

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Bacillus cereus: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA NA
CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E INFLUÊNCIA DA
PASTEURIZAÇÃO NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A TOXINAS DIARREICAS**

Gabriel Augusto Marques Rossi

Médico Veterinário

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Bacillus cereus: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA NA
CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E INFLUÊNCIA DA
PASTEURIZAÇÃO NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A TOXINAS DIARREICAS**

Gabriel Augusto Marques Rossi

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

Coorientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Coorientadora: Profa. Dra. Vera Letticie de Azevedo Ruiz

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2017

R832b Rossi, Gabriel Augusto Marques
Bacillus cereus : caracterização genômica na cadeia produtiva de leite e influência da pasteurização na expressão de genes relacionados a toxinas diarreicas / Gabriel Augusto Marques Rossi. – Jaboticabal, 2017
iv, 74 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Ana Maria Centola Vidal
Banca examinadora: Rachel Zoccal Saba, Marco Antonio de Andrade Belo, Naiá Carla Marchi de Rezende Lago, Andrezza Maria Fernandes

Bibliografia

1. Doenças veiculadas por alimentos. 2. Genômica populacional. 3. Microbiologia 4. Sequenciamento de futura geração. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.31:637.12

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Bacillus cereus*: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA NA CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E INFLUÊNCIA DA PASTEURIZAÇÃO NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TOXINAS DIARREICAS

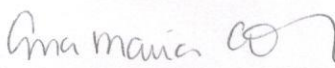
AUTOR: GABRIEL AUGUSTO MARQUES ROSSI

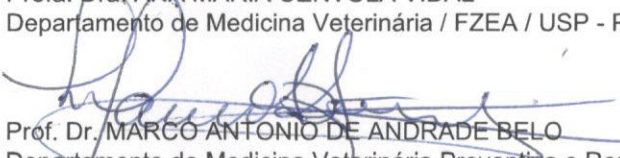
ORIENTADORA: ANA MARIA CENTOLA VIDAL

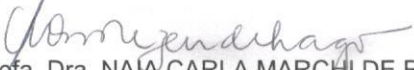
COORIENTADORA: VERA LETTICIE DE AZEVEDO RUIZ

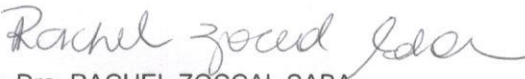
COORIENTADOR: HEIDGE FUKUMASU

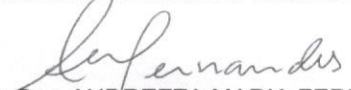
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


Prof.ª Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof.ª Dra. NAIA CARLA MARCHI DE REZENDE LAGO
Departamento de Medicina Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP


Prof.ª Dra. RACHEL ZOCCAL SABA
Departamento de Medicina Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof.ª Dra. ANDREZZA MARIA FERNANDES
Depto. de Medicina Veterinária / FZEA/USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL AUGUSTO MARQUES ROSSI – nascido em 23 de dezembro de 1987, no município de Bauru, obteve o título de Médico Veterinário pela Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal, em 2010. Durante sua graduação, foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPESP. Ingressou no curso de mestrado no ano de 2012 e a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) pela mesma instituição ocorreu em 2014. Durante os anos de 2015 a 2017, foi bolsista de doutorado pela FAPESP, e, ainda, obteve Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior junto ao The Milner Centre for Evolution (University of Bath – Inglaterra). Possui experiência nas áreas de segurança dos alimentos, higiene, microbiologia e inspeção sanitária de produtos de origem animal, e epidemiologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Valdir Rossi e Maria Cristina Marques Rossi por sempre me apoiarem em minhas decisões e durante todo o meu período de estudo. Sem vocês nada disso seria possível. Também aos meus irmãos André e Fernanda. Amo todos vocês.

À Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal, Prof. Dr. Heidge Fukumasu e Profa. Dra. Vera Letticie de Azevedo Ruiz, por compartilharem com muita paciência todos os seus conhecimentos sempre que foi necessário. Sem a orientação de vocês, esse trabalho seria impossível. Obrigado pela confiança em meu trabalho e pela coragem em terem participado dessa jornada tão desafiante.

