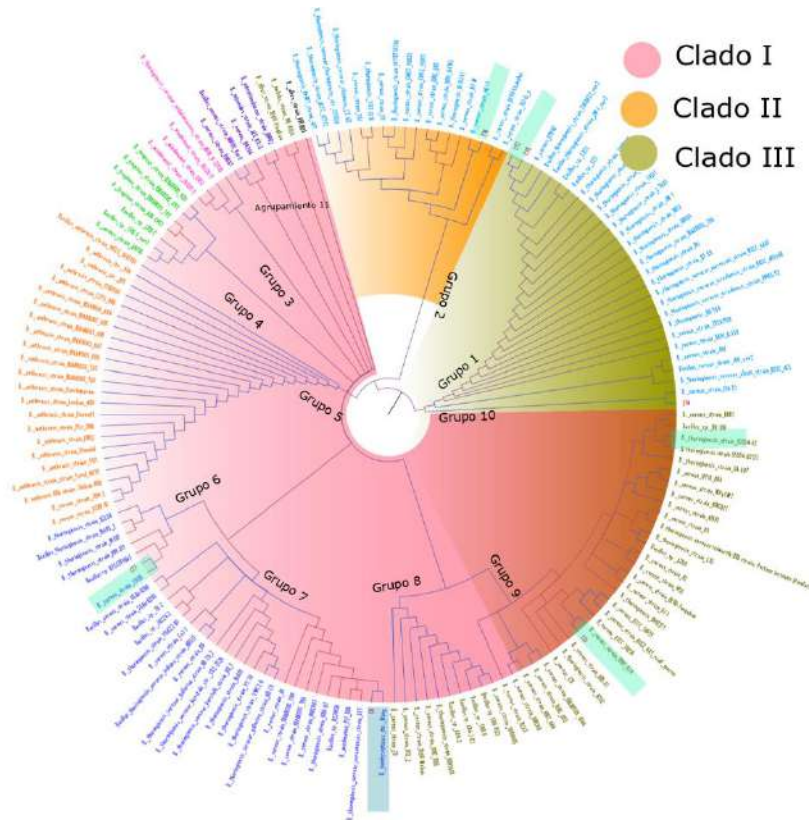


Figura 12 Filograma circular que representa las relaciones filogenéticas de los amplicones obtenidos dentro del grupo de *B. cereus sensu lato*. El análisis filogenético fue inferido utilizando el método de máxima parsimonia. El árbol consenso utilizó 1000 réplicas; se colapsaron las ramas cuando las particiones fueron menores del 50% de las réplicas. El procesamiento del árbol fue realizado en el software MEGA X y renderizado en FigTree 1.4.4

Dentro de este clado es importante señalar a nuestro aislado C6 que presentó un producto de PCR más pequeño; la secuencia de ADN mostró una gran similitud con la cepa *B. bombysepticus* cepa Wang; estas especies filogenéticamente relacionadas muestran una delección de alrededor de 348 bp que incluye parte del primer gen y la región intergénica antes del segundo gen (*yebC/pmpR*) dentro de la región genómica de estudio.

De igual manera el análisis genómico revela que para *B. thuringiensis* serovar *coreanensis* hay una inserción de ~30 Kb en la región intergénica entre el grupo de *trna* y el siguiente gen ubicado río abajo, con duplicación de *trna-leu* y pérdida de secuencias similares a las especies relacionadas filogenéticamente. La presencia de genes relacionados con recombinasas en esta inserción sugiere que algunos surgieron por un evento de recombinación.

Respecto al clado II agrupa especies de *B. thuringiensis* y predominantemente de *B. cereus*; dentro de este clado se agrupó nuestro amplicon C16. Finalmente, el clado III agrupa especies de *B. cereus* y predominantemente *B. thuringiensis*, formado dos grupos; dentro de este clado, se agruparon nuestros aislados C12 y C15 en el grupo 1 y C14 en el grupo 10.

VII. Conclusiones

Algunos miembros de *Bacillus cereus* son utilizados en la industria agrícola como agente de control biológico y en la industria alimentaria como probiótico; sin embargo, también existen especies dentro del grupo capaz de generar enfermedades en los humanos. La falta de prácticas óptimas en el control de infecciones repercute en la identificación del agente etiológico y con ello en el diagnóstico; tanto las IAAS y las ETA conllevan a repercusiones en morbilidad y mortalidad, dentro de los agentes etiológicos involucrados se encuentran especies del grupo de *B. cereus s.l.*

La relevancia del carácter patogénico de *B. cereus s.s.*, ha sido subestimada por diversos factores: la remisión de la sintomatología en ETA por lo que muchos pacientes no acuden al servicio médico; la variabilidad de patologías a nivel sistémico o local, producto de la diversidad de factores de virulencia; o la identificación errónea por el enmascaramiento en cultivos; así como variantes atípicas en los cultivos y por ser considerado “contaminante”. Cuando se identifica a *B. cereus* como agente causal solo

es a nivel presuntivo después de diversas pruebas fenotípicas que consumen tiempo valioso para el diagnóstico; por lo cual contar con un método de identificación rápida es relevante.

