

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Luís Renato dos Santos Mascarenhas

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Bacillus cereus sensu stricto*
ISOLADOS DE ALIMENTOS**

Belo Horizonte

2018

Luís Renato dos Santos Mascarenhas

FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Bacillus cereus sensu stricto* ISOLADOS DE ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FARFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda (FARFAR)

Co-Orientadora: Dra. Adriana Marcos Vivoni (Fiocruz-RJ)

Belo Horizonte

2018

M395f Mascarenhas, Luís Renato dos Santos.
Fatores de virulência de *Bacillus cereus* sensu stricto isolados de alimentos / Luís Renato dos Santos Mascarenhas – 2018.
85 f. : il.

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.
Coorientadora: Adriana Marcos Vivoni.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Bacillus (Bactéria) – Teses. 2. Enterotoxinas – Teses. 3. Virulência (Microbiologia) – Teses. 4. Intoxicação alimentar – Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Vivoni, Adriana Marcos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 576.163



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO LUÍS RENATO DOS SANTOS MASCARENHAS

Realizou-se, no dia 27 de março de 2018, às 09:00 horas, Sala 3062 da Faculdade de Farmácia UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada: **Fatores de Virulência de *Bacillus cereus sensu stricto* Isolados de Alimentos**, apresentada por LUÍS RENATO DOS SANTOS MASCARENHAS, número de registro 2016650847, graduado no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda – (Orientadora e Presidente da Comissão) Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira, ambos da Faculdade de Farmácia da UFMG, e o Dr. Ricardo Souza Dias da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 27 de março de 2018.

Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda (Orientadora e Presidente da Comissão)

Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Dr. Ricardo Souza Dias

Dedico este trabalho a todos aqueles
que confiaram na minha pessoa.

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais;

À Fundação Ezequiel Dias;

Ao Laboratório de Fisiologia Bacteriana da Fundação Oswaldo Cruz;

Aos meus pais Cléber e Maria Lídia (sempre presente);

À esposa Marina e à filha Maíra;

À antiga chefe do SMBP , Junara Viana de Oliveira, pelo apoio inicial e liberação para a realização do curso;

Aos colegas do Serviço de Microbiologia de Produtos da FUNED que colaboraram para eu conseguir realizar o curso (Roberta, Ricardo, Leandro, Gracielle e Ana Cláudia);

À Jovita e Gláucia do Serviço de Ciências Bioquímicas, pelo treinamento e suporte técnico em biologia molecular;

Aos professores, coordenadores e equipe da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG;

À professora do ICB/UFMG, Regina Maria Nardi Drummond, pela colaboração inicial e suporte técnico;

À Orientadora Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda, pela excelência na orientação;

À Co-Orientadora Dra. Adriana Marcos Vivoni, pela excelência na co-orientação,

pelo suporte técnico e condições de trabalho oferecidas;

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, Edmar Justo, Josiane e Vera, pela colaboração, apoio e amizade;

Em especial, ao Dr. Leon Rabinovitch, pela oportunidade de realizar o mestrado em parceria com o Laboratório de Fisiologia Bacteriana da FIOCRUZ-RJ, pelo suporte laboratorial nas análises de biologia molecular e pelas condições de trabalho oferecidas.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de fatores de virulência em 65 linhagens de *Bacillus cereus* sensu stricto (s.s.) isoladas de alimentos. Todas as 65 linhagens utilizadas nesse estudo foram caracterizadas fenotipicamente para a identificação da espécie *B. cereus* s.s. e também genotipicamente para a determinação da presença dos genes codificadores de fatores de virulência. Foram pesquisados os seguintes genes codificadores de fatores de virulência: *nheA*, *nheB*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, , *cytK-1*, *cytK-2*, *ces*, *clo*, *hlyII*, *hlyIII*, *pi-plc*, *pc-plc* e *sph*. Todas as linhagens de *B. cereus* s.s. foram positivas para os genes *nheA* e *nheB*, codificadores da toxina NHE. Os genes codificadores do complexo HBL (*hblA*, *hblC* e *hblD*) foram detectados em 47 (72,3%) amostras e em 3 amostras, somente os genes *hblA* e *hblC* foram detectados. O gene *cytK-2* foi detectado em 38 (58,4%) amostras. Todas as linhagens foram negativas para os genes *ces* e *cytK-1*. A análise da ocorrência dos genes codificadores das enterotoxinas permitiu a classificação das 65 linhagens em 5 perfis toxigênicos. O perfil toxigênico predominante foi o I, que inclui cepas positivas para todos os genes, menos *ces* e *cytK-1*. Com relação à ocorrência dos genes que codificam os outros fatores de virulência, os genes das hemolisinas *clo*, *hlyIII* e *hlyII* foram detectados em 65 (100%), 44 (67,7%) e 14 (21,5%) das 65 linhagens avaliadas, respectivamente. Com relação à ocorrência dos três genes que codificam as fosfolipases *pcplc*, *sph* e *piplc*, seus produtos foram amplificados em 49 (75,4%), 42 (64,6%) e 42 (64,6%) das linhagens avaliadas, respectivamente. A análise da ocorrência dos genes codificadores de hemolisinas e fosfolipases permitiu a classificação das linhagens em 20 perfis de virulência. O perfil de virulência predominante foi o II, que inclui linhagens positivas para todos os genes de virulência, menos *hlyII*. Os resultados do presente trabalho sugerem que as linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos apresentam vários fatores de virulência envolvidos na patogenia de infecções por *B. cereus* s.s, representando risco potencial para causar intoxicação alimentar e infecções oportunistas. Estudos adicionais envolvendo testes de citotoxicidade e afiliação aos grupos filogenéticos determinados pelo sequenciamento do gene *panC* devem ser realizados para uma melhor avaliação de risco de tais linhagens.

Palavras-chave: 1. *B. cereus* s.s. 2. Enterotoxinas 3. Fatores de virulência.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the presence of virulence factors in 65 strains of *Bacillus cereus* sensu stricto (s.s) isolated from food. All 65 strains used in this study were phenotypically characterized for *B. cereus* s.s. and also genotypically for the determination of the presence of genes encoding virulence factors. The following genes encoding virulence factors were investigated: *nheA*, *nheB*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK-1*, *cytK-2*, *ces*, *clo*, *hlyII*, *hlyIII*, *pi-plc*, *pc-plc* and *sph*. All strains of *B. cereus* s.s. were positive for the *nheA* and *nheB* genes encoding the NHE toxin. The genes encoding the HBL complex (*hblA*, *hblC* and *hblD*) were detected in 47 (72.3%) samples and in 3 samples, only *hblA* and *hblC* genes were detected. The *cytK-2* gene was detected in 38 (58.4%) samples. All strains were negative for the *ces* and *cytK-1* genes. The analysis of the occurrence of the genes encoding the enterotoxins allowed the classification of the 65 strains into 5 toxigenic profiles. The predominant toxigenic profile was I, which includes strains positive for all genes minus *ces* and *cytK-1*. Concerning the occurrence of the genes encoding the other virulence factors, the genes of *clo*, *hlyIII* and *hlyII* haemolysins were detected in 65 (100%), 44 (67.7%) and 14 (21,5%) of the 65 strains evaluated, respectively. With respect to the occurrence of the three genes encoding the phospholipases *pcplc*, *sph* and *piplc*, their products were amplified in 49 (75.4%), 42 (64.6%) and 42 (64.6%) of the evaluated strains respectively. The analysis of the occurrence of genes coding for hemolysins and phospholipases allowed the classification of the strains into 20 virulence profiles. The predominant virulence profile was II, which includes positive strains for all virulence genes, minus *hlyII*. The results of the present work suggest that the strains of *B. cereus* s.s. isolates of food present several virulence factors involved in the pathogenesis of *B. cereus* s.s infections, representing a potential risk for causing food poisoning and opportunistic infections. Further studies involving cytotoxicity testing and affiliation to phylogenetic groups determined by *panC* gene sequencing should be performed for a better risk assessment of such lineages.

Keywords: *B. cereus* s.s. 2. Enterotoxins 3. Virulence factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1-	Categoria de alimentos envolvidos em surtos de DTA	51
Figura 1-	Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos da PCR multiplex: genes <i>hblACD</i> e <i>ces</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Iniciadores utilizados nesse estudo.....	43
Tabela 2-	Contagem de <i>B. cereus</i> s.s. em alimentos provenientes do PROGVISA.....	45
Tabela 3-	Contagem de <i>B. cereus</i> s.s. em amostras do processamento de tucupi.....	48
Tabela 4-	Contagem de <i>B. Cereus</i> s.s. em alimentos envolvidos em surtos de DTA.....	49
Tabela 5-	Total de isolados positivos e respectiva frequência de detecção dos genes codificadores de fatores de virulência	55
Tabela 6-	Perfis toxigênicos identificados nas 65 linhagens de <i>B. cereus</i> s.s.....	57
Tabela 7-	Perfis de virulência identificados nas 65 linhagens de <i>B. cereus</i> s.s.....	61

LISTA DE SIGLAS

°C	Graus Celsius
<i>ces</i>	Gene codificador da Cereulida
CCGB	Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos
<i>clo</i>	Gene codificador da Cereolisina O
<i>cytK</i>	Gene codificador da Citotoxina K
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos Trifosfatos
DTA	Doença transmissível por alimentos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>entFM</i>	Gene codificador da Enterotoxina FM
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
<i>hbl</i>	Gene codificador da Hemolisina BL
<i>HlyII</i>	Gene codificador da Hemolisina II
<i>HlyIII</i>	Gene codificador da Hemolisina III
LACEN	Laboratório Central
LFB	Laboratório de Fisiologia Bacteriana
KB	Kilo bases
<i>nhe</i>	Gene codificador da Enterotoxina não-hemolítica
ng	Nanograma
<i>panC</i>	Gene codificador da enzima Pantotenato beta-alanina ligase
<i>pc-plc</i>	Genes codificador fosfolipase C específica para fosfatidilcolina
<i>pi-plc</i>	Gene codificador fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
PROGVISA	Programa de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos da Vigilância Sanitária
<i>sph</i>	Gene codificador da esfingomielinase
<i>taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato EDTA
TE	Tris-EDTA
µg	Micrograma
µL	Microlitros

μM	Micromolar
mM	Milimolar
V	Volts
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 GÊNERO <i>BACILLUS</i> spp.	20
3.2 GRUPO DO <i>Bacillus cereus</i>	22
3.3 ESPÉCIES DO GRUPO DO <i>Bacillus cereus</i>	26
3.3.1 <i>B. anthracis</i>	26
3.3.2 <i>B. thuringiensis</i>	27
3.3.3 <i>B. mycoides</i>	28
3.3.4 <i>B. pseudomycoides</i>	28
3.3.5 <i>B. weihenstephanensis</i>	28
3.3.6 <i>B. cytotoxicus</i>	29
3.3.7 <i>B. cereus</i> s.s.	29
3.4 PATOGENICIDADE DE <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto	31

3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto	33
3.5.1 Hemolisina BL (HBL)	34
3.5.2 Enterotoxina Não-hemolítica	34
3.5.3 Citotoxina K	35
3.5.4 Enterotoxina FM	35
3.5.5 Cereulida	35
3.5.6 Fosfolipases	36
3.5.7 Hemolisinas	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 LINHAGENS DE <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto UTILIZADAS NO ESTUDO E SUAS ORIGENS	38
4.2 CONTAGEM DE <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto NAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS	38
4.3 IDENTIFICAÇÃO CONVENCIONAL DE <i>Bacillus. cereus</i> sensu stricto	39
4.4 DETECÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA	39
4.4.1 Extração de DNA através de lise térmica	39
4.4.2 Amplificação dos genes codificadores da enterotoxina não-hemolítica	39
4.4.3 Amplificação simultânea dos genes codificadores da hemolisina BL e toxina emética	40
4.4.4 Amplificação dos genes codificadores da citotoxina K	40
4.4.5 Amplificação dos genes codificadores de hemolisinas e fosfolipases	41
4.4.6 Eletrofose em gel de agarose 2% para análise dos produtos da PCR	41

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ISOLAMENTO, CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto DE ORIGEM ALIMENTAR	44
5.1.1 Identificação fenotípica de <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto e diferenciação dos demais membros do grupo do <i>Bacillus cereus</i>	44
5.1.2 <i>B. cereus</i> s.s. isolados de alimentos do PROGVISA	45
5.1.3 <i>B. cereus</i> s.s. isolados de alimento fermentado: tucupi	48
5.1.4 <i>B. cereus</i> s.s. isolados de alimentos envolvidos em surtos de DTA	49
5.2 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE GENES CODIFICADORES FATORES DE VIRULÊNCIA	54
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS TOXIGÊNICOS DAS LINHAGENS DE <i>B. cereus</i> s.s.	56
5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DE VIRULÊNCIA DAS LINHAGENS DE <i>B. cereus</i> s.s.	60
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6 CONCLUSÃO	65
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE A	77
APÊNDICE B	79

1 INTRODUÇÃO

A preocupação e os cuidados com a higiene dos alimentos têm aumentado progressivamente nos últimos anos. Tal preocupação visa garantir a inocuidade e a qualidade dos alimentos, a fim de atender a crescente demanda da população por tais requisitos. No contexto da inocuidade, as doenças transmitidas por alimentos (DTA), por exemplo, apresentam abrangência mundial e destacam-se como um dos problemas mais frequentes em Saúde Pública (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2008, p. 88).

Frente a essa realidade, percebe-se, no cenário mundial, que a busca pelo consumo de alimentos inócuos é uma demanda crescente, visto ser essencial para a promoção da saúde e prevenção de doenças no ser humano. Nesse sentido, no Brasil, várias iniciativas institucionais, legais e comunitárias, com objetivo de assegurar a qualidade e a segurança dos alimentos, vêm sendo consolidadas desde a promulgação da Constituição da República Federativa do Brasil, em 1988. Dentre estas, destaca-se a publicação da Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990, que regulamentou o Sistema Único de Saúde (SUS) e dispôs sobre a execução Nacional das ações de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1990).

Complementando as ações mencionadas acima, foi publicada a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que definiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cuja finalidade precípua é exercer atividades de regulação, normalização, controle e fiscalização na área de Vigilância Sanitária. Outra relevante tratativa legal se deu por meio da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA, que aprovou o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos em Alimentos, reforçando, assim, a constante necessidade de aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, com vistas à proteção da saúde humana (BRASIL, 1999; BRASIL, 2001; SES-MG, 1999).

Corroborando as ações nacionais, Minas Gerais, a partir dos anos 2000, iniciou as atividades do Programa de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos da Vigilância Sanitária (PROGVISA/MG), um importante instrumento para o

planejamento e a estruturação das ações da Vigilância Sanitária no Estado e municípios, cuja finalidade baseia-se no monitoramento da qualidade dos alimentos que são comercializados no Estado. O programa conta com a participação de 28 Superintendências Regionais de Saúde (SRS), 346 Vigilâncias Sanitárias Municipais e do Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN-MG) (SES-MG, 2011).

Dados epidemiológicos dos EUA e do Brasil demonstram que os microrganismos são considerados os principais responsáveis pela ocorrência de surtos de DTA. Dentre os principais contaminantes microbiológicos dos alimentos destaca-se o *Bacillus cereus*, sendo que essa bactéria situa-se como o quarto agente etiológico mais identificado em surtos de DTA ocorridos no Brasil, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Sendo uma bactéria ambiental, contamina várias matérias-primas e alimentos, mas ao contrário da *Salmonella* spp. e do *Campylobacter* spp., *B. cereus* s.s. sobrevive à maior parte dos tratamentos de confecção dos alimentos, devido à sua capacidade de produção de esporos termorresistentes (BRASIL, 2010; JAY, 2005).

Em Minas Gerais, o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-MG) analisa rotineiramente amostras de alimentos envolvidas em surtos de toxinfecção alimentar e também do Programa de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos. Linhagens de *B. cereus* s.s. vêm sendo isoladas dessas amostras. Ter o conhecimento da presença de genes codificadores de fatores de virulência torna-se importante, a fim de avaliar o potencial de causar intoxicação alimentar dessas linhagens.