Ao Prof. Dr. Samuel K. Sheppard, Ben Pascoe, Guillaume Méric e Evangelo Mourkas (The Sheppard Lab) pela indescritível oportunidade que tive em aprender novas técnicas e pela paciência durante todo o período em que pude realizar atividades junto ao grupo de pesquisa integrante do The Milner Centre for Evolution (University of Bath/UK).

Ao Henrique Meiroz de Souza Almeida (Tainá) pela companhia durante todos esses anos. Obrigado pela paciência para ouvir que “nada daria certo” tantas vezes e por me mostrar tantas vezes a melhor forma de lidar com problemas. Você faz e sempre fará parte dessa conquista.

A todos meus amigos que fazem parte da minha vida e a tornam mais leve – Carlo, Giulia, Gui, Marcela, Larissa Contador, Laryssa, Higor, Kadu, Joyce, Ana Paula, Ana Carolina, Mari, Pêra, Lu, Sil, Lena, Bento e Jamile. Também a todos os outros amigos que pude fazer durante os períodos em que residi em Bath, Jaboticabal e Pirassununga.

Às técnicas de laboratório Arina Rochetti e Andréia C. N. Vaz por toda dedicação e ajuda durante o período do experimento. Obrigado por sempre nos ajudarem com boa vontade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela aprovação de três processos (Processos 2014/13104-1, 2015/20874-0 e 2016/19214-9) que foram essenciais para a elaboração desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo período de bolsa concedido.

Também ao Serviço de Pós-Graduação da FCAV/UNESP/Jaboticabal por toda a ajuda fornecida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Genômica do grupo do <i>Bacillus cereus</i>	2
2.2. Produção de toxinas e segurança alimentar.....	5
2.3. Importância para o processamento de leite e produtos lácteos.....	12
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 – PESQUISA COMPARATIVA GENÔMICA DE <i>Bacillus cereus</i> ISOLADOS NA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS.....	27
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.1. Amostragem bacteriana e genomas.....	30
2.2. Isolamento bacteriano e testes bioquímicos.....	31
2.3. Extração do DNA e sequenciamento genômico.....	31
2.4. Montagem dos genomas e análises de bioinformática.....	32
2.5. Análises estatísticas.....	33
3. RESULTADOS.....	33
3.1. Estrutura populacional e epidemiologia de isolados do grupo do <i>Bacillus cereus</i> associados à cadeia produtiva do leite e produtos lácteos ...	33
3.2. Avaliação do potencial toxigênico pela genotipagem.....	35
3.3. Genes acessórios associados com os estágios da cadeia produtiva do leite e produtos lácteos.....	38
4. DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÃO.....	41
6. AGRADECIMENTOS.....	42
REFERÊNCIAS.....	42

CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO DE TOXINAS DIARREICAS DE <i>Bacillus cereus</i> s.s. DURANTE A “SHELF-LIFE” DE LEITE PASTEURIZADO PRODUZIDO COM MATÉRIA PRIMA EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADA.....	49
RESUMO.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
2.1. Tindalização do leite e avaliação de sua eficácia.....	53
2.2. Contaminação experimental do leite tindalizado.....	54
2.3. Pasteurização do leite.....	54
2.4. Isolamento em placas.....	55
2.5. Extração do RNA e qPCR.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4. CONCLUSÕES.....	63
5. AGRADECIMENTOS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
APÊNDICE A.....	70
APÊNDICE B.....	71

Bacillus cereus: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA NA CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E INFLUÊNCIA DA PASTEURIZAÇÃO NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TOXINAS DIARREICAS