Bacillus cereus s.l. es un grupo caracterizado por ser formadores de endosporas altamente resistente al calor (Vilas-Bôas et al., 2007). Tras someter a tratamiento térmico las diluciones (1×10^{-1} hasta 1×10^{-7}) e incubación a 37°C por 24 h, en los 50 aislamientos obtenidos se apreció morfología colonial característica fenotípicamente (colonias grandes, planas, irregulares y secas) de *B. cereus s.l.*

El número y organización de los genes de *tRNAs* dentro del grupo de *B. cereus s.l.* es altamente conservado y es pertinente con lo descrito previamente por Tremblay-Savard (2015); la región genómica *trnacys - yebC/PmpR*, presente en *Bacillus cereus s.l.*, cumple con la característica de incluir genes conservados lo que permitió la viabilidad para el desarrollo e implementación de la estrategia molecular.

Después del alineamiento de secuencias seleccionadas para la región genómica de estudio y la valoración mediante PCR punto final, se encontró que es eficiente para detectar la región genómica de estudio. Tras la amplificación se aprecia similitud de los amplicones con cepas de diverso origen y características. Por ejemplo: el aislado C17 mostro similitud con la cepa reportada *B. cereus* 21155, la cual se ha descrito que es capaz de degradar el gluten y los péptidos inmunotóxicos para celíacos; el aislado C13 mostro similitud con la cepa reportada *B. cereus* FORC024, la cual fue aislada de sopa de pollo; el aislado C14 mostro similitud con la cepa reportada *B. cereus* CF4-51 que fue aislado de suelo; el aislado C16 mostro similitud con la cepa reportada *B. cereus* MLY1 que fue aislada de lodo activado; los aislados C12 y C15 mostraron similitud con la cepa reportada *B. cereus* G9842, que fue aislada de muestras de heces en pacientes de Nebraska y finalmente el aislado C6 mostro similitud con la cepa reportada *B. bombysepticus* str. Wang, característicamente patógeno para *Bombyx mori* Black Chest.

Por lo anterior es claro su carácter ubicuo y la relevancia del grupo en diversos entornos; una evaluación preliminar del riesgo de aislamientos de *B. cereus* es posible mediante la correlación de los aislados con su grupo filogenético.

Considerando los resultados del análisis filogenético *B. anthracis* queda restringido a un solo grupo lo que concuerda con (Patiño-Navarrete y Sanchis 2017); así mismo nuestro análisis filogenético concuerda con estudios previos que incorporan a *B. albus*, *B. mobilis* y *B. nitrotireducens* dentro del grupo de *B. cereus sensu lato*.

Los resultados descritos en diversos estudios sugieren un alto grado de diversidad genética entre las especies, con variabilidad en la expresión toxigénica y fenotípica; por lo que las cuestiones relacionadas con la taxonomía de *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis* continúa en debate entre los investigadores de este campo (Barraud y Tisné, 2019; Bavykin, et al., 2004; Chen y Tsen, 2002; Jessberger et al., 2019; Kotiranta et al., 2000; Nakano, 2020; Osakwe, 2020; Samarasekara, 2019; Sharma et al., 2019).

Tras el estudio concluimos que la estrategia molecular basada en el gen *trna-cys* permite detectar la presencia de especies del grupo de *B. cereus* a nivel de grupo, complementando métodos existentes para su detección; reduciendo y optimizando tiempos.

VIII. Referencias

- Abfalter, C. M., Schönauer, E., Ponnuraj, K., Huemer, M., Gadermaier, G., Regl, C., Briza, P., Ferreira, F., Huber, C. G., Brandstetter, H., Posselt, G., y Wessler, S. (2016). Cloning, Purification and Characterization of the Collagenase ColA Expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579. *PLOS ONE*, 11(9), e0162433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162433>
- Akamatsu, R., Suzuki, M., Okinaka, K., Sasahara, T., Yamane, K., Suzuki, S., Fujikura, D., Furuta, Y., Ohnishi, N., Esaki, M., Shibayama, K., y Higashi, H. (2019). Novel Sequence Type in *Bacillus cereus* Strains Associated with Nosocomial Infections and Bacteremia, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 25(5), 883-890. <https://doi.org/10.3201/eid2505.171890>
- Alexander, S. M., Grayson, T. H., Chambers, E. M., Cooper, L. F., Barker, G. A., y Gilpin, M. L. (2001). Variation in the spacer regions separating tRNA genes in *Renibacterium salmoninarum* distinguishes recent clinical isolates from the same location. *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 119–128. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.119-128.2001>
- Andrade, V. D. M., Flores, J. L. H., López, M. A. R., Hernández, A. C., Gómez, S. R., Calvillo, R. P. M., Martínez, A. G. E., Pérez, J. C., Hernández, I. A., Hidalgo, E. Á., Osuna, C. Á., Jones, G. H., y Guillén, J. C. (2019). Evaluation of the presence of *Paenibacillus larvae* in commercial bee pollen using PCR amplification of the gene for tRNA^{Cys}. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(2), 471-480. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00039-9>
- Aoyagi, T., Oshima, K., Endo, S., Baba, H., Kanamori, H., Yoshida, M., Tokuda, K., y Kaku, M. (2020). Ba813 harboring *Bacillus cereus*, genetically closely related to *Bacillus anthracis*, causing nosocomial bloodstream infection: Bacterial virulence factors and clinical outcome. *PloS one*, 15(7), e0235771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235771>

