

JORGE MARIO OLIVAR BARRETO

OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM PRODUTOS LÁCTEOS
COMERCIALIZADOS NA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA, MINAS GERAIS,
DETERMINAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E PRODUÇÃO DE TOXINAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48o
2016

Olivar Barreto, Jorge Mario, 1982-
Ocorrência de *Bacillus cereus* em produtos lácteos
comercializados na microrregião de Viçosa, Minas Gerais,
determinação de genes de virulência e produção de toxina /
Jorge Mario Olivar Barreto. - Viçosa, MG, 2016.
xii, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Nélio José de Andrade.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.37-44.

1. *Bacillus cereus* - Toxinas. 2. *Bacillus cereus*
- Virulência. 3. Derivados de leite - Microbiologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

JORGE MARIO OLIVAR BARRETO

OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM PRODUTOS LÁCTEOS
COMERCIALIZADOS NA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA, MINAS GERAIS,
DETERMINAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E PRODUÇÃO DE TOXINAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2016.

Ana Clarissa dos Santos Pires
(Coorientadora)

Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)

Patrícia Érica Fernandes

Ítalo Tuler Perrone

Nélio José de Andrade
(Orientador)

Dedico esta tese à minha família e a
minha namorada e companheira de vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ramiro Olivar e Beatriz Barreto, pela vida e amor, e pela paciência.

A minha namorada Adriana por estar sempre ao meu lado, por todo o amor, carinho, paciência e apoio incondicional.

Ao meu orientador, Nélio José de Andrade, pela paciência e amizade, por seu carinho, orientação e conhecimento.

Aos meus Coorientadores, Ana Clarissa dos Santos e Antônio Fernandes de Carvalho, por seu conhecimento e disposição em ajudar.

Ao professor Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo, pela amizade, por permitir-me usar seu laboratório para fazer as análises de biologia molecular.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV, ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos que permitiu a realização deste doutorado.

Aos colegas que conheci em Viçosa, pelo carinho recebido, e por suas colaborações na realização deste trabalho, em especial Nayara Matiko, Patrícia Fernandes, Roberta Teodoro, João Sá, Evelin Rose e Hiasmyne Medeiros.

Às secretarias do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Geralda e Polyana, por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos .

BIOGRAFIA

Jorge Mario Olivar Barreto, filho de Ramiro Olivar Garcia e Beatriz Barreto Gomez, nasceu em Libano, Estado do Tolima, Colômbia, em 7 de abril de 1982.

Em dezembro de 2008, graduou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade do Tolima – UT, Ibagué, Colômbia.

Em agosto de 2009, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Viçosa – UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2012.

Em março de 2012, iniciou o Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	2
2.2. Objetivo Específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. <i>Bacillus cereus</i>	5
3.2. Patogenicidade <i>Bacillus cereus</i>	6
3.2.1. Síndrome diarreica	7
3.2.2. Síndrome emética	8
3.3. Resistência térmica do <i>Bacillus cereus</i>	9
3.4. Isolamento e identificação de <i>Bacillus cereus</i> em alimentos.....	9
4. MATERIAS E METODOS	12
4.1. Coleta de amostras de produtos lácteos	12
4.2. Isolamento e Enumeração de <i>Bacillus cereus</i> em produtos lácteos	12
4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	13
4.3.1. Identificação Fenotípica	13
4.3.2. Motilidade e redução de nitrato.....	13
4.3.3. Fermentação anaeróbica de glicose	13
4.3.4. Decomposição da tirosina.....	14
4.3.5. Crescimento rizoide	14
4.4. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA.....	14
4.4.1. Extração de DNA	14
4.4.2. Confirmação genética usando gene <i>16S</i>	15
4.5. Detecção dos genes <i>nhe</i> , <i>hbl</i> , e <i>cytK</i>	16
4.6. Avaliação de produção de enterotoxinas.....	17
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	17
5.1. Isolamento.....	17
5.2. Presença de <i>Bacillus cereus</i> nos produtos lácteos analisados.....	19
5.3. Identificação genética.....	23
5.4. Amplificação dos genes de virulência.....	27

5.5. Determinação de produção das toxinas produtoras de síndrome diarreica.....	32
5.5.1. Comparação das sequências de proteínas obtidas a partir de tradução de sequências de ácidos nucleicos.....	32
5.5.2. Produção de enterotoxinas in vitro.....	34
6. CONCLUSÃO.....	36
7. BIBLIOGRAFIA.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de fabricação dos produtos analisado.....	18
Figura 2: Ocorrência de <i>Bacillus cereus</i> nos diferentes produtos lácteos analisados..	20
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a <i>PCR</i> do gene <i>16S</i>	23
Figura 4: Comparação de sequências de DNA do gene <i>16S</i> de um isolado de cada um dos produtos lácteos analisados com a sequência da estirpe <i>Bacillus cereus</i> KAVK4.	26
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a <i>PCR</i> do gene <i>nhe</i>	28
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a <i>PCR</i> do gene <i>hbl</i>	28
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a <i>PCR</i> do gene <i>cytk</i>	29
Figura 8: Alinhamento da sequência de proteínas da toxina <i>nhe</i> , traduzida a partir de DNA isolado de <i>Bacillus cereus</i> presente em vários produtos analisados.....	33
Figura 9: Alinhamento da sequência de proteínas da toxina <i>hbl</i> , traduzida a partir de DNA isolado de <i>Bacillus cereus</i> presente em vários produtos analisados.....	33
Figura 10: Alinhamento da sequência de proteínas da toxina <i>cytk</i> , traduzida a partir de DNA isolado de <i>Bacillus cereus</i> presente em vários produtos analisados.....	34
Figura 11: Determinação da produção das enterotoxinas, hemolisina BL e enterotoxina não hemolítica <i>nhe</i> , utilizando o kit <i>GLISA Duopath® Cereus Enterotoxins</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados neste estudo.....	16
Tabela 2: Perfil genético dos isolados presentes em cada um dos diferentes produtos lácteos analisados	24
Tabela 3: Perfis genéticos para os genes produtores de enterotoxina diarréica nos 69 isolados analisados.	29
Tabela 4: Similaridade genética dos genes produtores de enterotoxinas amplificados na <i>PCR</i> comparados às sequências disponíveis no GenBank.....	30
Tabela 5: Ocorrência dos genes produtores de enterotoxinas dos isolados analisados em cada produto.	31

RESUMO

BARRETO OLIVAR, Jorge Mario. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro, 2016. OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* EM PRODUTOS LÁCTEOS COMERCIALIZADOS NA MICRORREGIÃO DA CIDADE DE VIÇOSA, MINAS GERAIS, DETERMINAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E PRODUÇÃO DE TOXINAS. Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Antônio Fernandes de Carvalho.

O leite e os produtos lácteos podem se contaminar com *Bacillus cereus*, um micro-organismo que dependendo do número, da estirpe e das condições de processamento e comercialização, além de produzir lipases e proteases causadoras de *off-flavor* nos produtos, está associado a duas síndromes distintas que atingem os humanos: uma de natureza diarreica causada pela toxinas não hemolítica *nhe*, hemolítica *hbl* e citotoxina *cytk* e outra emética, causada pela toxina denominada de cereulide ces. Avaliou-se a presença de *B. cereus* no leite pasteurizado, leite em pó, leite UHT, queijo ricota e sobremesas lácteas, bebidas lácteas e leite achocolatado comercializados nos supermercados da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. Também, determinou-se a presença de fatores de virulência de *B. cereus* nos isolados e avaliou-se a produção de enterotoxina diarreica. A ocorrência de *B. cereus* em diferentes produtos lácteos foi avaliada utilizando métodos quantitativo e qualitativo. Das 129 amostras analisadas, foi observada a presença de *B. cereus* em 69 (53,4%) considerando ambos os métodos. As contagens do micro-organismo variaram de 1,30 log UFC/mL no leite pasteurizado até 5,32 log UFC/g na ricota. A presença do *B. cereus* foi detectada no leite UHT apenas no teste qualitativo. Os 69 isolados que apresentaram características fenotípicas de *B. cereus* foram confirmados como sendo dessa espécie pela técnica de PCR para o gene *16S*, e foram classificados como pertencentes a três estirpes diferentes (*B. cereus* KAVK4, *B. cereus* SVK1 e *B. cereus* ATCC 4342), sendo predominante em todos os produtos analisados a estirpe *B. cereus* KAVK4. Dos 69 isolados analisados para a presença de genes produtores de enterotoxinas, 68 (98 %) apresentaram o gene *nhe*. Este gene foi expresso nos 68 isolados com a produção de pelo menos 6 ng/mL da *nhe*, limite mínimo de detecção desta toxina na metodologia utilizada. Dos 69 isolados confirmados como *B. cereus*, 40 (57 %) apresentam a amplificação do

gene *hbl*, em 30 (75 %) destes constatou-se a produção de pelo menos 20 ng/mL da toxina *hbl*, limite de detecção do kit utilizado. A presença do gene *cytk* foi verificada nos 69 isolados analisados. A ocorrência de pelo menos um gene produtor de enterotoxina foi constatada em todos isolados, o que indicaria um alto potencial patogênico das estirpes presentes nos produtos lácteos.

ABSTRACT

BARRETO OLIVAR , Jorge Mario . D. Sc., Universidade Federal de Viçosa February, 2016. THE OCCURRENCE OF *Bacillus cereus* IN DAIRY PRODUCTS MARKETED IN THE MICROREGION VICOSA CITY, MINAS GERAIS, BRAZIL, DETERMINATION OF VIRULENCE GENES AND PRODUCTION OF TOXINS. Advisor: Nelio José de Andrade. Co-Advisors: Ana Clarissa dos Santos Pires and Antonio Fernandes de Carvalho

Milk and dairy products may be contaminated with *Bacillus cereus*, a micro-organism that depending on the number, of the strain and of the processing and marketing conditions can produce lipases and proteases that cause off-flavor in dairy product and it is associated with two distinct syndromes that affect humans: one diarrhea caused by toxins, not hemolytic *nhe*, hemolytic *hbl* and cytotoxin k *cytk* and another emetic caused by toxin, called cereulide. The aim of this study was to evaluate the presence of *B. cereus* in milk products marketed in the supermarkets of Viçosa city, Minas Gerais, Brazil. Also, it was determined the presence of virulence factors of *B. cereus* isolates and it was evaluated the diarrheal enterotoxin production. The occurrence of *B. cereus* in different dairy products was evaluated using quantitative and qualitative methods. Of the 129 samples analyzed, it was observed the presence of *B. cereus* in 69 (53.4%) considering both methods. The microorganism counts vary from 1.30 log UFC/ml in milk pasteurized up to 5.32 log UFC/g in the ricotta. The presence of *B. cereus* was detected in the UHT milk only in qualitative testing. The 69 isolates with phenotypic characteristics of *B. cereus* were confirmed as this species by PCR for gene *16S*, and they were classified as belonging to three different strains (*B. cereus* KAVK4, *B. cereus* SVK1 and *B. cereus* ATCC 4342), being predominant in all the products analyzed strain *B. cereus* KAVK4. From the 69 isolates analyzed for the presence of enterotoxin producing genes, 68 (98%) had the *nhe* gene. This gene was expressed in the 68 isolates with the production of at least 6 ng / ml of *nhe*, minimum detection limit of the methodology of this toxin. From the 69 isolates confirmed as *B. cereus*, 40 (57%) showed the amplification of the gene *hbl*, 30 (75%) of them it was found containing at least 20 ng / mL of the *hbl* toxin, according kit detection limit .The presence of *cytk* gene was found in 69 isolates analyzed. The occurrence of at least one enterotoxin producing gene was found in all

isolates, which would indicate a high potential pathogenic strains present in dairy products.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção leiteira ainda apresenta obstáculos na cadeia produtiva, especialmente em relação às condições higiênico-sanitárias, que comprometem a qualidade final do produto,

O estudo de micro-organismos deterioradores em produtos lácteos é de extrema importância para a qualidade e segurança desses alimentos. Por exemplo, *Bacillus cereus* é um dos principais micro-organismos deterioradores do leite processado causando *off-flavors* e defeitos no produto devido à atividade de proteases, lipases e fosfolipases.

A contaminação do leite por *B. cereus* presente no ambiente de processamento é muito comum, sendo influenciada por fatores externos, como a saúde dos animais, a higiene do ambientes onde os animais são ordenhados e alojados, os métodos de preparo da úbere e técnica de ordenha, métodos de limpeza e higienização de equipamentos e tanques de estocagem, a velocidade de resfriamento do leite para uma temperatura apropriada e tempo de armazenamento. Dependendo do número inicial de micro-organismos contaminantes, podem-se originar alterações de ordem sensorial e nas características físico-químicas, afetando a qualidade dos produtos lácteos durante a cadeia produtiva.

