

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRE LUIZ SOUZA REIS

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOGENICIDADE DE *Bacillus cereus*
ISOLADOS DE PRODUTOS LÁCTEOS

CURITIBA
2012

ANDRE LUIZ SOUZA REIS

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOGENICIDADE DE *Bacillus cereus*
ISOLADOS DE PRODUTOS LÁCTEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot.

CURITIBA
2012

Reis, Andre Luiz Souza

Caracterização genotípica de patogenicidade de *bacillus cereus* isolados de produtos lácteos / Andre Luiz Souza Reis – Curitiba, 2012.
60 f. il.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot
Dissertação (Mestrado) – Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Inclui Bibliografia

1. Tecnologia de Alimento. 2. Leite. 3. Laticínio. I. Bersot, Luciano dos Santos. III. Universidade Federal do Paraná.

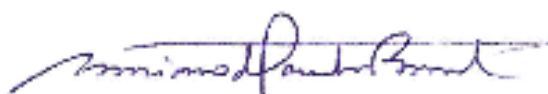
CDD 637.1277

ANDRE LUIZ SOUZA REIS

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOGENICIDADE DE
Bacillus cereus ISOLADOS DE PRODUTOS LÁCTEOS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:


Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Campus Palotina, UFPR


Prof^a. Dr^a. MARIA TERESA DESTRO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP


Prof^a. Dr^a. JULIANA VITÓRIA MESSIAS BITTENCOURT
Campus Ponta Grossa, UTFPR

Curitiba, 21 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser essa presença constante que me ilumina e me dá forças para continuar batalhando todos os dias.

À minha mãe, pelo amor, carinho, dedicação, torcida e orgulho incondicionais. Mais um sonho se realiza e mais uma vez a vitória é nossa!

Ao meu pai, pelas lições de responsabilidade, dedicação e honestidade sem as quais jamais chegaria aonde cheguei. Mesmo sem poder mais vê-lo trago sempre muito próximo de mim, em meu coração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, por me conceder a oportunidade de desenvolver o projeto de Mestrado. Agradeço também a amizade, ajuda dicas, paciência e dedicação que foram fundamentais para a execução de todas as etapas do meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Juliana Vitoria Messias Bittencourt, por todos os ensinamentos e ajuda dada e também pela disponibilização dos equipamentos e do laboratório para realização da parte prática do trabalho. Também agradeço aos estagiários do Laboratório de Bioengenharia da UTFPR em Ponta Grossa por toda a ajuda que me deram durante minha estadia, desejo a todos vocês muito sucesso.

À Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro, por me receber em seu laboratório, ajudar na elaboração do trabalho e pela grande generosidade com que disponibilizou reagentes e equipamentos durante minha estadia em São Paulo. Também agradeço ao aluno de Doutorado Vinícius Bucelli Ribeiro pela dedicação, ajuda e ensinamentos que me foram dados durante minha estadia na USP.

À minha colega de projeto, Maike Taís Maziero Montanhini, por todos os ensinamentos, ajuda e companheirismo desde o primeiro dia de trabalho.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos UFPR, pela amizade que formamos ao longo desses anos, a todas as risadas e lamentações que passamos juntos, as intermináveis horas de estudo, as festas, aos trabalhos e, sobretudo ao carinho com que sempre me trataram. Tenho certeza e torço muito pelo sucesso de vocês.

Ao meu professor da Graduação Deocy França, que me apresentou a Tecnologia de Produtos de Origem Animal e investiu no meu aperfeiçoamento, também sempre me ajudou e incentivou a continuar alçando vôos mais altos.

Aos meus colegas da faculdade de Medicina Veterinária UFPR, por toda a amizade durante estes anos, durante e após a graduação. Tenho muito orgulho de todos e me deixa muito feliz compartilhar mais uma etapa vencida junto com vocês. Serei sempre muito grato a todos.

Aos meus amigos de infância, estes sim me acompanharam em todos os rumos que a vida me levou desde o dia em que nos conhecemos quando crianças. Muito obrigado pelo companheirismo, torcida e por serem (e se Deus quiser, continuarem) perpétuos na minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro ao projeto.

E a todas as demais pessoas que de alguma maneira me ajudaram na realização deste trabalho.

*-DREAM! Dreams shape the world. Dreams create the world anew, every night.
-I do not know how many of us it will take. But we must dream it, and if enough of us
dream it, then it will happen. Dreams shape the world.*

[...]

*-Dream the world! Not this pallid shadow of reality. Dream the world the way it truly
is...That is my message. And I shall keep moving, keep repeating it. Until I die.*

“A Dream of a Thousand Cats”. The Sandman- Neil Gaiman.

RESUMO

Bacillus cereus é um micro-organismo ubiqüitário, formador de esporo, capaz de sobreviver à pasteurização e a maioria dos processos térmicos aplicados em leites e derivados. Além disso, é patogênico e causador de quadros distintos quando veiculado por alimentos contaminados. Este trabalho teve como objetivo verificar a frequência dos genes de patogenicidade de *Bacillus cereus* isoladas de leite e produtos lácteos, provenientes de estabelecimentos comerciais e de diferentes marcas nacionais comercializados no Brasil. Um total de 260 amostras de produtos foram analisadas e divididas da seguinte maneira: 100 amostras de leite pasteurizado obtidas de 18 marcas, 50 amostras de leite em pó obtidas de 16 marcas e 110 amostras de leite UHT obtidas de 19 marcas. Após cultivo microbiológico as culturas isoladas foram submetidas a testes morfológicos e bioquímicos para identificação de *B. cereus*. Foram isoladas 63 culturas do micro-organismo, sendo que 36 foram oriundas de leite pasteurizado, 15 de leite em pó e 12 de leite UHT. Os isolados bacterianos foram então testados para a presença dos genes codificantes das toxinas hemolisina BL (HBL), enterotoxina não-hemolítica (NHE) e citotoxina K (CytK), responsáveis pela síndrome diarréica, e para a toxina cereulida causadora da síndrome emética. A detecção das toxinas foi feita através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) que verificou a presença dos genes: *hblA*, *hblC* e *hblD* (componentes da HBL), *nheA*, *nheB* e *nheC* (componentes da NHE), *cytK* (gene que codifica a CytK), *cytK-1* e *cytK-2* (formas diferentes da CytK) e *ces* (gene que codifica a cereulida). Para a PCR foram utilizados *primers* e temperaturas de pareamento específicas para cada gene avaliado. Dentre os 63 isolados de *B. cereus* os resultados obtidos, em termos percentuais, para a detecção de cada gene foram: *hblA*: 41,27%, *hblC*: 53,97%, *hblD*: 53,97%, *nheA*: 65,08%, *nheB*: 23,81%, *nheC*: 82,54%, *cytK*: 68,25, *cytK-1*: não encontrado (NE), *cytK-2*: 61,90% e *ces*: 3,17%. Os resultados obtidos referentes às culturas isoladas do leite pasteurizado são: *hblA*: 44,44%, *hblC*: 69,44%, *hblD*: 69,44%, *nheA*: 83,33%, *nheB*: 33,33%, *nheC*: 75,00%, *cytK*: 80,55%, *cytK-1*: NE, *cytK-2*: 75,00% e *ces*: 2,78%. Para o leite em Pó: *hblA*: 66,66%, *hblC*: 60,00%, *hblD*: 60,00%, *nheA*: 80,00%, *nheB*: 20,00%, *nheC*: 93,33%, *cytK*: 86,66%, *cytK-1*: NE, *cytK-2*: 80,00% e *ces*: 6,66%. E os resultados para o leite UHT foram: *hblA*: NE, *hblC*: NE, *hblD*: NE, *nheA*: NE, *nheB*: NE, *nheC*: 91,66%, *cytK*: 8,33%, *cytK-1*: NE, *cytK-2*: NE e *ces*: NE. Para a verificação da presença da toxina diarréica hemolisina BL foi utilizado o kit diagnóstico BCET-RPLA da marca Oxoid[®], foram submetidas ao teste as culturas que apresentaram os três componentes formadores da HBL (genes *hblA*, *hblC* e *hblD*). Dos 63 isolados 23 apresentaram os genes *hblACD* e 20 foram positivas ao teste de expressão, gerando um percentual de 86,96%. Para os produtos separadamente os percentuais de detecção da toxina foram: leite pasteurizado: 92,85% e leite em pó: 88,88%. Nenhuma cepa proveniente de leite UHT apresentou os genes *hblACD*.

Palavras-chave: Leite. Produtos Lácteos. *Bacillus cereus*. Patogenicidade. Enfermidades Transmitidas por Alimentos. Toxinas.

ABSTRACT

Bacillus cereus is an ubiquitous, spore-forming bacteria that can survive pasteurization and the majority of the heating processes used in the dairy industry. Besides, it is a pathogen responsible for different types of food poisoning. The aim of this work was to evaluate the frequency of pathogenic *Bacillus cereus* isolates from milk and dairy products obtained from commercial establishments from different brands marketed in Brazil. A total of 260 product samples were analyzed and the distribution of them were: 100 samples of pasteurized milk from 18 brands, 50 samples of powdered milk from 16 brands and 110 samples of UHT milk from 19 brands. After microbiological culture the samples were tested, morphologically and biochemically, for the identification of *B. cereus*. 63 isolates of the microorganism were obtained and from that total 36 were isolated from pasteurized milk, 15 from powdered milk and 12 from UHT milk. The strains were tested for the presence of the encoding genes for hemolysin BL (HBL), nonhemolytic enterotoxin (NHE) and cytotoxin K (CytK), the causative agents of the diarrheal syndrome and for cereulide, responsible for the emetic syndrome. The toxins detection was carried through polymerase chain reaction (PCR) that verified the presence of the genes: *hblA*, *hblC* and *hblD* (sub-units of the HBL), *nheA*, *nheB* and *nheC* (sub-units of the NHE), *cytK* (gene that express the CytK), *cytK-1* and *cytK-2* (different forms of CytK) and *ces* (gene that express the cereulide). PCR were carried with specific set of primers and annealing temperatures for each evaluated gene. From the 63 isolated *B. cereus* cultures the results, in percentage, were: *hblA*: 41,27%, *hblC*: 53,97%, *hblD*: 53,97%, *nheA*: 65,08%, *nheB*: 23,81%, *nheC*: 82,54%, *cytK*: 68,25, *cytK-1*: not found (NF), *cytK-2*: 61,90% and *ces*: 3,17%. Of the 36 pasteurized milk isolates the results were: *hblA*: 44,44%, *hblC*: 69,44%, *hblD*: 69,44%, *nheA*: 83,33%, *nheB*: 33,33%, *nheC*: 75,00%, *cytK*: 80,55%, *cytK-1*: NF, *cytK-2*: 75,00% and *ces*: 2,78%. For powdered milk: *hblA*: 66,66%, *hblC*: 60,00%, *hblD*: 60,00%, *nheA*: 80,00%, *nheB*: 20,00%, *nheC*: 93,33%, *cytK*: 86,66%, *cytK-1*: NE, *cytK-2*: 80,00% and *ces*: 6,66%. And for UHT milk the results were: *hblA*: NF, *hblC*: NF, *hblD*: NF *nheA*: NF, *nheB*: NF, *nheC*: 91,66%, *cytK*: 8,33%, *cytK-1*: NF, *cytK-2*: NF and *ces*: NF. The expression of the diarrheal toxin HBL was evaluated using the BCET-RPLA toxin detection kit, Oxoid®. The strains tested were those carrying the three components of the HBL (genes *hblA*, *hblC* and *hblD*). From the 63 strains isolated 23 of them carried the *hblACD* genes and from that total 20 were positive in the toxin test kit , giving a 86,96% of strains producing the toxin. For group of products, the expression percentages were: pasteurized milk: 92,85% and powdered milk: 88,88%. None of the strains obtained from the UHT milk carried the *hblACD* genes.

Key words: Milk. Dairy Products, *Bacillus cereus*. Pathogenicity. Foodborne Diseases. Toxins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Mecanismo de formação de poros pela toxina HBL de <i>B. cereus</i> em células epiteliais.	23
FIGURA 2- Gel de agarose 1,5% pós PCR para detecção do gene <i>nheC</i> de <i>B. cereus</i>	37
FIGURA 3- Ilustração do padrão de aglutinação obtido através do kit BCET-RAPLA para toxina diarréica HBL de <i>B. cereus</i>	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- BACTÉRIAS MAIS FREQUENTES NOS SURTOS DE ETA NO BRASIL ENTRE 1999 E 2009.....	29
TABELA 2- PRODUTOS UTILIZADOS NO TRABALHO PARA A OBTENÇÃO DOS CULTIVOS DE <i>B. CEREUS</i>	32
TABELA 3- DISTRIBUIÇÃO DAS CULTURAS DE <i>B. CEREUS</i> ISOLADAS NESTE TRABALHO E RESPECTIVOS PRODUTOS DE ORIGEM.....	33
TABELA 4- SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS "PRIMERS" E TEMPERATURAS DE PAREAMENTO USADOS NESTE TRABALHO	35
TABELA 5- DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS GENES DE PATOGENICIDADE DETECTADOS ENTRE AS 63 CULTURAS ISOLADAS.....	39
TABELA 6- PERFIL DAS CULTURAS ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO EM RELAÇÃO À PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS COMPLEXOS <i>HBLACD</i> , <i>NHEABC</i> E DOS GENES <i>CYTK</i> E <i>CYTK-2</i>	40
TABELA 7- NÚMERO DE CULTIVOS QUE APRESENTARAM SIMULTANEAMENTE OS TRÊS GENES COMPONENTES DAS TOXINAS HBL E NHE.....	42
TABELA 8- PERCENTUAIS DE DETECÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE DE <i>B. CEREUS</i> ISOLADOS DE LEITE PASTEURIZADO, LEITE EM PÓ E LEITE UHT.....	45
TABELA 9- PERFIL DAS CULTURAS ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO EM RELAÇÃO À PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS COMPLEXOS <i>HBLACD</i> , <i>NHEABC</i> E DOS GENES <i>CYTK</i> E <i>CYTK-2</i>	45
TABELA 10- NÚMERO DE CULTURAS ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO APRESENTANDO SIMULTANEAMENTE OS TRÊS GENES COMPONENTES DAS TOXINAS HBL E NHE	46
TABELA 11- PERFIL DAS CULTURAS ISOLADAS DE LEITE EM PÓ EM RELAÇÃO À PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS COMPLEXOS <i>HBLACD</i> , <i>NHEABC</i> E DOS GENES <i>CYTK</i> E <i>CYTK-2</i>	48
TABELA 12- NÚMERO DE CULTURAS ISOLADAS DE LEITE EM PÓ APRESENTANDO SIMULTANEAMENTE OS TRÊS GENES COMPONENTES DAS TOXINAS HBL E NHE	48

