

JORGE MARIO OLIVAR BARRETO

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Bacillus cereus* ISOLADO NA CADEIA
PRODUTIVA DO LEITE NA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA, MINAS
GERAIS**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48f
2012

Olivar Barreto, Jorge Mario, 1982-

Fatores de virulência de *Bacillus cereus* isolado na cadeia produtiva do leite na microrregião de Viçosa, Minas Gerais / Jorge Mario Olivar Barreto. – Viçosa, MG, 2012.
vii, 52f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 45-52

1. Leite - Contaminação. 2. Leite - Análise.
3. *Bacillus cereus*. 4. Enterotoxinas. 5. Genética molecular.
6. Regulação de expressão gênica. 7. Sequenciamento de nucleotídeo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 637.127

JORGE MARIO OLIVAR BARRETO

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Bacillus cereus* ISOLADO NA CADEIA
PRODUTIVA DO LEITE NA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA, MINAS
GERAIS**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de fevereiro 2012.

Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo
(Coorientador)

Ana Clarissa dos Santos Pires
(Coorientadora)

Antonio Fernandes de Carvalho

Ítalo Tuler Perrone

Nélio Jose de Andrade
(Orientador)

Dedico

Aos meus pais Ramiro e Beatriz

A minha avó Judith

A minha namorada Adriana

Aos meus amigos pelo apoio

AGRADECIMENTOS

A meus pais Ramiro e Beatriz, pelo amor, pela força e pela paciência.

A minha namorada Adriana, pela paciência e amor.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Professor Nélio José de Andrade, pela amizade, orientação, confiança, pelo apoio e ensinamentos proporcionados.

Ao Professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, pela amizade, pelos ensinamentos e por permitir realizar minha pesquisa em seu laboratório.

Ao todos meus amigos e familiares pela confiança e apoio.

BIOGRAFIA

JORGE MARIO OLIVAR BARRETO, filho de RAMIRO OLIVAR GARCIA E BEATRIZ BARRETO GOMEZ, nasceu no Líbano, Tolima, Colômbia, em 7 de abril de 1982.

Em fevereiro de 2002, iniciou o curso de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade do Tolima, Colômbia, graduando-se em dezembro de 2008.

No ano 2009, ingressou no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em 3 de fevereiro de 2012.

SUMARIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Bacillus cereus</i>	4
2.1.1. Síndrome Diarréica.....	6
2.1.2. Síndrome Emética	6
2.2. Técnicas Moleculares	6
2.3. Classificação Taxonômica	7
2.4. Identificação de Estirpes de <i>B. cereus</i> Mediante o Uso do Gene <i>gyrB</i> 11	
2.5. Fatores de Virulência de <i>Bacillus cereus</i>	12
2.6. Enterotoxina Diarréica Hemolítica (<i>HBL</i>)	13
2.7. Enterotoxina Diarréica Não Hemolítica (<i>NHE</i>)	15
2.8. Citotoxina K (<i>CytK</i>)	17
2.9. Regulação Das Toxinas.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Análise da Contaminação por <i>B. cereus</i> em Leite Cru, Superfícies e Ambientes.....	20
3.1.1. Amostras	20
3.1.2. Análises no Leite Cru	22
3.1.3. Amostras de Superfícies, Manipuladores e Ambientes	23
3.2. Identificação de Fatores de Virulência de Isolados de <i>B. cereus</i>	24
3.2.1. Extração de DNA.....	24
3.2.2. Identificação Genética dos Isolados usando o Gene <i>gyrB</i>	25

3.2.3. Digestão Enzimática.....	25
3.2.4. Detecção dos Genes <i>NHE</i> e <i>CytK</i> nos Isolados de <i>B. cereus</i>	26
3.3. Sequenciamento do Produto Amplificado no PCR	27
3.3.1. Purificação do DNA	27
3.3.2. Sequenciamento do DNA	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Análises de Contaminação do Leite Cru e de Superfícies por <i>Bacillus sp.</i>	28
4.2. Análises de Contaminação do Leite Cru e de Superfícies por <i>Bacillus cereus</i>	31
4.3. Identificação Genética de Estirpes de Usando o Gene <i>gryB</i>	32
4.4. Pesquisa de Fatores de Virulência nos Isolados de <i>B. cereus</i>	35
4.4.1. Identificação do Gene que Codifica a Enterotoxina Não Hemolítica (<i>NHE</i>)	35
4.4.2. Identificação do gene da citotoxina K (<i>CytK</i>)	38
4.5. Sequenciamento do DNA dos isolados de <i>Bacillus cereus</i> positivos para citotoxina K (<i>CytK</i>)	40
3.6. Tradução do sequenciamento de DNA para a composição em aminoácidos da <i>CytK</i> de isolados de <i>Bacillus cereus</i>	41
3.7. Sequenciamento do DNA dos isolados de <i>Bacillus cereus</i> positivos para enterotoxina não hemolítica (<i>NHE</i>).....	42
4. CONCLUSÕES.....	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

OLIVAR BARRETO, Jorge Mario, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Fatores de virulência de *Bacillus cereus* isolado na cadeia produtiva do leite na microrregião de Viçosa, Minas Gerais.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo e Ana Clarissa dos Santos Pires.

A ocorrência de *Bacillus cereus* na cadeia produtiva do leite cru e de fatores de virulência associados a intoxicação diarréica foi avaliada em dois sistemas de produção, um tecnificado e outro, não. Inicialmente o isolamento do microorganismo foi feito no meio seletivo MYP (*Manitol-Egg Yolk-Polymyxin*), em tanques de armazenamento de leite, latão de leite, mão de ordenhador, teteiras, ar do ambiente e em amostras de água e de leite. Um total de 116 isolados de *Bacillus spp.* apresentavam atividade de lecitinase e não fermentavam manitol e foram submetidas à prova morfotintorial de coloração de Gram e às provas bioquímicas. Dos 116 isolados, 32 apresentaram resultado característico de *B. cereus* nas provas realizadas e foram submetidas aos testes de biologia molecular. Os 32 isolados foram submetidos a análises de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a detecção do gene *gyrB*. Em todos os isolados foi amplificado um produto de 352pb que após digestão utilizando a enzima de restrição *RsaI* apresentaram tamanhos de aproximadamente 250pb, resultados que de acordo com a literatura confirmam serem isolados de *Bacillus cereus*. Na análise dos fatores de virulência, em 15 isolados (47%) foram amplificados fragmentos de DNA de 761pb, indicando a ocorrência do gene produtor da toxina não-hemolítica (*NHE*). Também, foram encontrados em 7 (22%) dos 32 isolados fragmentos de DNA de 421pb, demonstrando a presença do gene que codifica a citotoxina K (*CytK*). *Bacillus cereus* NHE e, ou, *CytK* positivos foram isolados em todas as fontes de contaminação avaliadas em ambos os sistemas de produção de leite, embora houvesse uma maior prevalência do gene *NHE*. A análise de 14 isolados positivos para *NHE* ou *CytK* apresentaram sequências de genes conservadas semelhante à do *Bacillus cereus* ATCC 14579 usada como referência, indicando que esses isolados apresentam potencial patogênico.

ABSTRACT

OLIVAR BARRETO, Jorge Mario, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Virulence factors of *Bacillus cereus* isolated in milk production chain in the microregion of Viçosa, Minas Gerais.** Advisor: Nelio José de Andrade. Co-Advisors: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and Ana Clarissa dos Santos Pires.

The occurrence of *Bacillus cereus* in the production chain of raw milk and virulence factors associated with diarrheal toxicity was evaluated in two production systems, one technified another one no- technified. Initially, the micro-organism was isolate in selective medium MYP (*Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin*) from storage tanks of milk, churn, hand milker, air and water and milk samples. One hundred and sixteen isolates of *Bacillus spp.* showed lecithinase activity and not fermented mannitol and were submitted to Gram stain and biochemical tests. Of the 116 isolates, 32 showed results characteristic of *B. cereus* in the tests performed and were subjected to molecular biology tests. The 32 isolates were subjected to analysis of PCR (*Polymerase Chain Reaction*) to detect the *gyrB* gene. In all isolates was amplified a 352pb product that after digestion using the restriction enzyme *RsaI* and had sizes of approximately 250pb. According to the literature data, they are identified as *Bacillus cereus*. In the analysis of virulence factors, in 15 isolates (47%) were amplified segments of DNA from 761pb, indicating the occurrence of toxin producing gene non-hemolytic (*NHE*). Also, it were found in 7 (22%) of 32 isolates segments of DNA of 421 pb, demonstrating the presence of the gene encoding citotoxin K (*CytK*). *Bacillus cereus NHE* and, or, *CytK* positives were isolated from all sources of contamination evaluated in both systems of milk production, although there was a higher prevalence of the *NHE* gene. Analysis of 14 isolates positive for *NHE* or *CytK* genes showed conserved sequences similar to that of *Bacillus cereus* ATCC 14579 used as a reference, indicating that these isolates have the potential pathogenic.

1. INTRODUÇÃO

A leite é definida como a secreção das glândulas mamárias dos mamíferos , sua principal função natural é a nutrição dos jovens. O leite contém lactose, triacilgliceróis e outros lipídios, em estruturas globulares estabilizadas por uma membrana protéica, e partículas compostas de um grupo de fosfoproteínas conhecidas como caseínas, além de algumas proteínas globulares na fração aquosa. Sua composição oferece condições excelentes para a multiplicação de micro-organismos, em curto espaço de tempo.

A contaminação microbiana do leite cru é influenciada pela saúde dos animais, pela higiene do ambientes onde os animais são ordenhados e alojados, pelos métodos de preparo da úbere e técnica de ordenha, métodos de limpeza e higienização de ordenhadeiras e cisternas de leite, pela velocidade de resfriamento do leite para uma temperatura apropriada e tempo de armazenamento do leite que deve ser de no máximo de 7 ° C por 3 h em tanque de expansão e 10 ° C por 3 h em imersão

A contaminação do leite com *Bacillus cereus* presente no ambiente de ordenha é muito comum, e dependendo do número desses contaminantes, pode originar surtos de doenças e alterações tecnológicas nas características físico-químicas, afetando inocuidade e qualidade dos produtos lácteos durante a cadeia produtiva.

A produção de proteases e lípases termorresistentes por *B. cereus* particularmente por estirpes psicrotróficas pode afetar negativamente a qualidade dos produtos lácteos, causando o aparecimento de alteração na textura e a ocorrência sabores e odores indesejáveis. A atividade lipolíticas das lípases produzidas por *B. cereus* em queijos, podem causar a hidrólises da gordura com liberação de ácidos graxos com formação principalmente de ácido butírico o qual confere sabor saponificado ao produto, em leite UHT, a ação de lipases gera alterações sensoriais, como sabores rançoso e amargo. A

degradação da caseína do leite pela ação da protease produzida por *B. cereus* libera peptídeos de baixo peso molecular que podem causar a formação de sabores indesejáveis no leite. Esta proteólise provoca uma redução de 4,15% no teor de nitrogênio da caseína com relação a proteína total do leite. A proteólise do leite UHT durante a estocagem em temperatura ambiente é o principal limitante de seu prazo de validade, associada a alterações na sua textura.

Bacillus cereus é causador de doenças nas formas emética e diarreica. Na forma emética, a toxina preformada no alimento por *B. cereus* é consumida, provoca vômito e diarreia como síndromes da intoxicação alimentar. A síndrome diarreica é devido ao consumo de esporos termoresistentes os quais produzem a hemolisina (*HBL*), uma enterotoxina não hemolítica (*NHE*) e uma citotoxina K (*CytK*).

O objetivo principal dessa pesquisa foi determinar a ocorrência de *B. cereus* em sistemas não-tecnificado e tecnificado de produção de leite na região de Viçosa, Minas Gerais.

Os objetivos específicos deste trabalho foram a identificação da ocorrência de genes que codificam a produção da enterotoxina não-hemolítica (*NHE*) e da citotoxina K (*CytK*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O leite em natura é considerado alimento rico em componentes nutritivos, constituindo-se em ótimo meio de cultura para vários micro-organismos. Quando obtido ou processado em más condições higiênico-sanitárias, pode tornar-se importante veículo de transmissão de micro-organismos patogênicos ao homem (MARTINS et al., 2005)

A higiene e o controle durante as etapas de processamento do leite e produtos lácteos têm como objetivo básico assegurar sua inocuidade ao consumidor. A contaminação com certos micro-organismos e/ou suas toxinas, constituem as causas mais frequentes de problemas sanitários, além das perdas econômicas. A implementação da estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se no Brasil, na década de 90, sendo regulamentada pelo Ministério da Agricultura em 2002 (Instrução Normativa 51) e alterada no ano 2011, pela Instrução Normativa 62, a qual prevê novos valores para Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS). Esta prática reduz os custos operacionais de produção, incluindo a deterioração do leite por atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Porém, pode ocasionar problemas tecnológicos associados à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas de bactérias.

Muitas destas enzimas são termorresistentes e estão relacionadas às perdas de qualidade e à redução da vida de prateleira do leite UHT e de outros produtos lácteos (KORIM; CARMO, 2008)

2.1. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um micro-organismo oportunista que causa doenças gastrointestinais que se manifestam em duas síndromes: diarréica ou emética. A maioria das estirpes que causam a doença na forma emética é similar a outros patógenos específicos deste grupo e apresentam uma linhagem evolutiva única de estirpes intimamente relacionadas. Duas enterotoxinas hemolisina BL (*HBL*) e não hemolítica enterotoxina (*NHE*) são geralmente consideradas como os principais fatores da síndrome diarréica na intoxicação alimentar, outros fatores como a atividade da fosfolipase também são importantes.