O leite cru encontra-se principalmente contaminado com células vegetativas e esporos antes de seu processamento. Seus números antes da pasteurização geralmente são baixos, no entanto, esporos podem germinar após tratamento térmico e contaminar o leite já processado. As bactérias mais comuns formadoras de esporos encontrados em produtos lácteos são *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, e *Bacillus megaterium*. Estudos feitos em leite cru mostram que a maior parte destas amostras encontram-se contaminadas com *B. cereus*.

Outra causa de contaminação por *B. cereus* em produtos processados são esporos aderidos nos equipamentos, em virtude das falhas de higienização nas indústrias que podem originar processos de adesão microbiana e formação de biofilmes. As bactérias esporulantes estão presentes usualmente em

pequeno número, quando o leite é ordenhado em boas condições sanitárias e não apresentam mastite.

Com respeito a doenças veiculadas por alimentos causada por *B. cereus*, duas síndromes distintas são conhecidas, uma de natureza diarreica devido ao consumo de leite e seus derivados, molhos, sopas e vegetais, e outra emética, associada à ingestão da toxina pré-formada produzida em arroz frito e cozido, massas e macarrões. Ambas são auto-limitantes e a recuperação ocorre dentro de 24 horas.

Nos últimos anos, o reconhecimento de estirpes psicotróficas de *B. cereus* na indústria leiteira tem conduzido a um aumento na vigilância deste patógeno em produtos lácteos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- avaliar a presença de *B. cereus* em produtos lácteos comercializados nos supermercados da microrregião de Viçosa, Minas Gerais.

2.2. Objetivo Específicos

- Determinar a presença de fatores de virulência de *B. cereus* nos isolados coletados
- Avaliar a produção de enterotoxinas diarreicas nos diversos isolados analisados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Leite é considerado um dos melhores alimentos, dada a sua composição rica em proteínas, gorduras, carboidratos, minerais essenciais, aminoácidos e vitaminas, tornando-se um componente essencial na dieta de todos os mamíferos, incluindo os seres humanos (VIDAL et al., 2015). Além disso o leite, pelas suas características intrínsecas como alta atividade de água, pH próximo ao neutro e nutrientes disponíveis, é também considerado um meio ideal para a multiplicação de muitos micro-organismos (KORIM & CARMO, 2008, BARTOSZEWICZA et al., 2008).

No Brasil, a produção leiteira ainda apresenta obstáculos na cadeia produtiva, especialmente em relação às condições higiênico-sanitárias, que comprometem a qualidade final do produto, e limitam a durabilidade do leite e seus derivados, além de representarem problemas econômicos e de saúde pública. Por esse motivo, a qualidade desse produto merece a atenção de numerosos pesquisadores e autoridades ligadas à área de saúde e tecnologia de alimentos, principalmente pelos riscos de veiculação de micro-organismos patogênicos e deterioradores (WATANUKI & GALLO, 2008).

Dentre os vários micro-organismos que podem contaminar o leite “in natura” por meio das fezes e camas dos animais, poeira, equipamentos e utensílios deficientemente higienizados, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (WATANUKI & GALLO, 2008).

Esporos e células vegetativas de *B. cereus* são comuns e podem ser facilmente isolados em pequenas quantidades de muitos alimentos industrializados, tais como produtos lácteos. Matérias primas como leite cru são geralmente contaminadas na fazenda por esporos termodúricos que podem resistir o tratamentos de pasteurização e produzir toxinas nos alimentos processados causando intoxicação alimentar (ARSLAN et al., 2014, SILVA, 2015).

O número de esporos antes de pasteurização raramente excede 5×10^3 UFC/mL no entanto, eles também podem contaminar o leite após tratamento térmico (LEDENBACH AND MARSHALL, 2009). Contaminação por biofilmes de *B. cereus* em todas as etapas da cadeia produtiva pode ser originada a partir de células vegetativas ou esporos, que se aderem mais facilmente às

superfícies de aço inoxidável, devido à suas propriedades hidrofóbicas (RYU & BEUCHAT, 2005).

Os esporos são resistentes à higienização e vão recontaminar produtos já processados. Em condições ambientais favoráveis, os esporos podem se transformar em células vegetativas, através do processo de germinação (ELHARIRY, 2011).

A presença do *B. cereus* no leite é uma das maiores preocupações na indústria de laticínios. Esse micro-organismo pode causar alterações sensoriais no leite além de ser responsável por surtos de intoxicação alimentar (WATANUKI & GALLO, 2008, BARTOSZEWICZA et al., 2008)

Estudos feitos em leite cru mostram que mais de 80 % de amostras de leite são contaminadas com esporos de *B. cereus*. O processo de pasteurização ativa pelo choque térmico os esporos sobreviventes para que eles sejam preparados para germinar em condições positivas como temperatura de multiplicação dependendo da estirpe, pH, e atividade de água favoráveis, estas temperaturas podem variar no caso de psicotróficas na faixa de 4 °C a 11 °C (BROUSSOLLE et al. 2008).

O resfriamento a principal forma de conservação do leite cru após a ordenha, a refrigeração reduz a taxa de multiplicação da maioria dos micro-organismos do leite, entretanto não inibe a multiplicação dos micro-organismos psicotróficos (LEDENBACH AND MARSHALL, 2009).

A pasteurização e outros tratamentos aplicados na indústria tem a função de eliminar células vegetativas de micro-organismos presentes no leite, porém cerca de 50 % do leite envasado, após a estocagem prolongada à baixas temperaturas, podem estar contaminados com esporos sobreviventes destes tratamentos. O tratamento térmico estimula a germinação dos esporos que, na ausência da microbiota competitiva, encontra condições favoráveis para proliferar no produto (KORIM & CARMO, 2008, LEDENBACH AND MARSHALL, 2009).

A ocorrência de *B. cereus* em produtos lácteos processados também tem sido documentada por vários investigadores. Ahmed e colaboradores, em 1983, relata valores de prevalência de *B. cereus* de 35 % em amostras de leite pasteurizado, e 14 % em amostras de queijo analisadas. Wong e

colaboradores, em 1988, descrevem valores de ocorrência de *B. cereus* de 17 % em leites fermentados, 35 % em sorvetes, 2 % em leites pasteurizados e 29 % de leite em pó.

Produtos como leite em pó, são conhecidos por serem frequentemente contaminados com *B. cereus*, principalmente com seus esporos, embora estes não germinem nestes tipos de alimentos, só quando eles são reconstituídos e mantidos à temperatura ambiente favoráveis, esporos viáveis podem facilmente germinar em outros tipos de produtos lácteos e células vegetativas podem proliferar e produzem a toxina; o que poderia ocorrer até mesmo em temperaturas de refrigeração (REYES et al., 2007).

Nos últimos anos, o reconhecimento de estirpes psicotróficas de *B. cereus* na indústria leiteira tem conduzido a uma maior vigilância deste patógeno amplamente reconhecido como agente causador de doenças de origem alimentar (OH et al., 2012)

3.1. *Bacillus cereus*

B. cereus é, uma bactéria gram-positiva formadora de esporos de ubiqüitaria distribuição em todos os ambientes, mas também podem colonizar os intestinos de humanos e invertebrados (SASTALLA et al., 2013). O gênero *Bacillus* possui seis espécies muito próximas geneticamente: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* e *Bacillus weihenstephanensis*. (ZHOU et al., 2008, KUMARI & SARKAR, 2014). As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* compreendem um grande número de espécies, estando relatadas até o momento 48 espécies diferentes (FRANCO, LANDGRAF, 2006). Como são bactérias ubíquas do solo, elas podem ser encontradas no ar, água, alimentos para animais, produtos de agricultura e esterco, por tanto são considerados contaminantes inevitáveis em uma ampla variedade de alimentos como leite, e produtos lácteos (ZHOU et al., 2008).

B. cereus é uma bactéria cuja adaptação confere tolerância variável à diversas temperaturas de multiplicação. De fato, a evolução global de *B. cereus* não é anárquica, é sim fortemente determinada pelas adaptações a uma ampla

gama de temperatura. Esta diversificação ecológica pode ser geneticamente marcada pela abundância relativa de estirpes psicotolerantes (CARLIN et al., 2010).

O grupo *Bacillus* inclui membros que demonstram uma grande diversidade no que diz respeito à sua fisiologia, nicho ecológico, sequência de DNA e regulação gênica (SCHOENI & LEE WONG, 2005). Portanto, as técnicas de biologia molecular têm um bom poder de discriminação e são necessárias para investigação epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos que envolvam patógenos microbianos, incluindo espécies do grupo *B. cereus* e rastreamento de contaminação para gestão de qualidade e segurança (OH et al., 2012)

3.2. Patogenicidade *Bacillus cereus*

A patogenicidade de *B. cereus* está intimamente associada com a destruição de tecido pela ação de exoenzimas produzidas por este micro-organismo. Entre estas enzimas secretadas, pode-se listar quatro hemolisinas, três fosfolipases distintas, uma toxina emética, e três enterotoxinas formadoras de poros: hemolisina BL (*hbl*), toxina não hemolítica (*nhe*) e citotoxina k (BOTTONNE, 2010, EHLING-SCHULZ et al., 2006). Considera-se que a toxina emética é um peptídeo cíclico codificado pelo plasmídeo (cereulide), produzido por *B. cereus* diretamente no alimento, o qual é ingerido pré-formado (BOTTONNE, 2010). No trato gastrointestinal (intestino delgado), células vegetativas ingeridas ou esporos germinados podem produzir e secretar enterotoxinas que podem induzir a síndrome de diarreica.

Com respeito às doenças de origem alimentar causadas por *B. cereus*, duas síndromes distintas são conhecidas, uma de natureza diarreica devido ao consumo de leite e produtos derivados, molhos, sopas e vegetais, e outra emética, associada à ingestão da toxina pré-formada em arroz frito e cozido, massas e macarrões, nestes tipos de enfermidade, o alimento implicado geralmente foi tratado com calor e os esporos sobreviventes são a origem das síndromes (LEDENBACH AND MARSHALL, 2009).

B. cereus é capaz de produzir toxinas causadoras de intoxicação alimentar. As enterotoxinas não hemolítica *nhe*, a hemolítica *hbl* e a citotoxina

k provocam a síndrome diarreica. A cereulide é uma toxina emética (EHLING-SCHULZ et al., 2006). A intoxicação alimentar com toxinas do *B. cereus* tem uma progressão moderada sendo auto-limitantes mas em alguns casos, a toxina emética foi relatada como causa de doença grave. Há vários estudos de casos sobre intoxicações com as toxinas diarreicas, após o consumo de leite contaminado (SCHMIDT et al., 2012).

3.2.1. Síndrome diarreica

Os sintomas da síndrome diarreica produzida pelas toxinas de *B. cereus* se assemelham aos sintomas produzidos pela intoxicação alimentar causada por *Clostridium perfringens*. A síndrome diarreica, é produzida por micro-organismos no intestino delgado e a dose infecciosa pode variar de 10^4 - 10^9 UFC/g. O aparecimento de diarreia aquosa, cólicas abdominais e dor ocorre de 6 a 15 horas após o consumo de alimentos contaminados com esta bactéria. Náusea pode acompanhar a diarreia, vômitos que ocorrem raramente. Os sintomas persistem durante 24 horas, na maioria dos casos (BAD BUG BOOK, 2014).

Estes micro-organismos podem fazer parte da microbiota fecal, dependendo do tipo de alimentos consumido e da sazonalidade, principalmente no verão; entretanto não coloniza o intestino, não persistindo por longos períodos (FRANCO & LANDGRAF, 2006).

A síndrome diarreica é devido a hemolisina BL, uma enterotoxina não hemolítica e a citotoxina k (OMBUI. 2008). A hemolisina BL consta de uma proteína de união B (35 kDa) que é codificada pelo gene *hblA*, e duas proteínas de lises L1 (36 kDa) e L2 (45 kDa) que são codificadas pelos genes *hblC*, *hblD*. Máxima expressão de todas as atividades de *hbl* exige da presença dos três componentes proteicos. A enterotoxina não hemolítica tem três porções de proteína as quais são necessárias para a máxima citotoxicidade, as três proteínas são codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (OMBUI. 2008; FERNANDES et al., 2014; GRANUM et al., 1999; HANSEN AND HENDRIKSEN, 2001; KUMARI & SARKAR, 2014). Quase todas as estirpes de *B. cereus* conhecidas apresentam *nhe*, enquanto que os genes *hbl* são encontradas em aproximadamente 50 % das estirpes conhecidas. Como resultado, a co-expressão de ambas enterotoxinas encontra-se numa

percentagem elevada (40-60 %) das estirpes de *B. cereus* (JEßBERGER et al., 2014).

3.2.2. Síndrome emética

A síndrome emética é caracterizada por vômitos e náuseas após 0,5 a 6 h do consumo de alimentos contaminados com a enterotoxina cereulide. Ocasionalmente, cólicas abdominais e diarreia também podem ocorrer. A duração dos sintomas é geralmente inferior a 24 h. Os sintomas deste tipo de intoxicação alimentar são similares aquelas causadas pela intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*. Algumas estirpes de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* foram isoladas de cordeiro e frango incriminados em episódios de intoxicação alimentar, e demonstraram a produção de uma toxina altamente estável termicamente semelhante à toxina emética produzida por *B. cereus*.