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a produção de toxinas pelas linhagens de *B. cereus* s.s. e identificar a presença de genes responsáveis por sua formação (SANTOS, 2009). Entretanto, pouco tem sido feito com linhagens isoladas de países tropicais, sendo escassos os dados existentes no Brasil relacionados à patogenicidade de *B. cereus* s.s. isolados de alimentos. Diante do exposto, torna-se importante avaliar a presença de genes codificadores de fatores de virulência em linhagens de *Bacillus cereus* isoladas de alimentos no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo pesquisar a presença de genes codificadores de fatores de virulência em linhagens de *B. cereus* sensu stricto (s.s.) isoladas de alimentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar linhagens de *B. cereus* s.s. de diferentes alimentos;
- Identificar linhagens de *B. cereus* s.s. por métodos convencionais;
- Identificar a presença de genes codificadores de toxinas dos complexos HBL e NHE, bem como dos genes codificadores da citotoxina K e da toxina emética, caracterizando as linhagens quanto ao potencial toxigênico;
- Identificar a presença de genes codificadores de outros fatores de virulência, que incluem as fosfolipases e as hemolisinas, caracterizando as linhagens quanto ao potencial de virulência adicional;
- Identificar os perfis toxigênicos e de virulências dessas linhagens;
- Realizar teste estatístico para avaliar se existe diferença entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s isoladas de outros alimentos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GÊNERO *BACILLUS* spp

Pertencente à família *Bacillaceae*, o gênero *Bacillus* spp. forma um grupo de bactérias extremamente heterogêneo, tanto geneticamente quanto fenotipicamente. Poucas espécies são patogênicas, e as demais despontam, preferencialmente, como microrganismos de importância industrial, pois geram produtos que são comercializados. Diferentes enzimas, proteínas, antibióticos, inseticidas bacterianos e outros compostos orgânicos são produzidos em escala industrial graças a esses microrganismos. A espécie mais patogênica é o *B. anthracis*, agente etiológico do carbúnculo hemático nos animais e homem, e usado com arma biológica em atentados de terrorismo (GOMES, 2015; INTITUTO OSWALDO CRUZ, 2015).

Esse gênero foi estabelecido por Cohn em 1872 e tem apresentado considerável mudança taxonômica ao longo do tempo. As primeiras espécies descritas foram *B. anthracis* e *B. subtilis*, que apresentavam formação de endósporo como característica morfológica facilmente reconhecida para a diferenciação taxonômica (FRITZE, 2004).

O desenvolvimento de métodos de identificação de linhagens bacterianas, especialmente as análise de rRNA-16S e sequenciamento de DNA, tem exercido grande influência na reclassificação taxonômica das espécies desse gênero (ASH *et al.*, 1991; CLAUS, 1986). Com a análise sequencial do gene codificador do rRNA-16S, em 1991, Ash e colaboradores reclassificaram o gênero em 51 espécies e 5 grupos filogenéticos. A partir deste ponto, outros estudos foram feitos, novos gêneros foram sendo criados e novas espécies foram identificadas (FRITZE, 2004). Atualmente, encontramos 300 espécies e 7 subespécies no gênero *Bacillus* spp. (CLAUS, 1986; INTITUTO OSWALDO CRUZ, 2015).

As espécies desse gênero são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 X 1,2 µm até 2,5 x 10 µm), Gram-positivas, aeróbias ou aeróbias facultativas, em geral dotadas de mobilidade por

meio de flagelos peritríquios. O *B. anthracis* e o *B. mycoides* são imóveis. Nas espécies móveis, a motilidade é variável, segundo a linhagem. Algumas espécies, como o *B. anthracis*, o *B. licheniformis*, o *B. megaterium* e o *B. subtilis*, são capsuladas. O *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e o *B. weihenstephanensis* formam colônias de tamanho grande, de 2 a 7 mm de diâmetro, foscas ou granuladas e de forma variáveis, sendo circulares ou não, com bordas regulares ou denteadas ou filamentosas. O *B. mycoides* e o *B. pseudomycoides* produzem colônias rizoides e aderentes que se espalham por toda a superfície do ágar em 48 horas. (FRITZE, 2004; GOMES, 2015).

Os esporos são de origem endocitoplasmática e localizam-se no interior da célula-mãe, o esporângio. Ocorrem variações na forma desses esporos, podendo ser cilíndricos, elipsoidais, ovais ou esféricos. A localização no esporângio pode se dar na posição central, para-central, subterminal, terminal ou lateral. As características morfológicas e dimensões dos esporos são bastante úteis para, juntamente com aquelas fisiológicas e bioquímicas, se determinar a espécie (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2015).

São comumente encontrados no solo, água, vegetais, poeira e ar, sendo considerados ubíquos. A característica mais marcante do gênero é a capacidade de esporulação, fenômeno que, ao contrário que acontece com as espécies do gênero *Clostridium*, não é inibido pelo oxigênio (GOMES, 2009). Nesse processo, a célula bacteriana, quando em condições específicas, em geral desfavoráveis, desenvolve um ciclo de esporulação no qual são formados esporos que não exibem atividade metabólica e representam uma fase altamente resistente contra um ambiente adverso. Sendo assim, a bactéria consegue permanecer em um estado de “dormência” até que o ambiente torne-se novamente favorável. Quando partículas do solo são levadas pelo vento, ocorre disseminação de um grande número de espécies de microrganismos esporulados, o que faz com que eles apareçam em diferentes tipos de alimentos, principalmente em sementes, farinhas, folhas de vegetais e cascas de legumes (REZENDE-LAGO, 2002).

Por vezes, verifica-se que espécies de um mesmo gênero, pelo fato de apresentarem características fenotípicas e genotípicas muito semelhantes, são

agrupadas por alguns pesquisadores em conjuntos denominados de grupo. É o caso do *B. cereus* s.s. e espécies próximas, sendo esse grupo denominado de “*B. cereus* sensu lato” ou “grupo do *Bacillus cereus*” (FORGHANI *et al.*, 2016; INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2015).

As características fenotípicas clássicas para diferenciar os membros do grupo do *B. cereus* dos outros microrganismos formadores de endósporo na presença de oxigênio são a sua inabilidade para produzir ácido a partir do manitol e a produção de lecitinase (FRITZE, 2004). No meio de cultura tradicional ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP) as colônias ficam cor-de-rosa, pois não fermentam o manitol, utilizando as peptonas, alcalinizando o meio e mudando-o de coloração devido à viragem do indicador vermelho de fenol. Também formam uma zona de precipitação em torno das colônias devido à produção de lecitinase (TALLENT *et al.*, 2012). Enquanto os membros do grupo do *B. cereus* são facilmente distinguidos de outras bactérias formadoras de endósporo na presença de oxigênio, é difícil fazer a distinção entre os membros desse grupo de bactérias. (CHERIF *et al.*, 2007; JAASKELAINEN, 2008; FRITZE, 2004).

3.2 GRUPO DO *Bacillus cereus*

Esse termo se refere a um grupo de bactérias formado por sete espécies: *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* (NAKAMURA, 1998), *B. weihenstephanensis* (LECHNER *et al.*, 1998) e *B. cytotoxicus* (GUINEBRETIERE *et al.*, 2013). As espécies desse grupo compartilham um nível elevado de similaridade genética, de modo que tanto a hibridização DNA-DNA, quanto a análise das sequências RNAr 16s e 23s não conseguiram separar claramente os membros desse grupo (ASH *et al.*, 1991; FRITZE, 2004).

Fenotipicamente, o *B. anthracis* distingue-se pela formação de cápsula, por ser imóvel e não hemolítico (HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Já o *B. thuringiensis* distingue-se pela produção de um cristal proteico durante a esporulação. O aparecimento de colônias com crescimento rizoide em ágar é característico de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* (HENDRIKSEN *et al.*, 2006). O *B.*

weihenstephanensis é uma estirpe psicrotrófica capaz de se multiplicar abaixo de 7°C, mas não a 43°C enquanto o *B. cytotoxicus* somente cresce a temperatura acima de 20°C e até 50°C, sendo considerada uma espécie termotolerante (GUINEBRETIERE *et al.*, 2013; TOURASSE *et al.*, 2006). Entretanto, algumas propriedades atribuídas a determinada espécie podem não ser intrinsecamente exclusivas, como exemplo, a psicrotolerância, característica primária do *B. weihenstephanensis*, que foi relatada entre cepas de *B. thuringiensis* e *B. mycoides* (BARTOSZEWICZ *et al.*, 2009; GUINEBRETIERE *et al.*, 2010; STENFORS; GRANUM, 2001).

Quanto aos padrões clássicos de patogenicidade, a espécie *B. cereus* s.s. é considerada um patógeno de origem alimentar capaz de causar vômito ou diarreia, o *B. thuringiensis* é um entomopatógeno amplamente utilizado no controle de pragas, o *B. anthracis* é o temido agente do Antraz ou carbúnculo hemático, o *B. mycoides* e o *B. pseudomycoides* são habitantes do solo, sendo considerados saprófitas (HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Já o *B. citotoxococcus* é altamente citotóxico, sendo capaz de causar enterite necrótica (LECHNER *et al.*, 1998; TOURASSE *et al.*, 2006).

Segundo estudos genéticos de população e análises comparativas de genoma, o grupo do *B. cereus* constitui uma população coerente na qual os membros estão unificados pela presença de elementos genéticos específicos cujas sequências nucleotídicas e localizações genômicas não permitem distinguir entre os vários membros do grupo (REYES-RAMIREZ; IBARRA, 2005). Existem várias sequências nucleotídicas repetidas que são comuns a todos os genomas sequenciados do grupo *B. cereus* e que não são encontradas em nenhum outro organismo conhecido (PERUCA; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2008; TOURASSE *et al.*, 2006).

Não obstante a existência de uma base genética comum, o comportamento genético desse grupo é muito dinâmico, com presença de inúmeros elementos móveis e repetidos, sendo que algumas estirpes do grupo evoluem para formar complexos clonais, possivelmente adaptados a hospedeiros ou ambientes específicos, e podendo eventualmente exibir características fenotípicas específicas

(PATIÑO-NAVARRETE; SANCHIS, 2017; ZWICK, 2012). Um mecanismo que pode contribuir para a formação de complexos clonais e para o aparecimento de estirpes virulentas pode ser a aquisição de plasmídeos com determinantes específicos que conferem vantagem adaptativa num determinado nicho ou hospedeiro, como os plasmídeos *pXO1* e *pXO2* no *B. anthracis* e o plasmídeo *pCERE01* nas estirpes eméticas de *B. cereus* s.s. (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2006; TOURASSE *et al.*, 2006).

O dilema na análise e classificação do grupo do *B. cereus* consiste no fato de que os estudos de filogenia utilizam marcadores cromossômicos, enquanto a tradicional definição dessas espécies se baseia principalmente em características codificadas por plasmídeos. A transferência de plasmídeos dentro do grupo do *B. cereus* é um fato conhecido e pode tornar as cepas indistinguíveis, situação que pode ocorrer com o gene *cry* de linhagens de *B. thuringiensis*. Um não rizoide *B. mycoides* ou *B. pseudomycoides*, um *B. thuringiensis* não formador de cristal e um não patogênico *B. anthracis* são indistinguíveis da espécie *B. cereus* s.s. (FRITZE, 2004; TOURASSE *et al.*, 2006;).

Diversos estudos genômicos aplicaram a técnica de tipagem de sequências multilocus (MLST) para avaliar as relações filogenéticas das bactérias do grupo do *B. cereus* (BARKER *et al.*, 2005; HELGASON *et al.*, 2004; PRIEST *et al.*, 2004). Essas análises mostram que os membros do grupo do *B. cereus* podem ser agrupados em três principais grupos filogenéticos. Estudos posteriores mostraram que o grupo do *B. cereus* pode ser dividido em sete clusters, com diferentes características fenotípicas (GUINEBRETIERE *et al.*, 2008; PATIÑO-NAVARRETE; SANCHIS, 2017; TOURASSE *et al.*, 2011).

Com base nessa nova estrutura genética, Guinebretiere *et al.* (2010) demonstraram que as linhagens do grupo do *B. cereus* podem ser afiliadas nesses 7 grupos pelo sequenciamento parcial do gene *panC*, e que esses diferentes grupos diferem em suas temperaturas de crescimento e citotoxicidade. Foi demonstrado que, para a espécie *B. cereus* s.s., que está classificada nos grupos II a V, a associação aos grupos filogenéticos é uma maneira mais eficiente para avaliar o risco potencial de causar intoxicação alimentar e infecções oportunista em comparação à afiliação por espécie.

O grupo I é mesofílico e corresponde à espécie *B. pseudomycooides*. A faixa de temperatura de crescimento varia entre 10°C a 43°C. As cepas desse grupo são facilmente distinguidas de *B. mycooides* (grupo VI) por ausência da assinatura associada à psicrotolerância (gene *cspA*) (FRANCIS *et al.*, 1998). Esse grupo contém estirpes pouco ou não citotóxicas.

O grupo II inclui 25% de estirpes mesofílicas e 75% de estirpes psicrotolerantes. Faixa de temperatura de crescimento é de 7°C a 40°C. Trata-se de um grupo misto constituído por estirpes de *B. thuringiensis II* e *B. cereus II*. As estirpes psicrotolerantes são facilmente distinguidas das estirpes psicrotolerantes do grupo VI por ausência da assinatura associada a psicrotolerância (gene *cspA*). (FRANCIS *et al.*, 1998). Esse grupo pode conter estirpes citotóxicas (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

O grupo III é mesofílico e correspondente a *B. thuringiensis III*, *B. cereus III* (estirpes eméticas incluídas) ou *B. anthracis*, dependendo se as estirpes contêm cristal parasporal ou não, ou se contêm fatores de virulência associados ao antraz. A faixa de temperatura de crescimento varia entre 15°C e 45°C. Ainda não existem características fenotípicas que poderiam ser exploradas para identificar facilmente e rapidamente essas estirpes, exceto a presença do gene *ces* para estirpes eméticas. Estirpes deste grupo são geralmente citotóxicas ou altamente citotóxicas.

O grupo IV é mesofílico e corresponde a *B. thuringiensis IV* ou *B. cereus IV*, dependendo se as estirpes contêm cristal parasporal ou não. A faixa de temperatura de crescimento varia entre 10°C e 45°C. Ainda não existem características fenotípicas que possam ser exploradas para identificar facilmente e rapidamente estas estirpes. São geralmente citotóxicas ou altamente citotóxicas (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

O grupo V correspondente às estirpes de *B. thuringiensis V* ou *B. cereus V*, dependendo se as estirpes contêm cristal parasporal ou não. A faixa de temperatura de crescimento varia entre 8°C e 40°C. Ainda não existem

características fenotípicas que possam ser exploradas para identificar facilmente e rapidamente estas estirpes. Esse grupo pode conter estirpes citotóxicas.

O grupo VI, formado por psicotolerantes, corresponde à *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* ou *B. thuringiensis VI*, dependendo se as estirpes contêm o cristal parasporal ou não ou se formam colônia rizóide ou não. Faixa de temperatura de crescimento é de 5°C a 37°C. Todas as linhagens deste grupo são facilmente identificadas pela presença da assinatura associada à psicotolerância (gene *cspA*) e são consideradas pouco citotóxicas (FRANCIS *et al.*, 1998; GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

O grupo VII é termotolerante e correspondente a nova espécie *B. cytotoxicus* (GUINEBRETIERE *et al.*, 2013). A faixa de temperatura de crescimento é de 20°C a 50°C. As cepas deste grupo são facilmente identificadas pela ausência de crescimento em meio mínimo sem triptofano e crescimento a 50 °C. Essas estirpes são relativamente raras, mas altamente citotóxicas (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

3.3 ESPÉCIES do grupo do *Bacillus cereus*

3.3.1 *B. anthracis*

De acordo com Logan&Devos (2009), esta espécie é patogênica e tem sido considerado um agente potencial para a guerra biológica ou bioterrorismo. Provoca uma doença conhecida como antraz ou carbúnculo, que atinge primariamente os herbívoros, mas pode ser transmitida para humanos através do contato com animais infectados. A transmissão se dá por exposição cutânea, inalatória ou gastrintestinal. As principais características que o distinguem de *B. cereus* são a ausência de motilidade e atividade hemolítica e a sensibilidade ao fago gama (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2015).