Micro-organismos psicrotróficos formadores de esporos pertencentes ao gênero *Bacillus* são contaminantes comuns de leite cru. O leite torna-se contaminado por esporos de *B. cereus* em sistemas tecnificados e tradicionais, por causa, na maioria das vezes, do solo, da alimentação do gado, do tipo de ordenha, dos equipamentos ou do úbere durante a ordenha. No entanto, *B. cereus* também pode estar presente no leite de vaca como um resultado de mastite. Trabalhando na Escócia, Griffiths e Phillips (1990) encontraram *Bacillus spp* psicrotróficos em 58% da oferta de leite cru. Além disso, 39% dos isolados foram identificados como *B. cereus*, a maioria dos quais produziam toxina diarréica. Mais recentemente Scheldeman et al., (2005) avaliaram a presença de esporos de *Bacillus spp* em 17 fazendas na Bélgica e observaram contagens de esporos em leite cru de 10^0 até 10^3 UFC·mL⁻¹ nos meses de inverno. Quando as vacas encontram-se em estabulação.

A presença de esporos de *B. cereus* no leite cru, como consequência de condições higiênicas insatisfatórias no processo de ordenha, e sua resistência ao processo pasteurização pode causar a formação biofilmes nas superfícies dos equipamentos da linha de processamento. Uma vez que os micro-organismos estejam aderidos ou formem biofilmes nos equipamentos, haverá

resistência à remoção pelos procedimentos normais de higienização causando perdas econômicas.

A deterioração de origem microbiana é a causa mais comum de perdas de produtos e pode manifestar-se visivelmente, com formação de colônias bacterianas, mudanças de textura do alimento por degradação de seus componentes ou odores e sabores indesejáveis (GRAM et al., 2002).

A perda de produtos devido à deterioração microbiana representa um grande problema para o mercado de laticínios e acarreta grandes prejuízos econômicos. A utilização de leite de baixa qualidade microbiológica pela indústria também tem implicações tecnológicas relevantes, que apresenta como consequências perdas econômica e riscos à saúde do consumidor.

Muitos pesquisadores acreditam que a contaminação do leite pasteurizado por *Bacillus* spp resulta da sobrevivência de esporos que estariam presentes no leite *in natura*. Outros autores mencionaram que a contagem de esporos em amostras de leite pasteurizado pode ser maior do que em amostras de leite cru. Isso pode ser devido à contaminação com esporos do equipamento, em virtude das falhas de higienização nas usinas que podem originar processos de adesão e biofilmes na superfícies de equipamentos . As bactérias esporulantes estão presentes usualmente em pequeno número, quando o leite é ordenhado em boas condições sanitárias. Trabalhos realizados no Brasil por Rezende et al., (2000) analisaram 120 amostras de leite UHT na região de Ribeirão Preto, SP, encontrando *Bacillus cereus* em 34,1 % das amostras analisadas. Zacarchenco et al. (2000) analisaram 100 amostras de leite UHT provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, processadas pelo método de injeção direta e indireta de vapor e verificaram que 22% das amostras processadas pelo sistema direto e 71,4% pelo indireto apresentavam *Bacillus sp*

2.1.1. Síndrome Diarréica

Esta síndrome geralmente apresenta desenvolvimento de sintomas entre 8-16 h após exposição da toxina, mas a sintomatologia parece ser mais comum na faixa de 12-13 h após exposição, com uma duração de 6-12 horas. Os sintomas consistem em náuseas, dores abdominais e fezes aquosas, não apresenta febre. A similaridade entre esta síndrome e a toxinfecção alimentar causada *Clostridium perfringens* tem sido notada. (JAY et al., 2005). As enzimas proteolíticas e pH do trato gastrointestinal intestinal digerem este tipo de enterotoxinas que são pré-formadas nos alimentos. (JÄÄSKELÄINEN, 2008)

2.1.2. Síndrome Emética

Esta forma de intoxicação alimentar causada por *B. cereus* é mais grave e aguda do que a síndrome diarréica. O período de incubação varia de 1-6 h, sendo mais comum entre 2- 5 h após exposição. Esta síndrome comumente se encontra associada ao consumo de arroz, massas e macarrão. A dose de toxina emética foi estimada em 30 µg por kg de peso corporal. A toxina fixa-se nos receptores (5-HT₃) do nervo vago do estômago induzindo o vômito (BHUNIA, 2007). A síndrome emética apresenta semelhança com a intoxicação alimentar estafilocócica. O número necessário para causar esta síndrome parece ser superiores aos da síndrome diarréica com valores tão altos quanto como $2 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ (JAY et al., 2005)

2.2. Técnicas Moleculares

Metodologias microbiológicas tradicionais para o rastreamento e identificação desses micro-organismos podem, no entanto, levar vários dias

para a obtenção de resultados. As análises convencionais nem sempre suprem as necessidades da indústria, que necessita de uma identificação rápida da fonte de contaminação para a tomada de decisão no seu programa de controle de qualidade.

No início da década de 1980, uma variedade de técnicas moleculares foi desenvolvida em laboratórios de pesquisa para análises do DNA e exploração gênica. O rastreamento de reservatórios de micro-organismos contaminantes, no ambiente de processamento, requer a capacidade de diferenciar estirpes bacterianas, com maior agilidade. (RALYEA et al., 1998).

Dentre as técnicas desenvolvidas, a da reação em cadeia da DNA polimerase (*polymerase chain reaction*) permite o isolamento e identificação de ampla gama de bactérias, incluindo aquelas para as quais métodos de isolamento em laboratório ainda não foram desenvolvidos.

Entre as técnicas de biologia molecular e genéticas aprovados por a EPA (United States Environmental Protection Agency) no ano 2009 para a identificação da diversidade em micro-organismos podemos mencionar as seguintes: Nested PCR, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), PLFA (*Phospholipids Fatty Acid*), RFLP (*Restriction Length Polymorphism*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*)

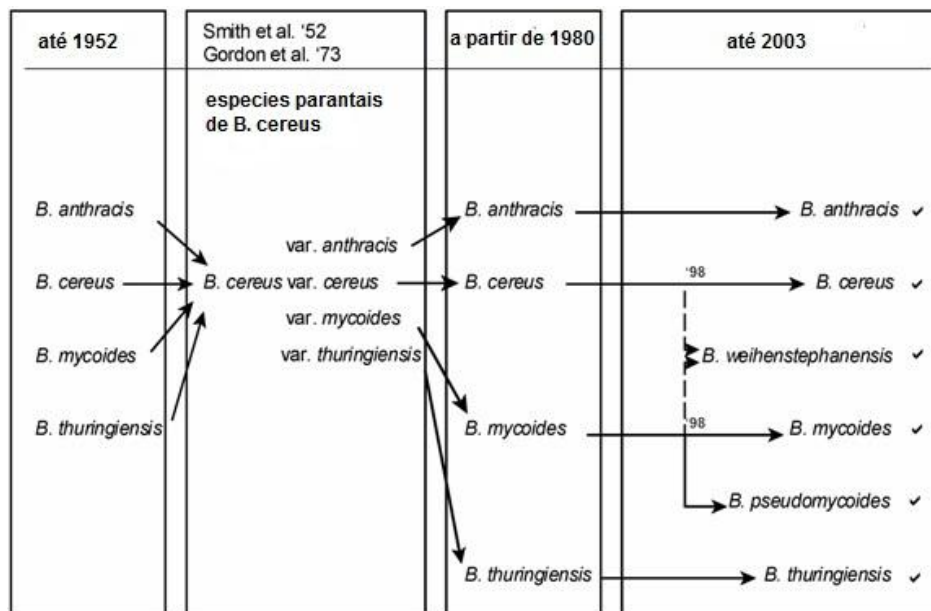
2.3. Classificação Taxonômica

Ao longo do tempo, o gênero *Bacillus* foi submetido a consideráveis mudanças taxonômicas. Começando com duas importantes espécies formadoras de endósporos, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, o número de espécies atribuídos a este gênero aumentou para 146 até o ano 1939. Minuciosos estudos comparativos de Smith et al. (1952) e Gordon et al. (1973), (citados por VILAS-BÔAS et al., 2007) reduziram o número de 1.114 estirpes de bactérias aeróbicas formadoras de endósporos, para 22 espécies bem

definidas. Um novo ponto de partida geral para a taxonomia bacteriana ocorreu em 1980. Aqui, 38 espécies de bactérias aeróbias formadoras de esporos (AEFB) foram listadas, das quais 31 foram atribuídas ao gênero *Bacillus* e sete de outros gêneros formadoras de endósporos (FRITZE, 2004)

Hoje a classificação taxonômica dos micro-organismos fundamenta-se em características clássicas (morfologia, fisiologia, metabolismo e características ecológicas) e em características moleculares, como composição de ácidos nucleicos, estudos de hibridação, e sequenciamento de ácidos nucleicos, sequenciamento de aminoácidos (PRESCOTT et al., 2008).

Na década de 1970, surgiram técnicas de biologia molecular que começaram então a ser utilizadas para a classificação; o método padrão utilizado inicialmente consistia na hibridação DNA-DNA. Atualmente, além da hibridação DNA-DNA, utiliza-se como critério de classificação taxonômica bacteriana a variação de nucleotídeos no DNA ribossomal (rDNA) 16S. (VILAS-BÔAS et al., 2007). A Figura 1 ilustra a classificação taxonômica utilizada atualmente.



fonte: FRITZE, 2004

Figura 1 - Taxonomia de *Bacillus cereus* ao longo do tempo.

Bacillus cereus, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, e *Bacillus thuringiensis* foram descritos inicialmente dentro do gênero *Bacillus*, com base simplesmente de critérios fenotípicos. *B. anthracis* foi descrito em relação à patogênese da doença do antrax, *B. cereus* foi descrito como um micro-organismo comumente associado com cereais, e o *B. mycoides* foi descrito com base no crescimento rizóide que exibem suas colônias durante o crescimento em meio nutriente. Posteriormente, *B. thuringiensis* foi descrito com base na produção de cristais de proteína paraesporal associado a controle biológico de pragas.

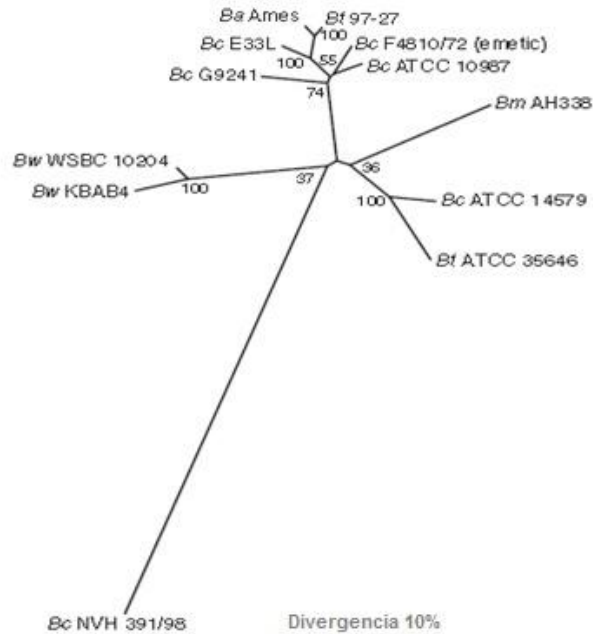
O surgimento das técnicas de hibridização, 16S rDNA e *Multi Locus Sequence Typing* revelou progressivamente um alto relacionamento entre espécies. Além disso, o grande crescimento da base de dados genômicos, fundamentada em sequenciamento do DNA de espécies de ambientes, resultou em uma nova estruturação ecológica e evolutiva, onde a classificação das sequências do DNA de *Bacillus* é definida com base nas necessidades específicas para a multiplicação da espécie. (MAUGHAN; AUWERA. 2011)

A estirpe NVH391-98 de *Bacillus cereus*, considerada rara, foi isolada de um surto particularmente grave de intoxicação alimentar, em que foram relatados três casos fatais. Nesse surto, foi detectada a citotoxina K que é importante por seu potencial patogênico. O gene *CytK* codifica a produção desta proteína em concentrações elevadas. Nenhum outro gene que codifica a toxina diarréica parece estar presente nessa estirpe. Portanto, NVH391-98 parece ser um modelo interessante para estudar o problema da intoxicação alimentar. Surpreendentemente, as sequências de nucleotídeos de genes conservados de NVH391-98 são muito distintas de outras cepas do grupo *B. cereus* (LAPIDUS et al.2008).

Um estudo feito por Lapidus e colaboradores em 2008 comparou a sequência do genoma da cepa NVH391-98 com outros genomas do grupo *B. cereus*. Representantes do grupo *B. cereus* possuem um genoma de aproximadamente 5.2- 5.5 milhões de pares de bases, enquanto o

genoma de NVH391-98 contém um cromossomo de 4085 pares de bases e um plasmídeo circular de 7136 pares de bases. A superposição do alinhamento cromossômico de estirpes conhecidas de *B. cereus* (*B. cereus* ATCC14579, *B. cereus* ATCC10987 e *B. anthracis* Ames) mostrou que quatro regiões do genoma destas estirpes de *B. cereus* correspondentes ao 750-1100 pares de bases, 1670-2000 pares de bases, 2200-3600 pares de bases e 4970-5030 pares, não foram encontradas no genoma NVH391-98.

A estirpe NVH391-98 apresenta três características em seu genoma que são de interesse. Um de eles é a ausência de genes para biossíntese de triptofano. Todas as outras estirpes conhecidas do grupo *B. cereus*, bem como outras espécies de *Bacillus*, possuem tais genes e são capazes de crescer sem triptofano no meio. Outra característica genética que surgiu a partir das análises da sequência completa, é a presença de genes para a biossíntese de uma toxina *NHE*, relacionada com intoxicação alimentar. Até agora, apenas uma toxina importante *CytK*, foi identificada e tem sido considerada como o principal fator na intoxicação alimentar severa por essa estirpe. Vários estudos com NVH391-98 utilizando PCR e anticorpos monoclonais, apresentaram falha na identificação da toxina hemolítica, não hemolítica e outros genes. Isto não é surpreendente uma vez que a codificação de sequência de proteínas desta estirpe é divergente o suficiente para dificultar a detecção de genes baseados em PCR. A sequência genômica do NVH391-98 confirmou a ausência do gene *HBL*, HI e II, mas revelou de forma inequívoca os três genes que codificam *nheA* (77% de identidade para o *B. cereus* ATCC14579 proteína), *nheB* (87%) e *NheC* (73%) organizados em um operon. Esses genes são expressos e, portanto as proteínas sintetizadas podem contribuir para toxicidade, além de *CytK* (Figura 2) (ARNESEN et al. 2008; Fagerlund et al., 2007;).