Cereulide é um pequeno dodecadepsipeptideo estável ao calor que tem sido envolvido no processo da insuficiência hepática fulminante em humanos. Tem sido demonstrado que causa danos celulares em modelos animais e apresenta toxicidade para as mitocôndrias, agindo como um ionóforo de potássio (ARAGON-ALEGRO et al., 2008; O'CONNELL et al., 2013; WONG et al., 1988; KUMARI & SARKAR, 2014).

A toxina é produzida no alimento durante a multiplicação vegetativa do micro-organismos, que depois de ser produzida é extremamente estável, sendo resistente aos ácidos do estômago e enzimas proteolíticas do trato intestinal, a doses de toxina causante do síndrome emético pode variar de 0,03–13,3 µg estas quantidades podem ser produzidas quando este micro-organismo atinge densidade de 10^5 - 10^8 UFC/g (EFSA, 2005). Após a liberação a partir do estômago para o duodeno, a cereulide se liga ao receptor de 5-HT₃, estimulando o nervo aferente do vago, provocando vômitos (LINDBÄCK & GRANUM, 2006).

Recentemente, foi relatado que cereulide inibe as células do sistema imunológico dos humanos, tendo um efeito de imuno-modulação (REZENDE-LAGO et al., 2007).

3.3. Resistência térmica do *Bacillus cereus*

A determinação da resistência térmica de células bacterianas é normalmente obtida pela sua taxa de morte durante o aquecimento. O procedimento é realizado através da exposição das respectivas células a ação de tempos programados de aquecimento, sob temperaturas fixas, com subsequente contagem dos organismos sobreviventes. Para um valor constante de D, o tempo para uma dada probabilidade de inativação é diretamente proporcional ao número inicial de micro-organismos presentes. Enquanto o valor D é susceptível à variações das condições do ensaio, o valor z é razoavelmente mais constante para um determinado micro-organismo numa faixa de condições de teste (WATANUKI, 2008).

A termorresistência dos esporos de *B. cereus* pode variar de acordo com a estirpe (MAZIERO e BERSOT, 2011). Bradshaw e colaboradores (1975) ao avaliarem duas estirpes de esporos de *B. cereus*, constataram que uma delas era termorresistente, com um valor $D_{121}^{\circ\text{C}}$ de 2,35 min ($z = 7,9^{\circ\text{C}}$). Dufrenne e colaboradores, em 1995 identificaram várias estirpes de *B. cereus* psicotróficas e formadoras de esporos com valor $D_{90}^{\circ\text{C}}$ entre 2,8 a 9,2 min e, uma delas, com valor $D_{90}^{\circ\text{C}}$ superior a 100 min.

Wang (1994) compilou os parâmetros cinéticos de resistência térmica dos principais organismos esporulados. Dentre eles reportou os valores $D_{121}^{\circ\text{C}}$ de 3,8 min e z de $35,9^{\circ\text{C}}$ para *B. cereus* em leite fluido sem especificar a metodologia aplicada ou o sistema de processamento. Mazas e colaboradores, em 1995, trabalharam com resistência térmica de esporos de *B. cereus* e concluíram que o meio de esporulação influencia os valores D, mas não o valor z. Assim, para cada linhagem foi verificado um melhor meio de esporulação (WATANUKI, 2008).

3.4. Isolamento e identificação de *Bacillus cereus* em alimentos

A presença de grandes números de *B. cereus*, maiores que 10^6 UFC/g em alimentos é indicativa de risco potencial para a saúde (EFSA, 2005). O diagnóstico de intoxicação alimentar por *B. cereus* depende tradicionalmente de meios de cultura e técnicas de biologia molecular para identificar as estirpes

de *B. cereus*, e detectar enterotoxinas. A detecção de contaminação em alimentos envolve a utilização de vários plaqueamentos seletivos como aqueles descritos pela APHA. A seleção é baseada na capacidade de *B. cereus* de multiplicar-se na presença de polimixina B e produzir lecitinase. O método para contagem de *B. cereus* em alimentos, padronizado pela *International Organization for Standardization* (ISO), é baseado na multiplicação em ágar com D-manitol, gema de ovo e polimixina B (*Mannitol EggYolk Polymyxin-MYP*) (APHA, 2005).

A polimixina B é um agente seletivo que inibe bactérias gram-negativas, o ágar contém D-manitol como substrato de fermentação e vermelho de fenol como indicador da presença de ácido. Como *B. cereus* não consegue fermentar o manitol não há formação de ácido e as suas colônias ficam cor-de-rosa devido ao vermelho de fenol. Devido à gema de ovo, surge uma zona de precipitação em torno das colônias com capacidade de produzir lecitinase, como é o caso da maior parte das estirpes de *B. cereus* (LINDBÄCK & GRANUM, 2006).

Classicamente, as características que distinguem *B. cereus* de outras bactérias aeróbias formadoras de endosporos são a sua incapacidade para produzir ácido a partir do manitol e o fato de produzir lecitinase (FRITZE, 2004). *B. cereus* apresenta atividade hemolítica e é resistente à penicilina. Esta bactéria necessita de três L-aminoácidos para o seu desenvolvimento: a treonina, leucina e a valina. As características bioquímicas que podem ser utilizadas para caracterizar *B. cereus*, distinguindo-o de outros *Bacillus*.

As espécies pertencentes ao grupo *B. cereus* são diferenciadas pelas características fenotípicas e genotípicas: *B. anthracis* é o agente causador do carbúnculo hemático, *B. cereus* é um patógeno comum em alimentos, *B. thuringiensis* pode ser distinguido por sua capacidade de produzir um cristal de inclusão inseticida (γ -endotoxinas) durante a esporulação; *B. mycoides* é caracterizado pelo seu crescimento rizóide; *B. anthracis* pode ser diferenciado de *B. cereus* em razão de sua atividade não hemolítica, motilidade, ausência de dois plasmídeos de virulência que codificam para a produção de toxinas e cápsula (JENSEN et al., 2005).

A identificação de *B. cereus* enterotoxigênicos consta principalmente de métodos biológicos e imunológicos que detectam a capacidade das estirpes

de produzir enterotoxina. A toxina emética tem baixa antigenicidade que impede sua detecção por imunológica (OMBUI, 2008).

No início da década de 1980, uma variedade de técnicas moleculares foram desenvolvidas em laboratórios de pesquisa para análises do DNA e exploração genética. Algumas dessas tecnologias foram aplicadas a análises bacteriológicas, como a ribotipagem. Esta é um método para geração de impressões genéticas bacterianas (*fingerprints*), baseado no polimorfismo dos genes *rDNA* (BRUCE,1996).

RNA ribossomal tem sido utilizado com sucesso na sistemática molecular bacteriana. No entanto, a comparação de genes codificadores de proteínas podem apresentar vantagem sobre a técnica do *rRNA* ou *rDNA* devido a uma maior variação das sequências e permitir a diferenciação de estirpes intimamente relacionadas (BRUCE,1996).

Recentemente, a *PCR* em tempo real torna-se uma ferramenta de diagnóstico poderosa para a detecção específica de micro-organismos e uma alta sensibilidade (1 UFC/mL) pode ser conseguida em poucas horas. Métodos de detecção para análise de alimentos precisam ser validados para a detecção, especificidade, sensibilidade e aplicabilidade nos alimentos direcionados. A detecção rápida das bactérias alvo em produtos alimentares permite a indústria para tomar decisões adequadas para lidar com as matérias-primas contaminadas ou produtos finais em um tempo hábil (HONGLIANG, 2005).

Análise baseada PCR do gene *16S* é uma ferramenta poderosa e essencial para estudos de diversidade bacteriana, estrutura da comunidade, evolução e taxonomia. Ela permitiu a detecção e identificação de bactérias não cultiváveis, e nos últimos anos tem levado a um enorme aumento de nosso conhecimento da ecologia bacteriana e taxonomia (OH et al., 2012).

A sequência do gene de *16S* tem sido determinada para um grande número de estirpes. O GenBank, é o maior banco de sequências de nucleotídeos, com mais de 20 milhões de sequências depositadas, dos quais mais de 90.000 são do gene *16S*, Isso significa que existem muitas sequências com as quais pode-se comparar a sequência de uma estirpe desconhecida. O gene *16S* é universal em bactérias, e assim relações entre bactérias podem ser medidas. Em geral, a comparação das sequências do

gene *16S* permite a diferenciação entre os organismos a nível de gênero em todos os principais filós de bactérias (CLARRIDGE, 2004).

4. MATERIAS E METODOS

4.1. Coleta de amostras de produtos lácteos

Cento e vinte nove amostras de diferentes produtos lácteos comercializados nos supermercados da microrregião de Viçosa, Minas Gerais, foram coletado de maneira aleatória e analisados para verificar a ocorrência de *B. cereus*. Vinte e cinco amostras de leite em pó integral instantânea de nove marcas diferentes, trinta e quatro amostras de leite pasteurizado de três marcas diferentes, vinte e um amostras de leite UHT integral de cinco marcas diferentes, vinte e sete amostras de ricota de quatro marcas diferentes, vinte e dois amostras de outros produtos (bebida láctea fermentada, leite achocolatado, sobremesa de base láctea), todas dentro do prazo de validade, foram coletadas nos diferentes mercados da cidade, no período de fevereiro de 2015 até setembro de 2015. As amostras de produtos lácteos foram transportadas em suas embalagens originais até o Laboratório de Microbiologia e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos. Quando necessário, as amostras eram armazenadas a 8 °C, antes das análises microbiológicas.

4.2. Isolamento e Enumeração de *Bacillus cereus* em produtos lácteos

Para enumeração e isolamento de *B. cereus* foram executadas duas metodologias. Na primeira, usou-se a contagem em placas, onde foi tomada de maneira asséptica uma alíquota de 25 g para produtos sólidos ou 25 mL para os produtos líquidos de cada uma das 129 amostras de produtos lácteos coletadas, sendo reconstituída em 225 mL de solução salina peptonada (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e homogeneizada durante 5 min em *stomacher* considerando-se esta diluição de 10^{-1} . Após homogeneização, 0,1 mL das diluições seriadas 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram plaqueadas em meio seletivo *Mannitol–Egg Yolk–Polymyxin agar* (MYP) e espalhado com alça de *Drigalski* e incubado por 24 h a 37 °C. O segundo método foi qualitativo, para isso, uma alíquota de 9 mL da diluição 10^{-1} de cada produto lácteo analisado menos a

leite achocolatado foi transferida para tubo de ensaio esterilizado e adicionado de 1 mL de polimixina B 50000 UI/mL e armazenada à temperatura de 30 °C por 48 h para ser plaqueado novamente em meio seletivo MYP, com o objetivo de avaliar a presença de *B. cereus* após estocagem. As colônias típicas de *B. cereus*, nas duas metodologias, apresentam cor rósea, rodeadas por um halo de precipitação de lecitinase (APHA, 2005; BARROS et al., 2001)

4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

4.3.1. Identificação Fenotípica

Para a confirmação dos isolados foram feitas análises morfológicas com coloração de Gram e testes bioquímicos como motilidade e redução de nitrato, fermentação anaeróbica de glicose, decomposição da tirosina e crescimento rizoide (APHA 2005). Cada um dos testes é detalhado a seguir.

4.3.2. Motilidade e redução de nitrato

Tubos contendo ágar motilidade-nitrato foram inoculados com os isolados, utilizando alça de platina do tipo agulha e incubados a 35 ± 1 °C por 18 a 24 h. Após incubação, verificou-se o tipo de multiplicação presente. Culturas imóveis mostram multiplicação apenas na linha de inoculação, enquanto as que apresentam motilidade multiplicam-se de forma difusa. *B. cereus* em 50 % a 90 % dos casos mostra-se móvel. Após a leitura da motilidade, foram adicionados aos tubos 2 a 3 gotas de α -naftilamina 0,5 % p/v e 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico 0,8 % p/v. O aparecimento de coloração rósea indica positividade para redução de nitrato. Quando não houver desenvolvimento de coloração, adiciona-se ao tubo alguns miligramas de pó de zinco. Nesta situação, o aparecimento de coloração rósea indica reação negativa, enquanto o não desenvolvimento de cor indica positividade pois *B. cereus* reduz o nitrato a nitrito.

4.3.3. Fermentação anaeróbica de glicose

Tubos contendo 3 mL de caldo de vermelho de fenol dextrose foram inoculados com os isolados usando-se alça de platina e incubados a 35 ± 1 °C por 24 h em anaerobiose. Mudança de cor vermelho para amarelo indica que

foi produzido ácido. O ácido é produzido a partir da glicose, em condições de anaerobiose, por *B. cereus* e outros membros do grupo *Bacillus*.