As cepas virulentas são caracterizadas pela presença de dois plasmídeos, *pX01* e *pX02*, os quais codificam uma exotoxina proteica de três componentes e uma cápsula polipeptídica, respectivamente. O ácido poli-glutâmico da cápsula de *B. anthracis* é codificado por três genes localizados no plasmídeo

pXO2, respectivamente (genes *capA*, *capB* e *capC*), que é importante como fator de virulência deste microrganismo, uma vez que linhagens não-capsuladas são avirulentas porque as três enzimas codificadas por esses três genes estão associadas à membrana celular (HENDRIKSEN *et al.*, 2006; INTITUTO OSWALDO CRUZ, 2015; RASKO *et al.*, 2004).

3.3.2 *B. thuringiensis*

Quando em condições específicas, geralmente desfavoráveis, as células vegetativas dessa espécie desenvolvem um ciclo de esporulação típico e produzem inclusões cristalinas proteicas (cristais parasporais) que conferem atividade entomopatogênica para várias espécies de insetos, sendo usado como agente de controle biológico (bioinseticida) na agricultura (RABINOVITCH *et al.*, 2014). Essas proteínas são compostas por um ou mais polipeptídeos (delta-endotoxina) e são codificadas por genes que geralmente se localizam em plasmídeos, designados pelo prefixo “*cry*”. As toxinas são ativas particularmente contra as larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, não afetando homens, animais e plantas (INTITUTO OSWALDO CRUZ, 2015; LOGAN; DEVOS, 2009).

Algumas estirpes dessa espécie possuem características de crescimento mesofílico e outras são psicrotolerantes (BARTOSZEWICZ *et al.*, 2009; GUINEBRETIERE *et al.*, 2010). Alguns estudos mostraram potencial toxigênico dessa espécie (GUINEBRETIERE; BROUSSOLLE; NGUYEN-THE, 2002; HANSEN; HENDRIKSEN, 2001), sugerindo risco de intoxicação alimentar relacionado à essa espécie devido à contaminação de alimentos através do uso de bioinseticidas na agricultura (RABINOVITCH *et al.*, 2014).

3.3.3 *B. mycoides*

Esta espécie possui características psicrotolerantes, é imóvel e apresenta morfologia de colônias característica em meios sólidos, chamadas de colônias rizoides. A partir do ponto de inoculação as colônias fortemente aderentes projetam-se radialmente, podendo facilmente cobrir toda a placa, com a aparência de raízes (HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Pertence ao grupo filogenético VI, sendo que não há

relatos de doenças de origem alimentar associadas a esta espécie (GUINEBRETIERE *et al.*,2010).

É considerado um organismo saprófito, o que o torna distinto das espécies patogênicas do grupo *B. cereus*. Além da morfologia colonial rizoide e a falta de motilidade, o *B. mycoides* pode ser distinguido das outras espécies do grupo pelas diferentes composições de ácidos graxos e atividade da produção de acetanilida. (LOGAN; DEVOS, 2009).

3.3.4 *B. pseudomycoides*

Espécie proposta por Nakamura (1998) para acomodar um grupo de cepas de *B. mycoides* com composição de ácidos graxos distinta. As características morfológicas, fisiológicas e de crescimento são indistinguíveis de *B. mycoides*, incluindo o crescimento rizóide em meios sólidos. A ausência de psicrotolerância associada ao gene *cspA* pode ser usado para distinguir de *B. mycoides* (FRANCIS *et al.*, 1998). Pertence ao grupo I e não há relatos de doenças de origem alimentar associadas a esta espécie (GUINEBRETIERE *et al*, 2010).

3.3.5 *B. weihenstephanensis*

É uma espécie proposta por Lechner *et al.* (1998) para acomodar as estirpes psicrotróficas de *B. cereus*, separadas das estirpes mesofílicas, que continuam como *B. cereus* s.s. . Apresenta todas as características típicas de *B. cereus* s.s., do qual se diferencia fenotipicamente apenas pela capacidade de crescer entre 4-7° C, mas não a 43° C. Genotipicamente, pode ser diferenciado pela presença de sequências com assinaturas típicas na região do DNAr 16s e do gene das proteínas de choque frio (*cspA*) (HENDRIKSEN *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2010). Estudos confirmaram potencial enterotoxigênico, embora não haja relatos de intoxicação atribuídos a essa espécie (; GUINEBRETIERE *et al.*,2010; STENFORS *et al.*, 2011).

3.3.6 *B. cytotoxicus*

É uma espécie nova, proposta por Guinebretiere *et al.* (2013), cuja principal característica é a natureza termotolerante, crescendo na faixa entre 20 a 50 °C . Foi isolada pela primeira vez em um surto de intoxicação alimentar na França em 1998, com três mortes. Na França, esse foi o surto diarreico mais grave atribuído a uma provável cepa do grupo *B. cereus*. Os pesquisadores relataram que a toxina envolvida foi a citotoxina K, capaz de causar enterite necrótica.

Essa toxina possui duas variantes distintas, a CytK-1 e CytK-2. A principal diferença entre essas toxinas é o efeito biológico: a CytK-1 apresentou toxicidade muito maior em ensaios biológicos, quando comparada com a CytK-2. A presença do gene *cytk-1* revelou-se um marcador confiável na identificação de *B. cytotoxicus*, já o gene *cytk-2* encontra-se amplamente distribuído entre cepas dos outros membros do grupo *B. cereus* (GUINEBRETIERE *et al.*, 2013).

3.3.7 *B. cereus* sensu stricto

Segundo Logan&Devos (2009), *B. cereus* s.s. é patogênico para o homem e outros animais, provocando intoxicações alimentares e infecções oportunistas (HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Apresenta-se sobre a forma de bastonete Gram-positivo, aeróbio facultativo e formador de esporos (VAISANEN *et al.*, 1991). O pH ótimo para o crescimento situa-se entre 6,0 e 7,0, com um mínimo de 5,0 e um máximo de 8,8. A atividade de água mínima é de 0,93 com tolerância a 7,5% de sal e os esporos apresentam resistência térmica (ABEE *et al.*, 2011; JAY, 2005).

Originalmente descrito como microrganismo mesófilo, esta bactéria se multiplica bem entre 10°C e 45°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento está entre 28°C e 35°C (JAY, 2005). De acordo com a classificação proposta por Guinebretiere *et al.*, (2008 e 2010), as cepas de *B. cereus* s.s. podem ser encontradas nos grupos II, III, IV e V, sendo a faixa temperatura de crescimento variável de acordo com o grupo, podendo encontrar linhagens psicrotolerantes no grupo II, com temperatura mínima de crescimento de 7°C (STENFORS; GRANUN, 2001).

A resistência fisiológica aliada à sua habilidade de produzir uma vasta gama de enzimas e metabólitos extracelulares que degradam diversos substratos orgânicos possibilita esta bactéria estar amplamente distribuída no meio ambiente, sendo o solo o seu reservatório natural. Em virtude dessas características, contamina facilmente diferentes tipos de alimentos, podendo ocasionar deterioração e prejuízos principalmente na indústria de laticínios e afins (GUINEBRETIERE *et al.*, 2008; PAIVA, 2009; SVENSSON *et al.*, 2004).

Os mecanismos de adaptação de *B. cereus* s.s. às condições ambientais são diversos e contribuem para sua sobrevivência e disseminação no ambiente. Os esporos são termorresistentes, podendo sobreviver aos processamentos térmicos, a alguns sanitizantes químicos e a radiações ionizantes, utilizados principalmente na indústria de alimentos. Os endósporos são resistentes às condições ambientais extremas, tais como altas temperaturas e desidratação, além de contribuir para os processos de adesão em superfícies, devido à sua hidrofobicidade. Acredita-se que a capacidade de adesão promova a formação de biofilme em materiais como aço inoxidável, comumente empregado na indústria de alimentos (BARTOSZEWICZ *et al.*, 2008; GUINEBRETIERE *et al.*, 2003).

Tem sido isolado em uma grande variedade de alimentos processados e “in natura”, entre eles arroz, massas, produtos desidratados, farináceos, fórmulas infantis, vegetais, pimentas, alimentos prontos para consumo, leite e derivados lácteos, inclusive leite UHT e leite pasteurizado (CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011; CHAVES *et al.*, 2017). É encontrado comumente em baixos níveis em alimentos (menos de 10^2 UFC/g), os quais, em termos de saúde pública, são considerados aceitáveis. Os surtos de intoxicação geralmente estão associados às falhas na conservação dos alimentos mediante exposição a tempos e temperaturas inadequadas, propiciando, assim, que estes microrganismos se multipliquem até níveis significativos (acima de 10^5 UFC/g), resultando em dois tipos de doenças: a síndrome emética e a síndrome diarreica (PAIVA, 2009).

B. cereus s.s. também está presente no ambiente hospitalar. Fômites, sistemas de ventilação e roupas de cama são algumas das fontes de transmissão documentadas de surtos em unidades de terapia intensiva. A presença de

dispositivos invasivos, tais como cateteres intravenosos e umbilicais, sondas urinárias, além de válvulas cardíacas e marca-passos, predispõem à contaminação pelo bacilo, pois este pode formar biofilmes que permite aderir a esses dispositivos. A partir do biofilme pré-formado, as células são liberadas periodicamente na corrente sanguínea, se dispersando para órgão distante e causando bacteremia (BOTTONI, 2010).

3.4 PATOGENICIDADE DE *B. cereus* sensu stricto

A patogenicidade do *B. cereus* s.s. é o reflexo de sua capacidade em gerar formas de resistência e também de produzir diferentes fatores de virulência extracelulares, como toxinas e enzimas (PIRHONEN *et al.*, 2005; PIRTTIJARVI *et al.*, 1999). É responsável por dois tipos de doenças de origem alimentar, sendo uma síndrome diarreica, provocada por enterotoxinas produzidas no intestino do hospedeiro e a outra uma síndrome emética, uma forma de intoxicação atribuída a uma toxina pré-formada no alimento (AGATA *et al.*, 1995; ARNESEN *et al.*, 2008).

A síndrome emética é a forma de intoxicação alimentar com período de incubação de 1 a 6 horas, sendo mais comum de 2 a 5 horas, semelhante à intoxicação estafilocócica. Determinada pela toxina emética, os sintomas iniciais são náusea, seguido de vômito e mal-estar, que persistem durante 24 horas. Muitas vezes está associada ao consumo de alimentos cozidos à base de arroz, mas massas, sopas, caldos, pudins, bolos e pratos contendo batatas também têm sido envolvidos. O número de microrganismos necessários para causar essa síndrome parece ser maior que o número que causa a síndrome diarreica, tendo sido encontradas contagens tão altas quanto 2×10^9 UFC/g em alimentos envolvidos em surtos (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010; JAY, 2005). Essa síndrome foi identificada pela primeira vez depois de vários surtos causados pela ingestão de arroz cozido no Reino Unido no início de 1970. Diversos casos graves e até mesmo fatais de contaminação alimentar pela toxina emética foram relatados (EHLING-SCHULTZ *et al.*, 2004b; FRICKER *et al.*, 2007; MAHLER *et al.*, 1997).

A toxina emética é produzida geralmente durante o armazenamento prolongado dos alimentos, na fase estacionária da curva de crescimento de *B.*

cereus s.s., sendo a ingestão destes alimentos contaminados com a toxina pré-formada a causa da manifestação do quadro emético (ARNESEN *et al.*, 2008). Devido ao fato da toxina emética ser resistente em condições ácidas, à proteólise e à altas temperaturas, ela não é destruída pelo suco gástrico, enzimas proteolíticas ou aquecimento do alimento, podendo conduzir à emese poucas horas após ingestão. Essa toxina, também chamada cereulida (ces), é um peptídeo insolúvel em água, com peso molecular de cerca de 1,2 KDa. Segundo Guinebretiere *et al.* (2008), as linhagens produtoras de toxina emética são classificadas no grupo III, com crescimento no intervalo de 15°C a 45°C, embora existam estudos que evidenciaram linhagens eméticas de *B. weihenstephanensis*, classificadas no grupo VI (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

Já a síndrome diarreica é uma toxinfecção causada por células vegetativas ingeridas como células viáveis ou esporos, que produzem enterotoxinas e outros fatores de virulência no intestino delgado. O paciente desenvolve os sintomas dentro de 8 a 16 horas, mais comumente entre 12 a 13 horas. A duração é, geralmente, de 6 a 12 horas, mas também foram relatados casos em que os sintomas duram vários dias. Os sintomas consistem em náusea (raramente com vômito), dores abdominais intermitentes, tenesmo e fezes aquosas (GRANUM; LUND, 1997). Geralmente não há febre. Observa-se uma semelhança entre esta síndrome e a intoxicação alimentar causada por *C. perfringens*. Os alimentos que normalmente são considerados veículos destes microrganismos consistem em alimentos à base de cereais, purê de batata, leite, peixes, carne moída, pudins, sopas e outros. Contagens realizadas em amostras de sobras de alimentos envolvidos em surtos investigados variaram entre 10^5 a 10^8 UFC/g. A faixa de crescimento encontra-se entre 7°C e 45 °C, sendo algumas estirpes mesofílicas e outras psicrotolerantes (JAY, 2005).

Além de toxinfecção alimentar, o *B. cereus* s.s. também pode causar infecções sistêmicas e locais, especialmente em pessoas imunodeprimidas, neonatos, toxicod dependentes e pacientes com história de feridas traumáticas, cirúrgicas ou cateteres, classificadas como: endoftalmite, infecções cutâneas primárias, infecção de feridas ortopédicas, osteomielite, periodontite, infecções pleuropulmonares, endocardite, infecção urinária, meningite pós-operatória

(BHUNIA, 2008; EHLING-SCHULTZ *et al.*, 2004^a; KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000). Estas infecções são pouco frequentes e geralmente estão associadas a ação das hemolisinas, cereolisinas e fosfolipases produzidas pelo micro-organismo, as quais podem causar danos extensos nos tecidos e necrose em órgãos viscerais (HELGASON *et al.*, 2004). A produção de β -lactamases pelas células de *B. cereus* s.s. promove a inativação das penicilinas e cefalosporinas, tornando, assim, a espécie resistente a esses antibióticos (NUNES *et al.*, 1999).

3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Bacillus cereus* sensu stricto

Segundo Logan&Devos (2009), *B. cereus* s.s. produz diferentes toxinas, incluindo uma citotoxina, uma toxina emética e quatro enterotoxinas, sendo esses considerados os principais fatores envolvidos na intoxicação alimentar. Além disso, é também produtor de várias enzimas e hemolisinas que desempenham um papel muito importante na virulência dessa bactéria. Estas enzimas incluem fosfolipases C, colagenase, protease, amilase e β -lactamase. A fosfolipase C contribui para a destruição de tecidos através da desgranulação dos neutrófilos humanos e a β -lactamase inativa a penicilina tornando o *B. cereus* s.s. resistente a este antibiótico (BHUNIA, 2008). A hemolisina II e III e as fosfolipases produzidas por linhagens de *B. cereus* s.s. também estão associadas com infecções não-gastrintestinais (CHAVES *et al.*, 2017).

As toxinas consideradas como principais fatores de virulência para a síndrome diarreica são a hemolisina BL (HBL), enterotoxina não hemolítica (NHE) e a citotoxina K (CytK). Ainda existem a enterotoxina FM (EntFM) e a hemolisina II (HLY II), que ainda são consideradas como possíveis toxinas diarreicas (MOLVA; SUDAGIDAN; OKUKLU, 2009), embora não haja relatos de que elas possam ser causadoras de enfermidades transmitidas por alimentos (HENDRIKSEN *et al.*, 2006; KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000). Além destas, a fosfolipase C (PI-PLC), as moléculas PC-PLC e SPH, componentes da unidade citolítica cereolisina AB (CerAB), a hemolisina III e a colagenase tem sido implicadas na síndrome diarreica, atuando sobre a permeabilidade e viabilidade de células do epitélio intestinal (HENDRIKSEN *et al.*, 2006; CEUPPENS *et al.*, 2011).

3.5.1 Hemolisina BL (HBL)

A hemolisina BL (HBL) é formada por um complexo proteico tripartido de três componentes. Uma das proteínas do complexo é um componente de ligação de 35 KDa, designado componente B, os outros dois, L₁ (36 KDa) e L₂ (45KDa), são elementos líticos (HENRICHS *et al.*, 1993). Este complexo causa hemólise, lise celular, dermonecrose, aumento da permeabilidade vascular e atividade enterotóxica (HENRICHS *et al.*, 1993). Os genes que codificam a enterotoxina HBL encontram-se incluídos num único operon localizados no cromossomo, estando organizados pela seguinte ordem: *hbhc*, *hbld*, *hbha* e *hbhb*. A proteína L₂ é codificada por *hbhc*, a proteína L₁ por *hbld* e a proteína B por *hbha* e *hbhb*. O Kit BCET-RPLA da Oxoid® detecta a proteína L₂ da toxina HBL, através da técnica de aglutinação passiva (BARRETO, 2012; SOARES, 2008). Segundo Logan&Devos (2009), é produzida por cerca de 60% das cepas do grupo *B. cereus* e tem sido sugerido que esta enterotoxina seja o principal fator de virulência implicado nos quadros de diarreia.