LISTA DE SIGLAS

A_w – Atividade de Água
BHI – Brain Heart Infusion
ces – Cereulida
CTAB - Brometo hexametilenodiamínico
CytK – Citotoxina K
DDA – Doença Diarréica Aguda
DNA – Deoxyribonucleic Acid
dNTPs - Deoxyribonucleotide Triphosphates
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – Enzyme Lynked Immunosorbent Assay
ETA – Enfermidades Transmitidas por Alimentos
EtBr – Brometo de Etídio
HBL – Hemolisina BL
IgG – Imunoglobulina G
NHE – Enterotoxina Não Hemolítica
PCR – Polymerase Chain Reaction
RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA
RPLA – Reversed Passive Latex Agglutination
TBE - Tris-Borato EDTA
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFPR – Universidade Federal do Paraná
UHT – Ultra High Temperature
USP – Universidade de São Paulo
UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV- Ultravioleta
pH – Potencial de Hidrogênio

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem
°C - Graus Celsius
g – Gravidade
min – minutos
ml – Mililitros
ng/ μ l – Nanograma por Microlitro
V – Volts
 μ l – Microlitro
 μ m – Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 TEMA	14
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo geral.....	14
1.2.2 Objetivos específicos	14
1.3 JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 GRUPO <i>Bacillus cereus</i>	16
2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Bacillus cereus</i>	17
2.3 CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS DE <i>Bacillus cereus</i>	17
2.4 PATOGENICIDADE DE <i>Bacillus cereus</i>	21
2.4.1 Síndrome Diarréica	22
2.4.2 Síndrome Emética	25
2.5 EPIDEMIOLOGIA DE <i>B. cereus</i> NO BRASIL.....	27
2.6 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>B. cereus</i> EM ALIMENTOS.....	29
2.6.1 Métodos Moleculares e Imunológicos para Identificação de Genes e Toxinas de <i>Bacillus cereus</i>	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNA BACTERIANO.....	33
3.2 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE DE <i>B. cereus</i>	34
3.3 SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NO TERMOCICLADOR	35
3.4 FOTODOCUMENTAÇÃO.....	36
3.5 LEITURA DOS RESULTADOS.....	36

3.6 DETECÇÃO DA TOXINA HBL PELO KIT BCET-RPLA Oxoid®	37
3.6.1 Método de Ensaio	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 DETECÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE.....	39
4.2 DETECÇÃO DA TOXINA HBL PELO USO DO KIT BCET-RPLA.....	43
4.3 DETECÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE DE ACORDO COM O PRODUTO DE ORIGEM.....	44
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia vem a cada dia aprimorando tecnologias e desenvolvendo novos métodos de produção a fim de aumentar a qualidade e inocuidade dos alimentos. Os consumidores também tem se mostrado cada vez mais exigentes com relação aos produtos que adquirem e, por esses motivos, torna-se necessário o constante aperfeiçoamento das técnicas produtivas, especialmente as que asseguram um alimento de qualidade e, acima de tudo, que os perigos biológicos, químicos e físicos identificados apresentem risco mínimo à saúde de seus consumidores.

Entre as preocupações no processamento e armazenamento de alimentos está a contaminação microbiana, sendo um fator fundamental na qualidade e inocuidade do produto já que pode afetar suas características sensoriais, diminuir seu tempo de prateleira e torná-lo um veículo de diversos patógenos causadores de doenças aos consumidores. Sendo assim, a identificação destes contaminantes se torna muito importante para que se possa evitar a presença destes agentes patogênicos durante todas as etapas da industrialização de um determinado alimento e para facilitar as intervenções clínicas aos pacientes nos casos e surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA).

Tendo em vista estas preocupações com qualidade e inocuidade alimentar este trabalho abordará *Bacillus cereus*, um micro-organismo encontrado no solo e capaz de prosperar em diversos habitats devido sua habilidade de produzir esporos resistentes a altas temperaturas, desidratação e outros estresses físicos. É encontrado comumente nos ambientes de produção de alimentos devido à alta capacidade de adesão de seus esporos nas superfícies metálicas dos equipamentos, o que permite sua ampla difusão pelos alimentos (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Bacillus cereus é um patógeno de origem alimentar que possui diversos fatores de virulência, suas toxinas podem causar diferentes manifestações no paciente sendo que a intensidade dos casos pode variar de leve a grave dependendo de fatores tais como idade do hospedeiro, quantidade de toxina ingerida e condição imunológica do paciente.

1.1 TEMA

Avaliação molecular de *Bacillus cereus* isolados de produtos lácteos comercializados no Brasil: identificação dos genes de patogenicidade produtores das toxinas causadoras das síndromes emética e diarréica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral:

Detectar a frequência dos genes de *Bacillus cereus*, responsáveis pela patogenicidade (produção das toxinas diarréicas e emética), isolados de leite e produtos lácteos obtidos de estabelecimentos comerciais.

1.2.2 Objetivos específicos:

Identificar a ocorrência de culturas potencialmente patogênicas de *B. cereus* isoladas de leite e produtos lácteos.

Avaliar a presença dos genes responsáveis pela produção das toxinas causadoras das síndromes diarréica: hemolisina BL (HBL), enterotoxina não hemolítica (NHE) e citotoxina K (CytK), e o gene responsável pela produção da toxina emética: cereulida (ces).

Utilizar ensaio imuno-enzimático para verificar a produção da toxina HBL pelos isolados de *B. cereus* possuidores dos genes *hblACD*.

1.3 JUSTIFICATIVA

Bacillus cereus é um micro-organismo termodúrico formador de esporos, com capacidade de multiplicação em baixas temperaturas e em temperaturas ambientes além de sobreviver à pasteurização e à maioria dos processamentos

tecnológicos aplicados em leites e seus derivados. A combinação das propriedades termodúricas, mesófilas e psicrotróficas em um mesmo micro-organismo representa um grande potencial contaminante em produtos lácteos. Além disso, *Bacillus cereus* é um micro-organismo patogênico de grande importância por causar doenças no consumidor com quadros distintos quando veiculado através de alimentos contaminados.

No Brasil ainda existe uma carência de trabalhos relacionados à patogenicidade de *B. cereus* em alimentos, sobretudo envolvendo o leite fluido e os demais produtos derivados.

Desta forma, ter conhecimento do potencial de contaminação desta espécie microbiana em produtos lácteos e estudar suas características moleculares quanto à capacidade genética de produção de toxinas são informações fundamentais para a garantia da inocuidade e qualidade dos produtos lácteos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GRUPO *Bacillus cereus*

Tradicionalmente eram classificadas como membros do gênero *Bacillus* bactérias aeróbias e formadoras de esporos. Ao longo dos últimos trinta anos esse gênero se expandiu para acomodar mais de 100 espécies, e a família Bacillaceae foi subdividida em nove gêneros diferentes. O primeiro é o gênero *Bacillus*, onde os membros do “grupo *Bacillus cereus*” se encontram (GRANUM, 2005).

“Grupo *Bacillus cereus*” ou *Bacillus cereus sensu lato* são termos utilizados para designar seis espécies bacterianas que se caracterizam morfológicamente por serem Gram-positivas e formadoras de esporos. Dentro deste grupo encontram-se: *Bacillus anthracis* (patógeno comumente associado a infecções animais e ocasionalmente envolvido em casos humanos), *Bacillus mycoides* e *Bacillus pseudomycoides* (ambos capazes de formar colônias rizóides e distinguíveis entre si apenas pela análise da composição de ácidos graxos), *Bacillus weihenstephanensis* (grupo psicotrófico), *Bacillus thuringiensis* (infectante de insetos e demais invertebrados) e *Bacillus cereus sensu stricto*, deteriorante e causador de ETA. Recentemente uma nova divisão tem sido proposta, a sétima espécie a ser incorporada ao “grupo *Bacillus cereus*” é *Bacillus cytotoxicus* cuja termotolerância moderada o distingue fenotipicamente das demais espécies (MARTÍNEZ-BLANCH *et al*, 2009; CARLIN *et al*, 2010).

A taxonomia do “grupo *Bacillus cereus*” ainda é bastante controversa. Estudos fenotípicos e de hibridização do DNA não foram capazes de separar os seis micro-organismos do “grupo *Bacillus cereus*” em espécies diferentes (DIDELLOT *et al*, 2009), sendo que alguns autores sugerem que estas espécies, por serem tão proximamente relacionadas, devem ser agrupadas como membros de uma única espécie. (HENDRIKSEN, HANSEN & JOHANSEN, 2006; DIDELLOT *et al*, 2009).

A ambiguidade taxonômica do “grupo *B. cereus*” ilustra a dificuldade para a definição das espécies bacterianas, especialmente na atualidade onde os estudos genômicos ganharam bastante destaque. As análises filogenéticas tradicionais do “grupo *B. cereus*” são bastante complicadas devido à extensa transferência

horizontal de genes entre as diferentes cepas.

2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um bastonete Gram-positivo caracterizado pela formação de esporos, tendo duas formas morfológicas: endosporo e célula vegetativa. As células vegetativas são classificadas como anaeróbias facultativas, que variam entre 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento e tendem a formar cadeias. A maioria das cepas é móvel apresentando flagelos, apesar de existirem cepas não móveis. A temperatura de multiplicação varia de 4° a 55°C, com a temperatura ótima entre 25° e 37°C, classificando o micro-organismo como mesófilo. Existe uma fração considerável de cepas psicrótróficas capazes de se multiplicar a 4-5°C que são mais frequentemente encontradas no leite e nos ambientes de laticínios (RAJKOWSKI & BENNETT, 2003; BHUNIA, 2008; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

A palavra “*bacillus*” significa bastonete e “*cereus*” traduz-se do latim como ceroso. O nome reflete a característica morfológica mais facilmente reconhecida do micro-organismo quando visualizado em microscópio ou em placas de ágar sangue (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

2.3 CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS DE *Bacillus cereus*

B. cereus é um micro-organismo com distribuição ubiquitária na natureza estando presente no solo e na água. Alimentos como leite, carne, especiarias e outros condimentos podem ser contaminados com os esporos. Também existem relatos de isolamento do micro-organismo em medicamentos, tanto nas formas tópicas como também nas formulações orais (LINDBÄCK *et al*, 2004).

Devido à capacidade em formar esporos resistentes a condições adversas, *B. cereus* permanece viável durante longos períodos de tempo no ambiente e nos alimentos (RAJKOWSKI & BENNETT, 2003; BHUNIA, 2008; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

B. cereus também pode ser isolado de amostras de fezes de indivíduos

saudáveis, sendo que a contaminação nestes casos, em sua maioria, acontece através da ingestão de alimentos contaminados. Estima-se que a prevalência de portadores varie de 15 a 40% da população, porém estes casos não são considerados significativos para a transmissão de ETA (WIJNANDS, DUFRENNE & van LEUSDEN, 2002), uma vez que não são considerados enteropatógenos.

Nos produtos lácteos a presença de *Bacillus* spp. é um grande problema para a indústria devido sua capacidade de esporulação e resistência do esporo ao processo de pasteurização (MOLVA, SUDAGIDAN & OKUKLU, 2009). *B. cereus* e *B. licheniformis* são as espécies de bacilos patogênicas predominantes encontradas em leite cru e em todas as etapas do processamento dos produtos lácteos (BANYKÓ & VYLETELOVÁ, 2009).

A presença de *B. cereus* diminui a qualidade dos produtos lácteos devido à produção de proteases, lipases e fosfolipases, por esses motivos podem ser observados alguns defeitos de fabricação, como por exemplo: mudança de sabores e coagulação doce (MOLVA, SUDAGIDAN & OKUKLU, 2009). No caso do leite cru as fontes mais comuns de contaminação da matéria-prima são o solo, materiais utilizados como cama para os animais, silagem, ração animal e resquícios de fezes nos tetos dos animais (SVENSSON *et al*, 2006; BANYKÓ & VYLETELOVÁ, 2009).

O conteúdo de esporos no leite está diretamente associado ao grau de contaminação do solo e dos tetos dos animais. Outros fatores que também determinam o aumento da concentração de esporos são a umidade do solo, baixa taxa de evaporação da água e sujeira nas vias de acesso dos animais (pastagens, camas, sala de ordenha, etc.). A ordenha, propriamente dita, é uma etapa crítica para contaminação por *B. cereus* no leite. A exposição ao ambiente permite que no momento da ordenha, os tetos dos animais sirvam como meio de transporte do micro-organismo para a indústria. Assim, as boas práticas de higiene na ordenha são fundamentais para impedir a contaminação do produto, que incluem a efetiva limpeza dos tetos dos animais (pré e pós ordenha) e higienização dos equipamentos e utensílios. Tais ações são bastante simples e eficientes para reduzir a contaminação do leite por esporos (MAGNUSSON, BERTILSSON & SVENSSON, 2007).

Os esporos são formas metabolicamente inativas ou dormentes, podendo sobreviver por anos, capazes de emergir como células vegetativas (uma célula por

esporo) em um ambiente favorável. O ciclo de uma bactéria formadora de esporo inclui uma fase vegetativa e uma esporulada, estágios que são controlados geneticamente e influenciados por diversos parâmetros ambientais e bioquímicos (BHUNIA, 2008).

Nas bactérias, a esporulação é desencadeada por mudanças ambientais, sobretudo de ordem nutricional (particularmente envolvendo as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo) e também por mudanças nas temperaturas ótimas de multiplicação e no pH. Uma vez submetido a estas condições desfavoráveis o micro-organismo encerra seu ciclo vegetativo e altera seu metabolismo para iniciar a fase de esporulação (BHUNIA, 2008).

Para que um esporo volte a sua fase vegetativa é necessário que ocorra a ativação do mesmo para que se inicie a germinação. A ativação pode ocorrer por diversas maneiras como por exemplo, tratamentos térmicos subletais, radiação, alta pressão, exposição a extremos de pH e sonicação. Estes fatores aceleram o processo de germinação, pois aumentam a permeabilidade do esporo facilitando o contato com agentes que ajudarão na reorganização macromolecular. O processo é reversível, sendo que um esporo não necessariamente germinará após a ativação se o ambiente em que estiver não for favorável (BHUNIA, 2008).

A presença de *B. cereus* nos produtos agrícolas possibilita a contaminação dos equipamentos e ambientes de processamento de alimentos, por esse motivo medidas efetivas de prevenção e controle devem incluir o controle da germinação dos esporos e proliferação das células vegetativas nos alimentos. Tratamentos térmicos e uso de radiação ionizante são alguns exemplos de ações que possibilitam a destruição do micro-organismo. Criar condições desvantajosas, como baixas temperaturas, controle da atividade de água (A_w) e pH nos alimentos, reduzem bastante a germinação das cepas enterotoxigênicas e assim, previnem a produção de toxinas no produto final (RAJKOWSKI & BENNETT, 2003).

Um dos fatores que viabiliza a proliferação de *B. cereus* em alimentos é a temperatura aplicada ao produto. Pode ocorrer ativação dos esporos quando são utilizadas temperaturas inferiores a 100°C no cozimento ou pasteurização, associado à redução lenta da temperatura e armazenamento em grandes quantidades dos produtos, em temperaturas acima de 10°C e inferiores a 60°C, acabam por propiciar uma condição favorável à germinação dos esporos e consequente produção de toxinas (RAJKOWSKI & BENNETT, 2003).

Quando algum alimento necessita de armazenamento sob refrigeração é recomendado que este seja feito a 8°C ou menos, já os que precisam ser mantidos aquecidos devem ser armazenados em temperaturas superiores a 60°C (RAJKOWSKI & BENNETT, 2003).