- Arvizu Hernández, I., Hernández Flores, J. L., Caballero Pérez, J., Gutiérrez Sánchez, H., Ramos López, M. Á., Romero Gómez, S., Cruz Hernández, A., Saldaña Gutierrez, C., Álvarez Hidalgo, E., Jones, G. H., y Campos Guillén, J. (2020). Analysis of tRNA Cys processing under salt stress in *Bacillus subtilis* spore outgrowth using RNA sequencing data. *F1000Research*, 9, 501. <https://doi.org/10.12688/f1000research.23780.1>
- Baele, M., Storms, V., Haesebrouck, F., Devriese, L. A., Gillis, M., Verschraegen, G., de Baere, T., y Vaneechoutte, M. (2001). Application and evaluation of the interlaboratory reproducibility of tRNA intergenic length polymorphism analysis (tDNA-PCR) for identification of *Streptococcus* species. *Journal of clinical microbiology*, 39(4), 1436–1442. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1436-1442.2001>
- Baldwin V. M. (2020). You Can't *B. cereus* - A Review of *Bacillus cereus* Strains That Cause Anthrax-Like Disease. *Frontiers in microbiology*, 11, 1731. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01731>
- Banerjee, R., Chen, S., Dare, K., Gilreath, M., Praetorius-Ibba, M., Raina, M., Reynolds, N. M., Rogers, T., Roy, H., Yadavalli, S. S., e Ibba, M. (2010). tRNAs: Cellular barcodes for amino acids. *FEBS Letters*, 584(2), 387-395. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.013>
- Barraud, O., Hidri, N., Ly, K., Pichon, N., Manea, P., Ploy, M.-C., y Garnier, F. (2012). Pacemaker-associated *Bacillus cereus* endocarditis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(3), 313-315. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.002>
- Barraud, P., y Tisné, C. (2019). To be or not to be modified: Miscellaneous aspects influencing nucleotide modifications in tRNAs. *IUBMB life*, 71(8), 1126–1140. <https://doi.org/10.1002/iub.2041>
- Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariyev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A., y Cherni, A. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* Gene Sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of *Bacillus cereus* Group Microorganisms. *J. CLIN. MICROBIOL.*, 42, 21.
- Bazinet A. L. (2017). Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *BMC*

evolutionary biology, 17(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1020-1>

Beisl, J., Pahlke, G., Abeln, H., Ehling-Schulz, M., Del Favero, G., Varga, E., Warth, B., Sulyok, M., Abia, W., Ezekiel, C. N., y Marko, D. (2020). Combinatory effects of cereulide and deoxynivalenol on in vitro cell viability and inflammation of human Caco-2 cells. *Archives of Toxicology*, 94(3), 833-844. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02658-w>

Berg, M. D., y Brandl, C. J. (2021). Transfer RNAs: Diversity in form and function. *RNA Biology*, 18(3), 316-339. doi:10.1080/15476286.2020.1809197

Bianco, A., Capozzi, L., Monno, M. R., Del Sambro, L., Manzulli, V., Pesole, G., Loconsole, D., y Parisi, A. (2021). Characterization of *Bacillus cereus* Group Isolates From Human Bacteremia by Whole-Genome Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 11, 599524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599524>

Böhm, M.-E., Huptas, C., Krey, V. M., y Scherer, S. (2015). Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons hbl, cytK and nhe. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 246. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0529-4>

Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382-398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

Buchan, B. W., Ginocchio, C. C., Manii, R., Cavagnolo, R., Pancholi, P., Swyers, L., Thomson, R. B., Anderson, C., Kaul, K., y Ledebor, N. A. (2013). Multiplex Identification of Gram-Positive Bacteria and Resistance Determinants Directly from Positive Blood Culture Broths: Evaluation of an Automated Microarray-Based Nucleic Acid Test. *PLoS Medicine*, 10(7), e1001478. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001478>

Burtscher, J., Etter, D., Biggel, M., Schlaepfer, J., y Johler, S. (2021). Further Insights into the

Toxicity of *Bacillus cytotoxicus* Based on Toxin Gene Profiling and Vero Cell Cytotoxicity Assays. *Toxins*, 13(4), 234. <https://doi.org/10.3390/toxins13040234>

Candelon, B., Guilloux, K., Dusko, S., Sorokin A. (2004) Two distinct types of rRNA operons in the *Bacillus cereus* group. *Microbiology*, 150(3), 601-611. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26870-0>

Campos-Guillén, J., Arvizu-Gómez, J. L., Jones, G. H., y Olmedo-Alvarez, G. (2010). Characterization of tRNACys processing in a conditional *Bacillus subtilis* CCase mutant reveals the participation of RNase R in its quality control. *Microbiology*, 156(7), 2102-2111. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034652-0>

Carlet, J. (s. f.). *World Alliance Against Antibiotic Resistance Alliance Contre le développement des Bactéries Multi-Résistantes The WAAAR declaration against antibiotic resistance*. 4.

Carroll, L. M., Wiedmann, M., y Kovac, J. (2020). *Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the Bacillus cereus Group Which Reconciles Genomic Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes*. 11(1), 15.