4.3.4. Decomposição da tirosina

Superfícies de ágar tirosina (inclinado em tubo) foram inoculadas com os isolados por estrias usando-se alça de platina. Os tubos foram incubados a 35 ± 1 °C por 48 h. Após incubação, observa-se o aparecimento de uma zona clara próxima ao crescimento, produzida pela decomposição da tirosina.

4.3.5. Crescimento rizoide

Superfícies de ágar nutriente foram inoculadas com isolados usando-se alça de platina, depositando-se o inóculo no ponto central que foram incubadas a 35 ± 1 °C por 48 a 72 h.

Após incubação observou-se o crescimento rizoide que se caracteriza pelo aparecimento de colônias com longas extensões em forma de raízes ou longos fios. Isolados típicos de *B. cereus* não apresentam crescimento rizoide, porém algumas estirpes podem apresentar colônias rugosas em forma rizoide.

4.4. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

4.4.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico dos isolados positivos nas provas bioquímicas e coloração de gram foi realizada com o kit *Bacterial Genomic DNA Isolation* (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a extração de DNA, os isolados foram reativados em tubos contendo 10 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 35 °C durante 24 h. A partir de cada tubo inoculado, foram tomadas amostras de 1 mL, para ser transferida a tubos de 1,5 mL os quais foram centrifugados a 14.000 g por 2 min para obtenção de um *pellet* de cada amostra, sendo o sobrenadante descartado, após a centrifugação. O *pellet* foi ressuspendido em 480 µL de EDTA 50 mM e misturado com 120 µL de solução de lisozima (400 mg/mL) para permitir a degradação da parede celular e a liberação total do DNA bacteriano e submetido ao vortex por 30 s.

Os tubos contendo as amostras foram incubados em banho-maria a 37 °C por 60 min, seguido por centrifugação a 14.000 *g* por 2 min e o sobrenadante descartado, após a centrifugação. Adicionaram-se 600 µL de *Nuclei Lysis Solution* em cada tubo e foram incubados em banho-maria a 80 °C por 5 min, e após resfriamento à temperatura 25 °C adicionaram-se 3 µL de *RNase Solution* e submetido a vortex por 20 s. Foi feita incubação a 37 °C por 60 min novamente e após resfriamento à temperatura ambiente (20-25 °C) foram adicionados a cada tubo 200 µL de *Protein Precipitation Solution* e submetidos a vortex por 20 s e incubados em gelo por 5 min.

As amostras foram centrifugadas novamente a 14.000 *g* por 3 min e o sobrenadante contendo DNA transferido a tubo limpos contendo 600 µL de isopropanol, os quais foram centrifugados a 14.000 *g* por 2 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 600 µL de etanol 70 % para submeter as amostras novamente à centrifugação a 14.000 *g* por 2 min e após essa etapa permitiu-se a evaporação do etanol de cada tubo. Foram adicionados a cada tubo seco, 100 µL de DNA *Rehydration Solution* e armazenados a 4 °C até utilização.

4.4.2. Confirmação genética usando gene 16S

A confirmação dos resultados dos testes fenotípicos foi realizada pelas análises de *PCR* para o gene que codifica a região 16s. Foram utilizados os primers universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) sintetizados pela empresa Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, (FRANK et al., 2008). O volume final para cada reação de *PCR* foi de 25 µL, contendo 23 µL de mix e 2 µL de DNA. O mix contém 5 µL de 5X *Green GoTaq® Reaction Buffer*, 2µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs, 1,0 µL de primer forward, 1,0 µL de primer reverso, 0,2 µL de *GoTaq® DNA Polymerase* com uma concentração de (5u/µL) e 12,3 µL de H₂O ultra pura. O protocolo para a *PCR* foi o seguinte: 4 min de desnaturação a 94 °C; 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 s, anelamento a 52 °C por 45 s, e extensão a 72 °C por 3 min.

4.5. Detecção dos genes *nhe*, *hbl*, e *cytk*

A avaliação da presença dos genes produtores das toxinas causadores da síndrome diarreica foi realizada pelo *PCR* convencional com um volume final para cada reação de 25 μ L, contendo 23 μ L de mix e 2 μ L de DNA. O mix contém 5 μ L de 5X *Green GoTaq® Reaction Buffer*, 2 μ L de $MgCl_2$, 2 μ L de dNTPs, 1 μ L de primer forward, 1 μ L de primer reverso, 0,2 μ L de *GoTaq® DNA Polymerase* com uma concentração de (5u/ μ L) e 13,8 2 μ L de H_2O ultra pura para cada um dos isolados que apresentaram características fenotípicas e genotípicas correspondentes ao *B. cereus*. As condições do termociclador foram as seguintes: 3 min de desnaturação a 94 °C; 32 ciclos de amplificação a 95° C por 45 s, anelamento a 52 °C por 45 s, e extensão a 72° C por 1 min. Os *primers* utilizados, com base em trabalhos publicados por Ehling-Schulz e colaboradores (2006) são listados na Tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados neste estudo

Primer	Gene	Primers no sentido 5'-3'	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de anelamento
HD2F HA4R	<i>hbl</i>	GTAAATTAIGATGAICAATTTTC AGAATAGGCATTCATAGATT	1091	52° C
NA2F NA4R	<i>nhe</i>	AAGCIGCTCTTCGIATTC ITIGTTGAAATAAGCTGTGG	766	52° C
CKF2 CKF5	<i>cytk</i>	ACAGATATCGGICAAAATGC CAAGTIACTTGACCIGTT GC	421	52° C

Fonte: Ehling-Schulz et., al.2006

4.6. Avaliação de produção de enterotoxinas

A produção de enterotoxinas por isolados confirmados como *B. cereus* e que apresentaram os genes de enterotoxicidade foi determinada com o kit rápido *GLISA Duopath® Cereus Enterotoxins (Gold Labelled Immuno Sorbent Assay)*, (MERCK). Seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante para determinação qualitativa de enterotoxinas de *B. cereus*. Para isso cada isolado foi resuspenso e incubado em caldo BHI por 24h a 35 °C, após incubação uma alíquota de 0,9 mL do inóculo pré-incubado foi transferido para um novo tubo de ensaio esterilizado contendo 9,0 mL caldo CGY (*Casitone Glycerol Yeast Autolysate, MERK*) esterilizado ao qual foi adicionado previamente 0,1 mL de solução de glicose a 10 % esterilizado. Esta mistura foi homogeneizada no vortex e novamente incubada por 24 h a 35 °C. Após incubação uma alíquota de 0,15 mL foi transferida para a placa teste onde foi observado o resultado após 30 min. A sensibilidade deste kit é de 6 ng/mL para *nhe* e 20 ng/mL para *hbl*. O teste detecta 100 % do *B. cereus* enterotoxigênico após enriquecimento de 24 h em caldo CGY a 37 °C.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento

Das 129 amostras de produtos lácteos analisadas, 69 (53,3%) apresentaram colônias típicas características de *B. cereus* em meio de cultura seletivo MYP, tanto no teste quantitativo como no qualitativo e foram submetidas aos testes de identificação fenotípicos. Estes resultados indicam a presença tanto de células vegetativas como esporos **em mais** da metade dos produtos analisados o que pode ser causado **por** falhas nas diversas etapas de processamento. *B. cereus* tanto na forma vegetativa como esporulada pode estar presente em todas as etapas de processamento os principais pontos de contaminação são apresentados na cor vermelha no fluxograma de processamento dos diferentes produtos analisados Figura 1.

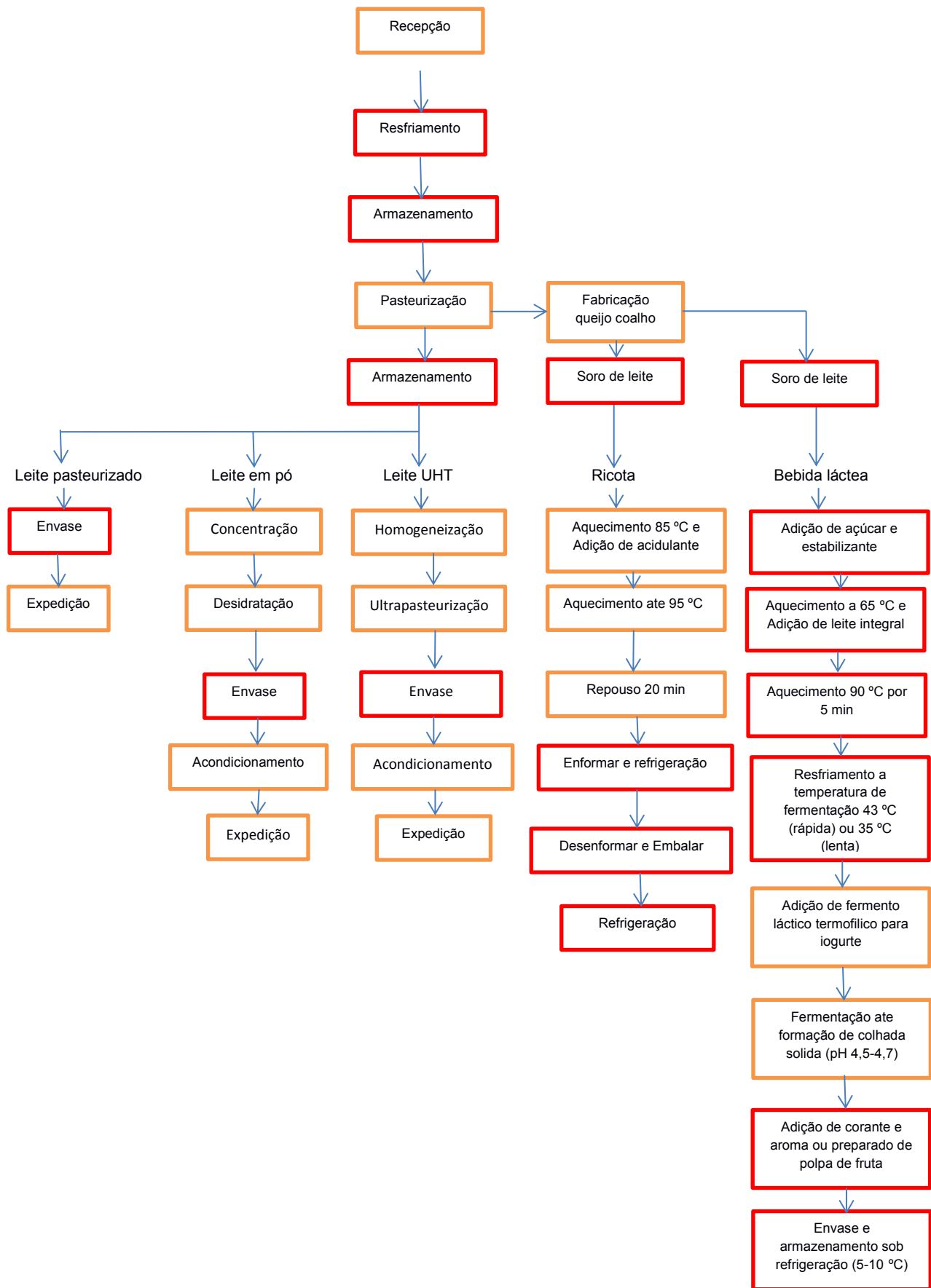


Figura 1: Fluxograma de fabricação dos produtos analisado.

5.2. Presença de *Bacillus cereus* nos produtos lácteos analisados

Foi observada multiplicação com formação de colônias características de *B. cereus* tanto no teste quantitativo como qualitativo em 19 (76 %) das 25 amostras de leite em pó analisados. No entanto, os valores de contagens em placa para este produto não foram maiores que 1,92 log UFC/g. Estes valores se encontram dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para leite em pó, que é, no máximo, $5,0 \times 10^3$ UFC/g ou 3,70 log UFC/g (BRASIL, 2001).

Para o leite pasteurizado 30/34 (88,24%) amostras analisadas apresentaram multiplicação de colônias típicas características de *B. cereus* em meio de cultura seletivo MYP, nos dois métodos testados. Para o leite pasteurizado foram observados valores de contagem em placa no teste quantitativo que variaram de 1,30 log UFC/mL até 3,00 log UFC/mL. Para *B. cereus* não existe legislação para leite pasteurizado no Brasil.

Para a ricota 10/27 (37,0 %) amostras analisadas apresentaram multiplicação de colônias típicas características de *B. cereus* em meio de cultura seletivo MYP, nos dois métodos testados. Os valores de contagem em placa no teste quantitativo para este produto variaram de 2,72 log UFC/g a 5,32 log UFC/g.