Outra característica de *B. cereus*, que afeta de maneira muito importante a indústria alimentícia, é a capacidade que algumas cepas possuem de se fixar nas superfícies úmidas de máquinas e equipamentos. Após esta fixação os micro-organismos se multiplicam e posteriormente se agrupam em uma matriz gelatinosa composta de polímeros extracelulares, formando um biofilme (SIMÕES, SIMÕES & VIEIRA, 2010).

No âmbito da indústria de alimentos, a presença de *B. cereus* nos laticínios é um problema significativo, especialmente quando a fonte de contaminação dos produtos está relacionada com a presença dos biofilmes (SIMÕES *et al*, 2006). Os biofilmes permitem aos micro-organismos uma maior resistência aos agentes desinfetantes do que em suas formas vegetativas, tornando sua eliminação das instalações um desafio (SIMÕES, SIMÕES & VIEIRA, 2010).

Diversos fatores acarretam a presença de *B. cereus* em leite pasteurizado. Como o solo é um dos habitats do patógeno é virtualmente impossível eliminar o micro-organismo dos ambientes aonde circulam os animais nas propriedades produtoras de leite. Entretanto, medidas de ordenha higiênica, higienização de equipamentos, asseio dos funcionários na hora de ordenha entre outras boas práticas de obtenção do leite na propriedade rural, têm se mostrado bastante eficazes no controle e qualidade do leite cru, bem como a não execução de tais procedimentos reflete significativamente no aumento da contagem do micro-organismo. Em se tratando de indústria os mesmos preceitos são equivalentes, existindo uma taxa considerável de contaminação do leite após o processo de pasteurização. As boas práticas de fabricação nos laticínios incluem diversos pontos críticos de controle cuja função é eliminar os micro-organismos do leite e produtos lácteos. Atenção nas temperaturas utilizadas (durante o tratamento térmico e durante o período de armazenamento), sanitização dos equipamentos com produtos adequados e com frequência apropriada são etapas que se mostraram mais importantes para o sucesso da eliminação de *B. cereus* durante a industrialização do leite (Te GIFFEL *et al*, 1997; REYS *et al*, 2007; BARTOSZEWICS *et al*, 2008; SALUSTIANO *et al*, 2009; SHAREEN *et al*, 2010).

2.4 PATOGENICIDADE DE *Bacillus cereus*

B. cereus foi originalmente estabelecido como um patógeno de origem alimentar no início da década de 50 com as primeiras descrições de um surto em um hospital da Noruega entre os anos de 1947 e 1949 (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

B. cereus é capaz de produzir uma ampla variedade de metabólitos potencialmente patogênicos. Entre elas podem-se citar hemolisinas, fosfolipases, enterotoxinas, metaloproteases, collagenases e beta-lactamases, entre outras. A importância relativa de todos estes metabólitos como fatores de virulência ainda não foi completamente elucidada (MARTÍNEZ-BLANCH *et al*, 2009).

A maior parte das cepas de *B. cereus* isolada em alimentos, especialmente no leite, demonstrou possuir propriedades patogênicas tornando estes alimentos potencialmente perigosos à saúde do consumidor (BANYKÓ & VYLETELOVÁ, 2009).

O gênero *Bacillus* compreende patógenos extracelulares, ou seja, seu mecanismo de patogenicidade ocorrerá fora da célula do hospedeiro. As bactérias se multiplicam no sistema circulatório, espaço intersticial e no trato gastrointestinal. A manifestação da doença ocorre pela indução do processo inflamatório ou através da ação de toxinas e enzimas produzidas por estes micro-organismos (BHUNIA, 2008).

Dois tipos distintos de ETA são associados a *B. cereus*, são as chamadas: “Síndrome diarréica” e “Síndrome emética” (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008). Ambas as enfermidades se manifestam de forma moderada nos portadores (sintomas brandos e com curta duração) e normalmente são auto-limitadas porém, casos mais graves que terminaram com óbito do portador já foram relatados (MAHLER, 1997).

Apesar de comumente ser um causador de ETA *B. cereus* já foi relatado como promotor de enfermidades sistêmicas, gerando diversas sintomatologias como septicemia, endoftalmite, endocardite, pneumonia, meningite e infecções cutâneas (RASKO *et al*, 2005). Entretanto, estas manifestações são mais associadas a um grupo específico de pacientes, como imunocomprometidos, recém-nascidos, usuários de drogas e em pacientes com feridas traumáticas ou pós-cirúrgicas. As cepas isoladas nestes casos possuíam capacidade de sintetizar hemolisinas e

fosfolipases necrosantes (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000).

Os fatores que regulam a expressão das toxinas de *B. cereus* são diversos e muito complexos. Com relação às toxinas diarréicas um destes fatores pode ser ilustrado pela relação que o estágio de multiplicação bacteriana desempenha na síntese de toxinas. Enquanto a maior produção específica da NHE parece ocorrer no início da fase de crescimento exponencial do micro-organismo, a HBL é sintetizada mais tardiamente na fase estacionária de multiplicação (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Outro fator que influi na patogenicidade de *B. cereus* é a temperatura de multiplicação. Embora ainda não seja completamente elucidada a ação da temperatura influencia os micro-organismos de maneira cepa-específica, gerando grupos bastante distintos que variam de cepas probióticas às causadoras de ETA (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

A regulação de virulência também é multifacetada para a expressão da cereulida, tais mecanismos também ainda não são inteiramente conhecidos, mas as diferenças sugerem acreditar que a expressão das toxinas diarréicas e emética ocorra de maneira independente, sendo conhecidas cepas que produzem apenas as toxinas diarréicas ou apenas a cereulida (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

2.4.1 Síndrome Diarréica

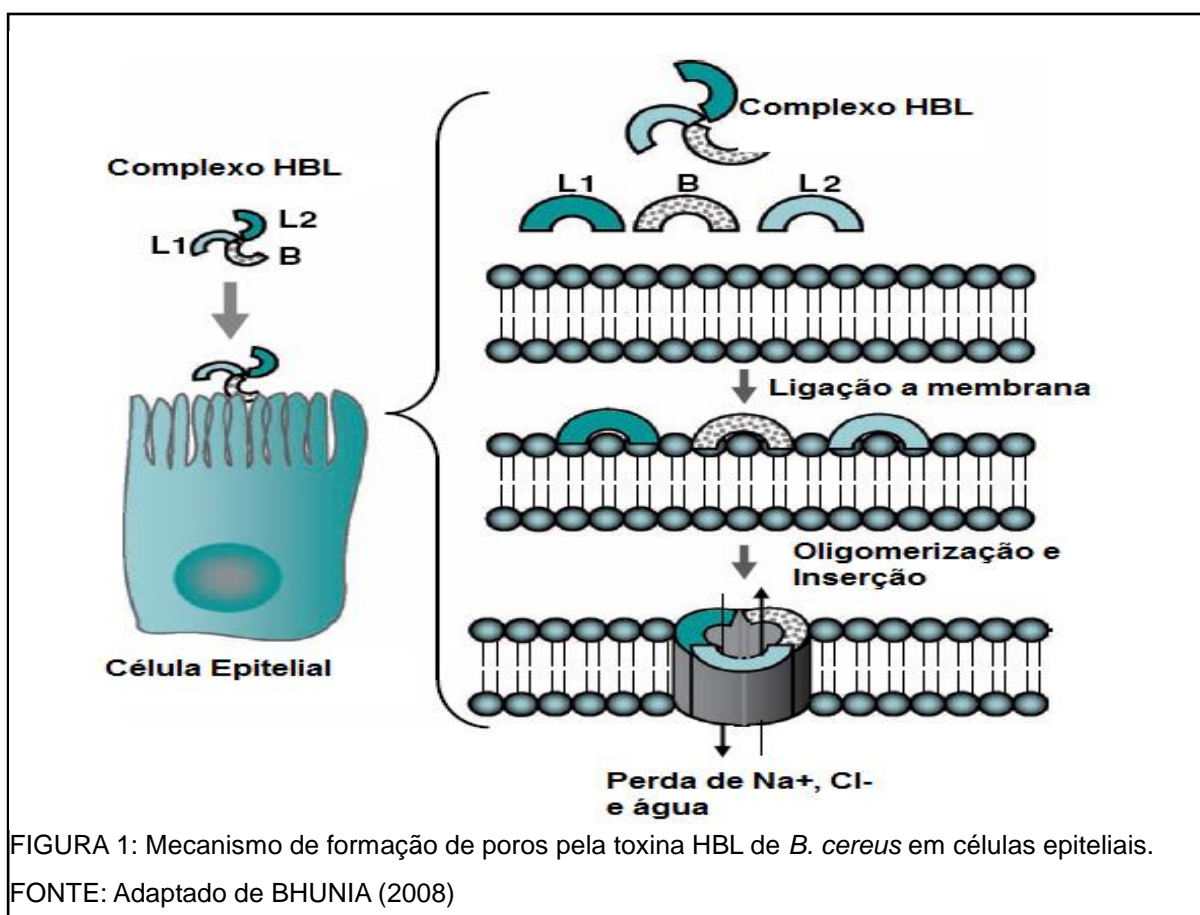
A síndrome diarréica é causada pela ingestão de células de *B. cereus* que produzem enterotoxinas termolábeis no lúmen do intestino delgado. (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008). A produção da toxina diarréica ocorre, em sua maioria, na fase de crescimento exponencial do micro-organismo (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000).

As toxinas diarréicas são produzidas após a colonização do intestino delgado por *B. cereus*. Estas toxinas têm como mecanismo de ação a formação de poros na membrana celular, estes poros induzem a perda dos íons Na^+ , Cl^- e de água, resultando em um desequilíbrio eletrolítico (BHUNIA, 2008; FAGERLUND, LINDBÄCK & GRANUM, 2010). (FIGURA 1)

A síndrome é caracterizada por dores abdominais, cólicas e diarréia aquosa

que iniciam num período de 8 a 16 horas após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas permanecem por 12 a 24 horas. Os alimentos mais associados à transmissão da enfermidade são produtos lácteos, vegetais e carnes (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000).

As toxinas consideradas como principais fatores de virulência para a síndrome diarréica são a hemolisina BL (HBL) (FIGURA 1), enterotoxina não hemolítica (NHE) e a citotoxina K (CytK). Ainda existem a enterotoxina FM (EntFM), enterotoxina T (BceT) e a hemolisina II (Hly II) que ainda são consideradas como possíveis toxinas diarréicas (MOLVA, SUDAGIDAN & OKUKLU, 2009) embora não haja relatos de que elas possam ser causadoras de ETA (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000; HENDRIKSEN, HANSEN & JOHANSEN, 2006).



2.4.1.1 Hemolisina BL (HBL)

A hemolisina BL (HBL) é um composto termolábil formado por três proteínas: B, L₁ e L₂, que são codificados pelos genes *hblA*, *hblC* (codifica a fração L₂) e *hblD* (codifica a fração L₁). A presença dos três elementos é necessária para a atividade da toxina. Uma mutação no gene *hblA* resultou no aparecimento de um quarto gene (*hblB*), porém a ausência desse gene não impede a atividade biológica da toxina (LINDBACK & GRANUM, 2006).

Os primeiros estudos sobre a HBL sugeriam que o componente B servia como fator de ligação à célula-alvo e que os componentes L₁ e L₂ atuavam como fatores de lise celular. Recentemente outro modelo tem sido proposto para o modo de ação da HBL. Sugere-se que os três componentes se liguem às células independentemente e então constituam um complexo de ataque à membrana celular. Este ataque é feito através de um mecanismo de lise osmótica (LINDBÄCK *et al*, 2004).

A HBL produz um padrão de hemólise incompleta em ágar sangue, sendo esta característica, associada a sua atividade citotóxica, um grande fator de virulência para *B. cereus* (HENDRIKSEN, HANSEN & JOHANSEN, 2006).

2.4.1.2 Enterotoxina não hemolítica (NHE)

A enterotoxina não hemolítica (NHE) também é composta por três proteínas: NheA, NheB e NheC sendo codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente. Assim como a HBL esta toxina também necessita dos três elementos para possuir atividade enterotóxica (RAJKOWSKI & BENNETT, 2003; BHUNIA, 2008; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

A NHE foi descrita inicialmente após um surto na Noruega causado por uma cepa HBL negativa. Acreditava-se que a toxina era um composto binário formado pelos componentes NheA e NheB, porém posteriormente descobriu-se que havia um terceiro componente, a fração NheC (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Estudos recentes indicam que entre as três toxinas diarréicas a NHE seja a mais dominante. Acredita-se que quase todas as cepas de *B. cereus* possuam os genes para a toxina (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

2.4.1.3 Citotoxina K (CytK)

A citotoxina K é uma proteína codificada pelo gene *cytK* e é similar à toxina- β de *Clostridium perfringens*. A CytK pode apresentar duas formas diferentes de acordo com a cepa de *B. cereus*: CytK-1 e CytK-2 (LUND, DE BUYSER & GRANUM, 2000; HENDRIKSEN, HANSEN & JOHANSEN, 2006).

As duas formas da toxina apresentam similaridade de 89% em sua sequência de aminoácidos porém, uma importante diferença entra as duas encontra-se em seus efeitos biológicos. A forma CytK-1 se mostrou bastante tóxica para as células intestinais humanas, mais que a forma CytK-2. Por esse motivo pode-se assumir que a forma CytK-1 apresenta mais perigo aos consumidores do que a forma CytK-2, o que torna importante a diferenciação entre as duas formas nos alimentos contaminados (GUINEBRETIERE *et al*, 2006).

A toxina foi isolada inicialmente de uma cepa de *B. cereus* responsável por um surto severo de infecção alimentar que culminou com a morte de três pessoas na França em 1998. A cepa não produzia nenhuma das outras toxinas conhecidas de *B. cereus* (FAGERLUND *et al*, 2004).

Diferentemente da HBL e da NHE a CytK é uma proteína individual. Apresenta capacidade necrótica, hemolítica e é capaz de formar poros em bicamadas lipídicas (FAGERLUND *et al*, 2004).

Além do caráter hemolítico e citotóxico, as toxinas causadoras da síndrome diarréica possuem outras características que contribuem para a virulência de *B. cereus*, entre elas destacam-se a atividade necrótica, permeabilidade vascular e capacidade de acumular líquido nas alças intestinais (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000; SVENSSON *et al*, 2006).

2.4.2 Síndrome Emética

A síndrome emética é desencadeada por um dodecapsipeptídeo cíclico (3 repetições de 4 aminoácidos modificados), codificado pelo gene *ces*, chamado cereulida. A toxina emética é produzida geralmente durante o armazenamento prolongado dos alimentos (durante a fase estacionária da curva de crescimento de *B. cereus*), sendo a ingestão destes alimentos contaminados com a toxina pré-

elaborada a causa da manifestação do quadro emético (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Os sintomas são caracterizados por náuseas e vômitos (ocasionalmente também pode ocorrer diarreia) que iniciam de 1 a 5 horas após a ingestão do alimento contaminado. A duração dos sintomas é inferior a 24 horas (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000).