Fonte : ARNESEN et al. 2008

Figura 2 - Nova árvore filogenética proposta a partir de cromossomas para a marcação de filogenia de diferentes estirpes de *Bacillus cereus* utilizando MLST (*Multilocus Sequence Typing*)

2.4. Identificação de Estirpes de *B. cereus* Mediante o Uso do Gene *gyrB*

A DNA girase é uma topoisomerase de tipo II requerida para a replicação do DNA, transcrição, e recombinação. Além de essas funções essenciais girase encontra-se envolvida no processo de esporulação em *Bacillus subtilis*. (LAMPE; BOTT, 1985). A taxa de evolução molecular inferida a partir de sequencias de genes *gyrB* é mas rápida do que a inferida a partir de sequências de genes 16s *rRNA*. Sequências de *gyrB* têm sido utilizadas em estudos genéticos de filogenia em diversas estirpes de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*. Estes estudos indicam que *gyrB* é um adequado marcador filogênico para o estudo de relações taxonômicas entre espécies (Wang et al. 2007). A análises

filogenéticas de nucleotídeos de *gyrB* também se reflete nos relacionamentos evolutivos de estirpes relacionadas.(DAUGA, 2002)

2.5. Fatores de Virulência de *Bacillus cereus*

A virulência deste micro-organismo tem sido atribuída a diferentes fatores extracelulares. Dois desses fatores de virulência são complexos de proteínas, ou seja, a hemolisina BL (*HBL*) e a enterotoxina não-hemolítica (*NHE*). Outros fatores de um único gene são codificados por *entFM* (*enterotoxina FM*) *CytK* (*citotoxina K*) e *bceT* (*B. cereus* enterotoxina) . Produtos de outros genes, como fosfatidilinositol específico da fosfolipase (*pipIC*), enterotoxina S (*entS*), esfingomielinase (*sph*), cereolysin O (*clo*) também são envolvidos na patogênese. (MINNAARD et al., 2007).

A virulência da chamada estirpes eméticas está relacionada com a cereulide, um polipeptídeo cíclico termoestável que resiste temperaturas de até 121 °C por 60 min sintetizado por uma enzima sintetase de peptídeo não-ribossômico codificados nos genes *ces* (ISOBE et al., 1995; EHLING-SCHULZ et al., 2004; HORWOD et al., 2004).

Ensaios *in vitro* demonstraram que a incubação de células epiteliais absorptiva abundantes no epitélio do trato intestinal humano junto com células vegetativas de *B. cereus* leva a efeitos citopáticos causando mudanças na estrutura química e moleculares nas células que podem ser observadas mediante o uso de microscopia ótica. Estes efeitos incluem deslocamento das células, diminuição da atividade desidrogenase mitocondrial, mudanças morfológicas e modifica a estrutura da actina. Além disso, outras estirpes têm mostrado a capacidade de invadir monocamadas de enterócitos em cultura, aumentando assim os mecanismos responsáveis pela virulência de *B. cereus*. A cereulide não perde sua atividade a 121 °C por 60 min, tolera valores extremos de pH entre 2 e pH 11, e tem estabilidade ao tratamento com pepsina e tripsina. É assumido que a cereulide não é um produto genético, mas é sintetizado enzimaticamente na multiplicação. A função da cereulide é a

estimulação do receptor 5-HT₃ do nervo vago aferente e também é responsável pela inibição da oxidação hepática de ácidos graxos mitocondriais sendo relatado como causador de insuficiência hepática. (KOTIRANTA et al., 2000)

Além destas toxinas, *B. cereus* produz várias hemolisinas responsáveis pela sua atividade hemolítica

- hemolisina I, uma citolisina inibida pelo colesterol, termo-lábil (também designada cereolisina O) e activada pelo tiol.
- hemolisina II, uma toxina termo-lábil, não inibida pelo colesterol, pertencente à família das toxinas β -barril formadoras de poros (KOTIRANTA et al., 2000)
- hemolisina III, uma proteína de 24.4 kDa que provoca a lise dos eritrócitos através da formação de poros transmembranais (GOMES, 2009)

Bacillus cereus é também produtor de várias enzimas que desempenham um papel muito importante na virulência deste micro-organismo. Estas enzimas incluem: fosfolipases, lecitinase, esfingomielinase, colagenase, protease, amilase e β -lactamase. A fosfolipase C é um fator de virulência de inúmeras bactérias patogênicas que contribui para a destruição do tecido através da desgranulação dos neutrófilos humanos (GOMES, 2009)

2.6. Enterotoxina Diarréica Hemolítica (HBL)

Originalmente *HBL* foi purificada a partir da estirpe de *B. cereus* F837/76, isolada a partir de uma ferida surgida após procedimento cirúrgico. Foi inicialmente pensado que era uma toxina binária composta de uma fração B de união e um componente L lítico (BEECHER; MACMILLAN, 1990). Trabalhos feitos por Beecher e MacMillan (1991) demonstraram que a enterotoxina *HBL* é uma toxina composta por três componentes, L₁, L₂ e B (Tabela 1) (ARNESEN et al., 2008). Ela causa acúmulo de líquido nas alças do íleo do coelho, tem

atividade dermonecrótica, provoca permeabilidade vascular, apresenta atividade citotóxica nas células vero e no tecido da retina e tem atividade hemolítica nos eritrócitos de diversas espécies. Um modelo da ação de *HBL* foi proposto a partir de sua atividade nos eritrócitos, sugerindo que os três componentes ligam-se de forma independente na membrana dos eritrócitos, formando um complexo de ataque na membrana que lisa os eritrócitos através de um mecanismo coloidal de lises osmóticas que forma um poro transmembrana. A estequiometria dos três componentes de *HBL* propostos ainda não foi bem documentada, apesar de que uma resposta positiva no teste de alça ileal de coelho foi obtida quando os três componentes *HBL* foram injetados em quantidades equimolares. (ARNESEN et al., 2008)

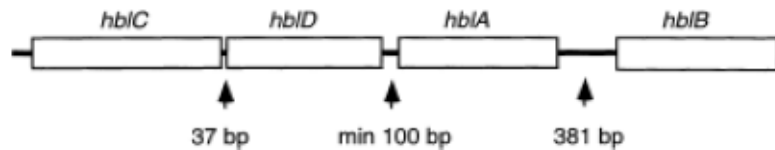
Tabela 1 - Características da enterotoxina HBL

HBL L ₂	Detectado pelo kit BCET-RPLA de Oxoid Não contém segmentos hidrofóbicos
HBL L ₁	Concentração excessiva inibe a hemólise em ágar sangue Possivelmente é produzido em quantidades menores que L ₂ e B. Contém um segmento hidrofóbico com um comprimento total de 60 aminoácidos ácidos (aa 234-293)
HBL B	Concentração excessiva inibe a hemólise em ágar sangue A reação com os eritrócitos é o passo limitante da hemólise causada por HBL Contém um segmento hidrofóbico com 17 aminoácidos de comprimento (aa 237-253)

A estrutura cristalina foi determinada (Protein Data Bank entrada 2nrj)

Adaptado de: ARNESEN et al., 2008

Os genes que codificam a enterotoxina *HBL* encontram-se incluídos num único operon, localizado no cromossomo, estando os genes organizados pela seguinte ordem: *hbIC*, *hbID*, *hbIA* e *hbIB* (Figura 3). A expressão da toxina é regulada pelo regulador transcricional *PlcR* (regulador fosfolipase C) (GOMES, 2009)



Fonte: GRANUM; LUND, 1997

Figura 3 - Estrutura do operon *HBL*

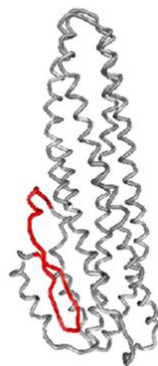
O operon inclui as três proteínas codificadas por *HBL*: A proteína L_2 é codificada por *hblC*, a proteína L_1 por *hblD*, a proteína B por *hblA* e *hblB*.

2.7. Enterotoxina Diarréica Não Hemolítica (*NHE*)

A enterotoxina não hemolítica foi caracterizada pela primeira vez depois de um grande surto de intoxicação na Noruega em 1995 após o consumo de ensopado de carne causado pela estirpe de *B. cereus* NVH 0075/95 negativa para a enterotoxina HBL. Inicialmente *NHE* foi pensada como uma citotoxina composta por um complexo de *NHEA*, *NHEB* e uma proteína de 105 kDa, mas depois foi demonstrado que a proteína de 105 kDa era uma colagenase que não é parte do complexo *NHE*. O sequenciamento do operon *NHE* identificou o gene que codifica para *NHEC* que foi posteriormente confirmado como componente de *NHE* (ARNESEN et al., 2008).

Sobre a base da estrutura cristalina do componente B dos três homólogos componentes da toxina *HBL*, a identificação da sequência das seis proteínas que compõem *HBL* e *NHE* indicam que *NHEB* e *NHEC* mostram forte semelhança estrutural com a hemolisina formadora de poros *ClyA* (34 kDa) presente em várias bactérias enteropatogênicas gram-negativas na Tabela 2 se apresentam as características do gene *NHE*.

Todas estas proteínas compõem de 4 a 5 pacotes de hélice conectados a um ponto em um subdomínio com característica hidrofóbica (Figura 4). Além disso, existem semelhanças funcionais entre o complexo *NHE* e *ClyA*, como a formação de poros de grande condutância e atividade citolítica e hemolítica (LINBACK et al., 2010)



Fonte: LINBACK et al. 2010

Figura 4 - Modelo estrutural de *NHEC* mutante, mostra-se em vermelho a região hidrofóbica.

Em contraste com a toxina *HBL*, que apresenta atividade hemolítica, dermonecrótica e enterotóxica, a *NHE* revela exclusivamente propriedades citotóxicas ou enterotóxicas. Lindbäck et al. (2004) realizaram um estudo de modo a determinar e quantificar a atividade citotóxica da toxina não-hemolítica em células vero. A atividade citotóxica máxima foi verificada quando a relação molar entre *NHEA*, *NHEB* e *NHEC* era de 10:10:1. Um aumento da concentração de *NHEC* provocava a diminuição da atividade por inibir a ligação da proteína *NHEB* nas células. Fagerlund et al. (2004) examinaram a natureza da atividade citotóxica da *NHE* sobre as células epiteliais, mostrando que, após a exposição a esta toxina, ocorria um rápido rompimento da membrana plasmática com formação de poros nas bicamadas lipídicas (GOMES, 2009). As características da toxina *NHE* são mostradas na Tabela 2.

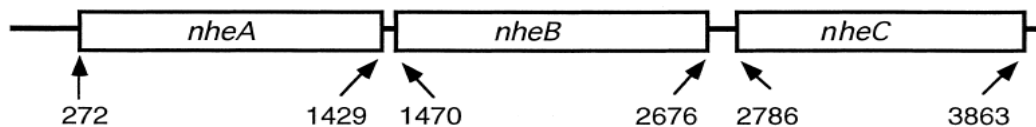
Estudos das interações entre *NHE* e células vero mostraram que a proteína de 105 kDa pode ser o componente de ligação desse complexo, os outros dois componentes, provavelmente não têm a capacidade de ligar-se a essa células sozinhos. Ainda não fica claro se os dois diferentes complexos da toxina só prejudicam o plasma das células alvo ou se alguns dos dois é translocado para o citosol e tem atividade lítica dentro da célula. (Granum and Lund, 1997).

Tabela 2 - Características de *NHE*

NHEA	<p>Detectado pelo kit TECRA-BDE da Tecra</p> <p>Não contem segmento hidrofóbico</p>
NHEB	<p>O único componente de NHE que se liga diretamente na superfície de as células vero</p> <p>Contem um segmento hidrofóbico com um comprimento total de 54 aminoácidos</p>
NHEC	<p>Excesso de concentração inibe a citotoxicidade</p> <p>Produzida em quantidades menores que <i>NheA</i> e <i>NheB</i></p> <p>Contem um segmento hidrofóbico com um comprimento de 25 aminoácidos que contem um par de resíduos de cisteína que podem formar enlaces disulfuro em proteínas gerando estabilidade térmica</p>

Adaptado de: ARNESEN et al., 2008

Na Figura 5, os números mostram o ponto do início e terminação de cada um dos três genes na estirpe de *Bacillus cereus* 1230-88 isolada de um surto de intoxicação, na Noruega, em 1988.



Fonte: GRANUM et al., 1999)

Figura 5 - Estrutura do operon *NHE*

2.8. Citotoxina K (*CytK*)

A citotoxina K (*CytK*) foi isolada de uma estirpe de *Bacillus cereus* que causou um surto de intoxicação grave em Essone França em 1998 após consumo de salada, onde três pessoas foram a óbito (LUND et al., 2000, FAGERLUND et al., 2004). É uma proteína de 34 kDa altamente citotóxica que não tem efeito sinérgico com outras proteínas secretadas. A *CytK* é citotóxica para as células vero e tem uma atividade hemolítica. A sequência de

aminoácidos dessa enterotoxina apresenta 30 % de identidade com o grupo β -barril de toxinas formadoras de poros que inclui a α -toxina de *Staphylococcus aureus* e β -toxina de *Clostridium perfringens* tipo C (LUND et al., 2000). Possui também a capacidade de formar poros nas bicamadas lipídicas das células, sendo também altamente tóxica para as células epiteliais do intestino humano. Em suma, estas propriedades sugerem que a citotoxina K é responsável por casos severos enterite necrótica associada (Gomes, 2009).