Para leite UHT foram analisadas 21 amostras das quais nenhuma foi positiva para presença de *B. cereus* pelo método de contagem em placa. Após pre-enriquecimento no teste qualitativo, 7/21 (33,3 %) das amostras apresentaram multiplicação com formação de colônias características de *B. cereus* em meio de cultura seletivo MYP, após a incubação 30 °C por 48 h, com aparente coagulação doce do leite. A ocorrência de *B. cereus* após incubação foi possivelmente devida influência da temperatura e das condições nutritivas do meio de enriquecimento (leite) que em ausência de flora competitiva favoreceu a germinação dos esporos e subsequente multiplicação do *B. cereus*. Estudos realizados por Johnson, Nelson e Busta (1983) utilizando meios ricos em nutrientes observaram que a germinação, de este micro-

organismo poderia ocorrer na faixa de temperatura entre 5 °C e 50 °C, porém sendo mais rápida a 30 °C. (WATANUKI, 2008).

Nas amostras de leite achocolatado e de sobremesa de base láctea não foi detectada a presença de *B. cereus* pelo método de contagem em placa, o método de qualitativo não foi realizado nestas amostras. No entanto, 3 amostras de bebida láctea fermentada, apresentaram crescimento de colônias típicas de *B. cereus* pelo método de contagem em placa, com valores que variaram de 2,00 log UFC/mL a 2,40 UFC/mL na Figura 2 é apresentada a ocorrência de *B. cereus* em todos os produtos analisados.

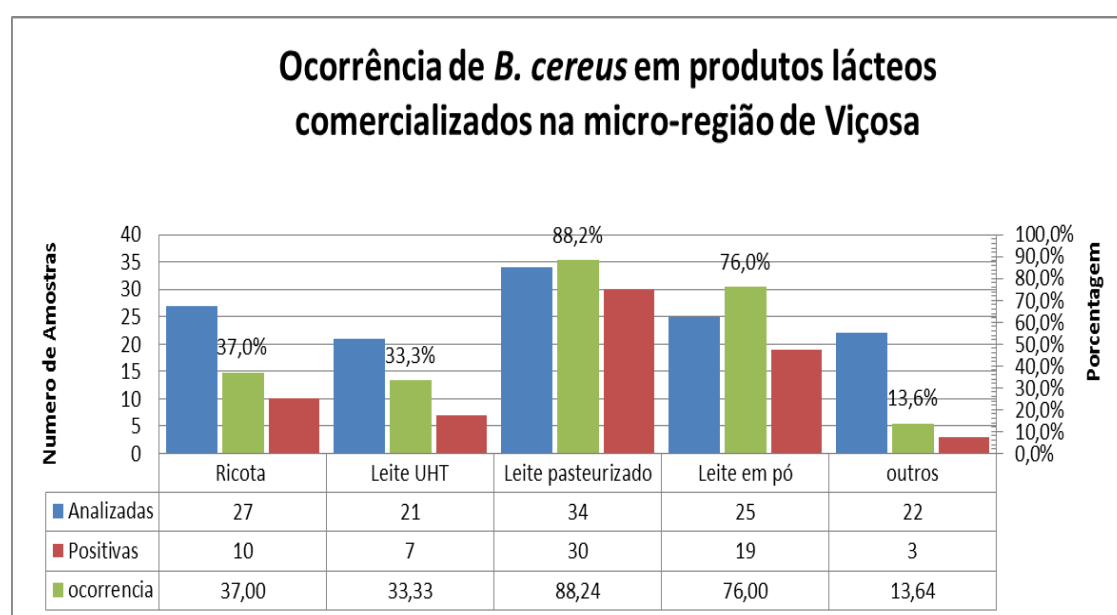


Figura 2: Ocorrência de *Bacillus cereus* nos diferentes produtos lácteos analisados.

No Brasil, Rezende-Lago e colaboradores (2007) analisaram 120 amostras de produtos lácteos comercializados na região de Ribeirão Preto, São Paulo, e encontraram *B. cereus* em 22 (73,3 %) de 30 amostras de leite em pó analisadas. Para outros produtos os valores de prevalência foram os seguintes: leite cru 15/30 (50 %), leite pasteurizado 29/30 (96,7 %) e leite UHT 4/30 (13,3 %). Outro trabalho realizado por Watanuki e Gallo (2008) na região de Piracicaba, São Paulo, determinou valores de prevalência de *B. cereus* de 61,3 % para produtos como leite cru, leite pasteurizado e leite UHT vendidos nessa região. Os valores de contagem em placa encontrados por esses autores variaram de <1,00 log UFC/mL até 3,10 log UFC/mL dependendo do produto

analisado, sendo o leite pasteurizado o produto com maiores contagens. Deve-se ressaltar que estes valores de contagens se encontram de acordo com os valores encontrados nesse estudo para os mesmos produtos analisados. O nível de contaminação do leite cru pode variar de acordo com as mudanças sazonais. Além disso, estudos têm demonstrado que contagens máximas de esporos de *B. cereus* no leite ocorrer durante a estação de pastoreio, e contagens mínimas ocorrem em inverno (BARTOSZEWICZA et al., 2008).

Trabalhos recente realizado por Rezende e colaboradores, em 2015 avaliaram a presença de *B. cereus* em leite cru, leite pasteurizado e leite UHT na região de São Paulo e encontraram valores de ocorrência de 51,6 % para leite cru, 81,6% para leite pasteurizado, e 13,8% para leite UHT. Estes resultados nos três trabalhos citados realizados no Brasil mostram-se muito similares aos encontrados em nosso estudo, o que indica uma ocorrência uniforme de *B. cereus* em produtos lácteos comercializados em diferentes regiões do Brasil.

A ocorrência de *B. cereus* em todos os produtos analisados poderia ser atribuído a baixa qualidade da matéria-prima ou práticas higiênico-sanitárias insatisfatórias, tanto nas etapas de produção e processamento ou outros fatores, como a capacidade desta bactéria em se aderir e formar biofilmes em superfícies de equipamentos, o que pode favorecer a contaminação de produtos lácteos em toda a cadeia produtiva, tornando estes produtos potencialmente perigosos para a saúde humana (SVENSSON et al., 2004).

O soro utilizado para a fabricação de ricota, embora seja acidificado e aquecido a 85-90 °C, é bastante suscetível a contaminação por microorganismos, e fatores como, contaminação do ar, resfriamento lento, alta umidade e seu pH favorecem a contaminação e sobrevivência microbiana (FERNANDES et al., 2014).

Esper (2006), avaliando 45 amostras de ricota comercializadas no município de Campinas, São Paulo e observou que 46,7% das amostras estavam em desacordo com os parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação Brasileira, Além disso, uma avaliação complementar mostrou que 51,1% das amostras estavam contaminadas com *B. cereus*, sendo que 28,9% com contagem na faixa de 2,00 log UFC/g a 6,00 log UFC/g e 85,7% (36/45) dos isolados analisados apresentavam potencial enterotoxigênico.

Trabalho realizado por Fernandes e colaboradores (2014), analisou 126 amostras tanto de matéria-prima como superfícies procedentes de diferentes pontos de fabricação de ricota em uma fábrica no sul de Minas Gerais. Esses pesquisadores observaram a presença de *B. cereus* em matérias-primas, amostras de superfície e no produto já processado. A contagem de *B. cereus* em leite pasteurizado foi maior que no leite cru, o que foi atribuído aos esporos presentes nas matérias-primas que foram ativadas durante a pasteurização. Subsequentemente, estes esporos germinaram, se multiplicaram no leite pasteurizado e contagens de *B. cereus* de até 3 log UFC/mL no queijo e no soro também foram observadas.

Essa situação é justificada pela composição desses produtos, sendo rico em nutrientes, com elevada atividade de água e um pH (6,0) que favorável à multiplicação de micro-organismos. Além disso, o soro retirado do processamento da ricota estava a uma temperatura média de 39 °C. Entre as superfícies que entraram em contato com a ricota, a forma pode ser destacada como uma fonte potencial de contaminação com *B. cereus*, com contagens de até 7,23 log UFC/cm²

Trabalho realizado por Wong e colaboradores (1988), avalio a presença de *B. cereus* em leites fermentadas encontrando em 17% das amostras analisadas o micro-organismo. Para produtos fermentados existem poucos dados de literatura sobre a ocorrência de este micro-organismo.

Os trabalhos anteriormente citados mostram-se uniformes com os resultados do nosso trabalho, sendo a diferença entre os valores de ocorrência devidas a fatores como o tempo de estocagem, qualidade da matéria-prima e infraestrutura de produção que podem favorecer a multiplicação deste micro-organismo. Pode-se destacar nestes trabalhos que o queijo ricota pode ter uma alta contaminação durante todas as etapas de processamento, o que pode ser devido a falhas nos processos de higienização de equipamento com formação de biofilmes e matérias-primas com altas concentrações de células vegetativas e esporos, que favorecem a contaminação do produtos já terminados.

5.3. Identificação genética

Os 69 isolados que apresentaram características fenotípicas similares a *B. cereus* foram analisados pela técnica de *PCR* para o gene *16s* amplificando um fragmentos de *DNA* de aproximadamente 1465 pb Figura 3.

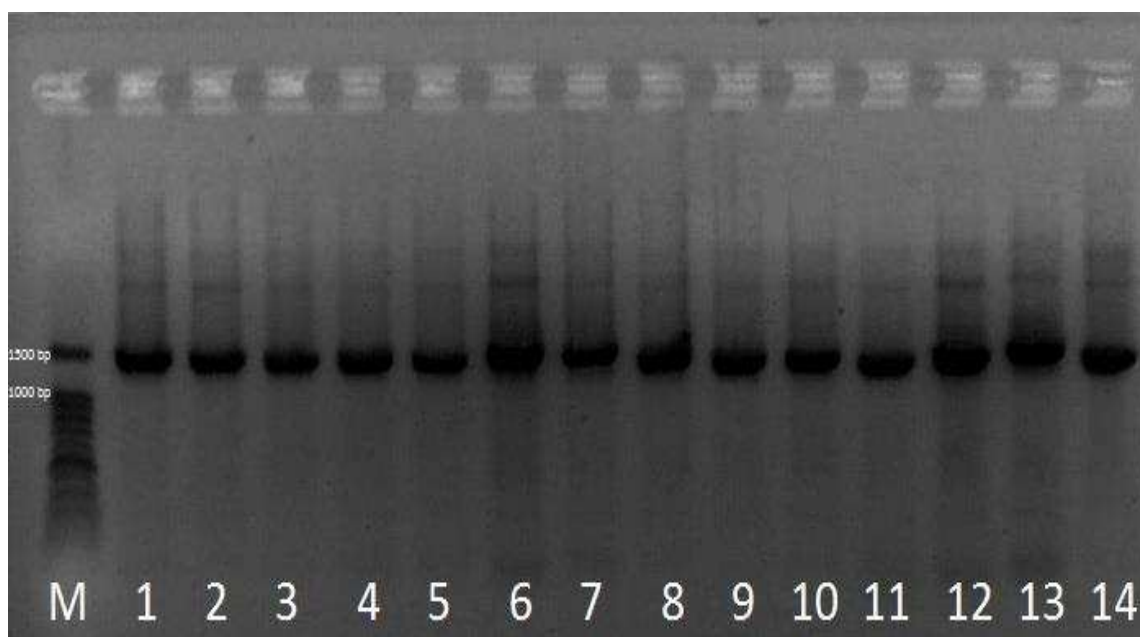


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a *PCR* do gene *16S*; linha M: marcador 100 bp linhas 1, 2, e 3, isolado de leite em pó; linhas 4, 5, e 6 isolados de leite pasteurizado; linhas 7, 8, e 9 isolado de leite UHT; linhas 10, 11 e 12, isolado de queijo tipo ricota; linhas 13 e 14 isolado outros produtos.

Após o sequenciamento do fragmento amplificado na MACROGEN, Coréia, os 69 isolados dos diferentes produtos lácteos analisados apresentaram perfis genéticos com similaridade entre 99-100% para três estirpes de *B. cereus* comumente isoladas de leite e produtos lácteos (*B. cereus* KAVK4, *B. cereus* SVK1 e *B. cereus* ATCC 4342), após comparação no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLASTN. Os perfis genéticos dos isolados presentes em cada produto analisado são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Perfil genético dos isolados presentes em cada um dos diferentes produtos lácteos analisados

Produto lácteo Analisado	Estirpe	Identificação GenBank	Similaridade %
Leite em pó	<i>B. cereus KAVK4</i>	KP792775.1	99
	<i>B. cereus SVK1</i>	KF612021.1	99
	<i>B. cereus ATCC 4342</i>	CP009628.1	100
Leite pasteurizado	<i>B. cereus KAVK4</i>	KP792775.1	99
	<i>B. cereus SVK1</i>	KF612021.1	99
Leite UHT	<i>B. cereus KAVK4</i>	KP792775.1	99
Queijo ricota	<i>B. cereus KAVK4</i>	KP792775.1	99
outros	<i>B. cereus KAVK4</i>	KP792775.1	99

As sequências de ácidos nucléicos do gene 16S que codifica para o *rRNA* de um isolado de cada produto analisado foi comparada com a sequência da estirpe *B. cereus KAVK4* por ser a mais presente em cada produto analisado, as quais são apresentadas na Figura 4.