RESUMO – As bactérias pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus* são importantes para indústrias processadoras de leite e produtos lácteos devido à capacidade de sobrevivência aos tratamentos térmicos utilizados durante os processamentos, e consequente deterioração dos produtos e risco à saúde pública. Assim, inicialmente, objetivou-se compreender a estrutura populacional de isolados pertencentes ao grupo do *B. cereus* na cadeia produtiva do leite e produtos lácteos. Por meio da utilização de amostragem estruturada e técnicas genômicas comparativas, investigou-se quais linhagens específicas e genes estão significativamente associados a estágios de produção específicos e produtos. Os genomas de 69 isolados obtidos de equipamentos, leite cru e produtos lácteos foram comparados com outros 193 disponíveis de diversas origens. A estrutura populacional incluiu os conhecidos grupos filogenéticos II, III, IV, V e VI, e quase todos os isolados dos produtos lácteos pertenceram ao grupo III. A investigação de genes específicos revelou um grande número de isolados carreando aqueles relacionados à produção de toxinas, como o *cytK* (53,62%), *hblA* (59,42%), *hblC* (44,93%), *hblD* (53,62%), *nheA* (84,06%), *nheB* (89,86%), *nheC* (84,06%), *cesA* (2,90%) e *cesB* (2,90%). Os isolados pertencentes aos grupos IV e V possuíram uma prevalência significativamente maior dos genes *hblACD* e o grupo IV do gene *cytK*. Os isolados obtidos de produtos lácteos tiveram uma prevalência significativamente menor dos genes *cytK* e *hblACD* comparados aos de equipamentos e leite cru/tanques de refrigeração. A análise genômica populacional demonstrou a diversidade dos isolados e a variedade de funções dentro do grupo do *B. cereus* da cadeia produtiva leiteira, com grande número de isolados potencialmente capazes de causar doenças alimentares. Posteriormente, objetivou-se avaliar a viabilidade do processo de tindalização de leite cru refrigerado e determinar se o processo de pasteurização do leite influencia na expressão dos genes relacionados à produção das toxinas diarreicas pelo *B. cereus* s.s. em leite experimentalmente contaminado. Para isso, realizou-se um processo de tindalização de leite cru refrigerado e então foi realizada a contaminação com um isolado potencialmente toxigênico, e, posteriormente, o mesmo foi pasteurizado, envasado e mantido em refrigeração durante 10 dias. Em momentos determinados, foram coletadas amostras do produto afim de avaliar a expressão de genes codificadores de toxinas (*hblACD*, *nheABC* e *cytK*). O protocolo de tindalização utilizado permitiu redução logarítmica da população de bactérias do grupo do *B. cereus* e foi possível detectar a expressão do gene *hblA* em amostras de leite 5 e 10 dias após a pasteurização. Conclui-se que o modelo proposto foi adequado e que a expressão do gene *hblA* não foi inibida após a realização da pasteurização do leite, demonstrando o potencial risco aos consumidores decorrentes do consumo de leite pasteurizado contaminado.

Palavras-chave: doenças veiculadas por alimentos, genômica populacional, microbiologia, RT-PCR, sequenciamento de futura geração

Bacillus cereus: GENOMICAL CHARACTERIZATION ON DAIRY PRODUCTION CHAIN AND INFLUENCE OF PASTEURIZATION ON EXPRESSION OF GENES RELATED TO DIARRHEIC TOXINS

ABSTRACT – The bacteria belonging to *Bacillus cereus* group are important to dairy industries due their ability to survive to thermal treatments used during processing, and consequently cause food spoilage and risk to public health. Thus, firstly, this study aimed to better understand the population structure of *B. cereus* group isolates in dairy production chain. Using structured sampling of *B. cereus* in dairy production chain and comparative genomics techniques, we investigated if specific lineages and genes are significantly overrepresented in particular production stages. The genomes of 69 isolates obtained from equipments, raw milk and dairy products were compared with others 193 available from several origins. The populational structure included the known phylogenetic groups II, III, IV, V and V, and almost all isolates from dairy products belonged to group III. The genes investigation showed a high number of isolates carrying genes related to toxins production, such as *cytK* (53.62%), *hblA* (59.42%), *hblC* (44.93%), *hblD* (53.62%), *nheA* (84.06%), *nheB* (89.86%), *nheC* (84.06%), *cesA* (2.90%) and *cesB* (2.90%). The isolates belonging to groups IV and V had a significant higher prevalence of genes *hblACD* an group VI of *cytK*. The isolates obtained from dairy products had a significant lower prevalence of genes *cytK* and *hblACD* compared to those from equipments and raw milk/bulk tanks. The populational genomic analyses showed the diversity of isolates and variability of functions in *B. cereus* group in dairy production chain, with a high number of isolates potentially able to cause foodborne disease. Posteriorly, this study aimed to evaluate the viability of tyndallizing raw milk and to establish if milk's pasteurization influences on the expression of genes related to the production of diarrheal toxins by *B. cereus* s.s. using a milk contaminated experimentally. For this purpose, the tyndallization of raw milk was performed and later it was contaminated with a potentially toxigenic isolate, and, posteriorly, it was pasteurized, packaged and kept under refrigeration during 10 days. In established periods, samples of this product were collected in order to evaluate the expression of genes related to toxins production (*hblACD*, *nheABC* and *cytK*). The protocol used for tyndallization allowed a logarithmic reduction of population of *B. cereus* group and the expression of *hblA* gene was detected in samples from milk after 5 and 10 days after pasteurization. It was concluded that the proposed model was appropriate and the expression of *hblA* gene was not inhibited after milk pasteurization, highlighting the potential risk for consumers through consumption of contaminated pasteurized milk.