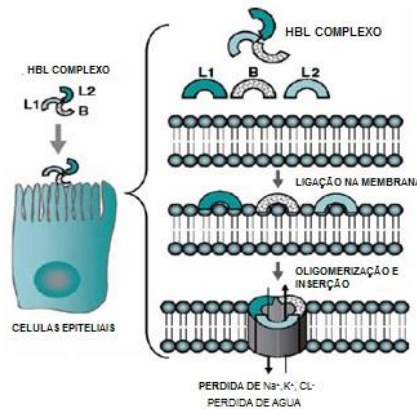
Citotoxina k pode ocorrer em duas formas diferentes *CytK 1* e *CytK 2*. *CytK 1* foi isolada inicialmente da estirpe de *B. cereus* NVH391/98 e foi observada a ser 5 vezes mais tóxica para a células intestinais CaCo2 e células Vero que *CytK 2*. No entanto a constatação de que outras estirpes produtoras de *CytK 1*, não são tão tóxicas como a toxina da estirpe NVH391/98, sugere que as variações da citotoxicidade estão ligadas a variações nos níveis de expressão da toxina, em vez do potencial de virulência entre as duas formas de toxina. (SENESI; GHELARDI, 2010).

2.9. Regulação Das Toxinas

Toxina diarréica é produzida durante a fase exponencial da multiplicação bacteriana no intestino. A glicose age como um repressor catabólico de HBL enquanto a sacarose aumenta a sua expressão durante o crescimento em um definido médio modificado (MOD). A expressão de *HBL*, *NHE* e outros 13 genes de virulência são regulados por uma proteína pleiotrópica *PlcR* de 34-kDa, que está presente em *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Um polipeptídeo *PlcR* também encontra-se presente em *B. anthracis* devido a uma mutação no gene *plcR* que provavelmente não funcional (BHUNIA, 2007). A expressão de *HBL* e *NHE* também é regulada pelo sistema de alta sensibilidade redox composto de dois componentes *ResDE* e o regulador redox *Fnr* e em menor medida por um proteína de controle catabolico *CcpA* demonstrando uma relação entre a virulência e o estado metabólico da bactéria. *PlcR* tem a capacidade de se unir

as sequências específicas de DNA conhecidas como (*PLcR* Box) localizadas nos extremos dos genes controlados e em várias distâncias, antes do (Box 235) do promotor sigma A. A transcrição do *plcR* começa pouco antes do início da fase estacionária t_0 e atinge seu nível máximo 2 horas depois. A transcrição de *plcR* é auto-induzida e é reprimida pelo fator de esporulação *Spo0A*. *PLcR* necessariamente precisa que *PapR* esteja ativo, sendo este peptídeo expressado em um propeptídeo sob o controle de *PlcR*, e exportado fora da célula, e processada para formar o peptídeo ativo durante sua exportação ao meio extra celular e capturado novamente pela célula através do sistema permease oligopeptídeos *OppBCDF*. Assim os três componentes *plcR*, *OppBCDF* e *PapR* funcionam como um sistema de *quorum sensing*. (GOHAR et al., 2008)

Em muitas bactérias patogênicas a expressão dos genes de motilidade e virulência são reguladas coordenadamente por um link de regulação que pode existir em *B. cereus* e *B. thuringiensis* os quais tem motilidade por flagelos peritríqueos. Por exemplo, a motilidade foi reduzida em um mutante *plcR*, a transcrição dos genes que codificam Hbl e fosfolipase C foi reduzida no mutante não flagelar *flhA*. (FAGERLUND et al. 2010)



Fonte: BHUNIA, 2008

Figura 6 - Mecanismo de ação das enterotoxinas

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi conduzida na região de Viçosa-MG em duas fazenda. Em uma delas, o sistema de produção de leite cru é tecnificado (sistema de ordenha mecânica, vacas com alto potencial genético da raça holstein, em estabulação e alimentadas com pastagem, silagem e suplementadas com sal mineral) com uma produção de 1200 litros de leite-dia. A outra e uma pequena fazenda fora da cidade, representando um sistema não-tecnificado (ordenha manual com balde, alimentação com capim, potencial genético baixo dos animais). Neste último sistema, encontra-se um tanque comunitário de coleta de leite de 450 litros-dia. Nos sistemas de produção foram coletadas amostras de leite, ambientes e superfícies para análises de fontes de contaminação com *Bacillus cereus*.

As análises de identificação microbiana foram desenvolvidas no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os isolados de *B. cereus* foram submetidos aos testes de biologia molecular no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV-BIOAGRO- UFV)

3.1. Análise da Contaminação por *B. cereus* em Leite Cru, Superfícies e Ambientes

3.1.1. Amostras

Com a finalidade de verificar a prevalência de *B. cereus* no leite cru e nos equipamentos e ambientes de ordenha nas linhas de produção foram realizadas oito coletas de amostras de leite, superfícies e ambientes durante os meses de verão de outubro de 2010 a março de 2011.

Amostras de leite entre 250-500 mL foram coletadas em frascos esterilizados direto do latão na Fazenda não tecnificada à temperatura ambiente

(28 °C) . Também, amostras de leite dos tanques de refrigeração em expansão direta foram coletas às temperaturas de 6°C após 2 h a ordenha. As amostras de superfícies de mãos, teteiras e tanque de resfriamento foram coletadas mediante a técnica do *swab*. Nas teteiras a coleta foi realizada no sentido horário a partir de dentro para fora, e de amostras de ambientes pela técnica da sedimentação em placa (Evancho et al., 2001).

A Figura 7 ilustra os locais a partir dos quais foram tomadas amostras de leite, superfícies e ambiente para avaliação.



Figura 7 - Fotografias das superfícies e locais onde foram coletas as amostras: tanque de coleta e resfriamento do sistema não tecnificado (A), coleta de leite no estábulo do sistema tecnificado (B), coleta de amostras pela técnica do *swab* nas teteiras do equipamento de ordenha mecânica do sistema tecnificado (C), coleta de amostras pela técnica do *swab* em mãos do ordenhador sistema não tecnificado (D).

3.1.2. Análises no Leite Cru

Amostras de leite entre 250- 500 mL foram coletadas em frascos de vidro esterilizados e transportadas sob refrigeração ao laboratório para as análises microbiológicas.

Alíquota de 25 mL de cada frasco de vidro foi transferida para um erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina peptonada 1% (m/v). A mistura foi transferida para um saco plástico esterilizado e homogeneizada por 60 s em *stomacher* (LABOTEC) considerando-se esta a diluição 10^{-1} . Foram preparadas diluições seriadas 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e volumes de 0,1 mL foram inoculadas sobre a superfície seca de Agar MYP (*Manitol-Egg Yolk-Polymyxin*). O inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski cuidadosamente por toda a superfície do agar e incubada a 35 °C por 24 h.

De cada placa de MYP, três colônias típicas para *Bacillus cereus*, com forma estrelada e de 5 mm de diâmetro, que apresentavam atividade de lecitinase e não fermentavam manitol foram submetidas à prova morfotintorial de coloração de Gram e às provas bioquímicas sendo testes característicos de *B. cereus* o seguinte: motilidade positiva, crescimento rizóide negativo, decomposição de tirosina positivo, fermentação anaeróbia de glicose positivo, de Voges-Proskauer positivo e redução de nitrato positivo, de acordo com metodologias propostas pela *American Public Health Association* (APHA, 2005).

Os isolados gram-positivos que se apresentaram na forma de bastonete e com resultados característicos para *B. cereus* em, pelo menos, quatro provas bioquímicas das seis avaliadas foram replicados para caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e após preparação adequadas foram submetidos aos testes de biologia molecular.

3.1.3. Amostras de Superfícies, Manipuladores e Ambientes

Amostras das superfícies foram coletadas utilizando-se *swabs* de algodão de 1 cm de diâmetro por 2 cm de comprimento com haste de 12 cm de comprimento. Os *swabs* foram esterilizados a 121 °C por 15 min. Para a coleta de amostras nas teteiras, o *swab* foi umedecido em solução tampão e neutralizante (tiosulfato de sódio a 0,25 % (m/v) e introduzido até uma profundidade de 10 cm no copo da teteira, sendo realizadas 20 fricções de forma circular no sentido do interior para o exterior. Em seguida, os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução tampão com neutralizante tiosulfato de sódio a 0,25 % (m/v).

Para as coletas de amostras em mãos, foi usado um *swab* com haste de 12 cm de comprimento e algodão hidrófilo de 2 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro. A coleta foi iniciada com *swab* umedecido em solução tampão fosfato, friccionando o algodão três vezes em direção a cada um dos dedos a partir do punho. Em seguida, a partir do punho, o algodão foi friccionado com mesmo *swab* entre os dedos, retornando novamente ao punho em seguida, os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução tampão com neutralizante tiosulfato de sódio a 0,25 % (m/v) considerando-se esta, a diluição 10^{-1} . Também, foram preparadas as diluições seriadas 10^{-2} e 10^{-3} .

A coleta de amostras de ambiente foi feita com placas de Petri contendo MYP e PCA (Agar para contagem padrão) que foram expostas ao ar durante 15 min e incubadas a 37 °C/24 h. Os resultados foram expressos em $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$, usando a fórmula: $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{Semana}^{-1} = \text{número de colônias} \times 10080 / (\pi \times r^2) \times t$

Em que:

t = tempo de sedimentação em minutos

r = raio da placa de Petri em cm

10080 = minutos por uma semana

3.2. Identificação de Fatores de Virulência de Isolados de *B. cereus*

3.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico dos isolados positivos nas provas bioquímicas e morfotintoriais foi realizada com o kit "*Bacterial Genomic DNA Isolation*" (Norgen Biotek Corporation, Canadá) de acordo com as instruções do fabricante, conforme descrito a seguir.

Para a extração de DNA, os isolados foram reativados em tubos contendo 10 mL de BHI e incubados a 35 ° C durante 24 h. A partir de cada tubo inoculado, foram tomadas duas amostras de 1 mL, uma para medição de sua densidade ótica no espectrofotômetro (Bio Rad SmartSpec, Estados Unidos) e outra para ser transferida a tubos Eppendorf de 1,5 mL os quais foram centrifugados a 14000 x g por 30 s para obtenção de um pellet de cada amostra, sendo o sobrenadante descartado, após a centrifugação. O pellet foi ressuspenso em 250 µL de solução de ressuspensão (0,4mL de TRIS 1M pH=8, 0,1mL de EDTA 0,5M, 4,5mL de H₂O destilada) e misturado com 12 µL de solução de lisozima (400 mg.mL⁻¹) para permitir a degradação da parede celular e a liberação total do DNA bacteriano e submetido ao vortex por 30 s.

A esta mistura foram adicionados 250 µL de solução de lise (10 mM Tris pH 7,4. 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS, água Mili Q) e 12 µL de proteinase K (12 mg em 0,6 mL). A solução resultante foi novamente submetida ao vortex e incubada em a 37 °C por 2 h ou até a mistura tornar-se transparente. Após incubação, foram adicionados 50 µL de solução de ligação (NaCl, EDTA, pH 8) na mistura para romper ligações iônicas de cadeias polipeptídica e também auxiliar na dissociação das proteínas ligadas aos ácidos nucléicos, e homogeneizada no vortéx. A mistura foi transferida para uma micro-coluna com um tubo coletor Eppendorf e centrifugada a 8000 x g por 4 min, o permeado foi descartado e foram adicionados à coluna 500 µL de solução de limpeza I (álcool 95 %) e novamente submetida à centrifugação a

14000 x g por 1 min. Outra vez o permeado foi descartado e 500 µL de solução de limpeza II (álcool 70 %) adicionados à coluna que foi centrifugada a 14000 x g por 2 min. Mais uma vez o permeado, foi descartado e à coluna foi adicionado de 200 µL de solução de tampão de eluição do DNA. A coluna foi inicialmente centrifugada a 6000 x g por 1 min para umedecer a resina onde se encontra o DNA e em seguida centrifugada a 14000 x g por 2 min. O Eppendorf contendo o DNA foi armazenado a -20 °C até o momento de sua quantificação.

3.2.2. Identificação Genética dos Isolados usando o Gene *gyrB*

Para a identificação genética dos isolados positivos nas provas bioquímicas foi realizada análise de PCR convencional, utilizando um par de primers (*iniciador 5'gtttctggtggtttacatgg 3' e reverso 5'caacgtatgatttaattccacc 3'*), descritos por Manzano et al. (2003) . Estes primers amplificam o gene *gyrB*, o qual codifica a produção da subunidade B do DNA girase (topoisomerase II).

A PCR foi realizada em microtubos apropriados de 0,2 mL, com tampa plástica, onde foram adicionados 25 µL de uma mistura de reagentes para a promoção da reação do PCR. Essa mistura é composta de 5µL do reagente 5X *Colorless GoTaq® Flexi Buffer* (Promega, Estados Unidos), 3 µL de MgCl₂ (Promega, Estados Unidos) na concentração de 25 mM, 2 µL de dNTP a 0,4 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Promega, Estados Unidos), 0,2 µL de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* na concentração de 5 unidades/µL (Promega, Estados Unidos), 0,5 µL do *primer iniciador*, 0,5 µL do *primer reverso*, 4 µL de DNA e 9,8 µL de água Mili Q esterilizada a 121 ° C. A PCR foi realizada no termociclador ATC 401 (CLP, Estados Unidos) de acordo com o seguinte protocolo: 5 min de desnaturação a 95 °C; 35 ciclos de amplificação a 95 °C por 1min, anelamento a 52 ° C por 1 min e extensão a 72 °C por 7 min.