A síndrome emética tem sido amplamente associada ao consumo de arroz e massas contaminados com *B. cereus* produtores de cereulida (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000). Mahler *et al* (1997) descreveram um caso de falência hepática fulminante e posterior óbito do paciente dois dias após a ingestão de macarrão ao pesto contaminado com a cereulida, na cidade de Zurique na Suíça.

2.4.2.1 Cereulida

A cereulida é termoestável (150°C durante 100 min), ativa numa faixa ampla de pH (pH 2,0 - 11,0) e não é digerida pela pepsina ou pela tripsina. Devido a estas características a toxina não é inativada pelo suco gástrico nem pelas enzimas proteolíticas do trato intestinal e permanecerá viável nos alimentos cozidos (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008). Devido ao pequeno tamanho da molécula a toxina emética possui alta estabilidade térmica e química, e não existe maneira de descontaminar alimentos ou matérias primas que contenham a cereulida (ANDERSSON *et al*, 2004).

A síntese da cereulida ocorre numa faixa de temperatura que varia dos 12° aos 37°C, porém a produção máxima da toxina parece ocorrer entre 12° e 22°C (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

O número de células viáveis de *B. cereus* necessárias para produzir quantidade suficiente de cereulida capaz de desencadear a síndrome emética ainda não foi determinado, mas em alimentos associados a esta ETA concentrações de $10^3 - 10^{10}$ UFC g⁻¹ de alimento foram encontradas sendo que na maioria dos casos a concentração encontrada foi de 10^5 UFC g⁻¹ de alimento (GILBERT & KRAMER, 1986; ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Estudos com experimentação animal e investigações de surtos de origem

alimentar envolvendo cepas eméticas de *B. cereus* estimam que uma dose mínima de 8 -10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corporal é suficiente para desencadear a síndrome emética (JAASKELAINEN *et al*, 2003; ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

O efeito tóxico da cereulida nas células humanas ainda não é completamente elucidado. Porém, em estudos realizados com camundongos, foi observada uma alta toxicidade em células hepáticas. A toxina causava vacuolização celular proveniente da interrupção da fosforilação oxidativa mitocondrial (LUND, DE BUYSER & GRANUM, 2000).

Recentemente, estudos demonstraram que a cereulida inibe a ação das células de defesa humanas, indicando que ela possui um efeito imunomodulador quando presente no organismo (EHLING-SCHULZ, FRICKER & SCHERER, 2004).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DE *B. cereus* NO BRASIL

B. cereus tem sido relacionado como causador de diversos surtos de ETA envolvendo um grande número de alimentos, como por exemplo arroz, massas, carnes, vegetais, leite e produtos lácteos (MARTÍNEZ-BLANCH *et al*, 2009). Atualmente concentrações acima de 10^3 UFC em 1 g ou 1 ml de alimento são consideradas não seguras para consumo (CHOMA & GRANUM, 2002; MARTÍNEZ-BLANCH *et al*, 2009).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece diversos parâmetros microbiológicos de qualidade do leite e produtos derivados (coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Salmonella*, etc.), porém não existem valores específicos para *B. cereus*, sendo que o parâmetro analítico exigido pelo ministério, na qual *B. cereus* se enquadra, é a contagem de microorganismos mesófilos aeróbios (contagens máximas variando de 1×10^4 a $3,0 \times 10^5$ UFC/ml para leite fluido de acordo com o tipo). Entretanto há a exceção do leite em pó, onde o limite estabelecido é de $5,0 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 2001).

Diferentes ingredientes também já foram identificados como fontes importantes de contaminação. Alguns deles são agentes texturizantes, ovos líquidos, ervas e também temperos (MARTÍNEZ-BLANCH *et al*, 2009).

Doenças veiculadas por *B. cereus* têm sido amplamente subestimadas tanto no Brasil como em outros países. Este fato se deve a curta duração e a pequena

intensidade dos sintomas na maioria dos casos, o que desestimula o paciente a procurar cuidados médicos. Além disso, quando diagnosticada, a doença não é de notificação obrigatória. Adicionalmente, os casos e surtos não podem ser sempre associados a *B. cereus*. Em geral, os sintomas da síndrome emética não são facilmente distinguíveis da intoxicação causada por *S. aureus* e a síndrome diarréica apresenta os mesmos sintomas que a ETA causada por *Clostridium perfringens* tipo A (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008). Logo, para o diagnóstico preciso do agente etiológico da ETA é necessário que o paciente seja submetido a diferentes exames laboratoriais.

Outro patógeno que tem dificultado os estudos epidemiológicos é *B. thuringiensis*, uma espécie bastante semelhante a *B. cereus* e que recentemente foi isolada em surtos. Apesar de não ser associado a surtos de ETA *B. thuringiensis* tem demonstrado citotoxicidade idêntica a cepas enterotoxigênicas de *B. cereus*. A diferenciação entre essas espécies tão proximamente relacionadas não é possível de ser feita utilizando os métodos comuns de identificação bioquímica (morfologia das colônias, motilidade, hemólise, etc.), o que gera um problema já que *B. thuringiensis* é usado amplamente como um inseticida de origem microbiana na agricultura, fazendo com que os dois micro-organismos estejam presentes em habitats semelhantes, dificultando ainda mais a diferenciação entre os dois (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

No Brasil a Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, órgão do Ministério da Saúde, realizou um levantamento epidemiológico de 1999 a 2009 intitulado “Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil”. Neste amplo estudo são encontrados dados sobre a ocorrência de ETA no país. Segundo o relatório, no período do levantamento, foram relatados 6.349 surtos de ETA no Brasil envolvendo 123.917 doentes e 70 óbitos, sendo que foram ignorados, em 45% dos casos, o agente etiológico e, em 35% dos casos, o alimento responsável (BRASIL, 2009).

B. cereus é a terceira bactéria mais frequente causadora de ETA no país. Em primeiro lugar encontra-se *Salmonella* spp e em segundo *Staphylococcus* spp (BRASIL, 2009). (TABELA 1)

TABELA 1 BACTÉRIAS MAIS FREQUENTES NOS SURTOS DE ETA NO BRASIL ENTRE 1999 E 2009

Agente Etiológico	Número de Surtos	%
<i>Salmonella</i> spp	1.313	42,5
<i>Staphylococcus</i> spp	635	20,5
<i>Bacillus cereus</i>	219	7,0
<i>Clostridium perfringens</i>	154	4,9
<i>Salmonella enteritidis</i>	129	4,1
<i>Shigella</i> spp	85	2,7
Outros	553	18,0
TOTAL	3.088	100,0

FONTE: BRASIL (2009)

2.6 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *B. cereus* EM ALIMENTOS

Por quase um século, a análise de alimentos se baseava quase que exclusivamente nos métodos de análises microbiológicas e físico-químicas tradicionais. Estes métodos se baseiam no cultivo em meios de cultura seletivos para o posterior isolamento e identificação bioquímica do patógeno de interesse. A análise de alimentos, entretanto, permanece sendo uma tarefa bastante desafiadora, devido à complexidade dos alimentos e a alta heterogeneidade das matérias-primas. Além disso, nos alimentos que são consumidos crus existe uma grande população de micro-organismos autóctones. Apesar destes micro-organismos, em sua maioria, não apresentarem risco à saúde sua presença física no alimento pode mascarar a presença de espécies patogênicas. Por esses motivos as análises microbiológicas recorriam a processos lentos que envolviam múltiplas etapas de enriquecimentos e cultivos em meios seletivos (FENG, 1997).

Os progressos científicos na biologia molecular introduziram diversos métodos diagnósticos para a detecção de patógenos alimentares e suas toxinas. O aparecimento destes ensaios coincide com o advento da biotecnologia, que por sua vez se originou dos avanços provenientes dos estudos e pesquisas nas ciências básicas ao longo dos anos. Um fator decisivo para esta evolução foi a descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA nos anos 1950, o que estimulou uma nova era de pesquisas (FENG, 1997). Como uma nova alternativa, os métodos moleculares oferecem a possibilidade de uma identificação mais precisa dos isolados de *B.*

cereus e demais micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes em alimentos (MARTÍNEZ-BLANCH *et al*, 2009).

Os métodos moleculares são mais sensíveis e específicos dos que os microbiológicos tradicionais para a detecção de patógenos em alimentos. Entretanto, como os alimentos são uma matriz mista não é possível a aplicação direta dos ensaios moleculares sem que antes sejam feitas algumas etapas de pré-seleção dos micro-organismos de interesse, dessa maneira otimizando as análises. Mesmo assim, com a eliminação da necessidade de semeadura seletiva houve uma redução considerável do tempo necessário para a execução das análises (FENG, 1997).

2.6.1 Métodos Moleculares e Imunológicos para Identificação de Genes e Toxinas de *Bacillus cereus*

Desde a sua introdução, em 1985, a reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* -PCR) transformou a maneira como as análises de DNA são conduzidas tanto em laboratórios clínicos como nos de alimentos. A PCR envolve a síntese enzimática, *in vitro*, de milhões de cópias de um determinado fragmento de DNA (ERLICH, GELFAND & SNINSKY, 1991).

Por se tratar de um método de análise molecular a PCR possibilita resultados mais precisos para o risco potencial do alimento contaminado porém, a técnica identifica somente a presença dos genes de patogenicidade, o que nem sempre pode ser correlacionada com a expressão dos componentes formadores das toxinas. Para tanto, o uso de métodos combinados, como imunologia e PCR, são necessários para confirmação da atividade tóxica de *B. cereus* bem como para demais micro-organismos (MOLVA, SUDAGIDAN & OKUKLU, 2009).

Os anticorpos têm sido usados há vários anos para identificar sorologicamente isolados bacterianos. O desenvolvimento de métodos imunológicos possibilitou a expansão do uso dos anticorpos e estes começaram ser usados para a detecção de patógenos alimentares. A natureza altamente específica dos anticorpos associada à versatilidade das reações antígeno-anticorpo facilitaram o desenvolvimento de vários ensaios imunológicos, sendo que diversos deles foram projetados para a análise de alimentos (FENG, 1997).

Os testes imunológicos para diagnóstico de toxinas de *B. cereus* utilizam

anticorpos sintetizados para a HBL e NHE. Ainda não há relatos da comercialização de testes para a identificação da CytK (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Diferentemente das toxinas causadoras da síndrome diarréica, a cereulida possui baixa atividade antigênica, por esse motivo não existem ensaios imunológicos capazes de identificar a presença desta toxina (KOTIRANTA, LOUNATMAA & HAAPASALO, 2000). Entretanto existe uma grande variedade de testes *in vivo* e *in vitro* para a identificação da toxina emética. A maioria destes testes se baseia na capacidade citotóxica da cereulida em diferentes tecidos animais (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Porém, um teste bastante utilizado para quantificação da toxina emética é a avaliação de perda da motilidade de espermatozóides em sêmen suíno. A análise se baseia na capacidade da cereulida em interromper o ciclo de fosforilação oxidativa das mitocôndrias dos espermatozóides, fazendo com que elas sejam danificadas resultando na perda de motilidade da célula (HOORNTRA *et al*, 2003; ANDERSSON *et al*, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

No período de março a dezembro de 2010, como parte do projeto de Doutorado do Programa de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, intitulado: “*Avaliação fenotípica e genotípica de Bacillus cereus isolado em produtos lácteos com relação ao seu comportamento psicrotrófico*” da aluna Maíke Taís Maziero Montanhini (CNPq Auxílio à Pesquisa: 471703/2009-5), foram analisadas, para a presença de *B. cereus*, um total de 260 amostras de leite UHT, leite pasteurizado e leite em pó (TABELA 2) provenientes de diferentes estabelecimentos comerciais e de diferentes marcas.

As análises de identificação e caracterização bioquímicas de *B. cereus* foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, localizado na Usina A do Centro Politécnico, *Campus Curitiba* tendo sido obtidos 63 isolados bacterianos identificados como *B. cereus* (TABELA 3). A partir destas amostras foi feita a extração do DNA bacteriano no laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus Ponta Grossa*.

TABELA 2- PRODUTOS UTILIZADOS NO TRABALHO PARA A OBTENÇÃO DOS CULTIVOS DE *B. CEREUS*

Produto	Nº de marcas analisadas	Nº de amostras utilizadas
Leite Pasteurizado	18	100
Leite em Pó	16	50
Leite UHT	19	110
TOTAL		260

FONTE: Projeto de Doutorado “*Avaliação fenotípica e genotípica de Bacillus cereus isolado em produtos lácteos com relação ao seu comportamento psicrotrófico*” de Maíke Taís Maziero Montanhini (2009)

A distribuição dos isolados de acordo com o produto do qual foram obtidos está demonstrada na TABELA 3.

TABELA 3- DISTRIBUIÇÃO DAS CULTURAS DE *B. CEREUS* ISOLADAS NESTE TRABALHO E RESPECTIVOS PRODUTOS DE ORIGEM

Produto de Origem	Nº (%) de culturas isoladas
Leite Pasteurizado	36 (57,1)
Leite em Pó	15 (23,8)
Leite UHT	12 (19,1)
TOTAL	63 (100)

FONTE: O autor (2012)

3.1 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNA BACTERIANO

As 63 culturas de *B. cereus* isoladas foram armazenadas em ágar nutriente sob refrigeração e a extração do DNA bacteriano foi feita segundo a técnica adaptada de Miranda *et al*, (2011). A técnica foi realizada seguindo-se os seguintes passos:

Inicialmente foi feita homogeneização das culturas bacterianas em meio líquido, em agitador tipo vórtex, seguido da transferência de 1,5 ml das culturas para tubos de micro-centrífuga e centrifugação a 13500 g por 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e então foram adicionados 450 µl de Brometo hexametilenodiamínico (CTAB) para a ressuspensão do *pellet* (em agitador de bandeja por 1 minuto).

Após a ressuspensão foi feita sonicação por 1 minuto e 30 segundos em banho de gelo. Foram adicionados mais 300 µl de CTAB e seguiu-se para banho seco a 65°C por 20 minutos. Após, foram adicionados 750 µl de clorofórmio, os tubos foram agitados por 5 minutos em vórtex de mesa e centrifugados a 13500 g por 7 minutos.

Transferiu-se o sobrenadante para outros tubos de micro-centrífuga (600 µl), adicionou-se mais 750 µl de clorofórmio e foram repetidas as últimas condições de agitação e centrifugação. Transferiu-se então o sobrenadante para novos tubos de micro-centrífuga (400 µl) e adicionaram-se dois volumes de Etanol 96% (gelado) seguido de agitação suave dos tubos e armazenamento a -20°C por 30 minutos.

Após, foi feita centrifugação por 7 minutos a 13500 g e descarte do sobrenadante. Adicionaram-se 750 µl de Etanol 70% (gelado) com homogeneização suave dos tubos. Por fim, centrifugou-se por 7 minutos, descartou-se o Etanol e após a secagem dos *pellets*, em temperatura ambiente, estes foram ressuspensos em 50 µl de água deionizada (Milli-Q, Millipore).

3.2 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE *DE B. cereus*

A técnica da PCR utilizou como molde para as reações o DNA bacteriano que foi extraído.

A concentração do DNA foi avaliada no equipamento *Nanodrop*[®] (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e posteriormente diluições foram feitas para que todas as amostras apresentassem uma concentração final de 100 ng/μl, como preconizando por Aragon-Alegro, *et al* (2008).