Cavello, I., Urbieto, M. S., Cavalitto, S., y Donati, E. (2020). *Bacillus cytotoxicus* Isolated from a Pristine Natural Geothermal Area Reveals High Keratinolytic Activity. *Microorganisms*, 8(6), 796. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060796>

Celandroni, F., Beecher, D. J., Senesi, S., Ghelardi, E., Salvetti, S., y Wong, A. C. L. (2002). Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*, 148(6), 1785-1794. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-6-1785>

Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Senesi, S., y Ghelardi, E. (2016). Identification and Pathogenic Potential of Clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates. *PloS one*, 11(3), e0152831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152831>

Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., y Ghelardi, E. (2019). Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PloS*

one, 14(5), e0217021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217021>

Ceuppens, S., Rajkovic, A., Hamelink, S., Van de Wiele, T., Boon, N., y Uyttendaele, M. (2012). Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne pathogens and disease*, 9(12), 1130–1136. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1230>

Ceuppens, S., Boon, N., y Uyttendaele, M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3), 433-450. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>

Chang, T., Rosch, J. W., Gu, Z., Hakim, H., Hewitt, C., Gaur, A., Wu, G., y Hayden, R. T. (2017). Whole-Genome Characterization of *Bacillus cereus* Associated with Specific Disease Manifestations. *Infection and Immunity*, 86(2), e00574-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00574-17>

Chen, I.-M. A., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Huntemann, M., Varghese, N., White, J. R., Seshadri, R., Smirnova, T., Kirton, E., Jungbluth, S. P., Woyke, T., Elae-Fadros, E. A., Ivanova, N. N., y Kyrpides, N. C. (2019). IMG/M v.5.0: An integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D666-D677. <https://doi.org/10.1093/nar/gky901>

Cheng, V. C. C., Chen, J. H. K., Leung, S. S. M., So, S. Y. C., Wong, S.-C., Wong, S. C. Y., Tse, H., y Yuen, K.-Y. (2017). Seasonal Outbreak of *Bacillus* Bacteremia Associated With Contaminated Linen in Hong Kong. *Clinical Infectious Diseases*, 64(suppl_2), S91-S97. <https://doi.org/10.1093/cid/cix044>

Cormontagne, D., Rigourd, V., Vidic, J., Rizzotto, F., Bille, E., y Ramarao, N. (2021). *Bacillus cereus* Induces Severe Infections in Preterm Neonates: Implication at the Hospital and Human Milk Bank Level. *Toxins*, 13(2), 123. <https://doi.org/10.3390/toxins13020123>

Cronin, U. P., y Wilkinson, M. G. (2008). Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and

- physiology of *Bacillus cereus* vegetative cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(12), 1695-1703. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0461-3>
- Dehal, P. S., Joachimiak, M. P., Price, M. N., Bates, J. T., Baumohl, J. K., Chivian, D., Friedland, G. D., Huang, K. H., Keller, K., Novichkov, P. S., Dubchak, I. L., Alm, E. J., y Arkin, A. P. (2010). MicrobesOnline: An integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Research*, 38(Database), D396-D400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp919>
- Demongeot, J., y Seligmann, H. (2019). Evolution of tRNA into rRNA secondary structures. *Gene Reports*, 17, 100483. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100483>
- Desriac, N., Broussolle, V., Postollec, F., Mathot, A.-G., Sohier, D., Coroller, L., y Leguerinel, I. (2013). *Bacillus cereus* cell response upon exposure to acid environment: Toward the identification of potential biomarkers. *Frontiers in Microbiology*, 4, 284-284. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00284>
- Diaz Ramirez, M., y Salgado Cruz, M. de la P. (2018). *Bacillus cereus*: Alimentos, salud y biotecnología. *Productos del vínculo Investigación-Docencia*. Conferencia Interdisciplinaria de Avances en Investigación, Lerma Estado de México, México. <https://doi.org/10.24275/uam/lerma/repinst/ciai2018/000146/Diaz>
- Doll, V. M., Ehling-Schulz, M., y Vogelmann, R. (2013). Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PloS one*, 8(4), e61404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061404>
- Draganic, V., Lozo, J., Biocanin, M., Dimkic, I., Garalejic, E., Fira, D., Stankovic, S., y Beric, T. (2017). Genotyping of *Bacillus* spp. Isolate collection from natural samples. *Genetika*, 49(2), 445-456. <https://doi.org/10.2298/GENSR1702445D>
- Drazin, D., Lehman, D., y Danielpour, M. (2010). Successful Surgical Drainage and Aggressive Medical Therapy in a Preterm Neonate with *Bacillus cereus* Meningitis. *Pediatric Neurosurgery*, 46(6), 466-471. <https://doi.org/10.1159/000325073>
- Duport, C., Jobin, M., y Schmitt, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to

Disease. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550>

Edwards, A. M., Addo, M. A., y Dos Santos, P. C. (2020). Extracurricular Functions of tRNA Modifications in Microorganisms. *Genes*, 11(8), 907. <https://doi.org/10.3390/genes11080907>

Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., & Gohar, M. (2015). Food-bacteria interplay: Pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 704-704. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00704>

Ehrenstein, B., Bernards, A. T., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Towner, K. J., Bouvet, P. J., Daschner, F. D., y Grundmann, H. (1996). *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *Journal of clinical microbiology*, 34(10), 2414–2420. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.10.2414-2420.1996>

Englert, M., Moses, S., Hohn, M., Ling, J., O'Donoghue, P., y Söll, D. (2013). Aminoacylation of tRNA 2'- or 3'-hydroxyl by phosphoseryl- and pyrrolysyl-tRNA synthetases. *FEBS Letters*, 587(20), 3360-3364. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.037>

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2016. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal* 2016;14(7):4524, 93 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4524

Farag M., Moghannem, S., Shehabeldine, A., y Azab, M., (2020). Antitumor effect of exopolysaccharide produced by *Bacillus mycoides*. *Microbial Pathogenesis*, 149(103947). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103947>

Fayad, N., Kallassy Awad, M., y Mahillon, J. (2019). Diversity of *Bacillus cereus* sensu lato mobilome. *BMC Genomics*, 20(1), 436. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5764-4>