LEITE PASTEURIZADO GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACCGTGG
 LEITE EM PÓ GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACCGTGG
 KAVK4 GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACCGTGG
 RICOTA GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACCGTGG
 LEITE UHT GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACCGTGG
 OUTROS GCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACCGTGG

LEITE PASTEURIZADO GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTATT
 LEITE EM PÓ GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTATT
 KAVK4 GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTATT
 RICOTA GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTATT
 LEITE UHT GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTATT
 OUTROS GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTATT

LEITE PASTEURIZADO TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC
 LEITE EM PÓ TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC
 KAVK4 TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC
 RICOTA TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC
 LEITE UHT TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC
 OUTROS TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC

LEITE PASTEURIZADO GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
 LEITE EM PÓ GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
 KAVK4 GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
 RICOTA GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
 LEITE UHT GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
 OUTROS GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG

LEITE PASTEURIZADO AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 LEITE EM PÓ AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 KAVK4 AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 RICOTA AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 LEITE UHT AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 OUTROS AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG

LEITE PASTEURIZADO TAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGG
 LEITE EM PÓ TAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGG
 KAVK4 TAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGG
 RICOTA TAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGG
 LEITE UHT TAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGG
 OUTROS TAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGG

LEITE PASTEURIZADO CTTTCGGGTCGTAAAACCTCGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
 LEITE EM PÓ CTTTCGGGTCGTAAAACCTCGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
 KAVK4 CTTTCGGGTCGTAAAACCTCGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
 RICOTA CTTTCGGGTCGTAAAACCTCGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
 LEITE UHT CTTTCGGGTCGTAAAACCTCGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
 OUTROS CTTTCGGGTCGTAAAACCTCGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA

LEITE PASTEURIZADO CTTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 LEITE EM PÓ CTTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 KAVK4 CTTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 RICOTA CTTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 LEITE UHT CTTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 OUTROS CTTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC

LEITE PASTEURIZADO GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATFGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAA
 LEITE EM PÓ GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATFGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAA
 KAVK4 GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATFGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAA
 RICOTA GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATFGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAA
 LEITE UHT GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATFGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAA
 OUTROS GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATFGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAA

LEITE PASTEURIZADO GTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACGGGAGACTTGAG
 LEITE EM PÓ GTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACGGGAGACTTGAG
 KAVK4 GTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACGGGAGACTTGAG
 RICOTA GTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACGGGAGACTTGAG

LEITE UHT	GTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCCTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAG
OUTROS	GTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCCTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAG

LEITE PASTEURIZADO	TGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
LEITE EM PÓ	TGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
KAVK4	TGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
RICOTA	TGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
LEITE UHT	TGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA
OUTROS	TGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA

LEITE PASTEURIZADO	CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGG
LEITE EM PÓ	CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGG
KAVK4	CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGG
RICOTA	CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGG
LEITE UHT	CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGG
OUTROS	CACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGG

LEITE PASTEURIZADO	AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG
LEITE EM PÓ	AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG
KAVK4	AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG
RICOTA	AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG
LEITE UHT	AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG
OUTROS	AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG

LEITE PASTEURIZADO	AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG
LEITE EM PÓ	AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG
KAVK4	AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG
RICOTA	AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG
LEITE UHT	AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG
OUTROS	AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG

LEITE PASTEURIZADO	CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
LEITE EM PÓ	CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
KAVK4	CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
RICOTA	CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
LEITE UHT	CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
OUTROS	CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT

LEITE PASTEURIZADO	TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCTCTGAAACCCCTAGAA
LEITE EM PÓ	TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAG
KAVK4	TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAG
RICOTA	TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCTCTGAAAACCCCTAGAG
LEITE UHT	TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAG
OUTROS	TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAA

LEITE PASTEURIZADO	ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGA
LEITE EM PÓ	ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAAA
KAVK4	ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGA
LEITE UHT	ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGA
OUTROS	ATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGA

Figura 4: Comparação de seqüências de DNA do gene 16S de um isolado de cada um dos produtos lácteos analisados com a seqüência da estirpe *Bacillus cereus* KAVK4.

Após comparação entre as seqüências de DNA obtidas neste trabalho com a seqüência da estirpe *Bacillus cereus* KAVK4, pode-se observar pouca variabilidade entre as seqüências comparadas, o que indicaria que as estirpes presentes nestes produtos lácteos poderiam ser as mesmas.

Vidal e colaboradores (2015) além de mostrar a alta ocorrência de *B. cereus* em produtos lácteos, verificaram que existe pouca diversidade entre estirpes isoladas de leite cru e estirpes isoladas de produtos processados. Pesquisa realizada por Salustiano e colaboradores (2009) também constatou a presença *B. cereus* em um laticínio da microrregião de Viçosa, eles analisaram 12 isolados de leite pasteurizado e 30 isolados de superfícies e equipamentos de pós-pasteurização do mesmo laticínio. A presença de sete ribotipos foi demonstrada, mas a maior parte dos isolados pertencia a mesma estirpe encontrada em quatro superfícies e no leite, indicando contaminação pós-processamento.

Presença de *B. cereus* em leite UHT está relacionada à limpeza inadequada da equipamento, à temperatura de pasteurização inadequada ou contaminação pós-processamento (BAHOUT, 2000).

Trabalho realizado por Malek e colaboradores (2013) analisaram diferentes isolados coletadas de um mesmo laticínio e as classificou em três genótipos diferentes e determinou um nível muito baixo de diversidade, entre as estirpes analisadas, sendo a maior parte foram classificadas como pertencentes ao genótipo A, apesar de suas origens diversas. Dezesete isolados coletados a partir de equipamentos da linha processamento, eram semelhantes ao genótipo A, o que sugere como principal fonte de contaminação a matéria-prima utilizada, que neste caso seria o leite em pó.

5.4. Amplificação dos genes de virulência

Os 69 isolados de produtos lácteos identificados como *B. cereus* de três estirpes diferentes apresentaram amplificação de fragmentos de DNA para os genes *nhe* 766bp, *hbl* 1091bp e *cytk* 421bp produtores de enterotoxina diarréica, Figuras (5,6 e 7) e foram tipificados em três perfis genéticos para as toxinas produtoras desta síndrome (Tabela 3).

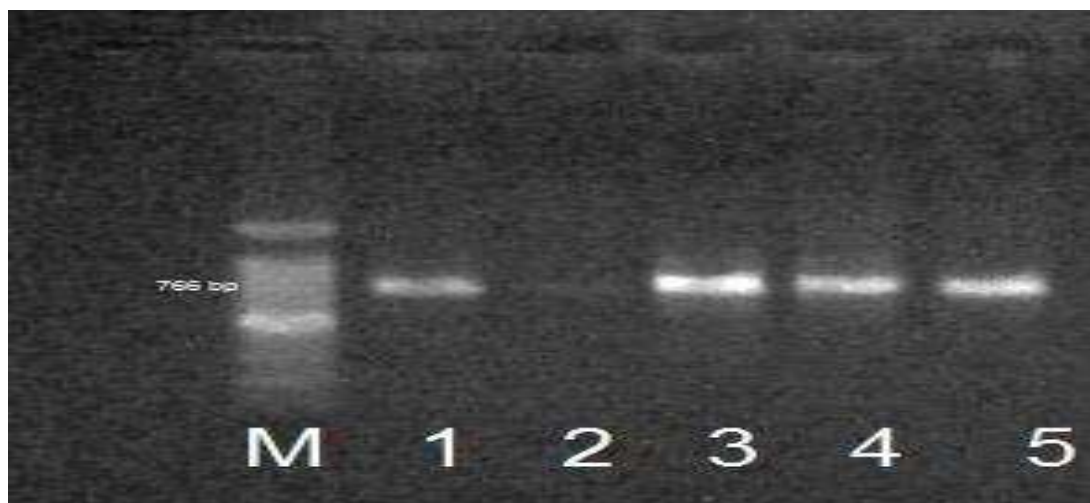


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a *PCR* do gene *nhe*. Linha M: marcador de 100 bp; linha 1, isolado de leite em pó; linha 2, isolado de leite pasteurizado; linha 3, isolado de leite UHT; linha 4, isolado de queijo tipo ricota; linha 5, isolado outros produtos.

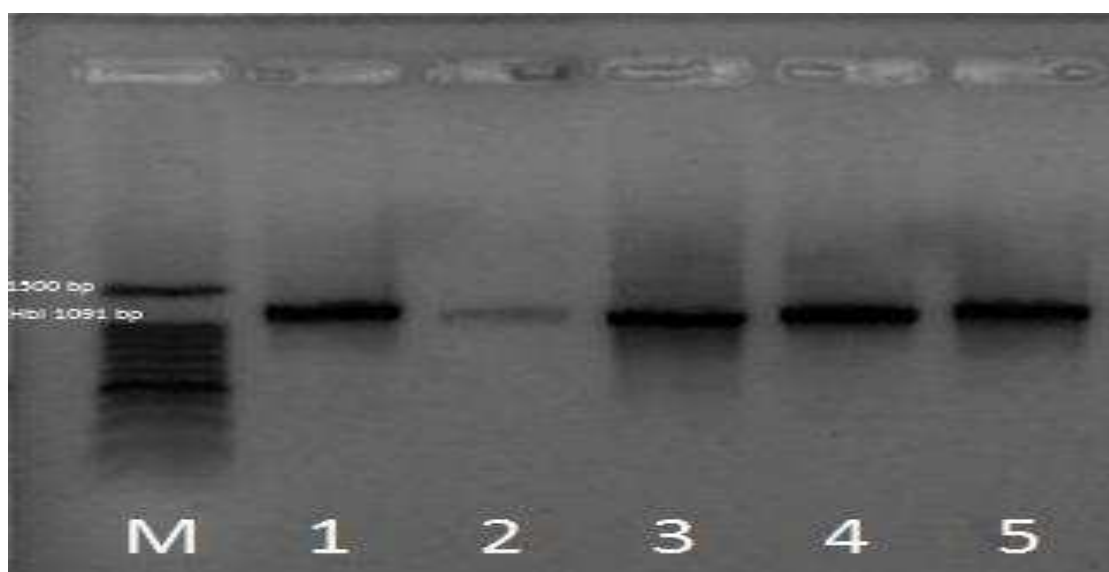


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a *PCR* do gene *hbl*. Linha M: marcador de 100 bp; linha 1, isolado de leite em pó; linha 2, isolado de leite pasteurizado; linha 3, isolado de leite UHT; linha 4, isolado de queijo tipo ricota; linha 5, isolado outros produtos.

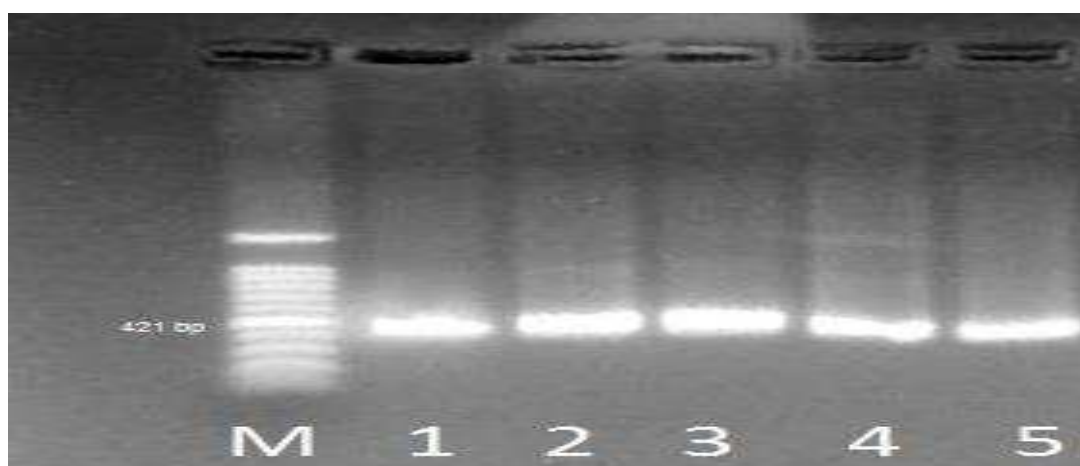


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1 % para a *PCR* do gene *cytk*. Linha M: marcador de 100 bp; linha 1, isolado de leite em pó; linha 2, isolado de leite pasteurizado; linha 3, isolado de leite UHT; linha 4, isolado de queijo tipo ricota; linha 5, isolado outros produtos.

Tabela 3: Perfis genéticos para os genes produtores de enterotoxina diarreica nos 69 isolados analisados.