A PCR foi feita utilizando-se 25 μl de solução mix para cada amostra, preparada com as seguintes concentrações: 0,2 mM de solução de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 500nM de cada *primer* (correspondente aos respectivos genes que amplificam), 0,75 U de Taq DNA polimerase e 0,75 U de solução tampão MgCl₂. Os reagentes utilizados foram da marca Fermentas (Burlington, Ontario, Canadá).

Após o preparo as soluções foram levadas ao Termociclador *Maxygene*[®] (Axygen, Union City, EUA) onde ocorreu a amplificação dos fragmentos do DNA de interesse.

O protocolo de amplificação utilizado para os genes *hblACD*, *nheABC* e *ces* foi o seguinte: ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a temperatura de pareamento e 2 minutos a 72°C com a extensão final de 5 minutos a 72°C, como preconizado por Guinebretière, Broussolle & Nguyen-The (2002).

Para os genes *cytK*, *cytK-1* e *cytK-2* o protocolo de amplificação foi um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a temperatura de pareamento e 30 segundos a 72°C com extensão final de 7 minutos a 72°C, como preconizado por Guinebretière *et al* (2006). Os “*primers*” e temperaturas de pareamento utilizados neste trabalho estão descritos na TABELA 4.

Após a finalização dos ciclos obtidos no termociclador, como descrito anteriormente, o fragmentos amplificados pela PCR foram aplicados em um gel de agarose para a separação dos mesmos por meio de eletroforese.

TABELA 4- SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS "PRIMERS" E TEMPERATURAS DE PAREAMENTO USADOS NESTE TRABALHO

<i>Primer</i>	<i>Gene</i>	Temperatura de pareamento (°C)	Tamanho do fragmento amplificado em pares de base (bp)	Sequência (5'-3')
HA F	<i>hblA</i>	56	1,154	AAGCAATGGAATACAATGGG
HA R				AGAATCTAAATCATGCCACTGC
HC F	<i>hblC</i>	58	740	GATAC(T,C)AATGTGGCAACTGC
HC R				TTGAGACTGCTCG(T,C)TAGTTG
HD F	<i>hblD</i>	58	829	ACCGGTAACACTATTCATGC
HD R				GAGTCCATATGCTTAGATGC
NA F	<i>nheA</i>	56	755	GTTAGGATCACAATCACCGC
NA R				ACGAATGTAATTTGAGTCGC
NB F	<i>nheB</i>	54	743	TTTAGTAGTGGATCTGTAGCG
NB R				TTAATGTTCGTTAATCCTGC
NC F	<i>nheC</i>	54	683	TGGATTCCAAGATGTAACG
NC R				ATTACGACTTCTGCTTGTGC
CK F	<i>cytK</i>	54	809	ACAGATATCGG(GT)CAAATGC
CK R				TCCAACCCAGTT(AT)(GC)CAGTTC
CK1 F	<i>cytK-1</i>	57	426	CAATTCCAGGGGCAAGTGTC
CK1 R				CCTCGTGCATCTGTTTCATGAG
CK2 F	<i>cytK-2</i>	57	585	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA
CK2 R				GTGIAGCCTGGACGAAGTTGG
CES F	<i>ces</i>	58	1,271	GGTGACACATTATCATATAAGGTG
CES R				GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA

FONTE: GUINEBRETIERE *et al*, (2006)

3.3 SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NO TERMOCICLADOR

Para a eletroforese foi utilizado gel de agarose a 1,5%. O gel foi preparado com o tampão TBE (Tris-Borato EDTA) que também foi utilizado como solução eletrolítica. As amostras foram previamente coradas com Azul de Bromofenol (5 µl), possibilitando a visualização do deslocamento das amostras no gel.

Em cada poço do gel foram aplicados 5 µl de produto da PCR já corado. O procedimento foi realizado em cuba de eletroforese da marca *Loccus Biotecnologia*®

(Cotia-SP).

A voltagem utilizada variou de 80 a 100 V e o tempo de corrida foi o suficiente para que as amostras percorressem dois terços do gel.

3.4 FOTODOCUMENTAÇÃO

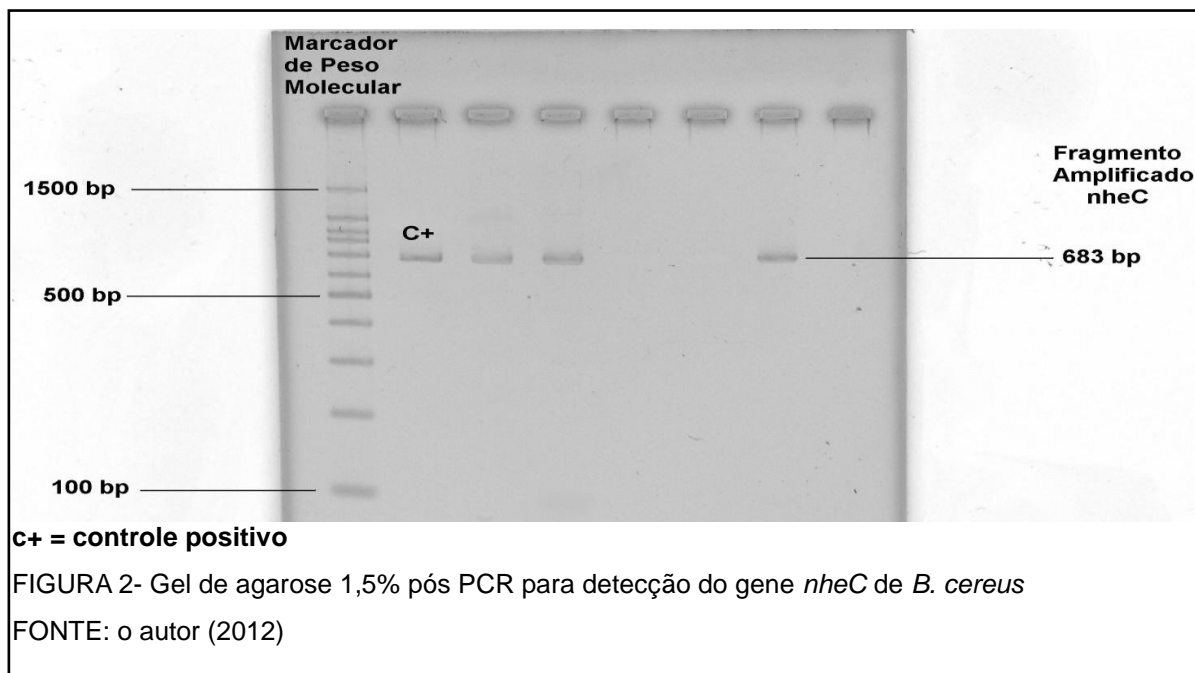
Após a retirada do gel da cuba eletrolítica este foi corado com EtBr (Brometo de Etídio). O Brometo é uma substância que se intercala as moléculas do DNA e emite fluorescência quando exposto a radiação UV (ultravioleta).

O gel foi mergulhado no EtBr por vinte minutos e então levado para o transiluminador aonde foi feita a fotodocumentação.

3.5 LEITURA DOS RESULTADOS

Uma amostra foi considerada positiva quando se observava a formação de uma banda distinta na mesma altura que o controle positivo (FIGURA 2), indicando que a amostra possuía o gene para a toxina ou um dos seus componentes. Foi utilizado o marcador de peso molecular *Easy Gen (Easy Path*[®], São Paulo-SP) que é constituído de 11 bandas (1500 a 100 bp). A leitura feita em equipamento transiluminador da marca *Loccus Biotecnologia*[®] (Cotia-SP) com o uso do software L-Pix Image.

Foram utilizadas como controles positivos as cepas NHV 1230/88 (contendo os genes *nhe*, *hbl* e *cytK*), NHV 0075/95 (*nhe*), NHV 0173/05 (*ces*) e RIVM-BC-0062 (*ces*), oriundas do Dr. Per Einar Granum, Noruega e gentilmente cedidas para este trabalho pela Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo.



3.6 DETECÇÃO DA TOXINA HBL PELO KIT BCET-RPLA Oxoid®

Foram submetidas ao teste BCET-RPLA as culturas de *B. cereus* que, após a PCR, foram positivas para a presença dos genes *hblACD* simultaneamente. Dos 63 cultivos utilizados 23 apresentaram os genes do complexo HBL, sendo este o total de isolados testados com o kit.

Como preconizado pelo fabricante, os isolados de *B. cereus* (previamente armazenados em ágar de estoque sob refrigeração) foram cultivados por meio de semeadura em caldo BHI e incubados em estufa a 37°C por 24 horas.

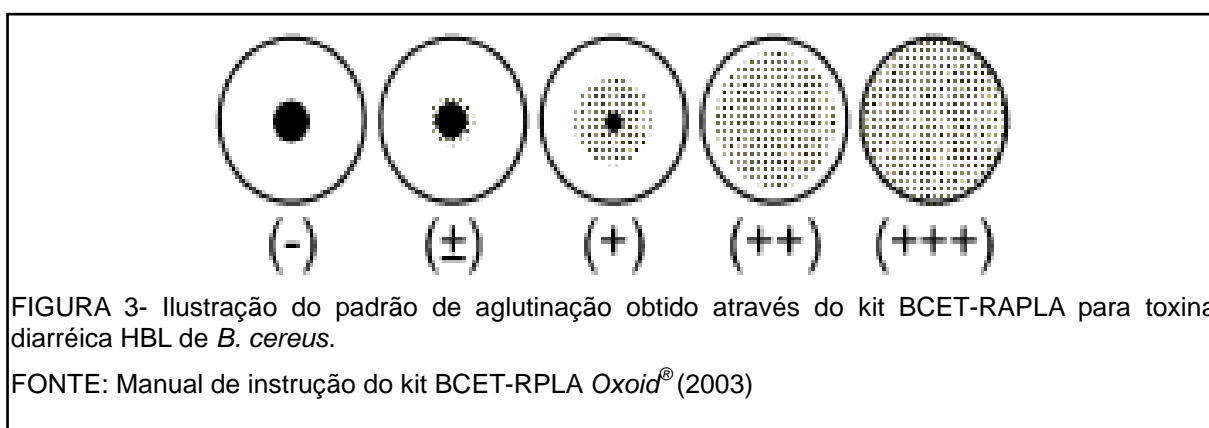
Após a etapa de reativação foram transferidos 2000 µl de caldo inoculado para tubos de micro-centrífuga que foram centrifugados a 4°C a 900 g durante 20 minutos.

3.6.1 Método de Ensaio

O controle de enterotoxina foi reconstituído utilizando-se 0,5 ml de diluente e, assim como os demais reagentes, submetido a agitação manual até a total homogeneização do produto. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

O ensaio consistia na divisão de uma placa em duas fileiras contendo 8 poços cada. Em cada poço foram pipetados 25 µl de diluente, exceto no primeiro de cada fila. O mesmo volume de amostra de teste foi adicionado ao primeiro e segundo poço de ambas as filas. A partir do segundo poço foram feitas diluições duplas até o sétimo poço das filas, deixando que o último contivesse apenas diluente. Após, foram aplicados 25 µl de látex sensibilizado na primeira fila e o mesmo volume de controle de látex na segunda fila. Misturou-se o conteúdo e as placas foram cobertas para evitar evaporação e deixadas em superfície livre de vibrações por 24 horas.

Os resultados foram interpretados segundo o padrão de aglutinação das amostras demonstrados na FIGURA 3.



Os resultados classificados como (+) (++) e (+++) são considerados positivos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETECÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE

Os dados obtidos, referentes a presença dos genes de patogenicidade que codificam as toxinas responsáveis pelas síndromes diarréica e emética, dos 63 cultivos de *B. cereus* utilizados neste trabalho, estão indicados na TABELA 5.

TABELA 5- DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS GENES DE PATOGENICIDADE DETECTADOS ENTRE AS 63 CULTURAS ISOLADAS

ETA	Toxina	Gene	Nº (%) de cepas positivas para o gene
Síndrome Diarréica	Hemolisina BL (HBL)	<i>hblA</i>	26 (41,3)
		<i>hblC</i>	34 (54)
		<i>hblD</i>	34 (54)
	Enterotoxina não hemolítica (NHE)	<i>nheA</i>	41 (65,1)
		<i>nheB</i>	15 (23,8)
		<i>nheC</i>	52 (82,5)
		<i>cytK</i>	43 (68,3)
Citotoxina K (CytK)	<i>cytK-1</i>	NE*	
	<i>cytK-2</i>	39 (61,9)	
Síndrome Emética	Cereulida	<i>ces</i>	02 (3,2)

*NE= Não encontrado.

FONTE: O autor (2012)

Analisando os resultados da TABELA 5, observa-se que, com relação aos genes codificantes das toxinas causadoras da síndrome diarréica as frequências detectadas entre as 63 culturas de *B. cereus* testadas, em ordem decrescente em termos percentuais gerais, é a seguinte: com o maior percentual de detecção está o gene *nheC* com 52 (82,5%) de isolados positivos. Após, o gene *cytK* com percentual de 43 (68,3%) seguido dos genes *nheA* (41/61,5%), *cytK-2* (39/61,9%), *hblC* (34/54%), *hblA* (26/41,6%) e a menor frequência entre os genes codificantes da síndrome diarréica foi observada para o gene *nheB* com apenas 15 (28,3%) dos isolados positivos.

Nenhum dos cultivos testados apresentou o gene *cytK-1*.

Com relação a síndrome emética 2 (3,2%) das 63 culturas foram positivas

para o gene *ces*. Ambas foram negativas para os genes *hblACD* e positivas para o *cytK* e *cytK-2*. Com relação aos componentes da NHE, uma delas apresentou os genes *nheA* e *nheB* e a outra apenas possuiu o gene *nheC*.

Entre as 63 culturas testadas 7 (11,1%) foram positivas para a presença dos genes codificantes das toxinas diarréicas *hblACD*, *nheABC*, *cytK* e *cytK-2* simultaneamente. Vinte e seis (41,3%) foram negativas para o complexo *hblACD*, 3 (4,8%) para o complexo *nheABC* e apenas uma (1,6%) não apresentou nenhum dos genes, sendo que as demais foram positivas para pelo menos um. O perfil apresentado pelas culturas de *B. cereus* em relação as toxinas diarréicas é apresentado na TABELA 6 .

TABELA 6- PERFIL DAS CULTURAS ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO EM RELAÇÃO À PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS COMPLEXOS *HBLACD*, *NHEABC* E DOS GENES *CYTK* E *CYTK-2*

Genes	Nº (%)
<i>hblACD</i> negativo	26 (41,3)
<i>nheABC</i> negativo	3 (4,8)
<i>hblACD</i> , <i>nheABC</i> , <i>cytK</i> e <i>cytK-2</i> negativo	1 (1,6)
<i>hblACD</i> , <i>nheABC</i> , <i>cytK</i> e <i>cytK-2</i> positivo	7 (11,1)

FONTE: O autor (2012)

Diversos trabalhos já foram desenvolvidos avaliando a prevalência de cepas patogênicas de *B. cereus* em alimentos, porém poucos destes são específicos para as culturas obtidas do leite e/ou derivados lácteos. Um dos estudos mais recentes foi realizado por Rather *et al.* (2011) onde foi avaliada a distribuição dos genes de patogenicidade de cepas isoladas de leite cru e pasteurizado obtidas na Índia. Neste trabalho os percentuais apresentam valores superiores para a presença dos complexos HBL e NHE. Para os genes da Hemolisina BL foram relatados os seguintes valores: *hblA*: 69,04%, *hblC*: 71,42% e *hblD*: 73,80%. E para os genes da enterotoxina não hemolítica (NHE) os resultados foram: *nheA*: 95,23%, *nheB*: 90,45% e *nheC*: 95,23%. Para a Citotoxina K os valores encontrados foram semelhantes aos nossos, onde 66,7% das cepas possuíam o gene *cytK* (não foram avaliadas as formas *cytK-1* e *cytK-2*).