3.5.2 Enterotoxina Não-hemolítica (Nhe)

O complexo NHE tem alta prevalência nas cepas de *B. cereus* s.s. e é composto pelos polipeptídeos NheA (45 KDa), NheB (39,8 KDa) e NheC (36,5 KDa) codificados pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente (GRANUM; OSULLIVAN; LUND, 1999). Essa toxina apresenta citotoxicidade mesmo em concentrações muito baixas. A proteína de 45 KDa do complexo NHE pode ser detectado por imunoensaio visual da Tecra, BDE (*Bacillus* Diarrheal Enterotoxin Visual Immunoassay) (REZENDE- LAGO, 2002).

3.5.3 Citotoxina K

A citotoxina, chamada de Citotoxina K (CytK), codificada pelo gene *cytK*, é uma proteína similar à β -toxina de *Clostridium perfringens* e foi associada a um surto de enterite necrótica na França, com três mortes (Logan&DeVos, 2009). Pode apresentar-se de duas formas diferentes: CytK-1 e CytK-2. As duas formas da toxina apresentam similaridade de 89% em sua sequência de aminoácidos, porém, uma importante diferença quanto a seus efeitos biológicos. A forma CytK-1 se mostrou

mais tóxica para as células intestinais humanas do que a forma CytK-2. Por esse motivo, pode-se assumir que a forma CytK-1 apresenta mais perigo aos consumidores, o que torna importante a diferenciação entre as duas formas nos alimentos contaminados (GUINEBRETIERE *et al.*, 2006; HENDRIKSEN *et al.*, 2006; LUND; DEBUYSER; GRANUM, 2000). A presença do gene *cytk-1* revelou-se um marcador confiável na identificação de *B. cytotoxicus*, já o gene *cytk-2* encontra-se distribuído entre linhagens dos grupos filogenéticos II a V (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

3.5.4 Enterotoxina FM

A enterotoxina FM (EntFM) foi isolada da estirpe *B. cereus* FM-1, causadora de toxinfecção alimentar. Porém, não foi ainda associada a nenhum surto de toxinfecção alimentar. Por outro lado, o gene *entFM* está presente na maioria das estirpes associadas a surtos, sendo o gene de enterotoxina mais prevalente em cepas do grupo do *B. cereus*. Algumas experiências em laboratório mostraram que a enterotoxina FM purificada causa acúmulo de líquido em modelos de alça ileal de coelhos e de ratos, sendo letal em ratos e citotóxica para células Vero (BOONCHAI *et al.*, 2008; CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011).

3.5.5 Cereulida

A toxina emética, chamada de cereulida, é um polipeptídeo não antigênico, resistente ao calor (121 °C durante 30 min), ativo numa faixa ampla de pH (2,0-11,0) e que não é digerido pela pepsina ou pela tripsina. Devido a estas características, não é inativada pelo suco gástrico nem pelas enzimas proteolíticas do trato intestinal e permanece ativa nos alimentos cozidos (ARNESEN *et al.*, 2008). Devido ao pequeno tamanho da molécula, possui alta estabilidade térmica e química, e não existe maneira de descontaminar alimentos ou matérias-primas que contenham a cereulida (ANDERSSON *et al.*, 2004; EHLING-SCHULZ; FRICKER; SCHERER, 2004b).

A síntese desta toxina ocorre numa faixa de temperatura que varia de 12 a 37 °C, porém a produção máxima da toxina parece ocorrer entre 12 e 22 °C, sob

condição aeróbica ou microaeróbica (ARNESEN *et al.*, 2008). Também já foi detectada em *B. weihenstephanensis* e outros *Bacillus*, indicando que o plasmídeo responsável por sua formação pode sofrer transferência lateral (LOGAN; DEVOS, 2009).

3.5.6 Fosfolipases

Uma das classes de toxinas expressas por linhagens do grupo do *B. cereus* são as fosfolipases, responsáveis por induzir hemólise e iniciar infecção. As linhagens dessa espécie bacteriana podem produzir três tipos de Fosfolipases C, cada uma com diferentes mecanismos de ação. De acordo com a classe de fosfolipídeos em que atuam, tem-se a fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) e esfingomielinase (SPH), as quais são codificadas pelos genes *pcplc*, *piplc* e *sph*, respectivamente. PC-PLC é responsável pela zona de precipitação em torno das colônias de *B. cereus* em placas de ágar seletivo de devido à degradação de lecitina da gema de ovo (CEUPPENS *et al.*, 2011). PC-PLC e SPH compreendem a unidade citolítica cereolisina AB. A ação da cereolisina AB é dependente da esfingomielinase (SPH), uma vez que a presença de esfingomielinina (SM) em membranas inibe a atividade da PC-PLC (HENDRIKSEN *et al.*, 2006).

Tais moléculas promovem a lise celular através da atividade enzimática, causando liberação de enzimas lisossômicas dos neutrófilos e contribuem para a resistência à fagocitose. A toxicidade da PC-PLC pode ser explicada pela hidrólise de diferentes fosfolípidios como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) (HENDRIKSEN *et al.*, 2006), os quais podem ocorrer nas membranas de células animais. Já a PI-PLC cliva fosfatidilinositol e derivados e exerce atividade citotóxica nas células hospedeiras. A SPH possui atividade hemolítica e participa do processo de ligação do *B. cereus* s.s. aos eritrócitos (ODA *et al.*, 2010). O papel dessas fosfolipases é pouco compreendido no processo de intoxicação alimentar, requerendo estudos adicionais (BEECHER; WONG, 2000).

3.5.7 Hemolisinas

As hemolisinas são responsáveis pela atividade hemolítica e são importantes em processos infecciosos. As hemolisinas da família citolisinas colesterol-dependentes (CDC), também conhecidas como citolisinas tiol-ativada são formadoras de poros nas membranas, e foram identificadas nas espécies do grupo do *B. cereus* (CEUPPENS *et al.*, 2011). A Hemolisina I foi primeiramente descrita em 1967, e era conhecida com cereolisina O (CLO) em *B. cereus*. A CLO, codificada pelo gene *clo*, é uma proteína termolábil cuja atividade hemolítica é inibida pelo colesterol e neutralizada pela globulina anti-estreptolisina. Além da CLO, estudos posteriores detectaram outras hemolisinas expressas por *B. cereus* s.s. entre estas, a Hemolisina II (HlyII), codificada pelo gene *hlyII* e a hemolisina III (HlyIII), codificada pelo gene *hlyIII* (CHAVES *et al.* 2017). Foi demonstrado que a HlyII está envolvida na morte de células do sistema imune por apoptose, o que sugere um importante papel nas infecções bacterianas oportunistas. A HlyIII atua na formação de poros nas membranas provocando a lise de eritrócitos (CEUPPENS *et al.*, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS DE *Bacillus cereus* sensu stricto UTILIZADAS NO ESTUDO E SUAS ORIGENS

Foram utilizadas nesse estudo 65 linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias no período de 2004 a 2017. Essas linhagens são provenientes de amostras de alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar ocorridos no Estado de Minas Gerais como também provenientes de alimentos investigados no escopo do Programa de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos de Minas Gerais (PROGVISA). E ainda estão incluídas também nessa amostragem algumas linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de amostras de tucupi. Esses 65 isolados foram identificados como *B. cereus* s.s. segundo metodologia descrita por Tallent *et al.* (2012) e preservados pelo método de congelamento a -80°C no Laboratório de Microbiologia de Alimentos de FUNED. No ano de 2017, todas essas 65 linhagens foram enviadas para o Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB) da Fiocruz-RJ para depósito na Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGB) e para realização das análises de biologia molecular.

4.2 CONTAGEM DE *Bacillus cereus* sensu stricto EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise microbiológica dos alimentos foi realizada segundo a técnica de contagem em superfície. Foram pesados ou pipetados, assepticamente, 25g ou mL da amostra de alimento e transferidos para saco plástico estéril. Em seguida, adicionados 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% e homogeneizados durante 60 segundos em homogeneizador “*stomacher*”. A partir deste material, foram preparadas, sucessivamente, diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram espalhadas sobre a superfície do meio MYP (ágar manitol gema de ovo com polimixina). As placas foram incubadas em posição invertida por 30°C durante 24 a 48 horas. As colônias suspeitas de *B. cereus* s.s. foram confirmadas pelas provas bioquímicas (TALLENT *et al.*, 2012).

4.3 IDENTIFICAÇÃO CONVENCIONAL DE *Bacillus cereus* sensu stricto

As colônias que se apresentaram com coloração rosa rodeada por um halo opaco, indicativo da ação da lecitinase, foram submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase. Em seguida, foram feitas as provas bioquímicas confirmatórias, como de utilização anaeróbica da glicose, redução de nitrato, Voges-Proskauer (VP), decomposição da tirosina e resistência à lisozima. Para diferenciação dos membros do grupo do *B. cereus* foram realizados os testes de crescimento rizoidal, motilidade, atividade hemolítica, detecção de cristais à microscopia óptica (TALLENT *et al.*, 2012).

4.4 DETECÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA

Todos os ensaios de PCR foram efetuados em um termociclador (*Applied Biosystem® GeneAMP® PCR System 9700*). Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação encontram-se descritos na tabela 1 (pg. 45). Foi utilizada a linhagem LFB-FIOCRUZ 406 (espécie *B. cereus* s.s.) como controle positivo para todas as reações de PCR. Como controle negativo das reações de PCR foi utilizada água livre de DNase/RNase.

4.4.1 Extração de DNA através de lise térmica

A extração de DNA amostras *B. cereus* s. s. e da linhagem utilizada como controle positivo (LFB-FIOCRUZ 406) foi realizada por lise térmica de acordo com instruções do fabricante do Kit *INSTAGENE MATRIX* da *BIO-RAD®*. Para isto, a cultura foi crescida previamente em meio sólido ágar nutriente a 37 °C por 14 horas e uma alçada deste crescimento foi utilizada no protocolo de extração. Os microtubos com o extrato de DNA de todas as linhagens foram estocados a – 20 °C até o momento do uso.

4.4.2 Amplificação dos genes codificadores da enterotoxina não-hemolítica

A detecção dos genes codificadores da enterotoxina não-hemolítica (*nheA* e *nheB*) foi realizada através da reação de PCR, segundo metodologia

descrita por Guinebretiere *et al.*, 2010. As reações da PCR foram feitas em um volume de reação de 25 µL contendo 1X de tampão PCR 10X (Tris-cloridrato 50mM, [NH₄]₂SO₄ 5mM, MgCL₂ 2mM, ph 8,3), MgCL₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM de cada base nitrogenada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 40 a 350 mM de cada iniciador (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 1 U de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*) e 1 µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94 °C/2 min, seguindo-se de 30 ciclos de 95^o C/30s, 60^o C/30s e 72^o C/45s com um ciclo final de extensão de 72^o C/7 min.

4.4.3 Amplificação simultânea dos genes codificadores da hemolisina BL e toxina emética

A detecção simultânea dos genes codificadores da hemolisina BL (*hblA*, *hblC* e *hblD*) e toxina emética (*ces*) foi realizada por meio de reações de PCR-multiplex segundo metodologia descrita por Yang *et al.* (2005). As reações da PCR foram feitas em um volume de reação de 25 µL contendo 1X de tampão PCR 10X (Tris-cloridrato 50mM, [NH₄]₂SO₄ 5mM, MgCL₂ 2mM, ph 8,3), MgCL₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM de cada base nitrogenada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 40 a 350 mM de cada iniciador (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 1 U de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*) e 1 µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94 °C/2 min, seguindo-se de 30 ciclos de 95^o C/30s, 60^o C/30s e 72^o C/45s com um ciclo final de extensão de 72^o C/7 min.

4.4.4 Amplificação dos genes codificadores da citotoxina K

O genes da Citotoxina K (*cytK-1* e *cytK2*) foram detectados por PCR duplex conforme metodologia descrita por Guinebretiere *et al.* (2006). As reações da PCR para a citotoxina K (*cytK2*) foram realizadas em um volume de reação de 25 µL contendo 1X de tampão PCR 10X, MgCL₂ 2,5mM, dNTPs 0,2mM de cada nucleotídeo, iniciadores 0,25µM de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 0,75 de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de Dna molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94 °C/5 min, seguindo-se 30 ciclos de 94°C/15s, 57°C/30s e 72°C/30s com um ciclo final de extensão de 72°C/7 min.

4.4.5 Amplificação de genes codificadores de hemolisinas e fosfolipases

Os genes que codificam os fatores de virulência fosfolipases C (*piplc*, *pcplc* e *sph*) e hemolisinas (*hlyII* e *hlyIII*) foram amplificados por meio da PCR como descrito por Hendriksen *et al.* (2006). As reações da PCR foram realizadas em um volume de reação de 25 µL contendo 1X de tampão PCR 10X, MgCL₂ 1,5mM, dNTPs 0,1mM de cada nucleotídeo, iniciadores 1 pM de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 0,5 de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de Dna molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/2 min, seguindo-se 30 ciclos de 94°C/15s, 56°C/30s e 72°C/2min com um ciclo final de extensão de 72°C/7 min

A cereolisina O (*clo*) foi detectada através de PCR como descrito por Martinez-Blanch *et al.* (2009). As reações da PCR foram realizadas em um volume de reação de 25 µL contendo 1X de tampão PCR 10X, MgCL₂ 1,5mM, dNTPs 100 µM de cada nucleotídeo, iniciadores 1 µM de cada (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*), 0,5 de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de DNA molde (aproximadamente 50ng). A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/5 min, seguindo-se 30 ciclos de 94°C/30s, 56°C/45s e 72°C/45s com um ciclo final de extensão de 72°C/5 min.

4.4.6 Eletroforese em gel de agarose 2% para análise dos produtos das reações de PCR

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Para isso, foram misturados 10 µL de produto de cada reação de PCR e 1 µL de corante para detecção de ácidos nucléicos (*Blue Green Loading dye*) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v) preparado com tampão de eletroforese TBE 0,5X (Tris Base 890 mM, Ácido Bórico 890mM, EDTA 20mM, pH 8,0), sendo submetidos a voltagem de 65V por 1h. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV a 302 nm. Como padrão foi utilizado marcador de DNA de 100pb.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Fisher foi usado para avaliar se o grupo das 32 linhagens relacionadas a alimentos envolvidos em surtos de DTA foi estatisticamente diferente do grupo das 33 linhagens isoladas de outros alimentos quanto a prevalência dos genes codificadores de enterotoxinas, fatores de virulência, perfil toxigênico e perfil de virulência mais frequentes.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo

Gene	Iniciador	Sequência	PB *	Referência
<i>nheAB</i>	nheAB1	GTAAATGCTGCVGATAGYCAAAC	372	Guinebretiere <i>et al.</i> (2010)
	nheAB2	GGCATVATRTTYCCTGCTGC		
<i>hblA</i>	HA-F1	ATTAATACAGGGGATGGAGAAACTT	237	Yang <i>et al.</i> (2005)
	HA-R1	TGATCCTAATACTTCTTCTAGACGCTT		
<i>hblC</i>	HC-F1	CCTATCAATACTCTCGCAACACCAAT	386	Yang <i>et al.</i> (2005)
	HC-R1	TTTTCTTGATTCGTATAGCCATTTCT		
<i>hblD</i>	HD-F1	AGATGCTACAAGACTTCAAAGGGAAACTAT	436	Yang <i>et al.</i> (2005)
	HD-R1	TGATTAGCACGATCTGCTTTCATACTT		
<i>ces</i>	EM-F1	AGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT	635	Yang <i>et al.</i> (2005)
	EM-R1	GTATTTCTTTCCCGCTTGCCTTTT		
<i>cytK-1</i>	CK1F	CAATTCCAGGGGCAAGTGTC	426	Guinebretiere <i>et al.</i> (2006).
	CK1R	CCTCGTGCATCTGTTTCATGAG		
<i>cytK-2</i>	CK2F	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA	585	Guinebretiere <i>et al.</i> (2006).
	CK2R	GTGIAGCCTGGACGAAGTTGG		
<i>piplc</i>	PhosC 1	CGCTATCAAATGGACCATGG	569	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	PhosC 2	GGACTATTCCATGCTGTACC		
<i>pcplc</i>	CERA1	ACTGAGTTAGAGAACGGTAT	536	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	CERA2	CGCTTACCTGTCATTGGTGT		
<i>sph</i>	CERB1	TCGTAGTAGTGGAAGCGAAT	457	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	CERB2	AGTCGCTGTATGTCCAGTAT		
<i>hlyII</i>	BcHlyII-S	AGAAGGAGTGGCTGTCTGTTA	535	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	BcHlyII-A	TTCTTTCCAAGCAAAGCTAC		
<i>hlyIII</i>	BCHEM 1	AATGACACGAATGACACAAT	444	Hendriksen <i>et al.</i> (2006)
	BCHEM 3	ACGATTATGAGCCATCCCAT		
<i>clo</i>	BC-1	CTGTAGCGAATCGTACGTATC	185	Martinez- Blanch <i>et al.</i> (2009)
	BC-2	TACTGCTCCAGCCACATTAC		

*Tamanho dos fragmentos (pares de bases)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO, CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE *Bacillus cereus* sensu stricto DE ORIGEM ALIMENTAR

Foram utilizadas nesse estudo 65 linhagens de *B. cereus* s.s. provenientes de diferentes tipos de alimentos, sendo 32 isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA notificados em Minas Gerais, 22 isoladas de alimentos monitorados pelo PROGVISA e 11 isoladas do Tucupi. Essas linhagens foram identificadas pelo método convencional por testes bioquímicos e foram depositadas no acervo da Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGB) do Laboratório de Fisiologia Bacteriana da Fiocruz-RJ. .