Produto lácteos	Perfil genético			isolados
	(<i>nhe</i> ⁺ , <i>hbl</i> ⁺ , <i>cytk</i> ⁺)	(<i>nhe</i> ⁺ , <i>cytk</i> ⁺)	(<i>hbl</i> ⁺ , <i>cytk</i> ⁺)	
Leite em pó	11	8	-	19
Leite pasteurizado	20	9	1	30
Leite UHT	3	4	-	7
Queijo tipo ricota	3	7	-	10
outros	2	1	-	3
			Total	69

Para confirmação do resultado, o produto da PCR para cada um dos três genes produtores de toxina diarreica foi enviado para sequenciamento na empresa MACROGEN. Uma sequência do gene *nhe* de uma estirpe presente em cada um dos produtos analisados foi comparada com a sequência do gene *nhe* da estirpe *B. cereus* NVH 0075-95 GENBANK número DQ153257.1 apresentando similaridade de 99 % para este gene.

Para as sequências do gene *hbl* obtida neste trabalho, a similaridade foi de 99 % quando foi comparada com sequência do gene *hbl* GENBANK número AY786407.1. As sequências do gene *cytk* foram comparadas com a sequência da estirpe *B. cereus* NVH762-00 GENBANK número KP409135.1,

dando uma identidade de 98 %, comparação das sequências dos genes produtores de toxinas são apresentados na tabela 4. Estes resultados confirmam a amplificação destes genes pela técnica de *PCR*.

Tabela 4: Similaridade genética dos genes produtores de enterotoxinas amplificados na *PCR* comparados às sequências disponíveis no GenBank

Produto	Gene	Estirpe	Similaridade (✓)	Genbank
Leite em pó				
Leite UHT				
Leite pasteurizado	<i>Nhe</i>	<i>Bacillus cereus</i>	99	DQ153257.1
Queijo		NVH 0075-95		
Outros				
Leite em pó				
Leite UHT				
Leite pasteurizado	<i>Hbl</i>	<i>Bacillus cereus</i>	99	AY786407.1
Queijo				
Outros				
Leite em pó				
Leite UHT				
Leite pasteurizado	<i>Cytk</i>	<i>Bacillus cereus</i>	99	KP409135.1
Queijo		NVH 762-00		
Outros				

Upasana (2014) avaliou a presença dos genes produtores de enterotoxinas em 77 isolados de *B. cereus* de diversos alimentos, dos quais 63 (82 %) dos isolados foram positivos para o gene *nhe* e 54 (72 %) para o gene *hbl*. Outros trabalhos (MORAVEK et al., 2006, KIM et al., 2011) analisaram a presença e expressão dos genes *nhe* e *hbl* em 100 e 120 isolados de *B. cereus* de alimentos, ambientes e surtos de intoxicação alimentar. Eles determinaram valores de ocorrência para gene *hbl* de 42 % e 90 % e para o gene *nhe* de 99 % e 94,2 %, respectivamente. Já para produtos como leite pasteurizado, outros autores (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001, BARROS et al., 2001, ZHOU et al., 2008) relatam valores de prevalência para o gene *hbl* de 33, 40 e 50 % respectivamente. No Brasil, ARAGON-ALEGRO (2008) analisou isolados de diversos alimentos e encontraram valores de ocorrência para o gene *hbl* de

67,7 % em 105 isolados e 99,4 % para o gene *nhe* em 154 isolados. Neste trabalho não foi possível determinar a presença do gene *cytk* nestes produtos.

Para o queijo ricota, trabalho realizado por Fernandes e colaboradores (2014) analisou isolados provenientes tanto de queijo como superfícies procedente de uma planta de processamento de ricota em um laticínio no sul de Minas Gerais, e encontraram valores de ocorrência para os genes *nhe* e *hbl* de 92,9 % e 38,1 %, respectivamente. Existem poucos trabalhos que relatam valores de ocorrência do gene *cytk*. Alguns autores (ZHOU *et al.*, 2008, BARTOSZEWICZA *et al.*, 2008) relatam valores de 52,5 % de isolados com a presença do gene *cytk*, quando avaliaram diversos alimentos e 57 % em isolados coletados em indústrias processadoras de leite pasteurizado e de leite UHT, e fazenda de gado leiteiro, já para produtos como leite em pó e queijo ricota não existem dados de literatura.

Os valores de ocorrência para os genes *nhe* e *hbl* foram variáveis em nosso estudo dependendo do produto analisado (Tabela 5), mas a média do total dos produtos analisados foi de 99,3 % e 53,44 %, respectivamente, para cada gene. Estes valores estiveram de acordo com os documentados por outros pesquisadores, o que nos indica uma alta ocorrência destes genes em isolados provenientes de produtos lácteos podendo apresentar um potencial patogênico, sendo que em todos os isolados analisados foi possível detectar pelo menos um gene produtor de enterotoxinas.

Tabela 5: Ocorrência dos genes produtores de enterotoxinas dos isolados analisados em cada produto.

Produto analisado	Numero de amostras analisadas	Gene <i>nhe</i> %	Gene <i>hbl</i> %	Gene <i>cytk</i> %
Leite em pó	19	100	57,8	100
Leite pasteurizado	30	96,6	70,0	100
Queijo ricota	10	100	30,0	100
Leite UHT	7	100	42,8	100
Outros	3	100	66,6	100
Média		99,3	53,44	100

Com respeito a ocorrência do gene *cytk*, os valores encontrados em nosso trabalho superam os poucos valores relatados na literatura, o que pode ser devido ao tipo de produto analisado. É importante ressaltar que a toxina produzida por este gene é considerada de alta patogenicidade já que ela tem causado alguns casos de óbito, na França. A *cytk* é altamente tóxica para as células epiteliais intestinais humanas, mostrando atividade necrótica e hemolítica, além disso é capaz de formar poros em bicamadas lipídicas celulares (CASTIAUX et al., 2015). Por sua patogenicidade e alta prevalência em produtos lácteos, torna-se importante o estudo desta enterotoxina, já que pessoas de todas as faixas etárias são consumidores desses produtos, o que a tornaria um problema de saúde pública.

5.5. Determinação de produção das toxinas produtoras de síndrome diarreica

5.5.1. Comparação das sequências de proteínas obtidas a partir de tradução de sequências de ácidos nucleicos

Para determinação da produção de enterotoxinas, as sequências dos genes produtores de enterotoxinas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLAST. Este algoritmo compara as sequências de proteínas a partir da tradução de uma sequência de DNA. A sequência de proteína obtida para o gene *nhe* a partir da sequência de DNA amplificado apresentou 100 % de similaridade com a sequência GenBank número AIE79091.1, Figura 8. Para o gene *hbl*, a similaridade da proteína traduzida a partir do DNA amplificado foi de 99 %, quando comparada à sequência de proteína GenBank referência WP_000714431.1 Figura 9, e para o gene *cytk*, a similaridade entre as proteínas foi de 98 %, Figura 10, quando foi comparada com a proteína GenBank AKJ86786.1.

```

Isolados nhe      RAIQASHFL*LYPGABSLSLLKPHQQMIHFQS*HYLV**LLKRTDPLIKRLNLFFPLHHF
B. cereus nhe    RAIQASHFL*LYPGABSLSLLKPHQQMIHFQS*HYLV**LLKRTDPLIKRLNLFFPLHHF
*****

Isolados nhe      KPSGPNEYSS*SL*AFATA*TGACFTVLSAAYVWAGIMPPAVNTAISADRAITL*GFFVI
B. cereus nhe    KPSGPNEYSS*SL*AFATA*TGACFTVLSAAYVWAGIMPPAVNTAISADRAITL*GFFVI
*****

Isolados nhe      FLLSLYRYLFLMYFNVCNVI*FKLICLLIHFITYFFNLIEMFLK*TTICICAFFNIFLNLD
B. cereus nhe    FLLSLYRYLFLMYFNVCNVI*FKLICLLIHFITYFFNLIEMFLK*TTICICAFFNIFLNLD
*****

Isolados nhe      HIIV*NPPIR**RP*SCNLTWN*PCKATYLIENBCNLCRLCFSL
B. cereus nhe    HIIV*NPPIR**RP*SCNLTWN*PCKATYLIENBCNLCRLCFSL
*****

```

Figura 8: Alinhamento da sequência de proteínas da toxina *nhe*, traduzida a partir de DNA isolado de *Bacillus cereus* presente em vários produtos analisados.

```

Isolados hbl      EGINDLITTINTNSKEVTDVIKMLQDFKGGKLYQNSTDFKQNVGGPDGKGGGLTAILAGQQA
B. cereus hbl    EGINDLITTINTNSKEVTDVIKMLQDFKGGKLYQNSTDFKQNVGGPDGKGGGLTAILAGQQA
*****

Isolados hbl      TIPQLQABIDQLRSNQKHFDDVLAWSIGGGLGAILVIAAIGGAVVIVVTGGTATPAVV
B. cereus hbl    TIPQLQABIEQLRSTQKHFDDVLAWSIGGGLGAILVIAAIGGAVVIVVTGGTATPAVV
*****;****.*****

Isolados hbl      GGLSALGAAGIGLGTAAAGVTASKEMDSYNEISNKIGELSMKADRANQAVLSLTNAKETLA
B. cereus hbl    GGLSALGAAGIGLGTAAAGVTASKEMDSYNEISNKIGELSMKADRANQAVLSLTNAKETLA
*****

Isolados hbl      YLYQTVDAQAILSLTNIQKQWNTMGANYTDLLDNIDSMQDHKFSLIPDDLKAAKESWNDIH
B. cereus hbl    YLYQTVDAQAILSLTNIQKQWNTMGANYTDLLDNIDSMQDHKFSLIPDDLKAAKESWNDIH
*****

Isolados hbl      KDANFISKDIAFKQE
B. cereus hbl    KDANFISKDIAFKQE
*****

```

Figura 9: Alinhamento da sequência de proteínas da toxina *hbl*, traduzida a partir de DNA isolado de *Bacillus cereus* presente em vários produtos analisados.

```

B.cereus cytk      NNDQADNMTHSLKVTFFIDDPHADKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLR
CytK isolados     NNDQADNMTHSLKVTFFIDDPHADKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLR
*****

B.cereus cytk      YPSQYDVAFNLQONSARFFNWAPTNAVEBETTVTSSVSYQLGGSVKASVTPNGPSGEBAGAT
CytK isolados     YPSQYDVAFNLQOKSARFFNWAPTNAVEBETTVTSSVSYQLGGSVKASVTPNGPSGEBVAT
*****.*****.***

B.cereus cytk      GQ
CytK isolados     GQ
**

```

Figura 10: Alinhamento da sequência de proteínas da toxina *cytk*, traduzida a partir de DNA isolado de *Bacillus cereus* presente em vários produtos analisados.

5.5.2. Produção de enterotoxinas in vitro

Sessenta e oito (98 %) dos 69 isolados analisados apresentaram o gene *nhe* na análise de *PCR*. Este gene foi expresso nos 68 isolados com a produção de pelo menos 6 ng/mL da *nhe*, limite mínimo de detecção desta toxina na metodologia utilizada. Dos 69 isolados confirmados como *B. cereus* 40 (57 %) apresentam a amplificação do gene *hbl* pela técnica de *PCR*, destes em 30 (75 %) constatou-se a produção de pelo menos 20 ng/mL da toxina *hbl*, Figura 11. Dos 30 isolados nos quais foi constatada a produção da toxina *hbl* 5 foram coletados da leite em pó, 10 do leite pasteurizado, 8 do ricota, 4 do leite UHT e 3 da bebida láctea fermentada.



Figura 11: Determinação da produção das enterotoxinas, hemolisina BL e enterotoxina não hemolítica *nhe*, utilizando o kit *GLISA Duopath® Cereus Enterotoxins*.

Trabalho realizado por Guinebretiere e colaboradores (2002) determinou que o gene *hbl* pode ser expresso em 42 % até 73 % das estirpes envolvidas em caso de intoxicação alimentar e o gene *nhe* em 97-99 % das estirpes associadas à surtos, a expressão do gene *hbl* parece menos frequentes em isolados não-patogênicos. A expressão dos genes *nhe* ou *hbl* ocorre somente em algumas estirpes de *B. cereus*. Além disso, a expressão simultânea de ambas toxinas foi só documentada em algumas poucas estirpes (SASTALLA et al.,2013).

Trabalho realizado no Brasil por Reis e colaboradores (2013) analisou 63 isolados de *B. cereus* coletados a partir de 260 amostras de leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó, encontrando que 23 isolados possuíam os 3 genes para produção da enterotoxina *hbl*, dos quais 20 (86,9 %) demonstraram produção de toxinas.

Trabalho realizado por Montanhini e colaboradores (2015) avaliou a produção da enterotoxina *hbl* em 23 estirpes de *B. cereus* isolados de leite pasteurizado e leite em pó às temperaturas de 30 °C e 10 °C por 7 dias e observou que 39 % das estirpes foram capazes de produzir a toxina sob temperatura de refrigeração e 100 % à temperatura ambiente, o que indica que diversas estirpes podem ter níveis variáveis de produção de enterotoxina, de acordo com a temperatura de escotagem. A temperatura de refrigeração recomendada para armazenamento de produtos lácteos é de 7 °C ou menos. Mesmo assim, nas regiões tropicais como Brasil não é raro encontrar produtos armazenados à temperaturas acima do indicado, o que representa um perigo para a saúde do consumidor, dada a capacidade de produção de toxina a diferentes temperaturas.