Outro trabalho envolvendo a prevalência de cepas patogênicas de *B. cereus* em alimentos foi realizado por Chitov, Dispan & Kasinrerck (2008) avaliando leite e produtos a base de grãos comercializados na Tailândia. Para os genes testados

foram obtidos resultados superiores ao deste trabalho, exceto para o gene *nheA*. Para o complexo HBL a distribuição dos genes com relação a *B. cereus* isolados foi: *hblA*: 64,0%, *hblC*: 60,8% e *hblD*: 64,0%. Para o complexo NHE os resultados foram: *nheA*: 59,20%, *nheB*: 80,80% e *nheC*: 69,60%. O gene *cytK* foi detectado em 70,40% das cepas testadas. Os autores também relataram que 4% das cepas não apresentaram nenhum dos genes de patogenicidade, sendo este valor superior aos encontrados neste trabalho, onde apenas uma cultura (1,6%) não apresentou nenhum dos genes testados.

Com relação a dados do Brasil Aragon-Alegro *et al.* (2008) também avaliaram a presença dos genes de patogenicidade de *B. cereus* em diferentes alimentos, incluindo produtos lácteos. Os resultados (referentes aos produtos lácteos) mostraram valores superiores em relação a NHE: *nheB*: 35,3% e *nheC*: 100%, porém a detecção do fragmento *nheA* foi inferior a encontrada neste trabalho com 58,8% de cepas positivas. Com relação a Citotoxina K os resultado de Aragon-Alegro *et al.* (2008) foram inferiores, com 52,9% das cepas apresentando o gene *cytK-2*, porém os percentuais para *cytK* foram semelhantes (64,7%). Também não foi encontrado *cytK-1* em nenhuma das amostras. Por fim, o complexo HBL apresentou a seguinte distribuição: *hblA*: 23,5%, *hblC*: 35,5% e *hblD*: 70,6% sendo os dois primeiros valores inferiores e o terceiro superior aos relatados neste trabalho, respectivamente.

A presença do gene *ces*, que codifica a toxina emética, foi detectada em 2 cultivos, sendo um isolado de leite pasteurizado e outro isolado de leite em pó. O percentual de 3,2% pode ser considerado bastante elevado tratando-se de leite e produtos lácteos, visto que a cereulida é mais prevalente em produtos amiláceos tais como arroz e massas e a produção da toxina emética é restrita a alguns poucos sorotipos de *B. cereus* (HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Svensson *et al.* (2006) realizaram um trabalho amplo envolvendo a prevalência de cepas eméticas de *B. cereus* em fazendas produtoras de leite e silos de estocagem de leite na Suécia. O trabalho obteve 5668 amostras que foram isoladas de diversos pontos da cadeia produtiva, tais como solo, camas, utensílios de ordenha e superfícies dos silos de armazenamento do leite. Do total de cepas isoladas apenas 1,9% foram denominadas eméticas. A classificação destas cepas baseou-se em análises moleculares (RAPD-PCR) e bioquímicas (degradação de amido, hemólise em ágar sangue, entre outras análises).

Uma importante característica que separa as cepas eméticas de *B. cereus* das cepas diarréicas é a não produção da toxina HBL (PIRTTIJÄRVI *et al*, 1999, CARLIN *et al*, 2006). Ambos os cultivos, isolados neste trabalho, apresentaram tal comportamento. Em nenhum dos dois isolados positivos para o gene *ces* foram detectados os genes do complexo HBL.

Recentemente tem sido demonstrado que a produção de toxina emética é restrita a uma única linhagem evolutiva de *B. cereus*, enquanto que a capacidade de produção das toxinas diarréicas está espalhada por diversos grupos do micro-organismo (CARLIN *et al*, 2006).

Adicionalmente, a síntese de cereulida em leite também é bastante pequena. Em estudo realizado no Japão por Agata, Ohta & Yokoyama (2002) vários alimentos foram utilizados para avaliar a multiplicação e produção de toxina de cepas eméticas de *B. cereus*. Para o leite, como produto individual, foi observado uma inibição da multiplicação do micro-organismo e só houve produção da cereulida em amostras que apresentavam coagulação.

Considerando-se o número de isolados de *B. cereus* que apresentaram, simultaneamente, os três genes das toxinas hemolisina BL (HBL) ou enterotoxina não hemolítica (NHE), causadores da síndrome diarréica foi elaborada a TABELA 7.

TABELA 7- NÚMERO DE CULTIVOS QUE APRESENTARAM SIMULTANEAMENTE OS TRÊS GENES COMPONENTES DAS TOXINAS HBL E NHE

Toxina	Genes componentes	Nº (%) de cultivos que apresentaram os três genes simultaneamente
Hemolisina BL (HBL)	<i>hblA</i>	23 (36,5)
	<i>hblC</i>	
	<i>hblD</i>	
Enterotoxina não hemolítica (NHE)	<i>nheA</i>	12 (19,0)
	<i>nheB</i>	
	<i>nheC</i>	

FONTE: O autor (2012)

Através da TABELA 7 observa-se que 23 culturas de *B. cereus* (36,5%) apresentaram os três genes codificantes da toxina HBL e 12 culturas (19%) os genes do complexo NHE.

Os percentuais referentes a detecção dos complexos HBL e NHE foram

menores quando comparados ao trabalho de Chaves, Pires & Vivone (2011) que desenvolveram um estudo com intuito de analisar o perfil genético de *B. cereus* isolados de alimentos obtidos na região sudeste do Brasil ao longo das décadas de 1980 a 2000. Os autores relataram que 84,5% das cepas estudadas apresentavam os três genes NHE e 62,9% possuíam os genes HBL.

Samapundo *et al.* (2011), na Bélgica, avaliaram diferentes alimentos, tais como: macarrão cozido, lasanha, molho bechamel, molho bolonhesa, carne picada, vegetais frescos picados e arroz cru. Os autores descreveram um valor de 84% e 70% de cepas apresentando os três genes componentes das toxinas HBL e NHE respectivamente, sendo a maior incidência do micro-organismo observada no arroz cru seguido dos vegetais frescos picados.

Apesar da menor ocorrência dos complexos HBL e NHE encontrados em nosso trabalho, quando comparado aos demais estudos, não é possível afirmar que haja uma maior inocuidade nos produtos lácteos utilizados neste estudo.

4.2 DETECÇÃO DA TOXINA HBL PELO USO DO KIT BCET-RPLA

Após a detecção dos genes *hblA*, *hblC* e *hblD*, componentes da hemolisina BL, as culturas positivas para os três genes simultaneamente foram submetidas à avaliação da expressão da toxina com o uso do kit diagnóstico BCET-RPLA (*Oxoid*[®]). Das 23 culturas testadas 20 foram positivas pelo teste, gerando um percentual de 87% de cepas efetivamente patogênicas, ou seja, potencialmente capazes de produzir o complexo HBL no alimento.

Em estudo realizado por Santos *et al.*, (2011) foi avaliada a expressão da toxina HBL de *B. cereus* em isolados obtidos de diferentes alimentos no Brasil através do kit BCET-RPLA. Os autores relatam valores de 91% de expressão da toxina nos cultivos isolados de alimentos envolvidos em surtos de origem alimentar. Já nos isolados provenientes de alimentos não associados à ETA o percentual de expressão da toxina foi de 21%. Os autores associam a discrepância dos percentuais de expressão entre os dois grupos analisados à grande variabilidade genética existente entre os diferentes grupos do micro-organismo.

Batchoun, Al-Sha'er & Khabour (2011) também realizaram um estudo referente a caracterização molecular de cepas de *B. cereus* isoladas de diferentes

alimentos comercializados na Jordânia, incluindo leite em pó e iogurte. Ao avaliarem a expressão da HBL das cepas de *B. cereus* isoladas, com o uso do kit BCET-RPLA, os autores encontraram um percentual de 94,7% de cepas, positivas na PCR para os genes do complexo HBL, expressando a toxina. No mesmo trabalho os autores relatam uma alta prevalência de *B. cereus* nas amostras de leite em pó e iogurte analisados (31,8%) e justificam esta ocorrência ao fato de o processo de pasteurização ser insuficiente para eliminar os esporos do micro-organismo que são hidrofóbicos e com capacidade de adesão às superfícies das tubulações das indústrias de laticínios.

Svensson *et al*, (2007) realizaram um estudo com intuito de detectar os genes de patogenicidade e o potencial de produção de toxinas de cepas de *B. cereus* isoladas de diversos pontos da cadeia produtiva de leite (fazendas, silos de armazenamento e laticínios) comparando os resultados obtidos através da PCR com os do kit BCET-RPLA. Os autores relatam uma detecção do gene *hblC* de 51% (entre o número total de cepas utilizadas no estudo) porém, a expressão da toxina observada pelo kit BCET-RPLA foi de 74%. A menor incidência observada pela técnica da PCR é explicada pelos autores como uma deficiência dos *primers* utilizados em detectar polimorfismos entre os diferentes grupos de *B. cereus*.

Desta forma os resultados da PCR não devem ser interpretados separadamente. Eles podem ser usados para identificar cepas BCET-RPLA negativas ou que expressaram a toxina em concentrações inferiores a capacidade de detecção do kit mas que possuem os genes do complexo HBL, sendo estas cepas consideradas também potencialmente patogênicas (SVENSSON *et al*, 2007).

4.3 DETECÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE DE ACORDO COM O PRODUTO DE ORIGEM

Os percentuais de detecção dos genes codificantes das toxinas diarréicas e emética, separados por produto de origem, são mostrados na TABELA 8.

TABELA 8- PERCENTUAIS DE DETECÇÃO DOS GENES DE PATOGENICIDADE DE *B. CEREUS* ISOLADOS DE LEITE PASTEURIZADO, LEITE EM PÓ E LEITE UHT

Produto	N° de cultivos obtidos	% de genes detectados									
		HBL			NHE			Citotoxina K			Cereulida
		<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>
Leite Pasteurizado	36	44,4	69,4	69,4	83,3	33,3	75	80,6	NE*	75	2,8
Leite em Pó	15	66,7	60	60	80	20	93	86,7	NE*	80	6,7
Leite UHT	12	NE*	NE*	NE*	NE*	NE*	91,7	8,3	NE*	NE*	NE*

*NE= Não encontrado
 FONTE: o autor (2012)

O maior número de cultivos de *B. cereus* foi obtido das amostras de leite pasteurizado. Dentre os 36 isolados obtidos do produto 4 foram positivos para todos os genes de patogenicidade causadores da síndrome diarréica, correspondendo a 11,1% dos isolados. Nove cultivos (25%) foram negativos para os genes *hblACD*, 2 (5,6%) não apresentaram nenhum dos genes *nheABC* e apenas um (2,8%) não apresentou nenhum dos genes testados (TABELA 9).

TABELA 9- PERFIL DAS CULTURAS ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO EM RELAÇÃO À PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS COMPLEXOS *HBLACD*, *NHEABC* E DOS GENES *CYTK* E *CYTK-2*

Genes	N° (%)
<i>hblACD</i> negativo	9 (25)
<i>nheABC</i> negativo	2 (5,6)
<i>hblACD</i> , <i>nheABC</i> , <i>cytK</i> e <i>cytK-2</i> negativo	1 (2,8)
<i>hblACD</i> , <i>nheABC</i> , <i>cytK</i> e <i>cytK-2</i> positivo	4 (11,1)

FONTE: O autor (2012)

O Leite Pasteurizado também foi a fonte de uma das culturas positivas para

o gene *ces* encontrado neste trabalho.

O número de culturas de leite pasteurizado que foram positivas para a presença dos três genes codificantes das toxinas hemolisina BL (HBL) ou enterotoxina não hemolítica (NHE), simultaneamente, são mostrados na TABELA 10.

TABELA 10- NÚMERO DE CULTURAS ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO APRESENTANDO SIMULTANEAMENTE OS TRÊS GENES COMPONENTES DAS TOXINAS HBL E NHE

Toxina	Genes componentes	Nº (%) de cepas que possuem os três genes componentes das toxinas
Hemolisina BL (HBL)	<i>hblA</i>	14 (38,9)
	<i>hblC</i>	
	<i>hblD</i>	
Enterotoxina não hemolítica (NHE)	<i>nheA</i>	09 (25)
	<i>nheB</i>	
	<i>nheC</i>	

FONTE: O autor (2012)

Estas 14 culturas possuidoras dos genes HBL foram submetidas a avaliação da expressão da toxina usando o kit diagnóstico BCET-RPLA. Deste total, 13 (92,85%) foram positivas para a análise. Resultados negativos ao teste não implicam diretamente a não expressão da toxina, tal resultado pode ser decorrente a concentrações inferiores a capacidade de detecção do teste (2 ng/ml) (SVENSSON *et al*, 2007).

Em estudo realizado por Zhou *et al.* (2008) foram analisados cultivos de *B. cereus* isolados de leite pasteurizado integral, durante as estações de primavera e outono, comercializados na China. Os percentuais de detecção para os genes de patogenicidade demonstrados pelos autores para a HBL foram: *hblA*: 37%, *hblC*: 66,3% e *hblD*: 71,7%. O percentual de cultivos *hblACD* positivos foi de 33,7% e em 25% dos isolados não foram detectados nenhum dos genes HBL. Com relação a NHE os resultados percentuais foram: *nheA*: 71,7%, *nheB*: 62% e *nheC*: 71,7%. O percentual de isolados *nheABC* positivos foi de 46,7% e 15,2% dos cultivos não possuíam nenhum dos genes NHE. Zhou *et al.* (2008) relatam uma maior incidência de *B. cereus* em leite pasteurizado nas amostras coletadas na primavera (71,4%) do que nas obtidas no outono (33,3%) porém, não atribui tal diferença à variação de temperatura entre as estações, uma vez que em ambas as épocas do ano a

temperatura, na localidade da coleta das amostras, se mantenha semelhante (aprox. 20°C). Os autores acreditam que a menor incidência do micro-organismo no leite pasteurizado durante o outono se deva ao uso de leite em pó para obtenção de leite reconstituído, em regiões mais pobres da China, onde a oferta do produto é menor e os preços de compra do leite são maiores. O leite em pó apresenta menor incidência de *B. cereus* que o leite pasteurizado e os esporos não germinam durante a estocagem, por esse motivo pode-se explicar a diferença entre a presença do micro-organismo no leite pasteurizado entre a primavera e o outono.