5.1.1 Identificação fenotípica de *Bacillus cereus* sensu stricto e diferenciação dos demais membros do grupo do *Bacillus cereus*

Os microrganismos presuntivamente identificados como *B. cereus* s.s. apresentaram colônias de coloração rosa (manitol negativo) rodeada por um halo opaco que indica a ação de enzima lecitinase e microscopicamente como bastonetes gram positivo. Os resultados dos testes bioquímicos realizados para identificar os isolados como pertencentes ao grupo do *B. cereus* foram: catalase positiva, fermentação anaeróbica de glicose, redução de nitrato, teste de VP (*Voges-Proskauer*) positivo, decomposição da tirosina e resistência à lisozima. Os resultados dos testes de confirmação da espécie *B. cereus* s.s e a diferenciação dos demais membros do grupo do *B. cereus* foram: teste de motilidade positivo, crescimento rizoidal negativo, forte atividade hemolítica e não produção de cristais de toxinas após esporulação. Segundo Tallent *et al.* (2012), somente a espécie *B. thuringiensis* é capaz de produzir cristais de toxinas após esporulação. A partir destes resultados, todas as linhagens em estudo provenientes de diferentes alimentos foram identificadas como *B. cereus* s.s..

5.1.2 Contagem de *B. cereus* s. s. isolados de alimentos do PROGVISA

É possível observar na tabela 1 as contagens de *B. cereus* s.s. isolados de 22 amostras de alimentos monitorados pelo PROGVISA no período de 2004 a 2016.

Tabela 2 – Contagem de *B. cereus* s.s. em alimentos provenientes do PROGVISA

ANO	Alimento	Isolado	Contagem microbiológica	Limite RDC 12
2004	Leite em pó	LFB-FIOCRUZ 1734	3,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2004	Massa pronta de pastel	LFB-FIOCRUZ 1735	1,0 x 10⁴ UFC/g	5,0 x 10 ²
2004	Leite em pó	LFB-FIOCRUZ 1736	2,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2004	Fórmula para mingau	LFB-FIOCRUZ 1737	2,0 x 10³ UFC/g	10 ²
2004	Farinha de mandioca	LFB-FIOCRUZ 1743	7,3 x 10 ⁴ UFC/g	3,0 x 10 ³
2005	Farinha de mandioca	LFB-FIOCRUZ 1744	3,0 x 10 ² UFC/g	3,0 x 10 ³
2005	Strogonoff	LFB-FIOCRUZ 1745	1,0 x 10 ² UFC/g	10 ³
2005	Salgado	LFB-FIOCRUZ 1748	7,2 x 10⁴ UFC/g	5,0 x 10 ³
2005	Pizza	LFB-FIOCRUZ 1749	3,8 x 10⁴ UFC/g	5,0 x 10 ³
2008	Leite em pó integral	LFB-FIOCRUZ 1759	1,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2008	Leite em pó integral	LFB-FIOCRUZ 1788	1,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2011	Leite em pó integral	LFB-FIOCRUZ 1765	2,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2012	Coxinha de frango	LFB-FIOCRUZ 1768	1,6 x 10⁴ UFC/g	5,0 x 10 ²
2012	Coxinha de frango	LFB-FIOCRUZ 1769	1,5 x 10⁴ UFC/g	5,0 x 10 ²
2016	Pão de queijo congelado	LFB-FIOCRUZ 1778	2,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2016	Empanado	LFB-FIOCRUZ 1779	1,0 x 10 ² UFC/g	10 ³
2016	Pão de queijo congelado	LFB-FIOCRUZ 1780	2,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ²
2016	Rondele	LFB-FIOCRUZ 1781	4,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2016	Pão de queijo congelado	LFB-FIOCRUZ 1782	4,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³
2016	Empanado de frango	LFB-FIOCRUZ 1783	6,0 x 10 ² UFC/g	10 ³
2016	Lasanha à bolonhesa	LFB-FIOCRUZ 1784	4,0 x 10 ² UFC/g	10 ³
2016	pão de queijo	LFB-FIOCRUZ 1787	1,0 x 10 ² UFC/g	5,0 x 10 ³

Em negrito: número de depósito da linhagem na CCGB e contagens de *B. cereus* s.s. acima do limite

RDC 12/2001.

Dentre os 22 alimentos apresentados na tabela 1, seis apresentaram contagens de *B. cereus* s.s. acima do limite permitido pela legislação RDC 12 ANVISA de 2001: a massa pronta de pastel, a fórmula para preparo de mingau, o salgado, a pizza e as duas coxinhas de frango. Esses alimentos foram considerados impróprios ou inseguros para o consumo (BRASIL, 2001), embora não atingissem a contagens de 10^5 UFC/g ou mL, dose que, segundo a literatura, é capaz de causar a doença (CEUPPENS *et al.*, 2011).

Os outros 16 alimentos monitorados pelo PROGVISA apresentaram contagens de *B. cereus* s. s. dentro do limite estabelecido pela RDC 12 ANVISA de 2001. Sabe-se que este microrganismo é encontrado comumente em baixos níveis em alimentos (menos de 10^2 UFC/g), os quais, em termos de saúde pública, são considerados aceitáveis (BRASIL, 2001).

A espécie *B. cereus* s.s. está presente em uma grande variedade de alimentos, sejam “in natura”, semi-prontos ou preparados, processados e servidos em unidades de alimentação. Dentre os principais fatores que contribuem para a presença de *B. cereus* s.s nesses alimentos monitorados podemos destacar a contaminação ambiental, a alta resistência da forma esporulada e a não utilização das boas práticas de produção (PAIVA *et al.*, 2009).

Produtos farináceos têm demonstrado grande potencialidade para a contaminação e desenvolvimento de *B. cereus* s. s. (JAY, 2005). Sabe-se que essa bactéria é encontrada comumente nesses alimentos devido às suas características fisiológicas de resistência da sua forma esporulada e capacidade de produzir diversas enzimas (CARLIN *et al.*, 2010). Por ser um microrganismo amplamente distribuído no ambiente, a contaminação ambiental desses alimentos é comum (BRASIL, 2010).

Com relação à presença de *B. cereus* s. s. nos alimentos industrializados, sendo incluídos nessa categoria os alimentos semi-prontos ou preparados e os processados, é importante ressaltar que os esporos de *B. cereus* s. s. apresentam característica que lhe conferem resistência às principais formas de controle utilizadas nas indústrias de alimentos, como a altas temperaturas, secagens,

sanitizantes químicos e radiações ionizantes, além de contribuir para os processos de adesão em superfícies (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2006).

Cinco linhagens de *B. cereus* s. s. isoladas de leite em pó (LFB-FIOCRUZ 1734, LFB-FIOCRUZ 1736, LFB-FIOCRUZ 1759, LFB-FIOCRUZ 1788, LFB-FIOCRUZ 1765) apresentaram vários genes codificadores de fatores de virulência (APÊNDICE A). A presença de *B. cereus* s.s. em leite em pó é de extrema importância, pois esse produto é consumido, na sua maioria, por crianças e recém-nascidos. Ressalta-se, ainda, que o leite em pó, após ser reconstituído, torna-se ainda mais perigoso se não for devidamente armazenado. Geralmente, os produtos lácteos secos são contaminados com *B. cereus* s.s. através do leite cru previamente contaminado. Fontes de esporos de *B. cereus* s.s. em leite cru são o solo, esterco, palha, feno e outras forragens, bem como superfícies contaminadas do equipamento ordenha (BECKER *et al.*, 1994). As plantas de produção de leite ou de alimentos infantis às vezes oferecem uma oportunidade para *B. cereus* s.s. crescer em alguns pontos da linha de produção. Em formulações de base láctea, além das fontes mencionadas acima, a contaminação com *B. cereus* s.s. pode ocorrer a partir de ingredientes derivados do leite ou de ingredientes de origem vegetal como amido (BECKER *et al.*, 1994; SHAHEEN *et al.*, 2006).

A presença de *B. cereus* s.s em outros tipos de leite também é comum. Em um estudo realizado com amostras de leite UHT, *B. cereus* s.s. foi detectado em 11,8% das 13 amostras de diferentes marcas comercializadas em São José do Rio Preto –SP. Atribuiu-se a presença deste patógeno como possível resultado de condições higiênico-sanitárias precárias na ordenha, beneficiamento ou transporte do leite, enfatizando-se que apesar do tratamento UHT (Ultra High Temperature) ser capaz de eliminar totalmente a forma vegetativa do microrganismo, formas esporuladas presentes no leite antes do tratamento térmico, altamente resistentes ao calor, poderão persistir e germinar no produto final (VIDAL-MARTINS; ROSSI JR; REZENDE-LAGO, 2005).

5.1.3 Contagem de *B. cereus* s.s. isolados de alimento fermentado: tucupi

Foram avaliadas também 11 linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de amostras de tucupi (tabela 2).

Tabela 3 – Contagem de *B. cereus* s.s. em amostras do processamento de tucupi

ANO	Alimento	Isolado	Contagem microbiológica
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1789	10 ³ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1790	3,0 x 10 ³ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1791	3,5 x 10 ⁴ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1792	1,5 x 10 ³ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1793	8,5 x 10 ⁰ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1794	10 ² UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1795	10 ³ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1796	3,0 x 10 ⁰ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1799	10 ³ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1800	10 ³ UFC/g
2017	Tucupi	LFB-FIOCRUZ 1801	3,9 x 10 ² UFC/g

Em negrito: número de depósito da linhagem na CCGB.

Diversos estudos relataram a presença de *B. cereus* s.s. em diferentes tipos de alimentos (ABRIOUEL *et al.*, 2007; MANZANO *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-BLANCH *et al.*, 2009). Em função da elevada presença de genes codificadores de fatores de virulência, essas linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de Tucupi (Tabela 2) foram consideradas potencialmente patogênicas (APÊNDICE A). Embora as contagens de *B. cereus* s.s. nessas amostras estejam abaixo da dose capaz de causar doença (10⁵ UFC/g), falhas na conservação desse alimento podem favorecer a multiplicação do microrganismo, colocando um risco a saúde do consumidor (JAY, 2005; CEUPPENS *et al.*, 2011).

5.1.4 Contagem de *B. cereus* s.s. isolados de alimentos envolvidos em surtos de DTA

Tabela 4 – Contagem de *B. cereus* s.s. - surto de DTA

ANO	Surto	Alimento	Isolado	Contagem microbiológica
2005	1	Farofa	LFB-FIOCRUZ 1739	3,0 x 10 ² UFC/g
2005	2	Arroz e feijão	LFB-FIOCRUZ 1740	1,5 x 10⁵ UFC/g
2005	2	Arroz e feijão	LFB-FIOCRUZ 1741	2,0 x 10⁵ UFC/g
2005	2	Carne assada	LFB-FIOCRUZ 1742	3,5 x 10 ⁴ UFC/g
2005	3	Carne moída com batata	LFB-FIOCRUZ 1746	8,0 x 10 ² UFC/g
2005	4	Refeição pronta	LFB-FIOCRUZ 1747	2,7 x 10 ³ UFC/g
2005	5	Refeição pronta	LFB-FIOCRUZ 1750	2,0 x 10 ² UFC/g
2005	6	Molho especial	LFB-FIOCRUZ 1751	5,0 x 10 ³ UFC/g
2005	7	Frango frito	LFB-FIOCRUZ 1752	2,5 x 10⁷ UFC/g
2005	7	Tutu de feijão	LFB-FIOCRUZ 1753	1,5 x 10⁶ UFC/g
2006	8	Marmitex	LFB-FIOCRUZ 1754	1,6 x 10⁸UFC/g
2007	9	Largato	LFB-FIOCRUZ 1756	6,0 x 10 ² UFC/g
2007	9	Salada	LFB-FIOCRUZ 1757	1,7 x 10 ⁴ UFC/g
2008	10	Farofa	LFB-FIOCRUZ 1758	3,0 x 10 ² UFC/g
2008	11	Farofa	LFB-FIOCRUZ 1760	1,44 x 10⁷ UFC/g
2009	12	Pernil assado	LFB-FIOCRUZ 1761	5,0 x 10 ³ UFC/g
2009	13	Pernil assado	LFB-FIOCRUZ 1762	1,9 x 10 ³ UFC/g
2009	13	Farofa	LFB-FIOCRUZ 1763	1,4 x 10⁵ UFC/g
2010	14	Pão	LFB-FIOCRUZ 1764	4,3 x 10⁵ UFC/g
2011	15	Almôndegas	LFB-FIOCRUZ 1766	4,2 x 10⁵ UFC/g
2012	16	Marmitex	LFB-FIOCRUZ 1767	2,2 x 10⁶ UFC/g
2012	17	Bolo	LFB-FIOCRUZ 1770	4,1 x 10 ⁴ UFC/g
2013	18	Canjica	LFB-FIOCRUZ 1771	5,6 x 10⁶ UFC/g
2013	19	Farofa	LFB-FIOCRUZ 1772	3,3 x 10⁵ UFC/g
2014	20	Salpição	LFB-FIOCRUZ 1773	5,5 x 10⁷ UFC/g
2014	21	Feijão tropeiro	LFB-FIOCRUZ 1774	1,3 x 10 ³ UFC/g
2014	22	Feijão tropeiro	LFB-FIOCRUZ 1775	5,0 x 10⁵ UFC/g
2014	23	Salpição	LFB-FIOCRUZ 1776	1,5 x 10⁵ UFC/g
2016	24	Marmitex	LFB-FIOCRUZ 1777	8,0 x 10⁵ UFC/g
2016	25	Farofa	LFB-FIOCRUZ 1785	1,5 x 10 ⁴ UFC/g
2016	25	Farofa	LFB-FIOCRUZ 1786	2,0 x 10 ⁴ UFC/g
2017	26	Maionese	LFB-FIOCRUZ 1798	3,0 x 10 ⁴ UFC/g

Em negrito: número de depósito da linhagem na CCGB e contagens de *B. cereus* s.s. acima de 10⁵ UFC/g ou mL.

É possível observar na tabela 3 as contagens de *B. cereus* s.s. isolados de 32 amostras de alimentos envolvidos em 26 surtos de DTA ocorridos em Minas Gerais, no período de 2005 a 2017.

As contagens de *B. cereus* s.s. nas amostras de alimentos envolvidos em surto variaram entre $2,0 \times 10^2$ UFC/g e $5,5 \times 10^7$ UFC/g (Tabela 3). Dos 32 alimentos descritos, 16 apresentaram contagens acima de 10^5 UFC/g, limite que, segundo a literatura, é capaz de causar doença (JAY, 2005). As intoxicações alimentares causadas por esse patógeno são favorecidas quando há abuso de temperatura, propiciando a multiplicação do microrganismo e contagens maiores que 10^5 UFC/g ou mL nos alimentos, resultando em dois tipos de doenças: a síndrome emética e a síndrome diarreica (PAIVA *et al.*, 2009; CEUPPENS *et al.*, 2011).