Keywords: foodborne diseases, microbiology, next generation sequencing, populational genomic, RT-PCR

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O comércio internacional de alimentos sofre constantes modificações visando atender os consumidores e indústrias processadoras, os quais se preocupam com a qualidade e inocuidade alimentar, a fim de se comercializar produtos que satisfaçam as exigências dos consumidores e não os coloquem em risco pela ocorrência de toxiinfecções alimentares. Os surtos de origem alimentar são frequentemente relatados quando os alimentos são indevidamente obtidos, manipulados, processados ou conservados, podendo ser causados por diversos microrganismos.

Dentro desse contexto, um grupo de bactérias se destaca: o grupo do *Bacillus cereus*. Esse grupo de microrganismos amplamente distribuído no ambiente é composto por diferentes espécies geneticamente similares entre si, das quais ainda emergem divergências em relação a sua taxonomia. Compreende espécies desde aquelas utilizadas como controle biológico de pragas agrícolas, como o *Bacillus thuringiensis*, e bactérias de relevância para a saúde pública, como o *B. cereus sensu stricto* (s.s.) e *Bacillus anthracis*.

B. cereus sensu stricto (s.s.) é uma espécie sabidamente causadora de duas importantes síndromes gastroentéricas: a diarreica e emética, que podem ocorrer após a ingestão de diversos alimentos contaminados por essas bactérias ou suas toxinas. Destaca-se que tal bactéria é considerada uma das mais importantes para as indústrias de alimentos, visto que possui a capacidade de esporular e resistir a diversos tratamentos térmicos, inclusive aqueles que utilizam temperaturas mais elevadas, como a ultra alta temperatura (UAT).

Esta bactéria ainda possui grande importância para a cadeia produtiva do leite, visto que suas enzimas (proteases, lipases e fosfolipases) contribuem significativamente para a deterioração dos produtos e conseqüentemente para a redução da vida de prateleira. Também, os procedimentos de higiene utilizados rotineiramente nos laticínios (“clean in place” – CIP) são ineficazes na remoção total

dos biofilmes em superfícies de equipamentos, tornando-os pontos constantes de contaminação dos produtos durante o processamento.

Trabalhos recentes avaliaram como a presença de sal e utilização de temperatura influenciam na produção de toxinas por essas bactérias, as quais apresentam mecanismos regulatórios complexos que levam a transcrição do material genético e consequente produção de toxinas. Tais estudos evidenciam que a expressão de genes envolve mecanismos complexos e que mais estudos se fazem necessários para elucidação dos fatores intrínsecos e extrínsecos que contribuem para colocar em risco a saúde dos consumidores.

A presença desse grupo de bactérias é amplamente reportada em leite e produtos lácteos termicamente tratados devido à sobrevivência dos esporos. Uma vez que essas bactérias se encontrem presentes nesses alimentos, poderá se multiplicar até atingir contagens que coloquem em risco à saúde dos consumidores pela produção de suas toxinas quando as condições de temperatura e aerobiose forem favoráveis, o que muitas vezes pode ser observado nas condições de armazenamento e manipulação a nível domiciliar.