Fields, R. N., y Roy, H. (2018). Deciphering the tRNA-dependent lipid aminoacylation systems in bacteria: Novel components and structural advances. *RNA biology*, 15(4-5), 480–491. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1356980>

- Fun, C., Rathinam, X., Ghazali, A., y Subramaniam, S. (2016). Characterization of a native *Bacillus thuringiensis* isolates from Malaysia that produces exosporium-enclosed parasporal inclusion. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(9), 653. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015-09-714>
- Gálvez MRE, Carranco DJA, Cárdenas MA y Sánchez-Hernández G. (2020). Infección de piel y tejidos blandos por *Bacillus cereus*. *An Med Asoc Med Hosp ABC*. 2020;65(2):148-152. doi:10.35366/94370.
- Gebetsberger, J., y Polacek, N. (2013). Slicing tRNAs to boost functional ncRNA diversity. *RNA biology*, 10(12), 1798–1806. <https://doi.org/10.4161/rna.27177>
- Guinebretiere M., Berge O., Normand P., Morris C., Carlin F., y Nguyen -The C. (2001) Identification of Bacteria in Pasteurized Zucchini Purées Stored at Different Temperatures and Comparison with Those Found in Other Pasteurized Vegetables Purées: American Society for Microbiology, *Applied and Environmental Microbiology* 67(10) 10, 4520-4530. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4520-4530.2001>
- Guinebretière, M. H., Broussolle, V., y Nguyen-The, C. (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of clinical microbiology*, 40(8), 3053–3056. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.3053-3056.2002>
- Guinebretière, M.-H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., y De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, 10(4), 851-865. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x>
- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M. L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., y Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 1), 31–40. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.030627-0>

Glasset, B., Herbin, S., Granier, S. A., Cavalié, L., Lafeuille, E., Guérin, C., Ruimy, R., Casagrande-Magne, F., Levast, M., Chautemps, N., Decousser, J.-W., Belotti, L., Pelloux, I., Robert, J., Brisabois, A., y Ramarao, N. (2018). *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLOS ONE*, 13(5), e0194346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194346>

Glasset, B., Sperry, M., Dervyn, R., Herbin, S., Brisabois, A., y Ramarao, N. (2021). The cytotoxic potential of *Bacillus cereus* strains of various origins. *Food microbiology*, 98, 103759. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103759>

Gomaa, O. M., y Momtaz, O. A. (2007). *16S rRNA characterization of a Bacillus isolate and its tolerance profile after subsequent subculturing*. 10, 10.

Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S.-L., Guinebretière, M.-H., Lereclus, D., y Ramarao, N. (2010). The InhA Metalloproteases of *Bacillus cereus* Contribute Concomitantly to Virulence. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 286-294. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-09>

Guo, R., Tian, Y., Zhang, H., Guo, D., Pei, X., Wen, H., Li, P., Mehmood, K., Yang, K., Chang, Y.-F., Liu, Z., Duan, Z., Yuan, F., Liu, W., y Fazlani, S. A. (2020). Biological characteristics and genetic evolutionary analysis of emerging pathogenic *Bacillus cereus* isolated from Père David's deer (*Elaphurus davidianus*). *Microbial Pathogenesis*, 143, 104133. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104133>

Hernaiz, C., Picardo, A., Alos, J. I., y Gomez-Garces, J. L. (2003). Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(9), 973-975. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00682.x>

Hernández Flores, J. L., Salinas Landaverde, D., Pacheco Huerta, Y., Guerra Castillo, V. L., Barrios Sánchez, M. de los Á., Arvizu Hernández, I., Ramos López, M. Á., Álvarez Hidalgo, E., H. Jones, G., y Campos Guillén, J. (2020). Phylogenetic Analysis of *Bacillus cereus sensu lato* Isolates from Commercial Bee Pollen Using tRNACys-PCR. *Microorganisms*, 8(4), 524. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040524>

Hoffmaster, A. R., Ravel, J., Rasko, D. A., Chapman, G. D., Chute, M. D., Marston, C. K., De, B.

- K., Sacchi, C. T., Fitzgerald, C., Mayer, L. W., Maiden, M. C. J., Priest, F. G., Barker, M., Jiang, L., Cer, R. Z., Rilstone, J., Peterson, S. N., Weyant, R. S., Galloway, D. R., ... Fraser, C. M. (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(22), 8449-8454. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402414101>
- Hoffmaster, A.R., Novak, R.T., Marston, C.K., Gee, J.E., Hesel L., Pruckler J.M., y Wilkins P.P., (2008). Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiol* 8, 191. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-191>
- Hopper, A. K., y Phizicky, E. M. (2003). tRNA transfers to the limelight. *Genes and Development*, 17(2), 162-180. doi:10.1101/gad.1049103
- Ibba, M., y Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 617-650. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.617>
- Jessberger, N., Kranzler, M., Da Rioli, C., Schwenk, V., Buchacher, T., Dietrich, R., Ehling-Schulz, M., y Märtlbauer, E. (2019). Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Food microbiology*, 84, 103276. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103276>
- Jessberger, N., Dietrich, R., Mohr, A. K., Da Rioli, C., y Märtlbauer, E. (2019b). Porcine Gastric Mucin Triggers Toxin Production of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infection and immunity*, 87(4), e00765-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00765-18>
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., Wimalaratna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K., Cody, A. J., y Maiden, M. C. J. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: Universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, 158(4), 1005-1015. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0>
- Katz, A., Elgamal, S., Rajkovic, A., e Ibba, M. (2016). Non-canonical roles of tRNAs and tRNA mimics in bacterial cell biology. *Molecular microbiology*, 101(4), 545–558. <https://doi.org/10.1111/mmi.13419>