3.2.3. Digestão Enzimática

Para realizar a digestão enzimática foi utilizada a enzima RsaI (Promega, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Foi feita uma

mistura de 2 µL do produto amplificado do PCR, 2 µL de BSA (*Bovine Serum Albumine*) 2 µL de buffer C, 5 U de *RsaI*, 15,3 µL de água Mili Q esterilizada, para um total de 25 µL de mistura por amostra, a mistura foi incubada em banho maria a 37 ° C por 2 h, e novamente observada em um gel de eletroforese.

3.2.4. Detecção dos Genes *NHE* e *CytK* nos Isolados de *B. cereus*

A pesquisa de genes que codificam as enterotoxinas de *B.cereus* foi realizada também por PCR convencional. O protocolo foi semelhante ao item 3.2.2, modificando-se os primers e as condições do termociclador: 3 min de desnaturação a 95 °C; 35 ciclos de amplificação a 95° C por 1 min, anelamento a 52° C por 45 s, e extensão a 72° C por 1 min.

Como controle positivo foi utilizada uma estirpe de *Bacillus cereus* RIBO-tipo 1-222-173-S4 pertencente ao estoque do LHMA/UFV e como controle negativo foi utilizada estirpe de *Escherichia coli* ATCC 11229 ou de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 do estoque. Os *primers* utilizados, com base em trabalhos já publicados por Ehling-Schulz et al. (2006), foram sintetizados pela empresa IDT (Integratec DNA Technologies, Brasil) e estão listados na Tabela 3.

Tabela 3- Primers usados na pesquisa de enterotoxinas

Primer	Gene	Primers no sentido 5'-3'	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de anelamento
NA2F	<i>NHE</i>	AAGCIGCTCTTCGIATTC	766	52° C
NA4R		ITIGTTGAAATAAGCTGTGG		
CKF2	<i>CytK</i>	ACAGATATCGGICAAAATGC	421	52° C
CKF5		CAAGTIACTTGACCIGTT GC		

Fonte: Ehling-Schulz et al.2006

3.3. Sequenciamento do Produto Amplificado no PCR

3.3.1. Purificação do DNA

A purificação do produto de PCR para seu sequenciamento foi feita utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Estados Unidos). Após a visualização do fragmento de DNA desejado no gel, um volume mínimo de agarose contendo o fragmento foi recortado usando um bisturi. A porção do gel cortada foi transferida para um tubo Eppendorf esterilizado de peso conhecido. Foi subtraído o peso do tubo vazio do peso do tubo total para obter o da porção de gel.

Após determinação do peso, foi adicionada a solução de ligação em uma relação de 10 μL de solução por cada 10 mg de agarose. A fatia de agarose e a solução de ligação foram misturadas no vortex por 30 s e incubadas a 57 ° C por 10 min ou até o gel ficar completamente diluído na solução.

Para a purificação do produto de PCR, a solução contendo o fragmento de agarose diluído foi transferida para uma microcoluna SV montada junto a um tubo coletor. Após transferir a mistura para a coluna, foi feita uma centrifugação a 16000 x g durante 1 min. O líquido permeado depositado no tubo coletor foi descartado e montado novamente o tubo coletor na coluna. Para a etapa de limpeza, foram adicionados 700 μL de solução de limpeza (etanol 95%) e a coluna foi novamente centrifugada a 16000 x g por 1 min e após centrifugação foi descartado novamente o permeado e montada coluna no tubo coletor.

Foi feita novamente uma etapa de limpeza adicionando 500 μL de solução de limpeza e centrifugando novamente a 16000 x g por 5 min para evaporar totalmente o etanol que poderia ficar na coluna. Após centrifugação, foi descartado o tubo coletor e montada novamente a coluna a um novo tubo Eppendorf. Para diluir o DNA, foram adicionados 50 μL de água livre de ácidos nucléicos no centro da sílica que fica no interior da microcoluna, tendo-se cuidado de não tocá-la com a ponta da ponteira. A coluna foi centrifugada novamente a 16000 x g por 1 min. Após centrifugação a coluna foi descartada e o tubo Eppendorf armazenado até o momento de sua quantificação e utilização.

3.3.2. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento dos genes foi realizado no Laboratório de Genômica Bioagro-UFV com o sequenciador (ABI 310, Perkin-Elmer). As sequências foram comparadas às aquelas sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o algoritmo BLASTN. O programa BLASTN compara as sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento, com sequências depositadas no banco de dados. O produto final da PCR foi caracterizado como sendo parte do gene que codificam a enterotoxina *NHE* e *CytK* em diversas estirpes de *B. cereus*

A tradução da sequência de DNA para aminoácidos componentes da enterotoxina não hemolítica (*NHE*) e da citotoxina K (*CytK*) de diferentes isolados de *B. cereus* foi feita utilizando o algoritmo BLASTX, o qual traduz uma sequência de nucleotídeos para aminoácidos e a compara com sequências depositadas no banco de dados da NCBI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises de Contaminação do Leite Cru e de Superfícies por *Bacillus sp.*

A ocorrência de *Bacillus sp.* foi constatada nas amostras de leite e de superfícies nas oito coletas realizadas durante os meses de outubro de 2010 a fevereiro de 2011 (Figura 8). Foram analisadas 116 colônias típicas de *Bacillus sp.* isoladas a partir de meio seletivo MYP, apresentando atividade de lecitinase e incapazes de fermentar manitol (Figura 9). Deste total, 10 colônias foram isoladas do ar do ambiente do estábulo da fazenda tecnificada, 19 do ar

ambiente Fazenda não-tecnificada, 26 da superfície e leite do tanque individual fazenda tecnificada, sete das mãos dos operários na fazenda não-tecnificada, 15 da superfície interna das teteiras na fazenda tecnificada, nove da superfície interna do tanque coletivo de leite não tecnificada, três das amostras da água fazenda não tecnificada, 21 do latão de leite fazenda não tecnificada e seis de leite do tanque comunitário da não tecnificada.

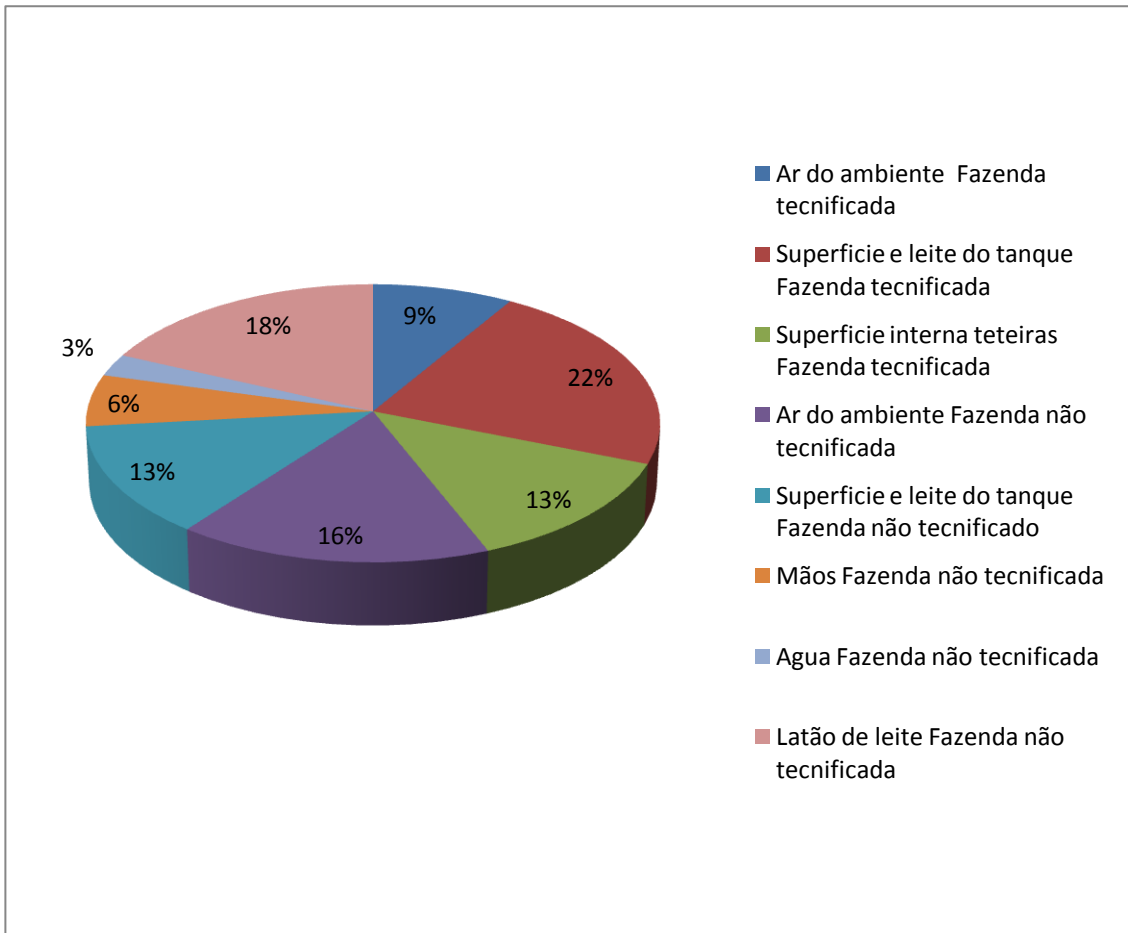


Figura 8 - Distribuição percentual dos isolados com características de *Bacillus* sp. nas amostras coletadas em fazendas tecnificada e não-tecnificada.

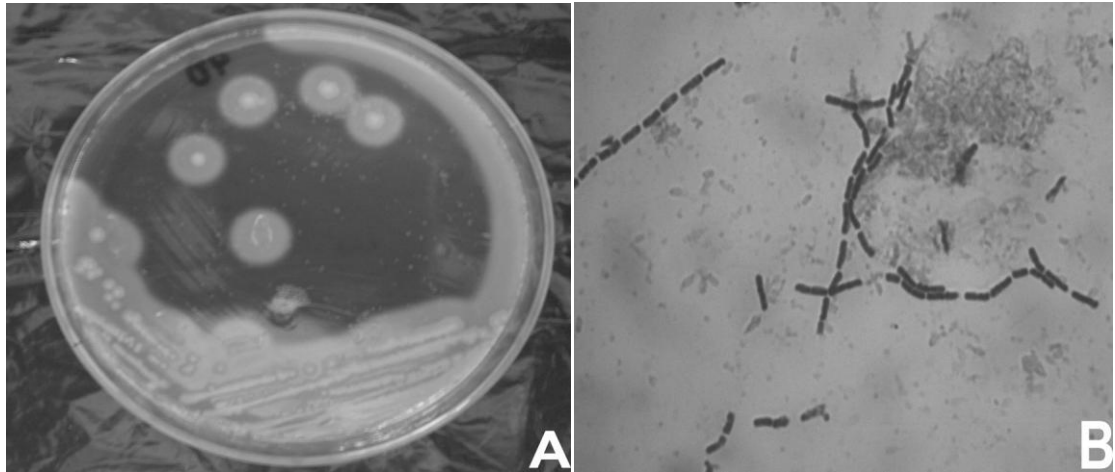


Figura 9 - Colônias típicas de *Bacillus cereus* isoladas em meio seletivo MYP. (A) halo de lecitinase e não-fermentação de manitol, (B) bastonetes longos, com bordas retangulares, gram-positivos

O maior número de isolados de *Bacillus sp* em leite ocorreu no tanque de resfriamento da UFV e pode ser devido a fatores que influenciam a contaminação como a qualidade do ar e higienização. Trabalhos feitos por Mckinnon et al., (1990) reportaram que o leite de vacas em sistema de confinamento podem apresentar contagens bacterianas no leite superiores que o leite de vacas criadas a pastos com tetos limpos. Uma explicação para este fato é a contaminação do úbere, causada por uma desinfecção incorreta do teto após ordenha, ou causada pelas camas, que, mesmo parecendo relativamente secas e limpas, podem ser velhas e favorecer a deposição de micro-organismo. Esporos de *B. cereus* são altamente resistentes a condições adversas, como calor, desidratação, dessecação, radiação, desinfetantes e produtos de limpeza. Os esporos de *B. cereus* são hidrofóbicos o que permite sua adesão a diversas superfícies e posteriormente a formação de biofilmes (SHAHEEN. 2009). Esta característica do micro-organismo, junto com inadequados processos de higienização nos sistemas de produção leiteira e considerando que resíduos de leite nas superfícies constituem uma fonte de nutrientes que pode permitir a contaminação e multiplicação de bactérias em etapas subsequentes do processamento.

Trabalhos realizados por PINTO et al. (2006) na região da Zona da Mata mineira, avaliaram a contaminação bacteriana em 33 amostras de leite procedentes de tanques de leite individuais, e 12 amostras de leite de tanques coletivos. A contagem de bactérias psicrófilas no leite cru refrigerado variou de $2,3 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $7 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ nas amostras coletadas em tanques individuais, e entre $2,9 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, $6,4 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ nas amostras de tanque coletivo. Os resultados porcentual do número de isolados coletados por PINTO et al. (2006) indicam uma maior recuperação de bactérias mesófilas, mesófilas proteolíticas e psicrófilas em tanque individual (6,1%), (18,5%) e (21,2%) respectivamente na faixa de contagem bacteriana de $\log 3$ – $\log 4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, em relação aos mesmos grupos bacterianos recuperados a partir de tanque de leite coletivo, na mesma faixa de contagem (0%), (18,2%), (0%).

Estes resultados são similares aos encontrados nesta pesquisa onde 26 (22%) dos 116 isolados encontravam-se no leite do tanque fazenda tecnificada e, 6 (5%) no leite do tanque coletivo da Fazenda não tecnificada. A recuperação de bactérias foi sempre maior nas diluições 10^{-3} e 10^{-4} no tanque individual, mas o total de isolados coletados em todos os ambientes indica uma maior recuperação de bactérias principalmente na Fazenda não tecnificada a causa de malas condições de produção e higiene.