Diante do exposto, este trabalho é relevante para a cadeia produtiva leiteira, visto que traz subsídios para melhor compreensão desse grupo de microrganismos na cadeia produtiva, abrangendo desde a fazenda, as indústrias processadoras e os produtos lácteos disponíveis para a população, permitindo conhecer melhor a ecologia das espécies contaminantes incluídas no grupo do *B. cereus* e os mecanismos que podem contribuir para o risco à saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Genômica do grupo do *Bacillus cereus*

O grupo do *Bacillus cereus* atualmente é composto por oito espécies distintas: *B. cereus sensu stricto* (s.s.), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxicus* (GUINEBRETIÉRE et al., 2013) e *Bacillus toyonensis* (JIMÉNEZ et al.,

2013). Também se propõe a inclusão de mais quatro diferentes espécies neste grupo: *Bacillus wiedmannii* sp. nov (MILLER et al., 2016), *Bacillus bingmayongensis* sp. nov. (LIU et al., 2014), *Bacillus manliponensis* sp. nov. (JUNG et al., 2011) e *Bacillus gaemokensis* sp. nov. (JUNG et al., 2010).

As bactérias incluídas nesse grupo possuem estreita relação quanto aos seus componentes genômicos, entretanto, apresentam distintas características fenotípicas, o que ocorre principalmente devido à transferência horizontal de genes mediada por plasmídeos, os quais contêm genes relacionados com a produção de toxinas, e outros com funções ainda não esclarecidas, os quais permitem a sobrevivência nos mais distintos nichos e hospedeiros (PATIÑO-NAVARRETE; SANCHIS, 2017).

As bactérias pertencentes a esse grupo são bastonetes, Gram positivas, anaeróbias facultativas, formadoras de esporos, o que permite sua sobrevivência em alimentos termicamente tratados, e se encontram amplamente distribuídas no ambiente (FDA, 2012). Entre todas as bactérias incluídas nesse grupo, destaca-se o *B. cereus sensu stricto* (s.s.) como um dos agentes causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e que potencialmente coloca em risco a saúde pública. A presença dessa bactéria em diferentes nichos, como solo, alimentos e trato gastrointestinal de mamíferos, está provavelmente relacionada com a capacidade de utilização de carboidratos para a multiplicação (WARDA et al., 2016).

Tal bactéria é capaz de causar duas síndromes distintas: emética, devido à ação de uma toxina termoestável pré-formada nos alimentos, e diarreica, devido à ingestão de esporos ou células viáveis em grandes quantidades nos alimentos ($>10^6$), com consequente produção das toxinas diarreicas termolábeis (FDA, 2012; WANG et al., 2014). Foi estimado que o custo anual decorrente de doenças alimentares causadas por *B. cereus* e *Staphylococcus aureus* seja de 523 milhões de dólares somente nos Estados Unidos (BENNER et al., 2013).

Dentro desse mesmo grupo, destaca-se o *B. anthracis*, importante bactéria capaz de causar o antraz, uma zoonose com distribuição mundial e que pode resultar em lesões cutâneas, respiratórias ou digestivas, podendo ser fatal e levar os

infectados a óbito (SPENCER, 2003). Algumas cepas de *B. cereus sensu stricto* (s.s.) carreadoras de plasmídeos similares aos de *B. anthracis* são consideradas capazes de causar uma doença semelhante ao antraz, podendo resultar em lesões respiratórias (HOFFMASTER et al., 2004) ou cutâneas (MARSTON et al., 2016). Essa patogenicidade pode ser transferida entre diferentes cepas, sendo mediada pelos plasmídeos pBCXO1 e pBC210, que contém os genes de toxicidade e o locus da cápsula, sendo regulados pelos reguladores da transcrição AtxA, que possui dois ortólogos AtxA1 e AtxA2, sendo ambos necessários para virulência do microrganismo (SCARFF et al., 2016).

Ainda, algumas cepas de *B. cereus sensu stricto* (s.s.) têm sido descritas como microrganismos emergentes capazes de causar bacteremia persistente, tal fato foi observado em pessoas que faziam uso de drogas injetáveis (SCHAEFER et al., 2016) ou em hospitais com utensílios contaminados com esporos (SASAHARA et al., 2011). Também, manifestações neurológicas (abscessos cerebrais e meningoencefalites) podem estar presentes no caso de utilização de cateter contaminado (TUSGUL et al., 2016).