- Kavanaugh, D.W., Glasset, B., Dervyn, R., Guérin, C., Plancade, S., Herbin, S., Brisabois, A., Nicolas, P., y Ramarao, N., (2021). New genetic biomarkers to differentiate non-pathogenic from clinically relevant *Bacillus cereus* strains, *Clinical Microbiology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.035>
- Khan, H. A., Ahmad, A., y Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509-514. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., y Tanabe, M.; KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res.* 49, D545-D551 (2021) 964–972. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0558-1>
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., y Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2(2), 189-198. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00269-0)
- Kuroki, R., Kawakami, K., Qin, L., Kaji, C., Watanabe, K., Kimura, Y., Ishiguro, C., Tanimura, S., Tsuchiya, Y., Hamaguchi, I., Sakakura, M., Sakabe, S., Tsuji, K., Inoue, M., & yWatanabe, H. (2009). Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Internal medicine*, 48 10, 791-6 .
- Laouami, S., Clair, G., Armengaud, J., y Duport, C. (2014). Proteomic Evidences for Rex Regulation of Metabolism in Toxin-Producing *Bacillus cereus* ATCC 14579. *PLoS ONE*, 9(9), e107354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107354>
- Leung, E. C., McFadden, S., y Tremblay, A. (2019). An unusual case of massive hemoptysis due to *Bacillus cereus* necrotizing pneumonia. *Respiratory Medicine Case Reports*, 28, 100943. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2019.100943>
- Liao, S. L., y Tsai, M. H. (2021). *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm infant caused by consumption of contaminated breastmilk. *Pediatrics and neonatology*, 62(3), 337–338. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2020.12.011>

- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., y Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5(1), 14082. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Liu, Y., Lai, Q., Du, J., y Shao, Z. (2017). Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments. *Scientific reports*, 7(1), 689. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00817-1>
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., y Shao, Z., (2017b) Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67 (8), . <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- Lotte, R., Hérissé, A., Berrouane, Y., Lotte, L., Casagrande, F., Landraud, L....Ruimy, R. (2017). Virulence Analysis of *Bacillus cereus* Isolated after Death of Preterm Neonates, Nice, France, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 845-848. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161788>.
- Luo, J. C., Long, H., Zhang, J., Zhao, Y., y Sun, L. (2021). Characterization of a Deep Sea *Bacillus toyonensis* Isolate: Genomic and Pathogenic Features. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 629116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.629116>
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., y Gohar, M. (2016). *Bacillus cereus* Biofilms—Same, Only Different. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01054>
- Mansilla, E. C., Moreno, R. C., y García, M. O. (2019). 65. *Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica*. 72.
- Manzulli, V., Rondinone, V., Buchicchio, A., Serrecchia, L., Cipolletta, D., Fasanella, A., . . . Galante, D. (2021). Discrimination of *bacillus cereus* group members by maldi-tof mass spectrometry. *Microorganisms*, 9(6) doi:10.3390/microorganisms9061202
- Marck, C., y Grosjean, H. (2002). tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* (New York, N.Y.), 8(10), 1189–1232.

<https://doi.org/10.1017/s1355838202022021>

Masuda, I., Matsubara, R., Christian, T., Rojas, E. R., Yadavalli, S. S., Zhang, L., Goulian, M., Foster, L. J., Huang, K. C., y Hou, Y. M. (2019). tRNA Methylation Is a Global Determinant of Bacterial Multi-drug Resistance. *Cell systems*, 8(5), 475. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.05.002>

Mathur, A., Feng, S., Hayward, J.A., Ngo, C., Fox, D., Atmosukarto I., Price J.D., Schauer K., Märtlbauer, E.,Robertson, A.B., Burgio, G., Fox, E.M., Leppla, S.H., Kaakoush N.O., y Man, S.M., (2019). A multicomponent toxin from *Bacillus cereus* incites inflammation and shapes host outcome via the NLRP3 inflammasome. *Nat Microbiol* 4, 362–374. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0318-0>

Méndez, A., Carroll L., Mukherjee M., Mills E., Xiaoli L., Dudley E., y Kovac J. (2020). Novel effective *Bacillus cereus* group species “*Bacillus clarus*” is represented by antibiotic-producing strain ATCC 21929 isolated from soil. *mSphere* 5:e00882-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00882-20>.

Méric, G., Mageiros, L., Pascoe, B., Woodcock, D. J., Mourkas, E., Lambie, S., Bowden, R., Jolley, K. A., Raymond, B., y Sheppard, S. K. (2018). Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. *Molecular ecology*, 27(7), 1524–1540. <https://doi.org/10.1111/mec.14546>

Messelhäußer, U., y Ehling-Schulz, M. (2018). *Bacillus cereus*—A Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 120-125. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0095-9>

Michel, C. J. (2013). Circular code motifs in transfer RNAs. *Computational Biology and Chemistry*, 45, 17-29. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2013.02.004>

Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., y Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4744–4753.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001421>

Mursalin, M. H., Coburn, P. S., Livingston, E., Miller, F. C., Astley, R., Flores-Mireles, A. L., y Callegan, M. C. (2020). Bacillus S-Layer-Mediated Innate Interactions During Endophthalmitis. *Frontiers in Immunology*, 11, 215. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00215>

Mursalin, M. H., Livingston, E. T., y Callegan, M. C. (2020b). The cereus matter of Bacillus endophthalmitis. *Experimental Eye Research*, 193, 107959. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.107959>

Nakano M. (2020). Development of a multiplex real-time PCR assay for the identification and quantification of group-specific Bacillus spp. and the genus Paenibacillus. *International journal of food microbiology*, 323, 108573.