Gitahi J *et al.* (2009) também avaliaram a presença dos genes de patogenicidade de *B. cereus* em cultivos obtidos de leite pasteurizado, queijo e arroz comercializados em hipermercados no Quênia. No trabalho citado os percentuais obtidos para os genes de patogenicidade referentes ao leite pasteurizado foram os seguintes: *hblA*: 9,8%, *hblC*: 13,7%, e *hblD*: 11,8% para os genes HBL. Com relação à NHE os valores foram *nheA*: 3,9% *nheB*: 19,6% e *nheC*: 3,9%. O gene codificante da citotoxina K (*CytK*) foi observado em 3,9% dos isolados e não houve detecção do gene codificante da cereulida em nenhum dos cultivos de *B. cereus* testados.

Gitahi J *et al.* (2009) relatam a diferença das distribuições dos genes de patogenicidade entre os diferentes produtos avaliados. O gene *cytK* foi detectado tanto em cultivos oriundos de leite pasteurizado como nos provenientes de arroz, porém nos isolados obtidos em queijo não houve detecção do gene. Da mesma maneira o gene codificante da cereulida foi observado nos cultivos isolados de arroz enquanto que nos obtidos de leite e queijo não houve a presença do mesmo. Segundo os autores tais variações indicam que o tipo de alimento influencia na distribuição das cepas toxigênicas de *B. cereus*.

O Leite em Pó foi o segundo produto com maior número de cultivos de *B. cereus*, porém nele foi observado o maior número de culturas possuindo todos os genes responsáveis pela síndrome diarréica com 3 (20%) culturas apresentando esta característica. Ao todo 5 culturas (33,3%) foram negativas para a presença dos genes *hblACD* e todas apresentaram pelo menos um dos genes *nheABC* (TABELA 11).

TABELA 11- PERFIL DAS CULTURAS ISOLADAS DE LEITE EM PÓ EM RELAÇÃO À PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS COMPLEXOS *HBLACD*, *NHEABC* E DOS GENES *CYTK* E *CYTK-2*

Genes	N°(%)
<i>hblACD</i> negativo	5 (33,3)
<i>nheABC</i> negativo	0
<i>hblACD</i> , <i>nheABC</i> , <i>cytK</i> e <i>cytK-2</i> negativo	0
<i>hblACD</i> , <i>nheABC</i> , <i>cytK</i> e <i>cytK-2</i> positivo	3 (20)

FONTE: O autor (2012)

O Leite em Pó também foi a fonte de uma das culturas positivas para o gene *ces* isolado neste trabalho.

Os resultados para as culturas de Leite em Pó positivas para a presença dos componentes da HBL e da NHE são descritos na TABELA 12.

TABELA 12- NÚMERO DE CULTURAS ISOLADAS DE LEITE EM PÓ APRESENTANDO SIMULTANEAMENTE OS TRÊS GENES COMPONENTES DAS TOXINAS HBL E NHE

Toxina	Genes componentes	Nº (%) de cepas que possuem os três genes componentes das toxinas
Hemolisina BL (HBL)	<i>hblA</i>	09 (60)
	<i>hblC</i>	
	<i>hblD</i>	
Enterotoxina não hemolítica (NHE)	<i>nheA</i>	03 (20)
	<i>nheB</i>	
	<i>nheC</i>	

FONTE: O autor (2012)

Dentre as 9 culturas positivas para os genes HBL oito (88,9%) expressaram a toxina através do kit diagnóstico BCET-RPLA.

Epidemiologicamente casos de ETA associadas a Leite em Pó são bastante raros. Todavia, tal produto é comumente utilizado em formulações para alimentação infantil, sendo que este grupo apresenta um maior risco de infecção por *B. cereus* que as demais faixas etárias (BECKER *et al*, 1994).

Produtos desidratados, como o leite em pó, contaminados com *B. cereus* podem ser potenciais veículos transmissores de ETA. Estes produtos possuem altos teores de carboidratos (lactose, amido, sucrose) e minerais que podem promover a multiplicação bacteriana quando reconstituídos e mantidos sob temperatura ambiente (REYS *et al*, 2007).

A prevalência de *B. cereus* em leite em pó varia de 10 a 100% chegando a atingir níveis de 0,3 a 10^3 células ou esporo/g⁻¹ (REYS *et al*, 2007).

Geralmente o leite em pó se torna contaminado por *B. cereus* através do leite cru contendo o micro-organismo, mesmo que em baixas quantidades. A fonte de contaminação do leite cru são esporos provenientes do solo, esterco, cama dos animais, feno e também superfícies contaminadas dos equipamentos de ordenha. Os esporos presentes nos equipamentos de ordenha são de germinação lenta, já os esporos presentes nas outras fontes citadas são de germinação rápida. Os esporos de germinação rápida são ativados no leite dentro de 24 horas a 20°C após tratamento “*High Temperature Short Time*” (HTST) a 72°-75°C durante 15-20 segundos, enquanto que os esporos de germinação lenta o farão após tratamento térmico de 80°C durante 10 minutos. Como se pode observar ambos os tipos de esporos apresentam comportamentos térmicos distintos, sendo que os de germinação lenta são mais termorresistentes que os de germinação rápida. Como os dois tipos de esporo são encontrados no leite cru é visível a importância que os equipamentos de ordenha desempenham na qualidade do leite (BECKER *et al*, 1994).

A taxa de eliminação de *B. cereus* pelo tratamento térmico inicialmente aplicado ao leite dependerá da temperatura utilizada no produto. Como mencionado, esporos de germinação rápida são termolábeis sendo parcialmente destruídos quando submetido a altas temperaturas, por outro lado estas temperaturas induzem a ativação dos esporos de germinação lenta. Por esse motivo para a total eliminação do micro-organismo temperaturas de 125°C aplicadas por 10 a 20 segundos são preconizadas (BECKER *et al*, 1994).

Ainda é incerto o motivo pelo qual ETAs envolvendo *B. cereus* em leite em pó são tão raras apesar do micro-organismo ser frequentemente isolado neste tipo de alimento (REYS *et al*, 2007).

Pelo Leite UHT obteve-se o menor número de isolados de *B. cereus* entre os produtos avaliados neste trabalho. Também foi observada uma baixa presença

dos genes de patogenicidade, sendo apenas detectado os genes *nheC* e *cytK* entre as 12 culturas isoladas do produto. Não houve detecção dos genes *hblACD* e por esse motivo não são demonstrados dados referentes a expressão da hemolisina BL.

Apesar da baixa frequência dos genes patogênicos observada no leite UHT houve uma detecção do gene *nheC* em 91,7% das culturas corroborando a hipótese de que a toxina NHE é a mais amplamente distribuída entre *B. cereus* (ARNESEN, FAGERLUND & GRANUM, 2008).

Os dados aqui apresentados evidenciam a importância de *B. cereus* em leite e nos produtos lácteos. Apesar dos cultivos utilizados neste trabalho terem apresentando, de forma geral, uma menor frequência dos genes de patogenicidade, em relação a outras investigações similares feitas por outros pesquisadores, não é possível afirmar que exista uma melhor qualidade dos produtos ou uma menor presença do micro-organismo no ambiente e nas indústrias.

O grupo *Bacillus cereus* é conhecido por sua alta variabilidade genética e polimorfismos entre as cepas, de tal maneira que resultados negativos para a detecção de um determinado gene pode não representar, com certeza, a ausência do mesmo. Sendo assim, o uso de kits diagnóstico para a detecção das toxinas de *B. cereus* atua como uma ferramenta complementar de análise. Associado aos métodos moleculares os imunoenaios previnem a ocorrência de resultados falso negativos nos casos em que a sensibilidade da técnica não é suficiente para a detecção dos genes de patogenicidade.

5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho evidenciam que os genes de patogenicidade de *B. cereus* estão amplamente distribuídos entre os grupos do micro-organismo que contamina o leite fluido e seus produtos derivados. Assim sendo, fica clara a necessidade de medidas de controle mais efetivas, tanto nas indústrias como no campo, visto o risco potencial de ETAs associadas ao consumo destes produtos.

Observou-se que os genes codificantes das toxinas diarréicas são frequentes nos produtos lácteos, sendo os genes codificantes da enterotoxina não hemolítica (NHE) os mais comuns.

A forma CytK-1 da Citotoxina K não foi detectada em nenhum dos cultivos testados. Também se observou que o grupo causador da síndrome emética é pouco encontrado no leite e seus derivados.

Os cultivos de *B. cereus* utilizados neste trabalho apresentaram uma alta atividade de produção da hemolisina BL, confirmada pela elevada taxa de detecção da toxina entre os isolados testados. Tal fato demonstra que existe um risco real de transmissão da síndrome diarréica através do consumo de leite pasteurizado ou leite em pó no Brasil.

Fica evidente a necessidade do estudo continuado de *B. cereus* para que se possa aumentar a inocuidade dos produtos lácteos comercializados no Brasil e também para que seja possível elucidar as lacunas existentes com relação a biologia e patogenicidade do micro-organismo.

REFERÊNCIAS

- AGATA, N; OHTA, M; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International Journal of Food Microbiology**. v.73 (23 – 27), 2002.
- ANDERSSON, M.A; JAASKELAINEN, E.L; SHAHEEN, R; PIRHONEN, T; WIJNANDS, L.M; SALKINOJA-SALONEN, S.M. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94 (175– 183), 2004.
- ARAGON-ALEGRO, L.C; PALCICH, C; LOPES, G.V; RIBEIRO, V.B; LANDGRAF, M; DESTRO, M.T. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. **Journal of Food Protection**. v. 71, n.10 (2115-2118), 2008.
- ARNESEN, L.P.S; FAGERLUND, A. GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiol Rev**. 32 (579-606), 2008.
- BANYKÓ, J; VYLETELOVÁ, M. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. **Letters in Applied Microbiology**. 48 (318-323), 2009.
- BARTOSZEWICZ, M; HANSEN, B.M; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**. v.25 (588–596), 2008.
- BATCHOU, R; AL-SHA'ER, A.I; KHABOUR, O.F. Molecular Characterization of *Bacillus cereus* Toxigenic Strains Isolated from Different Food Matrices in Jordan. **Foodborne Pathogens and Disease**. V.11- N.8 (1153-1158), 2011.
- BECKER, H; SCHALLER, G; VON WIESE, W; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**. v.23 (1-15), 1994.
- BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In BHUNIA, A.K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**. West Lafayette, Springer, 2008.
- BRASIL. Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 jan. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 – 2009**. Relatório, 2009.

CARLIN, F; BRILLARD, J; BROUSOLE, V; CLAVEL, T; DUPORT, C; JOBIN, M; GUINEBRETIERE, M.H; AUGER, S; SOROKINE, A; NGUYEN-THE, C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Research International**. v.43 (1885-1894), 2010.

CARLIN, F; FRICKER, M; PIELAAT, A; HEISTERKAMP, S; SHAHEEN, R; SALONEN, M. S; SVENSSON, B; NGUYEN-THÉ, C; EHLING-SHULZ, M. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**. v.109 (132-138), 2006.

CHAVES, J.Q; PIRES, E.S; VIVONI, A.M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology**. v.147 (12-16), 2011.

CHITOV, T; DISPAN, R; KASINRERK, W. Incidence and diarrhegenic potential of *Bacillus cereus* in pasteurized milk and cereal products in Thailand. **Journal of Food Safety**. v.28 (467-481), 2008.

CHOMA, C; GRANUM, P.E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **FEMS- Microbiology Letters**. 217 (115-119), 2002.

DIDELOT, X; BARKER, M; FALUSH, D; PRIEST, F, G. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. **Systematic and Applied Microbiology**. 32 (81-90), 2009.

EHLING-SCHULZ, M; FRICKER, M; SCHERER, S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. **FEMS-Microbiology Letters**. 232 (189-195), 2004.

ERLICH, H.A; GELFAND, D; SNINSKY, J.J. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. **Science**. 252 (1643- 1651), 1991.

FAGERLUND, A; LINDBÄCK, T; GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. **BMC Microbiology**. 10:304 (1-8), 2010.

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

FENG, P. Impact of Molecular Biology on the Detection of Foodborne Pathogens. **Molecular Biology**. 7 (267-278), 1997.

GILBERT, R.J; KRANER, J.M. *Bacillus cereus* food poisoning in progress. In:CLIVER, D.O; COCKRANE, B.A. **Food Safety**. Food Research Institute-University of Winsconsin. (85-93), 1986.

GITAH J, N; OMBUI, J.N; NDUATI, D.W; GICHERU, M.M. Genetic characterization of food borne *Bacillus cereus* strains from milk, cheese and rice by multiplex PCR

assay. **International Journal of Integrative Biology**. V.5-N.2 (82-86), 2009.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: FRATAMICO, P.M; BHUNIA, A.K; SMITH, J.L. **Foodborne Pathogens – Microbiology and Molecular Biology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2005.

GUINEBRETIERE, M.H; BROUSSOLLE, V; NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic Profiles of Food-Borne *Bacillus cereus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.40 N 8 (3053-3056), 2002.

GUINEBRETIERE, M.H; FAGERLUND, A; GRANUM, P.E; NGUYEN-THE, C. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. **FEMS- Microbiology Letters**. 259 (74-80), 2006.

HENDRIKSEN, N.B; HANSEN, B.M; JOHANSEN, J.E. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie van Leeuwenhoek**. 89 (239 –249), 2006.

HOORNSTRA, D; ANDERSSON, M.A; MIKKOLA, R; SALKINOJA-SALOMEN; M.S. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. **Toxicology in Vitro**. 17 (745-751), 2003.

JÄÄSKELÄINEN, E; HAGGBLOM, M.M; ANDERSON, M.A; VANNE, L; SALKINOJA-SALOMEN, M.S. Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products: quantitative analysis by chemical and biological methods. **Journal of Food Protection**. 66 (1047-1054), 2003.

JÄÄSKELÄINEN, E. Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food. **Department of Applied Chemistry and Microbiology - Division Microbiology, Helsinki, University of Helsinki**: 74, 2008.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**. 2 (189-198), 2000.

LINDBACK, T; GRANUM, P.E. Detection and Purification of *Bacillus cereus* Enterotoxins. In: ADLEY, C.C. **Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols**. Totawa, Humana Press, 2006.

LINDBÄCK, T., FAGERLUND, A., RØDLAND, M. S., GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. **Microbiology**. 150 (3959-3967), 2004.

LUND T., DE BUYSER M.L., GRANUM, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**. 38 (254 –261), 2000.

MAGNUSSON, M; BERTILSSON, J; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of Dairy Science**. 90 (2745-2754), 2007.

MAHLER, H; PASI, A; KRAMER, J.M; SCHULTE, P; SCOGING, A.C; BÄR, W; KRÄHENBUL, S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **The New England Journal of Medicine**, Vol 336 N 16 (1142-1148), 1997.

MARTÍNEZ-BLANCH, J.F; SÁNCHEZ, G; AZNAR, R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **International Journal of Food Microbiology**. 135 (15–21), 2009.

MIRANDA, R.R; MONTANHINI, M.T.M; BOREIKO, S; BITTENCOURT, J.V.M. **Avaliação de protocolos de extração de DNA genômico de bactérias de interesse em alimentos**. Trabalho apresentado no V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, Salvador, 2011.