Os outros alimentos que apresentaram contagens abaixo de 10^5 não foram indicados como os responsáveis pelos surtos de DTA, mas outros fatores como a distribuição não uniforme dos microrganismos no alimento, perda da viabilidade das formas vegetativas da bactéria durante o transporte das amostras e resistência térmica da toxina emética pré-formada nos alimentos devem ser analisados pelo grupo de investigação frente a outros fatores como critérios clínicos e epidemiológicos (BRASIL, 2010).

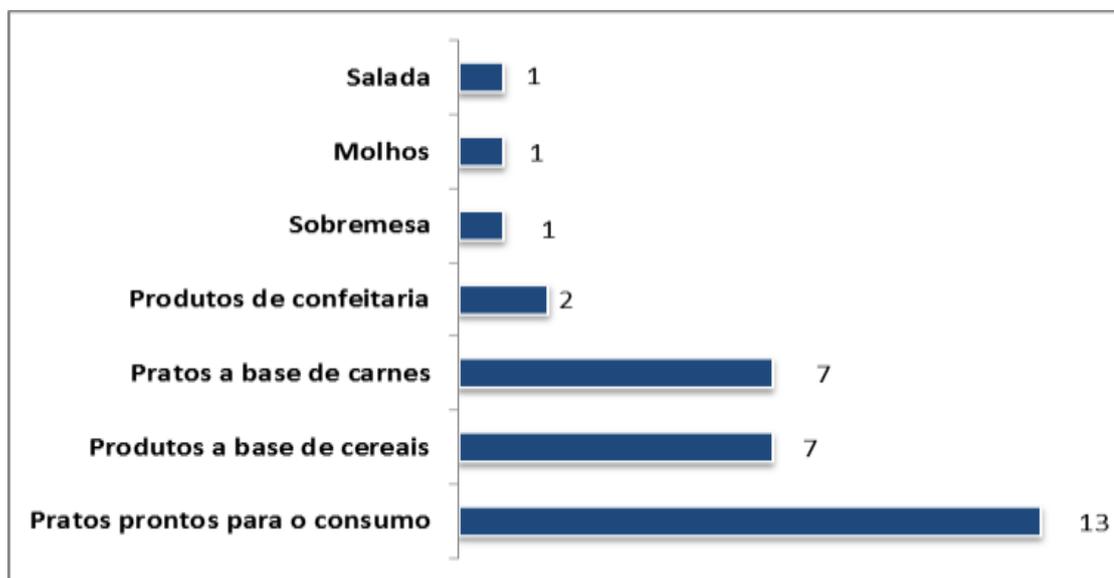
Na síndrome diarreica, as enterotoxinas pré-formadas não podem suportar a passagem no trato gastrointestinal, o que sugere que não contribuem para a síndrome de intoxicação alimentar diarreica. Esta diarreia é provavelmente causada pela produção de enterotoxinas por células de *B. cereus* s.s. que se desenvolvem a partir de esporos ingeridos, que primeiro aderem à mucosa intestinal e depois germinam perto do epitélio intestinal do hospedeiro, e produzem enterotoxinas no hospedeiro (JAY, 2005; CEUPPENS *et al.*, 2011).

Dados do Ministério da Saúde indicam que 3,1% dos casos de intoxicação alimentar no Brasil são causados por *B. cereus* s.s. (BRASIL, 2016a). Devido à natureza geralmente leve de síndrome diarreica causada por esse microrganismo, poucas pessoas procuram os serviços médicos e poucos surtos envolvendo esse agente são notificados pelos profissionais de saúde.

A excepcional resistência de suas formas esporuladas e a capacidade de multiplicação das células em diferentes substratos alimentares são os principais fatores relacionados à ocorrência desses surtos. A bactéria pode ser transferida para os alimentos a partir de diferentes fontes e aí sobreviver, em forma de esporos, a tratamentos térmicos que reduzem a população competitiva, o que lhe proporciona condições ideais de multiplicação. Frequentemente esses alimentos são estocados em condição de abuso de tempo e temperatura após o preparo. Dessa forma, há condição da germinação do esporo e multiplicação da forma vegetativa da bactéria e/ou de produção de sua toxina no alimento (PAIVA *et al.*, 2009).

Os 32 alimentos apresentados na Tabela 3 foram classificados em 7 categorias de alimentos (GRÁFICO 1).

Gráfico 1: Categoria de alimentos envolvidos em surto de DTA com isolamento de *B. cereus* s.s.



Barras: número de alimentos com isolamento de *B. cereus* s.s. por categoria de alimento

Esses alimentos correspondem àqueles frequentemente relatados em surtos envolvendo *B. cereus*, como alimentos mistos, pratos a base de cereais, pratos a base de carne, molhos e vegetais (JAY, 2005; BRASIL, 2017).

A presença de *B. cereus* s.s. nas amostras de alimentos provenientes dos surtos avaliados no presente estudo pode ter ocorrido devido a diversos fatores como: ingredientes previamente contaminados, contaminação ambiental, contaminação cruzada e falta de boas práticas de higiene (JAY, 2005).

Alguns ingredientes, tais como agentes texturizantes, ervas, temperos e especiarias, tem sido apontados como fontes importantes de contaminação com *B. cereus* s.s. (MARTINEZ-BLANCH *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2004). Um estudo realizado no Brasil identificou linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de pimenta preta e orégano com potencial toxigênico (CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011).

AZEREDO (1998) investigou a presença de *B. cereus* em 20 amostras de cada um dos três tipos de arroz – polido, parbolizado polido e integral – nas quais se observaram, respectivamente, índices de contaminação de 50%, 10% e 100%, correspondente a valores situados entre $1,00 \times 10^2$ e $1,76 \times 10^3$ UFC/g.

A contaminação das superfícies e bancadas de preparo dos alimentos com *B. cereus* s.s. também é comum. Mendes *et al.*(2004) avaliaram a contaminação de ambientes e superfícies de restaurantes comerciais. A presença de bactérias do grupo *B. cereus* foi observada em 42% de um total de 78 amostras obtidas de superfícies de bancada, equipamentos e utensílios. As maiores contagens, no ambiente, foram encontradas em equipamentos e utensílios, sendo verificado em cuba de aço inoxidável contagem de $1,2 \times 10^4$ UFC/utensílio e, em picador de vegetais e liquidificador, contagem de $5,0 \times 10^2$ UFC/equipamento.

Soares e colaboradores (2005) analisaram a presença de *B. cereus* s.s. em dois restaurantes institucionais do município de Campinas/SP através de análise de amostras ambientais e de alimentos coletadas na linha de preparo de pratos cárneos. O microrganismo foi detectado em amostras de ar ambientes ($2,0$ a $20,0$ UFC/m³); carne processada (10^2 UFC/g a $2,4 \times 10^3$ UFC/g); condimentos e temperos (10^1 a $5,0 \times 10^2$ UFC/g); e, em 51,7% das amostras de superfície analisadas.

Os pontos de contaminação podem permitir a contaminação cruzada, se não forem adotadas rigorosas medidas preventivas. Uma vez que a contaminação

pode ocorrer nas diversas etapas de produção de refeições, ressalta-se a importância da adoção de boas práticas de fabricação nos serviços de alimentação, de forma a favorecer condições seguras na produção das refeições. A redução do risco de intoxicações por *B. cereus* s.s. poderia ocorrer se o ambiente de manipulação dos alimentos fosse controlado (SOARES; AZEREDO; KUAYE, 2005)

Outro aspecto importante na análise desses resultados é que esporos de *B. cereus* s.s. possuem uma pronunciada habilidade de adesão ao aço inoxidável, que é um material comumente encontrado em equipamentos e utensílios. As células aderidas podem formar biofilmes, tornando-se mais resistentes aos sanificantes. É importante considerar que o patógeno, a partir desses pontos e por meio de contaminação cruzada, pode atingir os alimentos prontos para o consumo (MENDES *et al.*, 2004).

Em residências, as condições precárias de higiene dos utensílios e bancadas de cozinha favorecem a contaminação por *B. cereus* s.s. por ser esta uma bactéria amplamente distribuída no ambiente. Nos estabelecimentos de alimentação coletiva, como restaurantes, escolas e creches, os processos que garantem a limpeza e sanitização de áreas, utensílios e equipamentos, frequentemente são operados de forma precária, por motivos econômicos ou por deficiências da mão-de-obra (BRASIL, 2010).

Conforme demonstrado no APÊNDICE A, as 32 linhagens de *B. cereus* s.s. originárias de alimentos envolvidos em 25 surtos de DTA notificados em Minas Gerais no período de 2005 a 2017 demonstraram elevada prevalência de genes codificadores de fatores de virulência.

5.2 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência do *B. cereus* s.s. está atribuída à presença de vários genes que são relacionados com doenças gastrintestinais e somáticas. Esses genes codificam diferentes fatores de virulência extracelulares incluindo enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases, proteases e beta-lactamases (CEUPPENS *et al.*, 2011).

As enterotoxinas HBL e NHE, a hemolisina III, a PC-PLC, a PI-PLC e a SPH já foram detectadas por PCR em todos os membros do grupo do *B. cereus*. Por outro lado, a citotoxina K e a hemolisina II parecem ser restritas a algumas linhagens de *B. cereus* s.s. e *B. thuringiensis* (HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Com relação à Cereolisina O (CLO), segundo Martinez-Blanch *et al.* (2009), está presente em 100% dos isolados do grupo *B. cereus*, mas também em 25% de outras espécies de *Bacillus*, com o *B. subtilis* e o *B. circulans*. Já o gene *ces*, codificador da toxina emética, é considerado raro e está presente em algumas linhagens do grupo filogenético III e recentemente foi também detectado em linhagens do grupo filogenético VI (CARLIN *et al.*, 2006; GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

A tabela 5 apresenta o número de isolados positivos e a frequência de detecção dos genes codificadores de enterotoxinas. Hemolisinas e fosfolipases nas 65 linhagens de *B. cereus* s.s. avaliadas no presente estudo.

Tabela 5 – Total de isolados positivos e respectiva frequência de detecção dos genes codificadores dos fatores de virulência

Genes	Nº de isolados positivos	Frequência de isolados positivos (%)
<i>nheAB</i>	65	100
<i>hblACD</i>	47	72,3
<i>hblAC</i>	3	4,61
<i>ces</i>	0	0
<i>cytK-1</i>	0	0
<i>cytK-2</i>	38	58,4
<i>clo</i>	65	100
<i>hlyII</i>	14	21,5
<i>hlyIII</i>	44	67,7
<i>pipIc</i>	42	64,6
<i>pcpIc</i>	49	75,4
<i>sph</i>	42	64,6

Do total de amostras, 100% foram positivas para dois genes codificadores do complexo NHE. O gene *cytK-2* foi detectado em 38 (58,4%) amostras. Os genes do complexo HBL (*hblA*, *hblC* e *hblD*) foram detectados em 47 (72,3%) amostras e em 3 amostras, somente os genes *hblA* e *hblC* foram detectados. Todas as linhagens foram negativas para os genes *ces* e *cytK-1*.

Outro estudo envolvendo 97 linhagens isoladas de alimentos no Brasil apresentou resultado similar, com 84,5% das cepas positivas para os genes do complexo NHE, 62,9% para os genes do complexo HBL e 45,4% para a variante *cytK-2* (CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011). Isso mostra que a ocorrência desses genes em linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas no Brasil parece ser comum.

Além dos genes codificadores de enterotoxinas, encontramos alta frequência dos genes codificadores de hemolisinas e fosfolipases nas amostras analisadas. Os genes que codificam as hemolisinas *clo*, *hlyII* e *hlyIII* foram

detectados em 100% , 21,5% e 67,7% das linhagens avaliadas nesse estudo, respectivamente. Com relação à ocorrência dos três genes que codificam as fosfolipases *piplc*, *pcplc* e *sph*, seus produtos foram amplificados 64,6%, 75,4% e 42,6% das linhagens avaliadas, respectivamente.

Chaves *et al.* (2017) também demonstraram ampla distribuição do gene *pi-plc* na espécie *B. cereus* s.s., sendo detectado em 77,89% das amostras analisadas, assim como Hendriksen *et al.* (2006), que detectaram em 83% das amostras pertencentes à espécie *B. cereus* s.s.. Martinez-Blanc *et al.* (2009) demonstraram ampla distribuição dos genes *sph* e *pc-plc* nas espécies do grupo *B. cereus*, sendo detectados em 75% e 95% das cepas analisadas, respectivamente. Hendriksen *et al.* (2006) detectaram os genes *sph* e *pc-plc* em 83% e 67% dos isolados da espécie *B. cereus* s.s., respectivamente.

Os outros fatores de virulência, incluindo PC-PLC, PI-PLC e SPH e as hemolisinas CLO, HlyII e HlyIII, tem sido investigados em linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas em surtos de intoxicação alimentar, sendo que a importância relativa de todos esses metabólitos na patogenicidade de *B. cereus* s.s. ainda não está completamente bem compreendida (BEECHER; WONG, 2000; MARTÍNEZ-BLANCH *et al.*, 2009).

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS TOXIGÊNICOS DAS LINHAGENS DE *B. cereus* s.s.

Sabe-se que toxina cereulida é o principal marcador da síndrome emética. Já a síndrome diarreica é causada por diversas enterotoxinas, sendo a enterotoxina não-hemolítica NHE, a hemolisina HBL e a citotoxina K considerados os principais fatores relacionados com surtos de diarreia causados por *B. cereus* s.s. (CHAVES *et al.*, 2011; LUND; DE BUYSER, GRANUM, 2000).

A análise da ocorrência dos genes codificadores das enterotoxinas permitiu a classificação das 65 linhagens de *B. cereus* s.s. em 5 perfis toxigênicos (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfis toxigênicos identificados nas 65 linhagens de *B. cereus* s.s.

Perfil Toxigênico (n, %)	Genes das enterotoxinas					
	<i>nheAB</i>	<i>hblAC</i>	<i>hblD</i>	<i>ces</i>	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>
I (32, 49%)	+	+	+	-	-	+
II (15, 23,%)	+	+	+	-	-	-
III (6, 9,23%)	+	-	-	-	-	+
IV (9, 13,8%)	+	-	-	-	-	-
V (3, 4,6%)	+	+	-	-	-	-

+, um produto do tamanho esperado; **-**, nenhum produto de PCR resultou em amplificação.

Números em **negrito**: principais perfis toxigênicos.

O perfil toxigênico mais comum, o tipo I, que incluiu linhagens possuindo os genes *nheAB*, *hblACD* e *cytK-2*, foi identificado em 32 (49%) linhagens de *B. cereus* s.s.. O perfil toxigênico II, incluindo linhagens possuindo os genes *nheAB* e *HblACD*, foi o segundo mais frequente, sendo detectado em 15 (23%) linhagens avaliadas no presente estudo. Em outro estudo envolvendo 97 linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos no Brasil, o perfil toxigênico I foi identificado em 33% das linhagens. Já o perfil II foi identificado em 24,5% das linhagens avaliadas (CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011).

No presente estudo, o produto da amplificação dos genes do complexo NHE foram detectados em 100% das linhagens de *B. cereus* s.s classificadas nos 5 perfis toxigênicos. Esse resultado foi equivalente com o de outro estudo que utilizou o mesmo primer *nheAB*, onde a respectiva sequência foi amplificada em 100% das 391 cepas testadas distribuídas nos 7 grupos filogenéticos determinados pelo sequenciamento do gene *panC* (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010).

No presente estudo, em três linhagens (LFB-FIOCRUZ 1782, LFB-FIOCRUZ 1786 e LFB-FIOCRUZ 1776) somente foi observada a amplificação dos genes (*hblA* e *hblC*) (Figura 3), não tendo sido detectado o gene *hblD*. Outras publicações também relataram a falta de amplificação por PCR de um ou dois componentes dos complexos HBL (ABRIOUEL *et al.*, 2007; HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Sendo a toxina HBL tripartida, os três componentes são necessários para gerar a toxina ativa (BEECHER; WONG, 2000; HSIEH *et al.*, 1999). Estudos adicionais são necessários para avaliar qual o fator responsável pela falta de amplificação de um ou mais componentes da hemolisina HBL em linhagens de *B. cereus* s.s.