4.2. Análises de Contaminação do Leite Cru e de Superfícies por *Bacillus cereus*

De 116 isolados inicialmente submetidos às análises, 32 deles apresentaram-se na forma de bastonete e Gram-positivos, sendo que 19 apresentaram resultados característicos de *B. cereus* nas provas bioquímicas (positivos na fermentação de glicose, redução de nitrato positivo, Voges-Proskauer e crescimento decomposição de tirosina e negativo para crescimento rizóide) e na motilidade nas seis provas realizadas. Demais isolados

apresentam-se positivas em cinco ou quatro provas bioquímicas. Os resultados podem ser observados na Tabela 4

Tabela 4 - Resultados das provas bioquímicas aplicadas aos isolados coletados nos sistemas de produção tecnificada e não-tecnificada com características típicas de *Bacillus sp.* em MYP

Número	Fonte do isolado	Fermentação glicose	Motilidade/Redução de nitrato	Voges-Proskauer	Tirosina	Crescimento Rizóide	Bastonete Gram+
2	Ambiente/tecnificada	+	+	+	+	-	+
4	Ambiente/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
9	Swab tanque/nãotecnificada	+	+	+	+	-	+
17	Ambiente/não tecnificada	+	+	+	-	-	+
23	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
27	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
36	Ambiente /não tecnificada	+	+	+	+	-	+
40	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
45	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	-	+	+
58	Swab tanque/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
67	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
80	Mão ordenhador	+	-	+	-	+	+
87	Leite Fazenda/tecnificada	+	+	+	-	+	+
88	Leite Fazenda/tecnificada	+	+	+	+	-	+
89	Leite Fazenda/tecnificada	+	-	-	+	+	+
90	Leite Fazenda/tecnificada	+	-	-	+	+	+
93	Leite Fazenda/tecnificada	+	+	-	-	-	+
101	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
102	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
103	Ambiente/não tecnificada	+	-	+	+	-	+
104	Ambiente/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
106	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
107	Ambiente/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
108	Ambiente/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
109	Leite tanque/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
110	Leite tanque/não tecnificada	+	-	+	+	+	+
111	Leite Fazenda/tecnificada	+	+	+	+	+	+
112	Leite tanque/não tecnificada	+	+	+	+	-	+
113	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
114	Latão leite/não tecnificada	+	+	+	+	+	+
115	LeiteFazenda/ tecnificada	+	+	+	+	+	+
116	Leite Fazenda/tecnificada	+	+	+	+	+	+

4.3. Identificação Genética de Estirpes de Usando o Gene *gryB*

Os 32 isolados que se apresentaram como *B. cereus* nos testes morfotintoriais e bioquímicos foram submetidos a análises de biologia molecular para confirmação dos resultados bioquímicos para isto foi utilizada a técnica

PCR convencional utilizando um par de primers, os quais amplificam os genes que codificam a sub unidade B do DNA girase.

As análises para a amplificação da fração B do gene girase confirmaram a caracterização dos isolados anteriormente identificados como *B. cereus* nos testes bioquímicos. A eletroforese em gel de agarose para a identificação da fração B do DNA girase (Figura 10) mostrou a amplificação de um fragmento de DNA com aproximadamente 352pb, em todos os isolados testados, resultado idêntico ao obtido em estudos anteriores por Manzano et al., (2003) utilizando a mesma metodologia. É também similar aos obtidos por Yamada et al., (1999), que detectaram um fragmento com 362 pb.

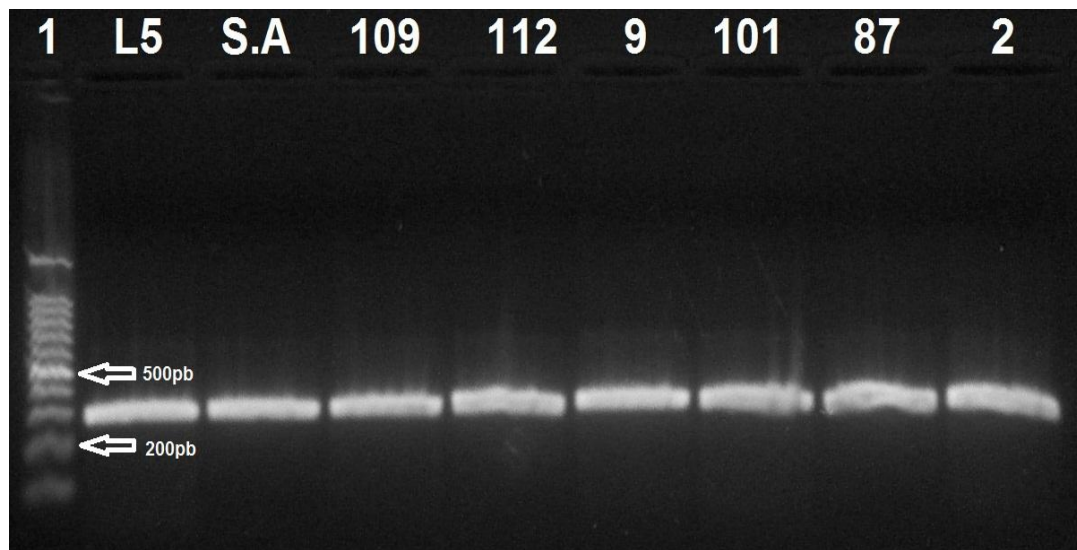


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado para o gene *gryB* em *Bacillus cereus*, (S.A) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 controle negativo e controle positivo *Bacillus cereus* Ribo-tipo 1-222-173-S4 (L5)

Produtos amplificados para o gene *gryB* de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* apresentaram com um tamanho de 352 pb . No entanto, após digestão enzimática com *RsaI* apresentaram tamanhos distintos: o produto oriundo de *B. cereus* mostrou um tamanho de aproximadamente 250 pb, que

contrasta com o produto da digestão em *Staphylococcus aureus* que é de aproximadamente 150pb. Esta diferença pode ser observadas na Figura 11.

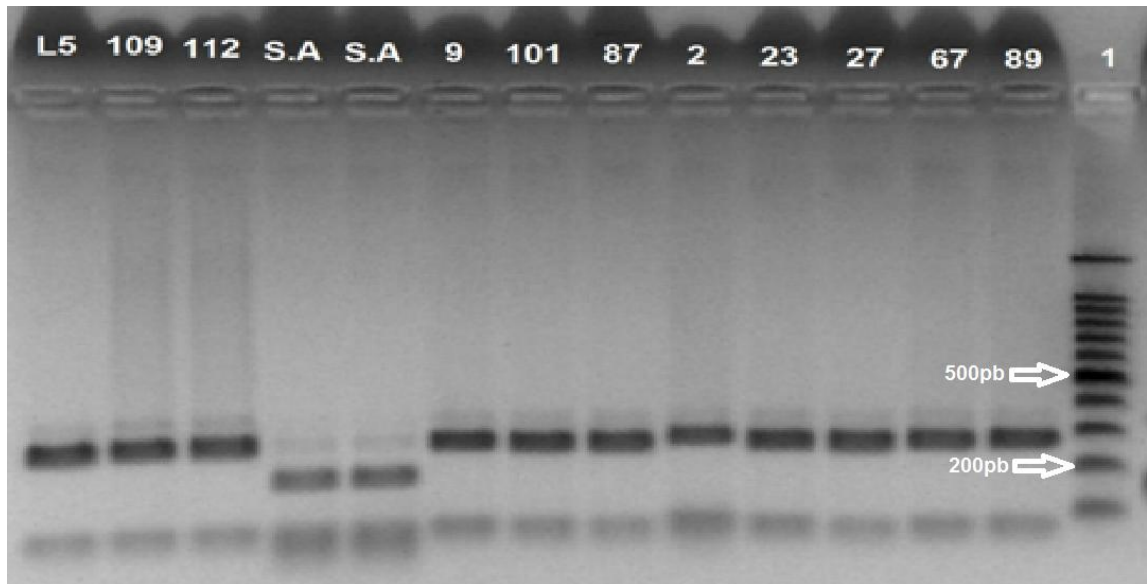


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose após digestão com a enzima *RsaI*, dos produtos de 352 pb amplificados para o gene *gryB* em *Bacillus cereus* e (S.A) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

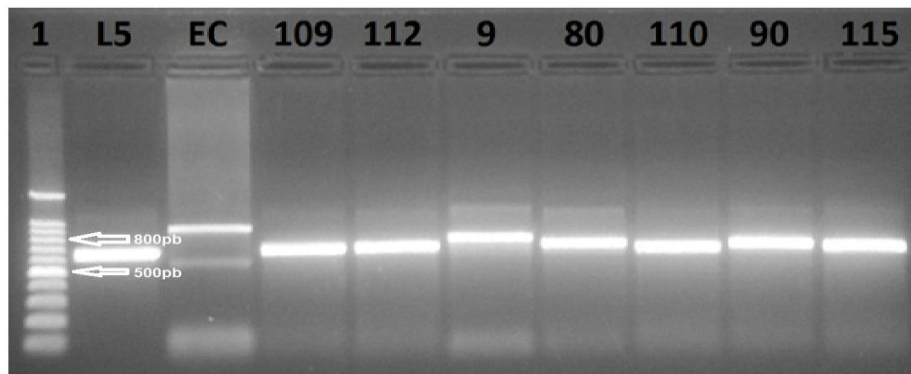
Embora os resultados obtidos pelas provas bioquímicas tenham sido similares àqueles encontrados nos testes de PCR, deve-se considerar que as pesquisas na atualidade devem envolver estudos tanto fenotípicos e genotípicos. O estudo de fatores de virulência relacionados com estas estirpes mediante análises de biologia molecular são de menor custo e sensíveis que os procedimentos tradicionais. Técnicas de biologia molecular como Real-Time PCR (RTm PCR), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) entre outros permitem uma alta especificidade e sensibilidade na detecção de patógenos e suas toxinas. Nessa pesquisa foram avaliados os fatores de virulência associados com os genes para produção da enterotoxina *NHE* e da citotoxina K.

4.4. Pesquisa de Fatores de Virulência nos Isolados de *B. cereus*.

4.4.1. Identificação do Gene que Codifica a Enterotoxina Não Hemolítica (NHE)

A eletroforese em gel de agarose para pesquisar a *NHE* demonstrou que das 32 estirpes identificadas como *B. cereus* na análise do gene girase, 15 delas também amplificaram um único fragmento de DNA na reação de PCR de dimensão de 766pb que esta de acordo com a literatura (Ehling-Schulz et al.2006) (Figura 12).

a)



b)

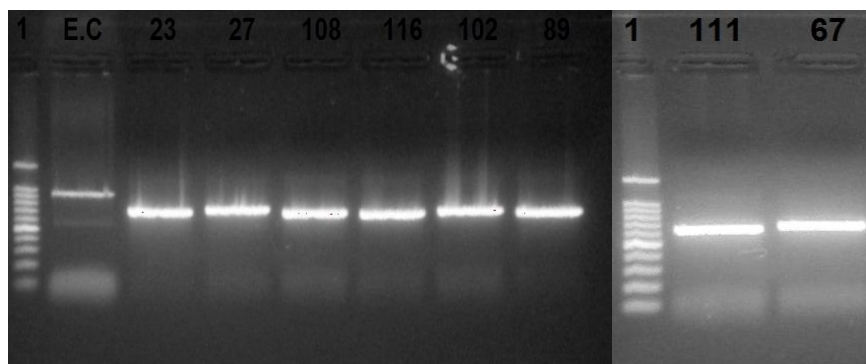


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1 % para a detecção de enterotoxina não hemolítica (*NHE*) em isolados de *Bacillus cereus*. e de (EC) *Escherichia coli* ATCC 11229. Linha 1 marcador de 100pb.

Constata-se pelas Figuras 12 (a,b) e Tabela 5 que foram encontrados isolados de *B. cereus* em todas as fontes de contaminação avaliadas em ambos os sistemas de produção de leite

Tabela 5 – Isolados de *Bacillus cereus* que apresentaram amplificação de gene da enterotoxina não-hemolítica (*NHE*) e suas fontes nos sistemas de produção de leite.

Fonte	Isolados
Leite Fazenda tecnificada	89, 90, 108, 111, 112, 115, 116
Leite latão Fazenda não tecnificada	23, 27, 67, 102
Leite tanque Fazenda não tecnificada	109, 110
Superfície do tanque não tecnificada	09
Mãos ordenhador	80
Controle positivo	L5

Dos 15 isolados que apresentaram amplificação do gene *NHE*, 13 (87 %) foram isolados a partir de leite nos dois sistemas de produção avaliados, do total avaliados 7 (46%) dos isolados foram coletados da fazenda tecnificada e o restante da Fazenda não-tecnificada.

Trabalhos realizados no Brasil por Zahner et al., (2005), no Instituto Oswaldo Cruz, determinaram a prevalência de alguns dos fatores de virulência associados a 80 isolados de *B. cereus* de diversos ambientes no Brasil. Em 50% dos isolados, foi detectada a presença dos genes da enterotoxina *NHE*. Considerando mais 41 isolados de *B.cereus*, coletados em outros países, perfazendo um total de 121 isolados, a pesquisa mostrou que 60% apresentavam os genes da enterotoxina não hemolítica.

Estes resultados corroboram os obtidos em nosso trabalho, onde 15 (47%) dos 32 isolados testados apresentaram amplificação dos genes para a toxina *NHE*.