Novoa, E. M., Pavon-Eternod, M., Pan, T., y Ribas de Pouplana, L. (2012). A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage. *Cell*, 149(1), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.050>

O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li W, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O'Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun H, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, Tatusova T, DiCuccio M, Kitts P, Murphy TD, Pruitt KD. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D733-45

Okutani, A., Inoue, S., Noguchi, A., Kaku, Y., y Morikawa, S. (2019). Whole-genome sequence-based comparison and profiling of virulence-associated genes of Bacillus cereus group isolates from diverse sources in Japan. *BMC Microbiology*, 19(1), 296. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1678-1>

- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., y Caballero, P. (2014). Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- Park, K. M., Kim, H. J., Kim, M. S., y Koo, M. (2021). Morphological Features and Cold-Response Gene Expression in Mesophilic Bacillus cereus Group and Psychrotolerant Bacillus cereus Group under Low Temperature. *Microorganisms*, 9(6), 1255. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061255>
- Parkunan, S. M., Randall, C. B., Coburn, P. S., Astley, R. A., Staats, R. L., y Callegan, M. C. (2015). Unexpected Roles for Toll-Like Receptor 4 and TRIF in Intraocular Infection with Gram-Positive Bacteria. *Infection and Immunity*, 83(10), 3926-3936. <https://doi.org/10.1128/IAI.00502-15>
- Patiño-Navarrete, R., y Sanchis, V. (2017). Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of Bacillus cereus group bacteria. *Beneficial and detrimental spore-formers*, 168(4), 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.002>
- Pettersson, B. M. (2009). tRNA Gene Structures in Bacteria. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 628.67pp. Uppsala. ISBN 978-91-554-7480-5. Recuperado de <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:210271/FULLTEXT01.pdf>
- Pilo, P., y Frey, J. (2018). Pathogenicity, population genetics and dissemination of Bacillus anthracis. *Infection, Genetics and Evolution*, 64, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.024>
- Premkrishnan, B.N.V., Heinle, C.E., Uchida, A., Purbojati, R.W., Kushwaha, K.K., Putra, A., santhi, P.S., Khoo, B.W., Wong, A., Vettath, V.K., Drautz-Moses, D., Junqueira, A. C., y Schuster, S., (2021) The genomic characterisation and comparison of Bacillus cereus strains isolated from indoor air. *Gut Pathog* 13, 6 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00399-4>

- Raina, M., e Ibba, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in genetics*, 5, 171. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00171>
- Ramarao, N., Tran, S. L., Marin, M., y Vidic, J. (2020). Advanced Methods for Detection of *Bacillus cereus* and Its Pathogenic Factors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 20(9), 2667. <https://doi.org/10.3390/s20092667>
- Ramm, F., Dondapati, S.K., Thoring, L., Zemella, A., Wüstenhagen D., Frentzel, H., Stech, M., y Kubick S., (2020). Mammalian cell-free protein expression promotes the functional characterization of the tripartite non-hemolytic enterotoxin from *Bacillus cereus*. *Sci Rep* 10, 2887 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59634-8>
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., y Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS microbiology reviews*, 29(2), 303–329. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.005>
- Raza, S., y Ameen, A. (2016). Comparison of 16S rRNA Gene of *Bacillus cereus* with Different Bacterial Species. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 7(2), 1-6. <https://doi.org/10.9734/JABB/2016/26524>
- Ruiz-Giardin, J. M., Ochoa Chamorro, I., Velázquez Ríos, L., Jaqueti Aroca, J., García Arata, M. I., SanMartín López, J. V., y Guerrero Santillán, M. (2019). Blood stream infections associated with central and peripheral venous catheters. *BMC infectious diseases*, 19(1), 841. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4505-2>
- Samarasekara H., Gilbey T., Albawarshy M., Janto C., Dasireddy V., y Branley J. (2019) *Bacillus cereus* bacteraemia complicated by a brain abscess in a preterm neonate. *Microbiology Society*. 2(2). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000080>
- Sánchez, J., Correa, M., Universidad de Antioquia, Castañeda-Sandoval, L. M., y Universidad de Antioquia. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2). <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12>