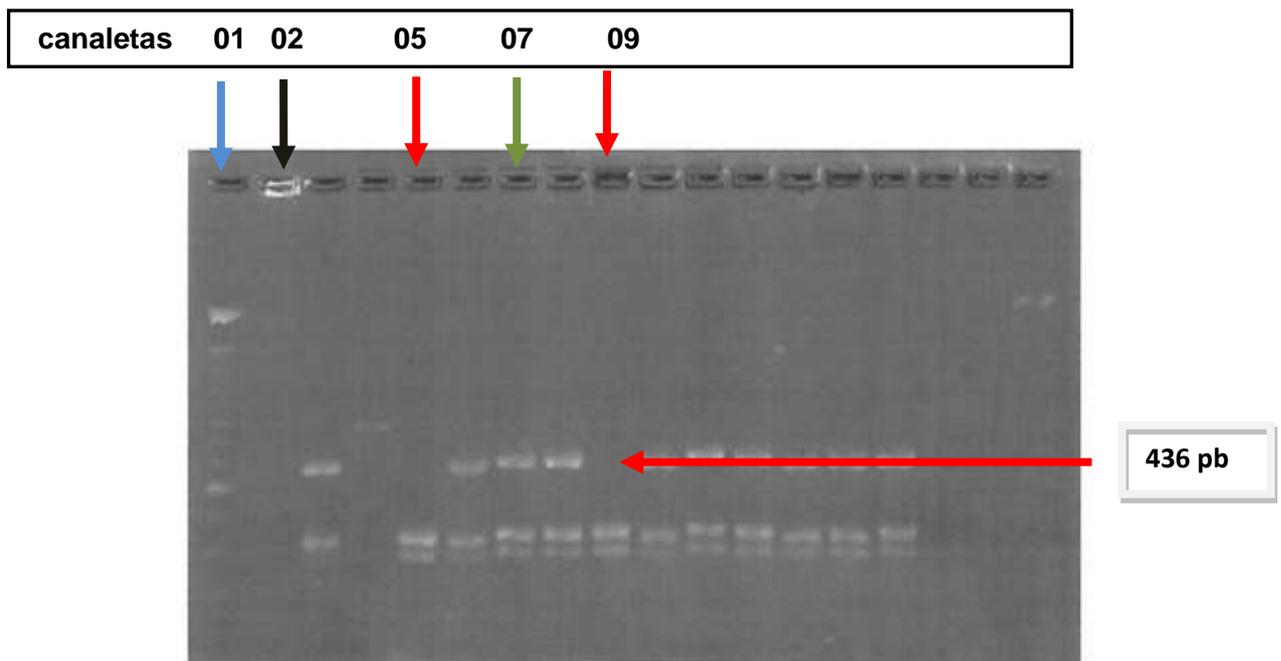


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos da PCR multiplex (genes *hblACD* e *ces*). **Canaleta 01: padrão de peso molecular (100 pb);** **Canaleta 02: branco;** **Canaleta 05: linhagem LFB-FIOCRUZ 1782 (ausência de amplificação do gene *hblD*);** **Canaleta 07: linhagem LFB-FIOCRUZ 1784 (amplificação dos três genes da hemolisina BL: *hblA*, *hblC* e *hblD*);** **Canaleta 09: linhagem LFB-FIOCRUZ 1786 (ausência de amplificação do gene *hblD*).**

A falta de amplificação do gene *ces* demonstra ausência da linhagem emética de *B. cereus* s.s. na amostragem do presente estudo. Chaves *et al.* (2011) também relataram ausência de amplificação do gen *ces* em um estudo com 97 linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos no Brasil. Sabe-se que a habilidade para produzir a toxina emética é restrita a poucas linhagens de *B. cereus* s.s., sendo esse gene considerado raro entre isolados do grupo *B. cereus*, sendo encontrado apenas em algumas linhagens de *B. cereus* s.s. do grupo filogenético III e raramente em *B. weihenstephanensis* do grupo VI (EHLING-SHULZ *et al.*, 2004a; GUINEBRETIERE *et al.*, 2010). Assim como na Noruega, Finlândia, Bulgária e Hungria, no Brasil a forma predominante de toxinfecção por *B. cereus* s.s. parece ser a síndrome diarréica, enquanto que no Reino Unido e Japão a forma predominante é a emética (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2004b).

Um estudo epidemiológico e molecular com 564 cepas associados a 140 surtos de intoxicação alimentar ocorridos na França entre 2007 a 2014 relatou ausência de amplificação do gene *ces* em linhagens isoladas de alimentos envolvidos em surtos com sintomas eméticos, evidenciando que outros fatores desconhecidos responsáveis pelos sintomas de vômito podem estar envolvidos na síndrome emética e, além dessa hipótese, pode ocorrer que a toxina emética pré-formada no alimento foi ingerida concomitantemente com o alimento sem isolamento das linhagens potencialmente produtoras de cereulida (GLASSET *et al.*, 2016).

Vários estudos relataram elevada prevalência da citotoxina K em linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos (CHAVES; FÁTIMA; VIVONI, 2012; GUINEBRETIERE *et al.*, 2002; HANSEN; HENDRIKSEN, 2001). No presente estudo, a PCR duplex descrita por Guinebretiere *et al.* (2006) foi utilizada para permitir a identificação das variantes *cytK-1* e *cytK-2*. A ocorrência de *cytK-1* é rara e é vista em cepas pertencem a um grupo filogenético distante que compreende linhagens da espécie *B. citotoxicus* (Guinebretiere *et al.*, 2013). No presente estudo, 38 amostras foram positivas para o gen *cytK-2*. Embora a CytK-2 não seja tão tóxica quanto a CytK-1, o seu potencial para causar doenças não pode ser subestimado (CHAVES; PIRES; VIVONI, 2011).

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DE VIRULÊNCIA DAS LINHAGENS DE *B. cereus* s.s.

A presença de vários genes de virulência em linhagens de *B. cereus* s.s. é importante porque a diarreia alimentar é provavelmente causada pela ação combinada de múltiplas toxinas e enzimas de degradação, incluindo colagenases, fosfolipases C, hemolisina III e cereolisina AB (HANDRIKSEN *et al.*, 2006). Por exemplo, a fosfolipase C aumenta a atividade da hemolisina BL por sinergismo (BEECHER; WONG, 2000). Já os componentes da unidade citolítica cereolisina AB (*CerAB*) tem sido associados à síndrome diarréica, atuando sobre a permeabilidade e viabilidade de células do epitélio intestinal (CHAVES *et al.*, 2017). O papel da esfingomielinase em doenças transmitidas por alimentos ainda é pouco esclarecido, mas a presença de *sph* foi descrita associado a casos de intoxicação alimentar (BEECHER; WONG, 2000; CEUPPENS *et al.*, 2011).

Embora o *B. cereus* s.s. seja geralmente associado a distúrbios gastrintestinais, é um agente patogênico humano oportunista que pode causar algumas infecções sistêmicas e locais, septicemias, periodontites, bacteremia nosocomial, endocardite, pneumonia e infecções oculares (BOTTONI, 2010).

Alguns estudos sugerem que as hemolisinas e fosfolipases expressas por linhagens de *B. cereus* s.s. desempenham um papel importante no desenvolvimento de infecções. Como vários autores têm sugerido que o trato gastrointestinal é uma possível fonte de linhagens que causam infecções no sistema respiratório e nervoso, considera-se importante avaliar a presença destes fatores de virulência em cepas *B. cereus* s.s. (CHAVES *et al.*, 2017).

A distribuição dos genes codificadores de hemolisinas e fosfolipases nas linhagens avaliadas no presente estudo permitiu a classificação em 20 perfis de virulência (Tabela 7). O perfil predominante, o perfil II, incluiu 20 (30,8%) linhagens que foram positivas para todos os genes codificadores de todos esses seis fatores de virulência, menos o gene *hlyII*. O segundo perfil mais frequente foi o XV, que incluiu seis (9,2%) linhagens positivas para os genes *clo*, *hlyIII* e *pc-plc*.

Tabela 7 - Perfis de virulência identificados nas 65 linhagens de *B. cereus* s.s.

Perfil de virulência (n, %)	Genes envolvidos					
	<i>clo</i>	<i>hlyII</i>	<i>hlyIII</i>	<i>pipIc</i>	<i>Pc-plc</i>	<i>sph</i>
I (4, 6,2%)	+	+	+	+	+	+
II (20, 30,8%)	+	-	+	+	+	+
III 2 (3%)	+	+	+	+	+	-
IV (1, 1,5%)	+	+	+	-	+	+
V (1, 1,5%)	+	+	-	+	+	+
VI (2, 3%)	+	-	+	+	+	-
VII (1, 1,5%)	-	+	+	+	-	-
VIII (2, 3%)	+	+	+	-	+	-
IX (1, 1,5%)	+	+	-	+	+	-
X (1, 1,5%)	+	+	-	-	+	+
XI (1, 1,5%)	+	-	+	-	-	+
XII (3, 4,6%)	+	-	+	+	-	+
XIII (4, 6,2%)	+	-	-	+	+	+
XIV (2, 3%)	+	-	+	+	-	-
XV (6, 9,2%)	+	-	+	-	+	-
XVI (1, 1,5%)	+	+	-	-	+	-
XVII (4, 6,2%)	+	-	-	-	+	+
XVIII (3, 4,6%)	+	-	-	-	-	+
XIX (5, 7,7%)	+	-	-	-	-	-
XX (1, 1,5%)	+	-	-	-	+	-

+, um produto do tamanho esperado; **-**, nenhum produto de PCR resultou em amplificação.

Números em negrito: principais perfis de virulência..

Com relação à classe de toxinas representadas pelas fosfolipases, as fosfolipases C são as mais conhecidas dentro dessa família de proteínas expressas por linhagens de *B. cereus* s.s. e espécies correlacionadas. As fosfolipases clivam os lipídeos que servem para ancorar as proteínas de superfície celular, comprometem a integridade da membrana celular e anulam a capacidade regenerativa das células e membranas mucosas, levando à necrose. De acordo com a classe de lipídeos que atuam têm-se a PI-PLC, PC-PLC e SPH, codificadas pelos genes *pi-plc*, *pc-plc* e *sph*, respectivamente (POMERANTSEV *et al.*, 2003).

No presente estudo, o complexo biológico cereolisina AB (CerAB), composto pelas moléculas PC-PLC e SPH, ocorreu em 35 (53,8%) linhagens distribuídas nos perfis de virulência I, II, IV, V, X, XIII e XVII. A função biológica do complexo depende da esfingomielinase (SPH), uma vez que a presença de esfingomielina (SM) em membranas inibe a atividade da PC-PLC (HANDRIKSEN *et al.*, 2006).

Outra classe de toxinas expressas por linhagens de *B. cereus* s.s. inclui as hemolisinas, as quais são responsáveis pela atividade hemolítica e consideradas importantes em processos infecciosos. A cereolisina O, codificada pelo gen *clo*, foi detectada em 100% das linhagens avaliadas nesse estudo. Martinez-Blanch *et al.* (2009) também demonstraram 100% de detecção desse gene nas linhagens do grupo do *B. cereus*, mas também em 25% de outras espécies de *Bacillus*.

Os resultados do presente estudo mostram uma distribuição limitada do gene *hlyII* entre as linhagens avaliadas, sendo esse gene detectado em 14 (21,5%) das linhagens distribuídas nos perfis de virulência I, III, IV, V, VII, VIII, IV, X e XVI. Outros estudos demonstraram resultados semelhantes (CHAVES *et al.*, 2017; HENDRIKSEN *et al.*, 2006). Sabe-se que esse gene tem sido reportado por estar associado a algumas linhagens potencialmente patogênicas responsáveis por intoxicação alimentar ou infecções (CEUPPENS *et al.*, 2011). GLASSET *et al.* (2016) sugeriram que a presença do gene *hlyII* pode ser um bom indicador de patogenicidade.

A hemolisina III, codificada pelo gene *hlyIII*, provoca lise nos eritrócitos por meio da formação de poros na membrana (HANDRIKSEN *et al.*, 2006). No presente estudo, esse gene foi detectado em 44 (67,7%) linhagens. Outros estudos mostraram resultados semelhantes, sendo o gene *hlyIII* foi amplamente distribuído entre linhagens que pertencem ao grupo do *B. cereus* (CHAVES *et al.*, 2017; HENDRIKSEN *et al.*, 2006).

Em função da patogenicidade dessa espécie, verifica-se, portanto, que devem ser realizadas medidas eficazes de controle higiênico-sanitário para reduzir contaminação por *B. cereus* s.s. na cadeia produtiva alimentar. A identificação dos principais pontos de controle na cadeia produtiva deve ser considerada para evitar ou reduzir a contaminação dos alimentos por esse patógeno.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do teste de Fisher utilizado para avaliar se o grupo das 32 linhagens relacionadas a alimentos envolvidos em surtos de DTA foi estatisticamente diferente do grupo das 33 linhagens isoladas de outros alimentos quanto a prevalência dos genes codificadores de fatores de virulência, perfil toxigênico e perfil de virulência mais frequentes estão apresentados no APÊNDICE B.

O critério de aceitação para aceitar a hipótese de que os grupos testados são estatisticamente iguais é que o valor P calculado seja maior que 5%. Todos os parâmetros testados apresentaram valor P calculado maior que 5% (APÊNDICE B). Portanto, não podemos inferir que o potencial para causar diarreia ou infecções oportunistas é diferente entre as linhagens envolvidas em surtos e as isoladas de outros alimentos.

Os resultados do presente estudo foram diferentes dos resultados encontrados por Guinebretiere *et al.* (2002), no qual foi avaliado o potencial toxigênico de 37 linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e 51 linhagens isoladas de outros alimentos. Este autor mostrou uma diferença estatística entre os dois grupos de linhagens. As linhagens isoladas de alimentos envolvidos em surto de DTA apresentaram um maior potencial para

causar diarreia do que as linhagens isoladas de outros alimentos (GUINEBRETIERE; BROUSSOLLE; NGUYEN-THE, 2002).

6 CONCLUSÃO

Todas as 65 linhagens isoladas de diferentes alimentos foram identificadas por métodos convencionais como *B. cereus* s.s. e foram consideradas potencialmente patogênicas devido à presença de vários genes codificadores de fatores de virulência;

As 65 linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de diferentes alimentos possuem alta diversidade genética, apresentando perfis toxigênicos e de virulência variados (5 perfis toxigênicos e 20 perfis de virulência encontrados);

Não há evidências estatísticas de que o grupo de linhagens isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA apresentam diferença no potencial para causar diarreia ou infecções oportunistas em relação ao grupo de linhagens isoladas de outros alimentos estudados;

É possível sugerir que a forma predominante de surtos de intoxicação alimentar por *B. cereus* s.s. em Minas Gerais parece ser a forma diarréica, em função da elevada prevalência nas amostras analisadas de genes codificadores de fatores de virulência associados à síndrome diarreica e ausência de amplificação do gene *ces*, marcador associado à síndrome emética.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Testes de citotoxicidade e afiliação a grupos filogenéticos determinados pelo sequenciamento do gene *panC* recentemente foram propostos como metodologias para fornecer indicação mais precisa do risco de linhagens de *B. cereus* s. s. (GUINEBRETIERE *et al.*, 2010). A aplicação dessas metodologias às linhagens analisadas neste trabalho poderá gerar dados adicionais e contribuir para melhorar a avaliação do potencial de risco de causar intoxicação alimentar e infecções oportunistas de tais linhagens.

A escassez de dados a respeito do potencial de virulência das linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos no Brasil em contraste com vários estudos envolvendo linhagens isoladas de países de clima temperado reforça a importância da pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência em linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos no Brasil.

Outro argumento para se realizar estudos moleculares envolvendo linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas no Brasil é a possibilidade de se identificar linhagens emergentes altamente patogênicas circulantes no Brasil. Os dados desses estudos poderão subsidiar ações de Vigilância Sanitária.