Svensson et al., (2007) analisaram o potencial de produção de enterotoxinas em 396 isolados de *B. cereus* procedentes de fazendas, silos de leite e linhas de produção de leite pasteurizado usando o kit TECRA[®] (*diarrhoeal enterotoxin immunoassay, Bioenterprises Pvt. Ltd., Roseville, New South Wales, Australia*) e comparando-os com a técnica do PCR. Dos 396 isolados, 78 isolados que produziam NHE foram coletados da fazenda, 72 do silo de leite e 141 do leite da linha de produção. O kit detectou que 291 (74%) dos isolados produziam a enterotoxina não-hemolítica. Já o teste de PCR detectou que em 84% dos isolados havia a presença dos genes para produção dessa enterotoxina. Estas discrepâncias entre os resultados dos ensaios de PCR e TECRA foi atribuída ao fato de alguns dos isolados produzirem pequena quantidade de enterotoxina que o kit TECRA não seria capaz de detectar. Estes resultados mostram que isolados de *B. cereus* que apresentam genes que codificam para os fatores de virulência podem ser produtores de enterotoxinas em altas ou baixas quantidades, inclusive não produzir, dependendo de condições intrínsecas do leite como (pH, atividade de água, potencial de oxido-redução e nutrientes) e fatores extrínsecos ambientais como (umidade ambiental e temperatura).

Trabalho feito por Cardazzo et al. (2007) caracterizou 47 isolados de *B. cereus* de origem alimentar utilizando *Multilocus Sequence Typing* (MLST). As sequências determinadas foram combinadas com sequências disponíveis em banco de dados já publicados para produzir uma maior fonte de dados. As análises filogenéticas foram realizadas em um total de 296 estirpes de *B. cereus* as quais foram divididas em três grupos de linhagens. A linhagem I continha estirpes de *B. cereus*, *B. anthracis*, e *B. thuringiensis*, a linhagem II continha *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* e *B. cereus* e a linhagem III incluiu seis isolados de *B. thuringiensis* e *B. cereus* idênticos no MLST. Este trabalho determinou que todos os genes produtores de toxinas se encontravam presentes na linhagem I, enquanto nas linhagens II e III não se detectou a presença dos genes para esse fatores de virulência. Outros trabalhos realizados por Hansen and Hendriksen (2001) analisaram a presença dos

genes da enterotoxina *NHE* em 41 isolados de *B. thuringiensis* e 22 isolados de *B. cereus* dando um total de 63 isolados estudados. Dos 41 analisados, em 33 (80%) dos isolados de *B. thuringiensis* foram detectados genes para esta enterotoxina. Dos 22 isolados de *B. cereus* analisados 13 (59%) apresentaram genes para esta enterotoxina (*NHE*).

4.4.2. Identificação do gene da citotoxina K (*CytK*)

A eletroforese em gel de agarose para pesquisar a *cytK* demonstrou que das 32 estirpes identificadas como *B. cereus* na análise do gene girase, sete delas também amplificaram um único segmento de DNA na reação de PCR de dimensão de 421pb e são apresentadas na tabela 6.

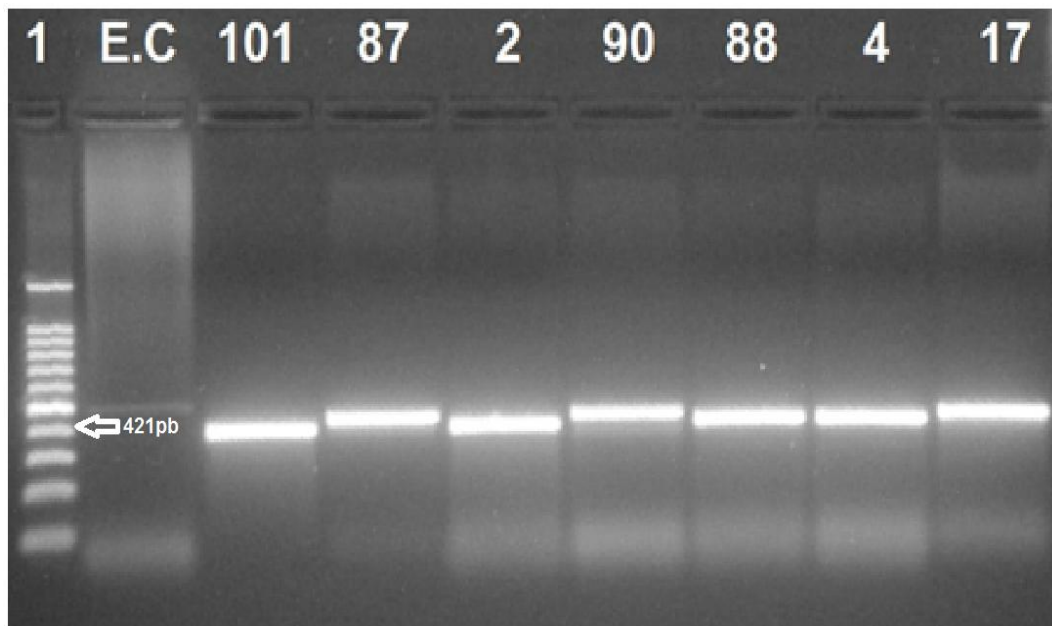


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1 % para a detecção de gene de citotoxina K (*cytK*) em isolados de *Bacillus cereus* e (EC) *Escherichia coli* ATCC 11229. Linha 1 marcador de 100pb.

Tabela 6 – Isolados de *Bacillus cereus* que apresentaram amplificação de gene da citotoxina K (*CytK*) e suas fontes nos sistemas de produção de leite.

Fonte	Isolados
Leite Fazenda tecnificada	87, 88, 90
Leite latão Fazenda não tecnificada	101
Ambiente Fazenda não tecnificada	04, 17
Ambiente Fazenda tecnificada	02

Dos 32 isolados analisados 7 amplificaram o gene *CytK*, destes 4 (57%) isolados foram coletados a partir de leite o restante dos isolados foram coletados do ambiente.

Estudos anteriormente mencionado feitos por Svensson et al., 2007. Analisaram também a presença de *CytK* em 396 isolados de *B. cereus* procedentes de fazendas, silos de leite e linhas de produção de leite pasteurizado detectaram o gene *CytK* em 84 (21%) dos 396 isolados testados, estes resultados estão em concordância com os encontrados neste trabalho (22%). Na Figura 14 apresenta-se a distribuição dos genes *NHE* e *CytK* nos diversos ambientes testados.

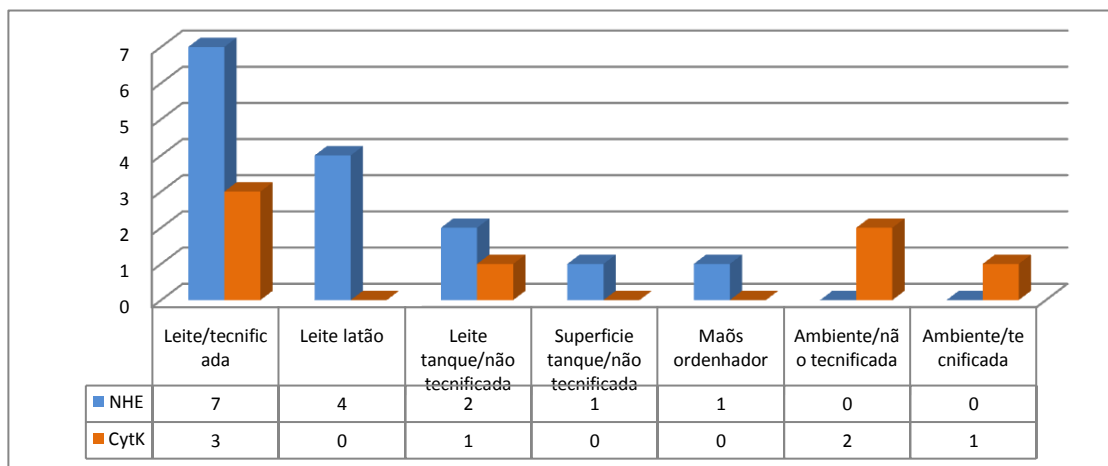


Figura 14 - Distribuição dos genes *NHE* e *CytK* nos ambientes avaliados.

A partir dos análises de diversas fontes de contaminação foi constatado que *B. cereus* contaminou o leite cru, inclusive com estirpes que continham os genes de fatores de virulência: em 13 isolados de 15 avaliados foram detectados o gene da *NHE* e em 4 o da *CytK*. Um dos isolados apresentaram ambos os genes. O gene da *CytK* também foi detectado em *B. cereus* presente no ar de ambiente de produção. A presença do gene *NHE* é causada por uma maior distribuição deste, muitos estudos de mostraram uma maior prevalência deste gene que pode ser atribuída a uma transferência horizontal que é um mecanismo de adaptação comum em bactérias. O maior isolamento de bactérias na tanque de resfriamento da fazenda tecnificada pode ser devido a uma incorreta limpeza e higienização do sistema de placas que faz o resfriamento do leite, neste sistema pode ocorrer a deposição de matéria orgânicas como lipídios e proteínas e minerais que podem favorecer a adesão bacteriana e formação de biofilmes. A estrutura do tanque também favoreceria a deposição de material orgânico já que por seu desenho este tanque não permite uma adequada inspeção visual do interior do mesmo

4.5. Sequenciamento do DNA dos isolados de *Bacillus cereus* positivos para citotoxina K (*CytK*)

O sequenciamento do fragmento de DNA dos isolados de *B. cereus* positivos para citotoxina K (*CytK*) só foi realizado com as amostras que continham entre 75 ng e 100 ng de DNA após purificação de este com kit como requisito do Laboratório de Genômica Bioagro-UFV para o processamento das amostras. Todas apresentam o mesmo tamanho no fragmento de DNA amplificado, o qual pode ser observado na Figura 13. Observa-se pela Figura 16 que os isolados de *B. cereus* das amostras de leite da fazenda tecnificada (87, 88 e 90) e do ar do ambiente da Fazenda não tecnificada (2 e 4) apresentaram sequências genéticas conservadas semelhantes à sequência do *B. cereus* ATCC 14579 obtida no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usada como referência para comparação neste trabalho, indicando que esses isolados apresentam potencial patogênico.

```

87      ----ATAATGATCAAGCTGATAAATATGACAATGTCCTTTAAAGGTAACTTTATCGATGAT 56
2      TTTAATAATGATCAAGCTGATAAATATGACAATGTCCTTTAAAGGTAACTTTATCGATGAT 60
ATCC 14579 TTTAATAATGATCAAGCTGATAAATATGACAATGTCCTTTAAAGGTAACTTTATCGATGAT 60
90     TTTAATAATGATCAAGCTGATAAATATGACAATGTCCTTTAAAGGTAACTTTATCGATGAT 60
88     TTTAATAATGATCAAGCTGATAAATATGACAATGTCCTTTAAAGGTAACTTTATCGATGAC 60
4      ----TAAATGATCAAGCTGATAAATATGACAATGTCCTTTAAAGGTAACTTTATCGATGAC 55
          *****

87      CCAAGCGCTGATAAACAGATTGCCGTTATTAATACAACCTGGTAGTTTTCTAAAAGCAAAT 116
2      CCAAGCGCTGATAAACAGATTGCCGTTATTAATACAACCTGGTAGTTTTCTAAAAGCAAAT 120
ATCC 14579 CCAAGCGCTGATAAACAGATTGCCGTTATTAATACAACCTGGTAGTTTTCTAAAAGCAAAT 120
90     CCAAGCGCTGATAAACAGATTGCCGTTATTAATACAACCTGGTAGTTTTCTAAAAGCAAAT 120
88     CCAAGCGCTGATAAACAGATTGCCGTTATTAATACAACCTGGTAGTTTTCTAAAAGCAAAT 120
4      CCAAGCGCTGATAAACAGATTGCCGTTATTAATACAACCTGGTAGTTTTCTAAAAGCAAAT 115
          *****

87      CCTACTATAAGTGATGCACCTATTGATAACTACCCAATCCCTGGCGCTAGTGCAACATTA 176
2      CCTACTATAAGTGATGCACCTATTGATAACTACCCAATCCCTGGCGCTAGTGCAACATTA 180
ATCC 14579 CCTACTATAAGTGATGCACCTATTGATAACTACCCAATCCCTGGCGCTAGTGCAACATTA 180
90     CCTACTATAAGTGATGCACCTATTGATAACTACCCAATCCCTGGCGCTAGTGCAACATTA 180
88     CCTACTATAAGTGATGCACCTATTGATAACTACCCAATCCCTGGCGCTAGTGCAACATTA 180
4      CCTACTATAAGTGATGCACCTATTGATAACTACCCAATCCCTGGCGCTAGTGCAACATTA 175
          *****

87      CGTTATCCTTCACAATATGATGTTGCATTTAACCTTCAAGATAACAGCGCTCGTTTCTTT 236
2      CGTTATCCTTCACAATATGATGTTGCATTTAACCTTCAAGATAACAGCGCTCGTTTCTTT 240
ATCC 14579 CGTTATCCTTCACAATATGATGTTGCATTTAACCTTCAAGATAACAGCGCTCGTTTCTTT 240
90     CGTTATCCTTCACAATATGATGTTGCATTTAACCTTCAAGATAACAGCGCTCGTTTCTTT 240
88     CGTTATCCTTCACAATATGATGTTGCATTTAACCTTCAAGATAACAGCGCTCGTTTCTTT 240
4      CGTTATCCTTCACAATATGATGTTGCATTTAACCTTCAAGATAACAGCGCTCGTTTCTTT 235
          *****

87      AACGTAGCA CCTACAAATGCTGTAGAAGAAACGACTGTAAACATCTAGCG---- 285
2      AACGTAGCACCTACAAATGCTGTAGAAGAAACGACTGTAAACATCTAGCGTATC 293
ATCC 14579 AACGTAGCACCTACAAATGCTGTAGAAGAAACGACTGTAAACATCTAGCGTATC 293
90     AACGTAGCACCTACAAATGCTGTAGAAGAAACGACTGTAAACATCTAGTGTATC 293
88     AACGTAGCACCTACAAATGCTGTAGAAGAAACGACTGTAAACATCTAGCGTATC 293
4      AACGTAGCACCTACAAATGCTGTAGAAGAAACGACTGTAAACATCTAGCGTAT- 287
          *****