- Santamaría, J., Rubio, M., López, I., Romero, A., Delgado, F., Bru, R., Romero F., Herrero, A., Ibba M., Ochoa, J., y Luque, I. (2021) Role of a cryptic tRNA gene operon in survival under translational stress, *Nucleic Acids Research*, 2021; gkab661, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab661>
- Saikia, L., Gogoi, N., Das, P. P., Sarmah, A., Punam, K., Mahanta, B., Bora, S., y Bora, R. (2019). *Bacillus cereus* –Attributable Primary Cutaneous Anthrax-Like Infection in Newborn Infants, India. *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), 1261-1270. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181493>
- Sastalla, I., Fattah, R., Coppage, N., Nandy, P., Crown, D., Pomerantsev, A. P., y Leppla, S. H. (2013). The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe Tripartite Enterotoxin Components Assemble Sequentially on the Surface of Target Cells and Are Not Interchangeable. *PLoS ONE*, 8(10), e76955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076955>
- Schimmel, P. (2018). The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 45–58 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.77>
- Shah, M., Patnaik, S., Wongrakpanich, S., Alhamshari, Y., y Alnabelsi, T. (2015). Infective endocarditis due to *Bacillus cereus* in a pregnant female: A case report and literature review. *IDCases*, 2(4), 120-123. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2015.10.003>
- Sharma, C., Salem, G. E. M., Sharma, N., Gautam, P., y Singh, R. (2019). Thrombolytic Potential of Novel Thiol-Dependent Fibrinolytic Protease from *Bacillus cereus* RSA1. *Biomolecules*, 10(1), 3. <https://doi.org/10.3390/biom10010003>
- Sheppard, K., Yuan, J., Hohn, M. J., Jester, B., Devine, K. M., y Soll, D. (2008). From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 36(6), 1813-1825. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn015>
- Shepherd, J., e Ibba, M. (2015). Bacterial transfer RNAs. *FEMS microbiology reviews*, 39(3), 280–300. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv004>

- Stevens, M., Tasara, T., Klumpp, J., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., y Johler, S. (2019). Whole-genome-based phylogeny of *Bacillus cytotoxicus* reveals different clades within the species and provides clues on ecology and evolution. *Scientific Reports*, 9.
- Tabassum, M., Hussain, U., Scott, S., y Farndon, M. (2017) *Bacillus cereus*: A causative organism for deep soft tissue infection to forearm following trauma. *Journal of JAJS*. 4 (12), 100-102. <https://doi.org/10.1016/j.jajs.2017.05.001>
- Tallent, S. M., Kotewicz, K. M., Strain, E. A., y Bennett, R. W. (2012). Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group. *Journal of AOAC International*, 95(2), 446-451. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-251>
- Tallent, S. M. (2012b). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 14*. 9.
- Tran, S.-L., Guillemet, E., Ngo-Camus, M., Clybourn, C., Puhar, A., Moris, A., Gohar, M., Lereclus, D., y Ramarao, N. (2011). Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages: *Bacillus cereus* HlyII is a toxic factor inducing apoptosis. *Cellular Microbiology*, 13(1), 92-108. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01522.x>
- Tran, S.-L., y Ramarao, N. (2013). *Bacillus cereus* immune escape: A journey within macrophages. *FEMS Microbiology Letters*, 347(1), 1-6. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12209>
- Tran, T. T., Belahbib, H., Bonnefoy, V., y Talla, E. (2015). A Comprehensive tRNA Genomic Survey Unravels the Evolutionary History of tRNA Arrays in Prokaryotes. *Genome biology and evolution*, 8(1), 282–295. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv254>
- Tremblay-Savard, O., Benzaid, B., Lang, B. F., y El-Mabrouk, N. (2015). Evolution of tRNA Repertoires in *Bacillus* Inferred with OrthoAlign. *Molecular biology and evolution*, 32(6), 1643–1656. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv029>

- Tusgul, S., Prod'hom, G., Senn, L., Meuli, R., Bochud, P. Y., y Giulieri, S. G. (2016). *Bacillus cereus* bacteraemia: comparison between haematologic and nonhaematologic patients. *New microbes and new infections*, 15, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.11.011>
- Ulrich, S., Gottschalk, C., Dietrich, R., Märtbauer, E., y Gareis, M. (2019) Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF M. *Food Microbiology*, 82 (2019), 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.012>
- Veysseyre, F., Fourcade, C., Lavigne, J.-P., y Sotto, A. (2015). *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 45(11-12), 436-440. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.09.011>
- Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S., y Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(6), 673-687. <https://doi.org/10.1139/W07-029>
- Welsh, J., y McClelland, M. (1991). Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic acids research*, 19(4), 861–866. <https://doi.org/10.1093/nar/19.4.861>
- World Health Organization (Ed.). (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases*. World Health Organization.
- World Health Organization. (2016). *Guidelines on core components of infection prevention and control programmes at the national and acute health care facility level*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK401773/>
- Xaplanteri, P., Chondroleou, A., Kolonitsiou, F., Skintzi, A., Anastassiou, E. D., Marangos, M., y Spiliopoulou, I. (2019). Postpartum bacteraemia outbreak due to *Bacillus cereus* in the delivery room. *New Microbes and New Infections*, 29, 100510. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.01.006>
- Yi, Y., Frenzel, E., Spoelder, J., Elzenga, J. T. M., van Elsas, J. D., y Kuipers, O. P. (2018). Optimized fluorescent proteins for the rhizosphere-associated bacterium *Bacillus*

mycoides with endophytic and biocontrol agent potential. *Environmental Microbiology Reports*, 10(1), 57-74. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12607>

Yi, Y., Li, Z., Song, C., y Kuipers, O. P. (2018b). Exploring plant-microbe interactions of the rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus mycoides* by use of the CRISPR-Cas9 system. *Environmental Microbiology*, 20(12), 4245-4260. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14305>

Zablullah, S., Ebrahimi, F., y Mulugeta A. (2020) *Bacillus cereus* as a Rare Cause of PD Peritonitis in an Immunocompromised Patient. *AJKD*, 75(4), 660. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.02.425>

Zschöck, M., Manhold-Maurer, S., Wescher, A., Merl, K., Khan, I., y Lämmle, C. (2005). Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. *The Journal of dairy research*, 72(3), 333–337. <https://doi.org/10.1017/S0022029905000956>