REFERÊNCIAS

- ABEE, T. *et al.* Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food Microbiology**, v. 28, p.199-208, 2011.
- ABRIOUEL, H. *et al.* Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto poto and degué, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. **Journal of Food Protection**, v.70, p.1165-1173, 2007.
- ÁGATA, N. *et al.* The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. **Microbiology**, v. 141, p. 983-988, 1995.
- ANDERSSON, M. A. *et al.* Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p.175– 183, 2004.
- ARNESEN, L. P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **Microbiol Rev.** v. 32, p. 579-606. 2008.
- ASH, C. *et al.* Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal System. Bacteriol.** v. 41, p. 343-346, 1991.
- AZEREDO, R. M. C. **Estimativa de risco relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus*.** 1998. Tese. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998.
- BARKER, M.; THAKKER, B.; PRIEST, F.G. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 245, p. 179–184, 2005.
- BARTOSZEWICZ, M. *et al.* The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microb.** v. 25, p. 588–596, 2008.
- BARTOSZEWICZ, M. *et al.* Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. **J. Appl. Microbiol.**; v. 106, p. 1967-1975, 2009

BARRETO, J. M. O. **Fatores de Virulência de *Bacillus cereus* isolados na cadeia produtiva do leite na microrregião de Viçosa, Minas Gerais.** 2012. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

BECKER, H. *et al.* *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 1-15, 1994.

BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. **Microbiology**, v. 146, p. 3033-3039, 2000.

BHUNIA, A. K. Introduction to foodborne pathogens. In: BHUNIA A. K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis.** New York, 2008. p. 1-16.

BOONCHAI N. *et al.* Study on Cytotoxicity and Nucleotide sequences of enterotoxin FM of *Bacillus cereus* isolated from various food sources. **J Med Assoc Thai**, v. 91, p. 1425-1432, 2008.

BOTTONE E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, v. 23, p. 382-398, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Poder Executivo, **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 20 de set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Lei nº 9.782**, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual integrado de Vigilância, Prevenção e controle de Doenças Transmitidas por Alimentos.** Brasília: Editora MS, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Brasília**, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA. Brasil 2000 a 2015, 2016a.

[http:// foodsafetybrazil.org/wp-content/uploads/2016/06/5.jpg](http://foodsafetybrazil.org/wp-content/uploads/2016/06/5.jpg).

CARLIN, F. *et al.* Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. **Int J Food Microb**, v. 109, p. 132-138, 2006.

CARLIN, F. *et al.* Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Res Int.** v.43, p.1885-1894, 2010.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos e Água. **Normas e Instruções para Investigação de Surtos**. São Paulo, 2008. 88 p.

Disponível em <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/VEDTA08_manual.pdf>. Acesso em: 03 julho. 2017.

CEUPPENS, S. *et al.*, Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, p. 188–213, 2011.

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

CHAVES , J. Q.; FÁTIMA, C.; VIVONI, A. M. Molecular and Toxigenic characterization of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated of commercial ground roasted coffee. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 518-522, 2012.

CHAVES, J. Q. *et al.* Molecular Characterization and Risk Assessment of *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolated from Ultrahigh-Temperature and Pasteurized Milk Marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 80, p. 1060-1065, 2017.

CHERIF, A. *et al.* Genomic diversity and relationship of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by multi-REP PCR fingerprinting. **Can J Microb**, v. 53, p.343–350, 2007.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In: Sneath, P.H.A. *et al.*(Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2, The Williams & Wilkins C.O., Baltimore, 1986. p. 1105-1139.

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

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of foodborne illness. **Mol Nutr Food Res**. v. 48, p. 479-487, 2004a.

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

EHLING-SCHULZ, M. *et al.* Cerulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pX01. **BMC Microbiol**. v. 6, n. 20, 2006.

FORGHANI, F. *et al.* A novel pentaplex real time (RT)- PCR high resolution melt curve assay for simultaneous detection of emetic and enterotoxin producing *Bacillus cereus* in food. **Control. Food**. v. 60, p 560-568, 2016.

FRANCIS, K. P. *et al.* Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. **Appl Environ Microb**. v. 64, p. 3525-3529, 1998.

FRITZE, D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1245- 1248, 2004.

FRICKER, M. *et al.* Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 1892–1898, 2007.

GLASSET, B. *et al.* *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. **Euro Surveil**, 2016.

GOMES, I. L. **Pesquisa de enterotoxinas em isolados alimentares do grupo *Bacillus cereus***. 2009. 91p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

GOMES, M. **Gênero *Bacillus* spp.** Rio Grande do Sul: [FAVET-UFRGS], 2015.

GUINEBRETIERE, M. H.; BROUSSOLLE, V.; NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 3053-3056, 2002.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. **Int J of Food Microbiol**, v. 82, n. 3, p. 223-232, 2003.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* Rapid discrimination of *cytk-1* and *cytk-2* genes in *Bacillus cereus* strains by novel duplex PCR system. **FEMS Microbiol Lett**, v. 259, p. 74-80, 2006.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. **Environmental Microbiology**. v. 10, p.851–865, 2008.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (Groups I to VII) rather than species affiliation. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 9, p. 3388–3391, 2010.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* *Bacillus cytotoxicus* sp. is a novel thermotolerante species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 31–40, 2013.

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

GRANUN, P.E.; O'SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol Lett**. v.177, p. 225-229, 1999.

HENRICHS, H. *et al.* Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **J Bacteriol**, v. 175, p. 6760-6766, 1993.

HANSEN, B. M; HENDRIKSEN, N. B. Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. Denmark, v. 67, n. 1, p. 185-189, Jan. 2001.

HENDRIKSEN, N. B. *et al.* Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 239-249, 2006.

HELGASON, E. *et al.* Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 1615–1622, 2000.

HELGASON, E. *et al.* Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 191–201, 2004.

HSIEH, Y. M. *et al.* Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from food-borne outbreaks. **J Appl Microbiol**, v. 87, p. 481-490, 1999.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **COL683**: coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. Rio de Janeiro, 2015.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Bacillus cereus* gastroenteritis, Morden Food Microbiology, & TH ED. **Springer Science Business Media**, Ney York, USA, p. 583-590, 2005.

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

LECHNER, S. *et al.* *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **Int J Syst Bacteriol.** v. 48, p. 1373-1382. 1998.

LOGAN, N. A.; DEVOS, P. Genus *Bacillus*. In: DE VOS P. *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2^aEd. New York:, Springer. 2009. v. 3, p 21-128.

LUND T.; DE BUYSER M.L.; GRANUM, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Mol Microbiol**, v. 38, p. 254-261, 2000.

MANZANO, M. *et al.* Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. **Food Microbiol**, v. 26, p. 259–264, 2009.

MAHLER, H. *et al.* Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **N Engl J Med**, v. 336, p.1142-1148, 1997.

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

MENDES, R. A. *et al.* Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Rev. Nutr.** Campinas, v.17, n.2, p.255-261, 2004.

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

NAKAMURA, L.K. *Bacillus pseudomycooides* sp. Nov. **International Journal of Systematic bacteriology**. v.48, p. 1031-1035. 1998.

NUNES, E. L. *et al.* Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 34, p. 77-81, 1999.

ODA, M. *et al.* Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 1073-1080, 2010.

OLIVEIRA, J. V. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos comercializados em Minas Gerais no ano de 2012**. 2013 32f. Trabalho de conclusão de curso [Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária] - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2013.

PAIVA, C. P. *et al.* *Bacillus cereus* e suas toxinas em Alimentos. **Higiene Alimentar**. Mirandópolis, v. 23, p. 170/171, março/abril. 2009.

PATIÑO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in Microbiology**, v. 168, p. 309-318, 2017.

PERUCA, A. P.; VILAS-BÔAS, G.; ARANTES, O. Genetic relationships between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, p. 497-500, 2008

PIRHONEN, T. J. *et al.* Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food poisoning. **Food Microbiology**, v. 22, p. 87–91, 2005.

PIRTTIJARVI, T. S. M. *et al.* Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 133–144, 1999.

POMERANTSEV, A. P. *et al.* Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C and Sphingomyelinase Activities in Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. **Infect Immun**, v.71, p. 6591-6606, 2003.

PRIEST, F.G. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. **J. Bacteriol**, v. 186, p. 7959–7970, 2004.

RABINOVITCH, L. *et al.* Seletive inactivation of spores maintaining larvicidal activity in *Bt serovar israelensis* irradiated with gamma rays. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 9, p. 120-124, 2014.

RASKO, D. A. *et al.* The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. **Nucleic Acids**. v. 32, p. 977-988. 2004

REIS, V. B. M. **Detecção e caracterização bioquímica e molecular de *Bacillus cereus* em grãos**. 2012. 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2012.

REYES-RAMIREZ, A.; IBARRA, J. E. Fingerprinting of *Bacillus cereus* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence based PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1346-1355, 2005.

REZENDE-LAGO, N. C. **Bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite e estudo enterotoxigênico das cepas isoladas**. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

RITTER, A. C.; TONDO, E. C. Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travelers. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n.3, p.254-257, 2014.

SANTOS, C. A. **Ocorrência e Diversidade de fatores de virulência em isolados brasileiros de *Bacillus cereus* provenientes de alimentos e do solo.** 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS (SES-MG). Lei nº 13.317 de 24 de janeiro de 1999. Código de Saúde do Estado de Minas Gerais. Diário oficial de Minas Gerais, Poder Executivo, Minas Gerais, 25 de set. 1999.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS (SES-MG). VISA da SRS/Barbacena realiza reunião do PROGvisa (2011). Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/cidadao/banco-de-noticias/story/2182-visa-da-srs-barbacena-realiza-reuniao-do-progvisa-sesmg#navigation-start> . Acesso jan/2016.

SHAHEEN, R. *et al.* Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. **Int J Food Microbiol.** v. 107, p. 287-294, 2006.

SOARES, C. M; AZEREDO, R. M. C; KUAYE, A. Y. Análise da contaminação de preparações cárneas por *Bacillus cereus* em serviços de alimentação. **Alimentos e Nutrição.** Araraquara, v. 16, n. 2, p. 169-175, abr./jun. 2005.

SOARES, C. M. *et al.* Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. **Ciência Rural.** Santa Bárbara, v. 38, n. 2, p. 504-510, març.-abr., 2008.

STENFORS, L. P.; GRANUM, P. E. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. **FEMS Microbiol Lett,** v. 197, p. 223-228, 2001

STENFORS, L. P. *et al.* Using an insect model to assess correlation between temperature and virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol Lett,** v. 317, p. 196-202, 2011

SVENSSON, B. *et al.* Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. **Int Dairy J;** v. 14, n.1, p.17-27, 2004.

TALLENT, S. M. *et al.* Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group.food biological contaminants.**Journal of aoac International** v. 95, no. 2, 2012

TOURASSE, N. J. *et al.* The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. **J Appl Microbiol.** v. 101, n.3, p. 579-593, 2006.

TOURASSE, N. J. Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. **Food Microbiol.** v. 28, p. 236–244, 2011.

VAISANEN, O. M. *et al.* Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature and fatty acid analysis. **J Appl Microbiol.** v. 70, p. 315-324, 1991.

VIDAL-MARTINS, A.; ROSSI JR, O.; REZENDE-LAGO, N. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 57, n.3, p. 396-400, 2005.

VIDAL-MARTINS, A. M. *et al.* *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em diferentes fases do processamento de leite UHT. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária.** Niterói, v. 13, n. 1, p. 32-36, jan-abr. 2006.

YANG, I. C. *et al.* Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. **Journal of food Protection**, v. 68, p. 2123-2130, 2005.

ZHOU, G. *et al.* Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. **Int J Food Microbiol**, v. 137, p.143-146, 2010

ZWICK, M. E. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. **Genome Res.** v. 22, p.1512–1524, 2012.

APÊNDICE A- Perfil toxigênico (Perfil T) e perfil de virulência (Perfil V) de linhagens de *Bacillus cereus* sensu stricto isoladas de alimentos.

Nº CCGB (LFB-FIOC RUZ)	<i>nhe AB</i>	<i>hbl</i>	<i>cytK -1</i>	<i>Cytk-2</i>	<i>ces</i>	<i>clo</i>	<i>HlyII</i>	<i>HlyIII</i>	<i>Pi-plc</i>	<i>Pc-plc</i>	<i>sph</i>	Perfil T/Perfil V
1734	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	IV e XV
1735	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1736	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	IV e XV
1737	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	IV e VI
1739	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	I e V
1740	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	II e XVI
1741	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	II e VIII
1742	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	I e XVII
1743	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	I e I
1744	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	I e III
1745	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	I e XIII
1746	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1747	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1748	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	II e XVIII
1749	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	II e XVIII
1750	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	I e III
1751	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	III e VIII
1752	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	II e II
1753	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	II e II
1754	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	I e XIII
1756	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	I e I
1757	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	II e II
1758	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1759	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	I e IX
1760	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	IV e XV
1761	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1762	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1763	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	I e XIII
1764	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	IV e VI
1765	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	II e II
1766	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	III e XIII
1767	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	II e XVIII
1768	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	II e XVII
1769	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	II e XIX
1770	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	III e XV
1771	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	I e XII
1772	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	I e XII
1773	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1774	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1775	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	IV e XV

1776	+	+	*	-	-	-	+	+	+	+	-	-	V e VII
1777	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	III e XIX
1778	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	III e XIX
1779	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	IV e XIV
1780	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	II e XVII
1781	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	II e XX
1782	+	+	*	-	-	-	+	-	+	+	+	+	V e II
1783	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	II e XV
1784	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	I e I
1785	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	II e X
1786	+	+	*	-	-	-	+	-	-	-	+	+	V e XVII
1787	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	I e XII
1788	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	I e XIV
1789	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	I e I
1790	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	I e XI
1791	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1792	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1793	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	III e II
1794	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1795	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1796	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1798	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	I e II
1799	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	IV e XIX
1800	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	IV e XIX
1801	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	I e IV

Legenda:



(cepas isoladas alimentos do PROGVISA, cepas de surtos de DTA, cepas isoladas tucupi).

APÊNDICE B – TESTE DE FISHER BILATERAL

Tabela de contingência 2 x2 (gene *hbl*)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total de cepas
Alimentos (surto)	25	7	32
Outros alimentos	25	8	33
Total	50	15	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 1.0000: hipótese nula aceita.

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência dos genes codificadores do complexo HBL entre os grupos de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e nas linhagens isoladas de outros alimentos.

Tabela de contingência 2 x2 (gene *cytk-2*)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	20	12	32
Outros alimentos	17	16	33
Total	37	28	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 0,4553: hipótese nula aceita.

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência dos gene *cytk-2* entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimentos.

Tabela de contingência 2 x2 (gene *hlyII*)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	8	24	32
Outros alimentos	6	27	33
Total	14	51	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 0,5580: hipótese nula aceita.

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência do gene *hlyII* entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimentos.

Tabela de contingência 2 x2 (gene *hlyIII*)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	22	10	32
Outros alimentos	22	11	33
Total	44	21	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 1: hipótese nula aceita.

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência do gene *hlyIII* entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimentos.

Tabela de contingência 2 x2 (gene *pi-plc*)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	21	11	32
Outros alimentos	19	14	33
Total	40	25	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 0,8276: hipótese nula aceita.

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência do gene *pi-plc* entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimentos.

Tabela de contingência 2 x2 (gene *pc-plc*)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	27	5	32
Outros alimentos	22	11	33
Total	49	16	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 0,1497: hipótese nula aceita.

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência do gene *pc-plc* entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimentos.

Tabela de contingência 2 x2 (gene *sph*)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	22	10	32
Outros alimentos	20	13	33
Total	42	23	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 0,6059: hipótese nula aceita

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência do gene *sph* entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimentos.

Tabela de contingência 2 x2 (perfil toxigênico I)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	16	16	32
Outros alimentos	16	17	33
Total	32	33	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 1: hipótese nula aceita

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência do perfil toxigênico I entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimento.

Tabela de contingência 2 x2 (perfil de virulência II)

Grupo	Reação (+)	Reação (-)	Total
Alimentos (surto)	11	21	32
Outros alimentos	9	24	33
Total	20	45	65

Teste de Fisher: examinar a significância da associação (contingência) entre os dois grupos de linhagens

Hipótese nula: os grupos testados são iguais

Hipótese alternativa: os grupos testados são diferentes

Critério de aceitação: P é maior que 5%

Resultado: O valor P de duas colunas é igual a 0,5977: hipótese nula aceita

Conclusão: a associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada não estatisticamente significativa. Portanto, não há diferença entre a prevalência do perfil de virulência II entre o grupo de linhagens de *B. cereus* s.s. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA e de linhagens isoladas de outros alimentos.