```

Figura 15 - Alinhamento das seqüências de DNA amplificadas para o gene *CytK* de *Bacillus cereus* isolados nos sistemas de produção de leite cru em comparação ao *Bacillus cereus* ATCC 14579

3.6. Tradução do sequenciamento de DNA para a composição em aminoácidos da *CytK* de isolados de *Bacillus cereus*.

O alinhamento das sequências de proteínas de *B. cereus* revelou um fragmento altamente conservado da proteína. Uma possível região formadora de poros pode ser observada parcialmente nas sequências obtidas neste trabalho já descrita por outros autores na literatura (Fagerlund et al., 2004).

```

4      ---MTMSLKVTFIDDPKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLRYPSQ 57
90     ---MTMSLKVTFIDDPKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLRYPSQ 57
88     ---MTMSLKVTFIDDPKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLRYPSQ 57
ATCC 14579  ADNMTMSLKVTFIDDPKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLRYPSQ 60
2      ADNMTMSLKVTFIDDPKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLRYPSQ 60
87     ADNMTMSLKVTFIDDPKQIAVINTTGSFLKANPTISDAPIDNYPIPGASATLRYPSQ 60
          *****

4      YDVAFNLDNSARFFNVAPTNAVEETTVTSSVSYQLGGSVKASV----- 101
90     YDVAFNLDNSARFFNVAPTNAVEETTVTSSVSYQLGGSVKAS----- 100
88     YDVAFNLDNSARFFNVAPTNAVEETTVTSSVSYQLGGSV----- 97
ATCC 14579  YDVAFNLDNSARFFNVAPTNAVEETTVTSSVSYQLGGSVKASVTPNG 108
2      YDVAFNLDNSARFFNVAPTNAVEETT----- 87
87     YDVAFNLDNSARFFNVAPTNAVEETTVTSSVSYQLGGSVKA----- 102
          *****

```

Figura 16 - Alinhamento de aminoácidos para dedução da proteína *CytK* de diferentes isolados de *Bacillus cereus* comparadas à do *Bacillus cereus* ATCC 14579 , em amarelo a possível região formadora de poro.

3.7. Sequenciamento do DNA dos isolados de *Bacillus cereus* positivos para enterotoxina não hemolítica (NHE)

Constata-se (Figura 17) que os isolados dos sistemas de produção apresentaram sequências conservadas semelhantes a do *Bacillus cereus* NVH 0075-95 e, portanto, apresentam potencial de causar doenças de origem alimentar. Esta afirmação se fundamenta no fato de que a estirpe usada como referência para comparar o alinhamento das sequências obtidas do sequenciamento do DNA de isolados que amplificaram o gene da enterotoxina não-hemolítica foi isolada em surto de intoxicação alimentar.

```

111    AATGAATAAGCAAACAAATCAATTTGAAGATTACGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 60
NVH0075-95  AATGAATAAGCAAACAAATCAATTTGAAGATTACGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 60
89     AATGAATAAGCAAACAAATCAATTTGAAGATTACGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 60
L5     AATGAATAAGCAAACAAATCAATTTGAAGATTACGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 60
115    -----CGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 27
110    -----CGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 27
116    -----CGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 27
108    AATGAATAAGCAAACGAAATCAATTTGAAGATTACGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 60
90     AATGAATAAGCAAACGAAATCAATTTGAAGATTACGTTACAAACGTTGAGTACATTAATA 60
          *****

111    ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 120
NVH0075-95  ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 120
89     ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 120
L5     ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 120
115    ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 87

```

```

110      ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 87
116      ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 87
108      ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 120
90       ATAAGTAACGATATAGGGAGAGAAGAAAAATGACAAAAAACCTTATAAAGTAAATGGCTC 120
          *****

111      TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 180
NVH0075-95 TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 180
89       TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 180
L5       TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 180
115      TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 147
110      TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 147
116      TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 147
108      TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 180
90       TATCAGCACTTATGGCAGTATTTACAGCAGGAAACATTATGCCAGCCCATACGTATGCAG 180
          *****

111      CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 240
NVH0075-95 CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 240
89       CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 240
L5       CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 240
115      CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 207
110      CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 207
116      CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 207
108      CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 240
90       CTGAAAGTACAGTGAACCAAGCTCCAGTTTCATGCGGTAGCAAAGCTTATAATGACTATG 240
          *****

111      AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 299
NVH0075-95 AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 299
89       AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 299
L5       AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 299
115      AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 266
110      AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 266
116      AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 266
108      AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 299
90       AGGAATACTCATTAGGACCAGAAAGGCTTAAAAGATGCAATGGAAGAAACAGGTTCAA 299
          *****

```

Figura 17 - Alinhamento das sequências de DNA amplificadas para o gene NHE de *Bacillus cereus* isolados nos sistemas de produção de leite cru em comparação ao *Bacillus cereus* NVH0075-95

Trabalhos realizados por Ngamwongsatit et al., (2008) avaliaram a presença de fatores de virulência em 121 isolados de *B. cereus* coletados de amostras de alimentos. Esse isolados foram submetidos a PCR Multiplex e 19 (16%) isolados não amplificaram fragmento de DNA desejado para os genes que codificam as enterotoxinas *HBL* e *CytK*. Estes resultados são compatíveis com obtidos nosso trabalho uma vez que dos 32 isolados submetidos à técnica do PCR para a detecção de fatores de virulência 9 (28%) isolados não amplificaram nem um dos genes de virulência.

4. CONCLUSÕES

A partir dos análises de diversas fontes de contaminação foi constatado que *B. cereus* contaminou o leite cru, inclusive com estirpes que continham os genes de fatores de virulência: em 13 isolados de 15 avaliados foram detectados o gene da *NHE* e em 4 o da *CytK*. Um dos isolados apresentaram ambos os genes. O gene da *CytK* também foi detectado em *B. cereus* presente no ar de ambiente de produção.

A associação de técnicas de biologia molecular com as técnicas de microbiologia tradicionais se complementaram para uma melhor compreensão das características das estirpes isoladas.

A técnica de PCR mostrou-se sensível para a detecção de fatores de virulência relacionados a síndrome diarréica produzido por *B. cereus* pois detectou os fatores *NHE* e *CytK* em 22 (69%) dos isolados testados.

Os resultados indicam que nos sistemas de produção avaliados, há perigo do leite cru veicular estirpes de com potencial patogênico de produzir a intoxicação diarréica por *B. cereus*, sendo portanto uma preocupação para a saúde pública e também para a tomadas de medidas quanto as boas práticas de produção do leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. **Compendium methods for microbiological examination of foods**. 5. Ed. American Public Health Association (APHA) cap. 32, 2005., p. 311-316
- ARNESEN, L. P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Review**, v.32 p. 579–606., 2008
- BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. A Novel Bicomponent Hemolysin from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunology**, v. 58, p. 2220-2227, 1990
- BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunology** v. 59, p. 1778–1784, 1991.
- BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens - mechanisms and pathogenesis**. West Lafayette: Springer, p. 135-149, 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.
- CARDAZZO, B.; NEGRISOLO, E.; CARRARO, L.; ALBERGHINI, L.; PATARNELLO, T.; GIACCONE, V. Multiple-Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in *Bacillus cereus* Food-Borne Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 850–860, 2008.
- CEMPÍRKOVÁ, R. Factors negatively influencing microbial contamination of milk. **Agricultura Tropica et Subtropica**, v. 39, p. 220-226, 2006.

CRIELLY, E. M.; LOGAN, N. A.; ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk product. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 256-263, 1994.

DAUGA, C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 531–547, 2002.

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

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

ELMER, H. M. **Applied Dairy Microbiology Food Science and Technology**. University of Wisconsin. Madison, Wisconsin, p. 285-290, 1998.

EVANCHO, G. M.; SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. APHA, 2001. cap. 3, p. 25-35.

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.

Fagerlund, A.; Brillard. J.; Furst, R.; Guinebretiere, M. H.; Granum, P. E. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. **BMC Microbiology**, v.7, p. 43, 2007.

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

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

GARRIDO, N. S.; MORAIS, T. J. M.; BRIGANTE, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, S. A. V.; FÁVARO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de leite pasteurizada proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 60, p. 141 – 146, 2001.

GOHAR, M.; FAEGRI, K.; PERCHAT, S.; RAVNUM, S.; OKSTAD, O. A.; GOMINET, M.; KOLSTO, A. B.; LERECLUS, D. The *PlcR* Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. **Plos One**, v. 3, p. 2793, 2008

GOMES, I. L. **Pesquisa de enterotoxinas em isolados alimentares do grupo *Bacillus cereus***. Lisboa, PORTUGAL, UNIVERSIDADE TECNICA DE LISBOA, 2009. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUNH, J. B.; CHRISTENSEN, A. B.; GIVSKOV, M. Food spoilage – international between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 79-97, 2002.

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

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223-228, 1997.

GRIFFITHS, M. W., PHILLIPS, J. D. Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus spp.* found in raw milk and pasteurized milks. **Journal Society of Dairy Technology**, v.43, p.62-70, 1990.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 185–189, 2001.

HORWOD, P.F.; BURGESS, G.W.; JANE OAKEY, H. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 319–324, 2004

ISOBE, M.; ISHIKAWA, T.; SUWAM, S.; AGATA, N.; OHTA, M. Synthesis and activity of cereulide, a cyclic dodecadepsipeptide ionophore as emetic toxin from *Bacillus cereus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p. 2855–2858, 1995.

JÄÄSKELÄINEN, E. Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food., University of Helsinki, Helsinki, p. 74, 2008.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. ***Bacillus cereus* gastroenteritis**, **Modern Food Microbiology**, 7th Ed. Springer Science + Business Media, Inc., New York, USA, p. 583–590, 2005.

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, p. 36, 2008,

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections, **Microbes and Infection**, v. 2, p. 189–198, 2000.

LAMPE, M. F.; BOTT, K. F. Genetic and Physical Organization of the Cloned *gyrA* and *gyrB* Genes of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.162. p. 78-84, 1985.

LAPIDUS, A.; GOLTSMAN, E.; AUGER, S.; GALLERON, N.; SÉGURENS, B.; DOSSAT, C.; LAND, M. L.; BROUSSELLE, V.; BRILLARD, J.; GUINEBRETIERE, M, H.; SANCHIS, V.; NGUEN-THE, C.; LERECLUS, D.; RICHARDSON, P.; WINCKER, P.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S. D.; SOROKIN, A. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 236–249, 2008

LAWRENCE, K.; CREAMER, LINDSAY E.; PEARCE, JEREMY; HILL, P.; MIKE, J.; BOLAND. Milk and Dairy Products in the 21st Century Prepared for the 50th Anniversary of the Journal of Agricultural and Food Chemistry. **Journal of Agricultural and Foodchemistry**, v. 50, p. 7187 – 7193. 2002

LINDBACK,T.; HARDY, S. P.; DIETRICH, R.; SØDRING, M.; DIDIER, A, MORAVEK, M.; FAGERLUND, A.; BOCK, S.; NIELSEN, C.; CASTEEL, M.; GRANUM, P. E.;MARTLBAUER, E. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* NHE Enterotoxin Requires Specific Binding Order of Its Three Exoprotein Components. **Infection and Immunity**, v. p. 3813–3821, 2010.

LINDBÄCK, T.; FAGERLUND, A.; RODLAND,M. S.; GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* NHE enterotoxin. **Microbiology**, v. 150, p. 3959–3967, 2004.

LUND, T.; BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 38, p. 25-261, 2000.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 249-254, 2003.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI, O. D.; LAGO, N. C. R. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 396-400, 2005.

MAUGHAN, H.; AUWERA, G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 789–797, 2011

MCKINNON, C. H.; ROWLANDS, J.; BRAMLEY, A. J. The effect of udder preparation before milking and contamination from the milking plant on bacterial numbers in bulk milk of eight herds. **Journal of Dairy Research**, v. 57, p. 307-318.

MINNAARD, J.; DELFEDERICO, L.; VASSEUR, V.; HOLLMANN, A.; ROLNY, I.; SEMORILE, L.; PEREZ, P. F. Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 197–206, 2007

NGAMWONGSATIT, P.; BUASRI, W.; PIANARIYANON, P.; PULSRIKARN, C.; OHBA, M.; ASSAVANIG, A.; PANBANGRED, W. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 352–356, 2008.

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

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, p. 645-651, 2006.

PRESCOTT, HARLEY, & KLEIN'S.. **Microbiology** , 7th New York McGraw Hill, p. 1088, 2008.

RALYEA, R.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1336-1340, 1998.

REZENDE, N.C.M.; ROSSI Jr., O.D.; AMARAL, L.A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, p.162-166, 2000

SCHELDEMAN, P.; PIL, A.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Incidence and Diversity of Potentially Highly Heat-Resistant Spores Isolated at Dairy Farms. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1480-1494, 2005.

SENESI, S.; GHELARDI, E. Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1690-1703, 2010.

SHAHEE, R. ***Bacillus cereus* Spores and Cereulide in Food-Borne Illness**. Academic Dissertation in Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry University of Helsinki, p. 50, 2009.

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

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 673-687, 2007.

ZACARCHENCO, P.B.; LEITÃO, M.F.F.; DESTRO, M.T. et al. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, v.20, p.363-368, 2000

ZAHNER, V.; CABRAL, D. A.; RÉGUA-MANGIA, A. H.; RABINOVITCH, L.; MOREAU, G.; MCINTOSH, D. Distribution of Genes Encoding Putative Virulence Factors and Fragment Length Polymorphisms in the *vrrA* Gene among Brazilian Isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8107–8114, 2005.

WANG, L. T.; LEE, F. L.; TAI, C. J.; KASAI, H. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1846–1850, 2007.