MOLVA, C; SUDAGIDAN, M; OKUKLU, B. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. **Food Control**. 20 (829–834), 2009.

OXOID MICROBIOLOGY PRODUCTS. **BCET-RAPLA CÓDIGO: TD0950A**. Reino Unido, 2003. Manual de Instruções.

PIRTTIJÄRVI, T.S.M, ANDERSSON, M.A; SCOGING, A.C; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Evaluation of Methods for Recognizing Strains of the *Bacillus cereus* Group with Food Poisoning Potential Among Industrial and Environmental Contaminants. **Systematic and Applied Microbiology**. v.22 (133-144), 1999.

RAJKOWSKI, K.T; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*. In: MILIOTIS, M.D; BIER, J.W. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Nova York: Marcel Dekker, 2003.

RASKO, D.A; ALTHERR, M.R; HAN, C.S; RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS-Microbiology Reviews**. 29 (303–329), 2005.

RATHER, M.A; AULAKH, R.S; GILL, J.P.S; VERMA, R; RAO,T.S. Enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Indian Journal of Animal Sciences**. v.81, n.05 (448-452), 2011.

REYS, J.E; BASTÍAS, J.M; GUTIÉRREZ, M.R; RODRÍGUEZ, M.O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. **Food Microbiology**. v.24 (1–6), 2007.

SALUSTIANO, V.C; ANDRADE, N.J; SOARES, N.F.F; LIMA, J.C; BERNARDES, P.C; LUIZ, L.M.P; FERNANDES, P.E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**. v.20 (439-442), 2009.

SAMAPUNDO, S; HEYNDRIKX, M; XHAFERI, R; DEVLIEGHERE, F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**.

v.150 (34-41), 2011.

SANTOS, C.A; ALMEIDA, F.S; GUIMARÃES, A.G; ABRAHÃO, W.M; ARANTES, O.M.N; VILAS-BOAS, G.T. RE-PCR variability and toxigenic profile of food poisoning, foodborne and soil-associated *Bacillus cereus* isolates from Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 151 (277-283), 2011.

SHAHEEN, R; SVENSSON, B; ANDERSSON, M.A ANDERS; CHRISTIANSSON, A; SALKINOJA-SALONEN, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiology**. V.27 (347-355), 2010.

SIMÕES, M; SIMÕES, L.C; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology** 43 (573–583), 2010.

SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., MACHADO, I., PEREIRA, M. O., VIEIRA, M. J. CONTROL OF FLOW-GENERATED BIOFILMS USING SURFACTANTS – Evidence of Resistance and Recovery. **Food and Bioproducts Processing**, 84 (338–345), 2006.

SVENSSON, B; MONTHÁN, A; GUINEBRETIERE, M.H; NGUYEN-THE, C; CHRISTIANSSON, A. Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. **International Dairy Journal**. 17 (1201-1208), 2007.

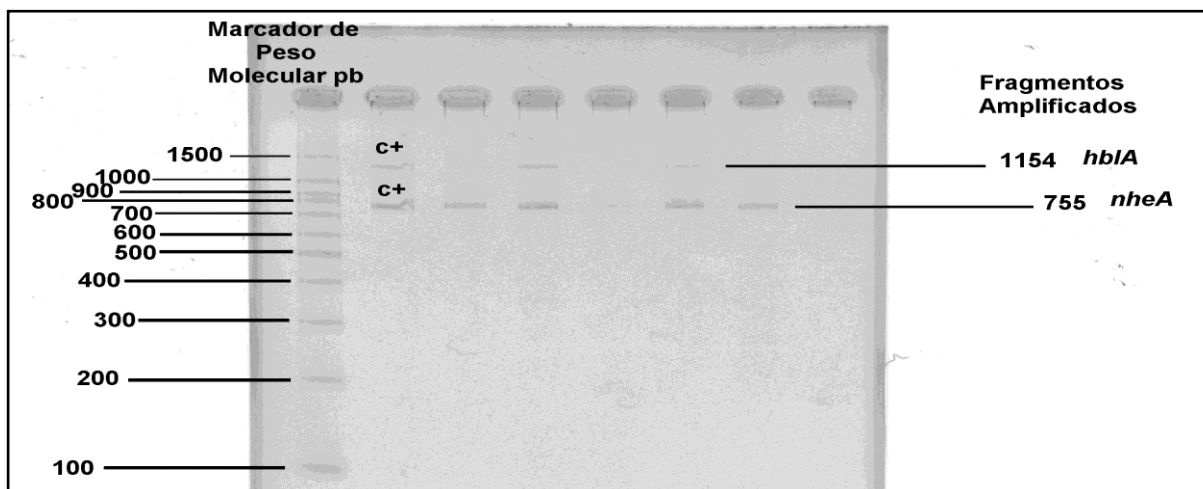
SVENSSON, B; MONTHÁN, A; SHAHEEN, R; ANDERSSON, M.A; SALKINOJA-SALONEN, M; CHRISTIANSSON, A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. **International Dairy Journal**. 16 (740-749), 2006.

Te GIFFEL, M.C; BEUMER, R.R, GRANUM, P.E; ROMBOUTS, F.M. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**. V. 34 (307-318), 1997.

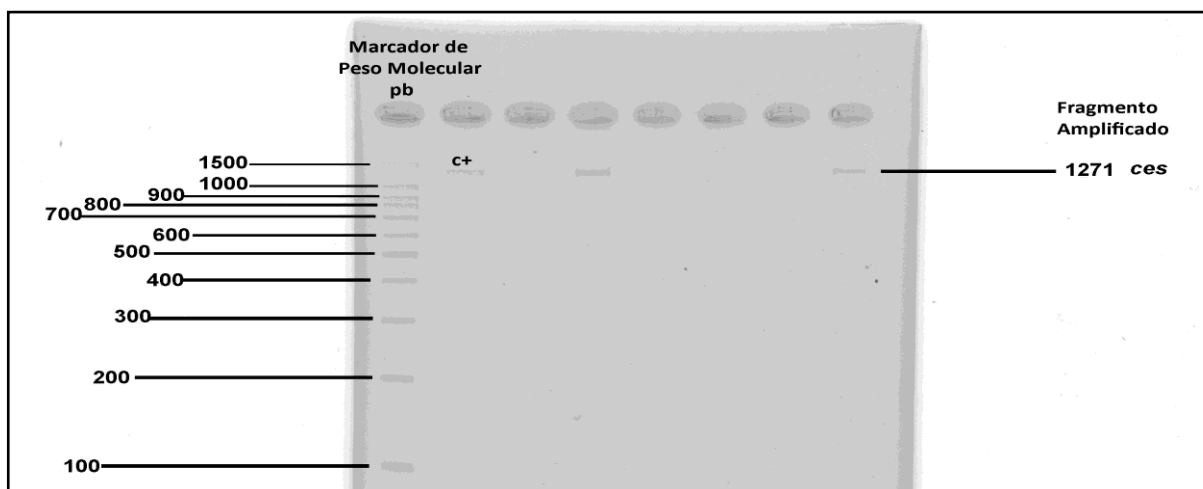
WIJNANDS, L.M; DUFRENNE, J.B; van LEUSDEN, F.M. Characterization of *Bacillus cereus*. **National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)**. Report 250922002/2002, 2002.

ZHOU, G; LIU, H; HE, J; YUAN, Y; YUAN, Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. **International Journal of Food Microbiology**. 121 (195-200), 2008.

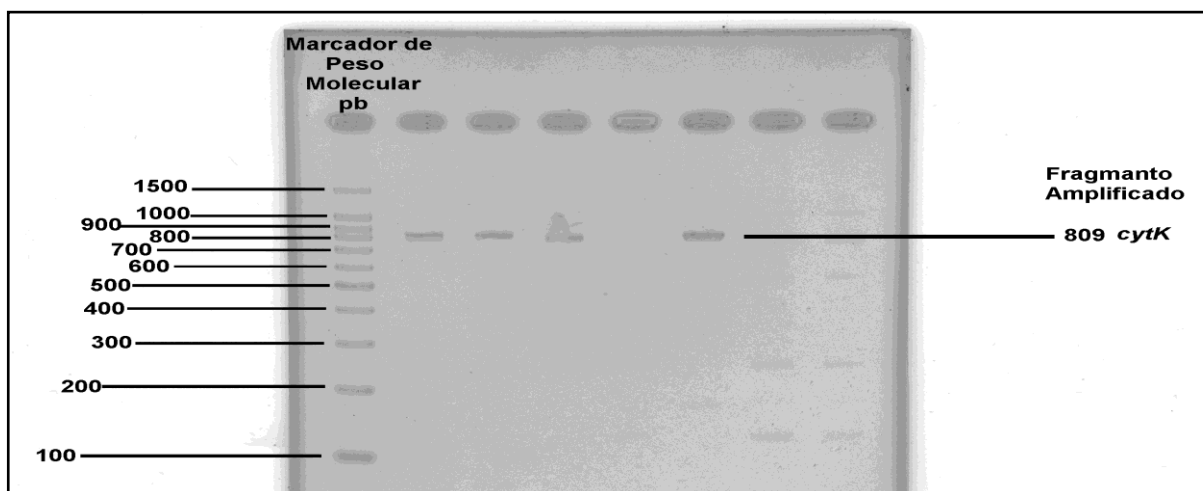
ANEXO



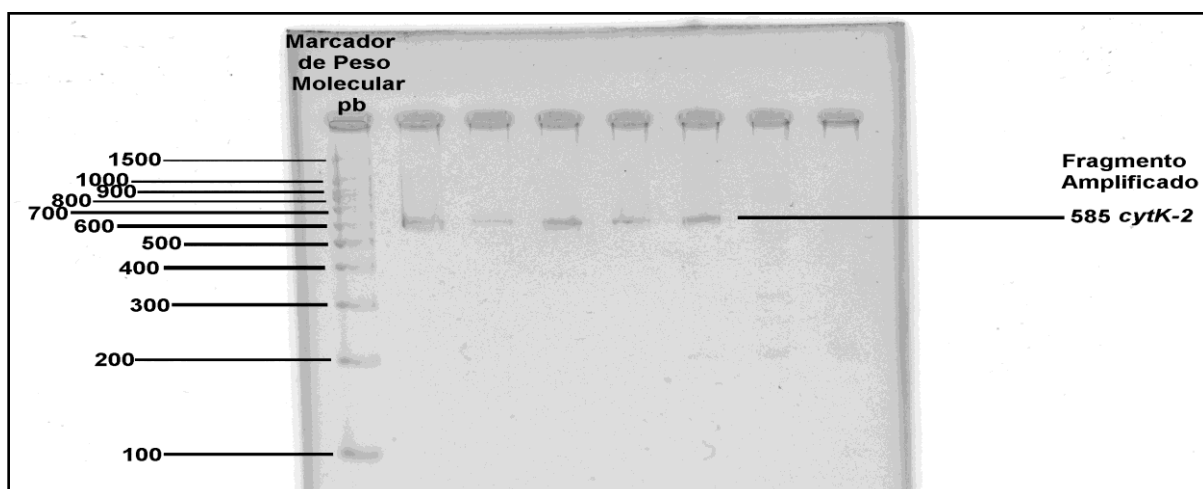
Gel de agarose 1,5% pós PCR duplex para detecção dos genes *hblA* e *nheA*.



Gel de agarose 1,5% pós PCR simplex para detecção do gene *ces*.



Gel de agarose 1,5% pós PCR simplex para detecção do gene *cytK*.



Gel de agarose 1,5% pós PCR simplex para detecção do gene *cytK-2*

RESULTADOS DA PCR

(+) POSITIVO (-) NEGATIVO

Leite Pasteurizado (TOTAL= 36 CULTIVOS)

Amostra	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>
56	-	+	+	-	-	-	+	+	-
58	+	+	+	+	+	+	+	+	-
59	+	+	+	+	+	+	+	+	-
60	+	+	+	+	-	-	+	+	-
61	+	+	+	+	-	+	+	+	-
62	-	-	-	-	-	+	+	+	-
63	+	+	+	-	-	+	-	-	-
64	+	-	-	+	+	-	+	+	-
65	+	+	+	+	-	+	+	+	-
66	+	+	+	+	+	+	+	+	-
68	+	+	+	+	+	+	+	+	-
70	+	+	+	+	-	+	+	+	-
71	+	+	+	+	-	+	+	+	-
73	-	-	-	+	-	+	+	-	-
74	+	+	+	+	-	+	+	-	-
75	+	+	+	+	-	+	+	-	-
76	-	+	+	+	+	+	+	+	-
77	-	+	+	+	-	-	-	-	-
79	-	+	+	+	-	+	+	+	-
80	-	+	+	-	-	+	-	-	-
82	+	+	+	+	-	-	+	+	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	+	-	+	+	+	-
85	-	+	+	+	-	+	-	-	-
86	-	-	-	+	-	+	-	-	-
87	-	-	-	-	+	+	+	+	-
88	-	-	-	+	+	+	+	+	-
89	-	+	+	+	-	+	+	+	-
90	-	+	+	+	+	+	+	+	-
91	-	+	+	+	+	+	+	+	-
92	-	+	+	+	-	+	+	+	-
93	-	+	+	+	-	+	+	+	-
94	-	-	-	+	-	-	-	+	-
95	+	+	+	+	-	-	+	+	-
96	+	-	-	+	+	+	+	+	-
97	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Total +	16	25	25	30	12	27	29	27	1
(%)	44,44%	69,44%	69,44%	83,33%	33,33%	75,00%	80,55%	75,00%	2,78%

Leite em Pó (TOTAL= 15 CULTIVOS)

Amostra	<i>hbIA</i>	<i>hbIC</i>	<i>hbID</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-	+	+	+	-
7	-	-	-	+	-	-	+	+	-
8	+	+	+	+	-	+	+	+	-
10	-	-	-	-	-	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	+	-	-	-
12	-	-	-	-	-	+	+	+	-
13	+	-	-	+	-	+	+	+	-
28	+	+	+	+	-	+	+	+	-
41	+	+	+	+	-	+	-	-	-
46	+	+	+	+	+	+	+	+	-
47	+	+	+	+	-	+	+	-	-
52	-	-	-	+	-	+	+	+	-
53	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Total +	10	9	9	12	3	14	13	12	1
(%)	66,66%	60,00%	60,00%	80,00%	20,00%	93,33%	86,66%	80,00%	6,66%

Leite UHT (TOTAL= 12 CULTIVOS)

Amostra	<i>hbIA</i>	<i>hbIC</i>	<i>hbID</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>
16	-	-	-	-	-	+	-	-	-
21	-	-	-	-	-	+	-	-	-
26	-	-	-	-	-	+	-	-	-
27	-	-	-	-	-	+	-	-	-
30	-	-	-	-	-	+	-	-	-
31	-	-	-	-	-	+	-	-	-
36	-	-	-	-	-	+	-	-	-
37	-	-	-	-	-	+	-	-	-
42	-	-	-	-	-	+	-	-	-
43	-	-	-	-	-	+	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	+	-	-
54	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Total +	NE	NE	NE	NE	NE	11	1	NE	NE
(%)	0	0	0	0	0	91,66%	8,33%	0	0