A expressão destes genes de virulência em *B. cereus* é regulada por um sistema sensor de *quorum sensing* composto pelo ativador transcricional *PLCR* e o seu peptídeo de ativação *PAPR* (GOHAR et al.,2008). Em muitas bactérias patogênicas, a expressão de genes de motilidade e fatores de virulência são coordenadamente regulado em um *link*, o que parece existir em *B. cereus* e *B. thuringiensis*, que têm motilidade por flagelos peritríqueos. Por exemplo, em mutantes do *PLCR*, a motilidade reduziu e a transcrição dos

genes que codificam o *Hbl* e fosfatidilinositol-fosfolipase C específica decresceu (FAGERLUND et al.,2010).

De acordo com a classificação proposta por Guinebretière e colaboradores (2008), os isolados presentes em produtos lácteos comercializados em Viçosa se enquadram no Grupo III, considerado de elevada enterotoxigenidade e geralmente associado à síndrome diarreica (GUINEBRETIERE et al., 2010).

6. CONCLUSÃO

A partir das análises microbiológicas realizadas, foi constatada a ocorrência de *B. cereus* em todos os produtos lácteos avaliados. Na maior parte dos produtos, os valores de contagens obtidos não apresentam risco para a saúde e estão aptos para o consumo humano alguns autores afirmam que contagens acima de 10^4 até 10^9 UFC/g podem originar a produção de toxinas o que tornaria produtos com estas contagens perigosos para a saúde. A exceção foi o queijo ricota que em algumas amostras atingiu valores de contagem relativamente altos, cerca de 10^5 UFC/g, que podem apresentar riscos para a saúde humana.

Nas análises de identificação molecular do micro-organismo, pôde-se constatar a presença de três estirpes diferentes nos produtos analisados, sendo predominante a estirpe *B. cereus* KAVK4 em todos os produtos, o que sugere uma melhor adaptação desta estirpe para sobreviver nestes tipo de produtos analisados, máquinas e equipamentos e ambientes de produção.

Em todos os isolados analisados foram encontrados pelo menos um dos genes produtores de enterotoxinas diarreica. Estes resultados sugerem que dependendo das condições de comercialização e estocagem, em particular a temperatura inadequadas de refrigeração, populações de *B. cereus* presentes dos diversos produtos lácteos podem se multiplicar até atingir números suficientes para iniciar a produção de toxinas, tornando estes produtos perigosos para o consumo humano.

7. BIBLIOGRAFIA

AHMED, A.H., MOUSTAFA, M.K., MARTH, E.M. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **Journal Food Protection**, v.46, p.126- 128, 1983.

APHA. Compendium methods for microbiological examination of foods. 5. Ed. American Public Health Association (**APHA**) cap. 32, 2005., p. 311-316.

ARAGON-ALEGRO, L.C., PALCICH, G., VOLZ, L. G., BUCCELLI, R. V., LANDGRAF, M., DESTRO, M.T. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. **Journal of Food Protection**, n. 10, p. 2115-2118, 2008.

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

BAHOUT, A. A. Prevalence of *Bacillus* species in UHT milk. **Assiut Veterinay Medical Journal**, v.42, n.84, p.47-53, 2000.

BARROS. V. R. M. PANETTA. J. C., MIGUEL. O. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na Capital do Estado de São Paulo, Brasil - 1987/1988. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 1, 2001.

BARTOSZEWICZA, M., HANSEN, B. M., SWIECICKA, I. The members of *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**. v. 25 p. 588–596, 2008.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, p. 382–398, 2010.

BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; TWEDT, R. M. Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 943-945, 1975.

BRASIL, RDC 12. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2 de janeiro de 2001, Brasília, 2001

BROUSSOLLE, V., GAUILLARD, F., NGUYEN-THE, C., CARLIN, F. Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the *Bacillus cereus* group. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1081–1090, 2008.

BRUCE, J. automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. **Food technology**, p. 77-81, 1996.

CARLIN, F.; BRILLARD, J.; BROUSSOLLE, V.; CLAVEL, T.; DUPOUR, C.; JOBIN, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; SOROKINE, A.; NGUYEN-THE, C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous world wide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Research International**, v43. p. 1885-1894, 2010.

CASTIAUX, V., LIU, X., DELBRASSINNE, L., MAHILLON, J. Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin?. **International Journal of Food Microbiology**, v.211, p.79–85, 2015.

DUFRENNE, J., BIJWAARD, M., GIFFEL, M., BEUMER, R., NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophics *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27 p. 175-183, 1995.

EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHAN, A.; BERGE, O.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. **Microbiology Letters** v. 260, p. 232–240, 2006.

ELHARIRY, H. M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce, **Food Microbiology** v. 28, n. 7, p. 1266–1274, 2011.

ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP**. Campinas, 2006. 97p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, E. F. V. M. High pressure processing of milk: Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38–70 °C. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 141–148, 2015.

FAGERLUND, A., LINDBÄCK, T., GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* cytotoxins *Hbl*, *Nhe* and *CytK* are secreted via the Sec translocation pathway. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 304, 2010.

FERNANDES, S. M., FUJIMOTO, G., SCHNEID, I., KABUKI, D. Y., KUAYE, A. Y. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. **International Dairy Journal**, v.38, p.16-23, 2014.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco B. D. G. M.; **Microbiologia dos alimentos**: Atheneu. Cap. 4, p. 41-43. 2006.

FRANK, J. A., REICH, C. I., SHARMA, S., WEISBAUM, J. S., WILSON, B. A., OLSEN, G. J. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial *16S rRNA* Genes. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, p. 2461–2470, 2008.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, p. 1245-1248. 2004

GOHAR, M., FAEGRI, K., PERCHAT, S., RAVNUM, S., ØKSTAD, O.A., GOMINET, M., KOLSTØ, A.B., LERECLUS, D. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. **PLoS One**, v.3 p.2793, 2008.

GRANUM, P. E., O'SULLIVAN, K., LUND, T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. Federation of European Microbiological Societies **Microbiology Letters**, v. 177, p. 225-229, 1999.

GUINEBRETIERE, M. H., BROUSSOLLE, V., NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 3053–3056, 2002.

GUINEBRETIERE, M.H., THOMPSON, F.L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V.,

NGUYEN-THE, C., HEYNDRIKX, M., DE VOS. P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology** v.10, p. 851–865, 2008.

GUINEBRETIERE, M.H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., DEBUYSER, M.L., NGUYEN-THE, C. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. **Journal of Clinical Microbiology** v.48, p.3388–3391, 2010.

HANSEN, B.M., HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied Environmental Microbiology** v. 67, p.185–189, 2001.

JEßBERGER, N., DIETRICH, R., BOCK, S., DIDIER, A., MÄRTLBAUER, E. (2014). *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. **Toxicon** v.77, p.49–57, 2014.

JENSEN, G. B.; FISHER, N.; SPARSO, T.; ANDRUP, L. The possibility of discriminating within the *Bacillus cereus* group using *gyrB* sequencing and PCR-RFLP. *International Journal of Food Microbiology*, v.104, p.113–120, 2005.

JOHNSON, K. M., NELSON, C. L., BUSTA, F. F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrhea strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n.1, p. 286-287, 1983.

KIM, J. B., KIM, J. M., CHO, S. H., OH, S. H., , CHOI, N. J., OH, D.H. Toxin Genes Profiles and Toxin Production Ability of *Bacillus cereus* Isolated from Clinical and Food Samples. **Journal of Food Science**, v.76, n.1, 2011.

KORIM, S. L. C.; CARMO, P. A. Aspectos higiênicos sanitários do leite na alimentação humana com ênfases nos aspectos microbiológicos. São João do rio preto, SP, UNIVERSIDADE CASTELO BRANCO, 2008, 36p. Monografia (Especialista em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco, 2008.

KUMARI, S., SARKAR, P. K. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group from various marketed dairy products in India. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p. 483-497, 2014.

LEDENBACH, L. H., MARSHALL, R. T. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, **Food Microbiology and Food Safety**, p. 41-67, 2009.

LINDBÄCK, T., GRANUM, P.E. Detection and Purification of *Bacillus cereus* Enterotoxins. **Protocol Food-Borne Pathogens**, v. 21, p. 15-26, 2006.

MALEK, F., BOUDJEMAA, B. M., AOUAR-MÉTRI, A., KIHAL, M. Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. **Dairy Science & Technology**, v. 93, p.73-82, 2013

MAZAS, M., MARTINEZ, S. LOPEZ, M. ALVAREZ, A. B., MARTIN, R.. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by solutes used to control water activity of the heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 61-67, 1999

MAZIERO, M. T., BERSOT, L. S. *BACILLUS CEREUS* EM PRODUTOS LÁCTEOS – UMA REVISÃO. **Revista do Instituto de Laticínios**. “Cândido Tostes”, n. 381, v. 66, p. 5-12, 2011.

MONTANHINI, M.T.M., MONTANHINI NETO, R., BERSOT, I. Enterotoxigenic potential of *Bacillus cereus* strains isolated from dairy products at different incubation temperatures. **International Food Research Journal** v. 22, p. 1315-1317, 2015.

MORAVEK, M., DIETRICH, R., BUERK, C., BROUSSOLLE, V., GUINEBRETIERE, M. H., GRANUM, P. E., NGUYEN-THE, C., MARTLBAUER, E. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiology Letters** v. 257 p. 293–298, 2006.

O’CONNELL. A., RUEGG. P., L.,GLEESON. D. Farm management factors associated with the *Bacillus cereus* count in bulk tank milk. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 52, p. 229–241, 2013.

OH, M. H., HAM, J. S., COX, J. M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 1-8, 2012.

OMBUI, N. J. et al. Direct detection of *Bacillus cereus* enterotoxin genes in food by multiplex Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Integrative Biology. IJIB**, v.2, p.172, 2008.

Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp* in foodstuffs. **The EFSA Journal**. v.175, p.1-48, 2005.

REIS, A. L. S., MAIKE, T.M., MONTANHINI, J. V.M., BITTENCOURT , M. T. D., BERSOT, L. S. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 44, p. 1195-1198, 2013.

REYES. J. E., BASTIAS. J., GUTIERREZ, M. M.R., RODRIGUEZ. M. O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. **Food Microbiology**, v. 24, p. 1–6, 2007.

REZENDE-LAGO, N.C.M., ROSSI, O. D, VIDAL-MARTINS, A.M.C., AMARAL, L.A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.59, n.6, p.1563-1569, 2007.

RYU, J. H., BEUCHAT, L.R. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of Food Protection**, n.12, p. 2502-2720, 2005.

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 raw milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automed ribotyping. **Food Control**, v.20, p.439-442, 2009.

SASTALLA, I., FATTAH, R., COPPAGE, N., NANDY, P., CROWN, D., POMERANTSEV, A.P., LEPLA, S. H. The *Bacillus cereus Hbl* and *Nhe* Tripartite Enterotoxin Components Assemble Sequentially on the Surface of Target Cells and Are Not Interchangeable. **PLoS ONE** v. 8, 2013.

SCHOENI, J. L., LEE WONG, A. C. *Bacillus cereus* Food Poisoning and Its Toxins. **Journal of Food Protection**, n.3, p. 448-648, 2005.

SHAHEEN, R. (2009) *Bacillus cereus* Spores and Cereulide in Food-Borne Illness. Academic Dissertation in Microbiology. Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Faculty of Agriculture and Forestry University of Helsinki.

SCHMIDT, V.S., KAUFMANN, V., KULOZIK, U., SCHERER, S., WENNING, M. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 1-9, 2012.

SVENSSON, B., EKELUND, K., OGURA, H., CHRISTIANSSON, A. Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 17-27, 2004.

UPASANA. H. Enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Spores in U.S. retail Spices. *Masters Theses May 2014-current*. Paper 153. 2014.

U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (“**Bad Bug Book**”) <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>.

VIDAL, A. M. C., ROSSI, O. D. J., ABREU, I. L., BÜRGER, K. P., CARDOSO, M. V., GONÇALVES, A. C. S., ROSSI, G. A. M., D’ABREU, L. F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, Manta maria, v. 46, n.2, p. 286-292, 2015.

WATANUKI, M. M. Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura. Piracicaba, SP: USP, 2008, 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo, 2008.

WANG, O. K. Kinetics of death of bacterial spores at elevated temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 12, n.1, p. 451-454, 1994.

WATANUKI, M. M., GALLO, C. R. Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3. 2008.

WONG, H. C., CHANG, M.H., FAN, J.Y. Incidence and Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Contaminating Dairy Products. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 699-702, 1988.

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**, v.121, p.195–200, 2008.