As bactérias incluídas no grupo do *B. cereus* podem ser classificadas em diferentes espécies através de aspectos fenotípicos e de características bioquímicas, como a determinação de motilidade, presença de cristais de toxinas, atividade hemolítica e crescimento rizóide (SCHLEIFER; WHITMAN, 2009; FDA, 2012). Entretanto, a diferenciação entre as espécies desse grupo é complexa, inclusive pela utilização de metodologias moleculares. Helgason et al. (2000) evidenciaram uma grande semelhança genética entre as espécies *B. cereus sensu stricto* (s.s.), *B. thuringiensis* e *B. anthracis*, e apontaram que as diferenças fenotípicas observadas podem ocorrer devido à transferência de fatores de virulência através de plasmídeos.

Ainda tenta-se descobrir métodos eficazes para distinguir essas espécies de bacilos através de suas diferenças genômicas (CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015), principalmente através da construção de árvores filogenéticas capazes de evidenciar a formação de agrupamentos das cepas de acordo com suas características

genômicas, potencial risco à saúde pública, entre outras características fenotípicas (LIU et al., 2015; WANG; ASH, 2015; KOVAC et al., 2016).

Kovac et al. (2016) propuseram a utilização de classificação filogenética baseada no sequenciamento completo do genoma das bactérias pertencentes ao grupo do *B. cereus* em substituição a classificação taxonômica para avaliar o risco da síndrome diarreica à saúde pública. Esses autores destacaram que a produção de uma das toxinas (hemolisina BL) relacionada com a ocorrência de síndrome diarreica não é realizada somente pelo *B. cereus sensu stricto* (s.s.) mas também por outras espécies do grupo. Ainda evidenciaram um maior potencial de produção da toxina em alguns agrupamentos composto por diferentes espécies do grupo nas árvores filogenéticas, demonstrando a necessidade de mais estudos genômicos para elucidar as reais interações entre as espécies do grupo e os riscos decorrentes da presença das mesmas em alimentos.

Ainda, Guinebretière et al. (2008; 2010) propuseram a classificação das bactérias do grupo do *B. cereus* em sete grupos filogenéticos distintos (I a VII), utilizando características como as temperaturas ideais para multiplicação, níveis de citotoxicidade e potencial para produção de toxinas, a fim de determinar o risco da ocorrência de toxi-infecções alimentares.

2.2 Produção de toxinas e a segurança alimentar

É reconhecido que o *B. cereus sensu stricto* (s.s.) é a espécie com maior importância dentro desse grupo em relação à segurança dos alimentos. Essa bactéria é uma importante causadora de toxi-infecções alimentares, e possui como temperatura ótima de multiplicação o intervalo entre 28 a 35°C, sendo o mínimo 4°C e o máximo de 48°C, o que permite sua sobrevivência em uma ampla diversidade de alimentos. O intervalo de geração do microrganismo se encontra entre 18 a 27 minutos, podendo multiplicar-se em valores de pH entre 4,9 a 9,3 (NTERMANS; BATT, 1998).

Destaca-se que essa bactéria é capaz de resistir a diversos tratamentos térmicos utilizados pelas indústrias de alimentos, devido à capacidade de formação de esporos, cuja capacidade de germinar e posterior multiplicação recebem influência do pH, composição do alimento e tratamentos inativadores (WARDA et al., 2015). O tratamento térmico pelo calor causa danos aos esporos, entretanto, os mesmos são capazes de germinar, realizar reparação dos danos e posteriormente multiplicar-se, sendo que tal processo é dependente do gene *cdnL*, o qual foi sugerido como um possível alvo de técnicas moleculares visando à segurança dos alimentos (WARDA et al., 2016).

Algumas cepas dessa espécie são capazes de causar duas síndromes gastrointestinais distintas: a síndrome diarreica causada por toxinas termolábeis, a qual está mais relacionada com o consumo de produtos lácteos, molhos, vegetais e produtos cárneos, e a síndrome emética, a qual se relaciona com o consumo de massas e produtos que contenham arroz, entre outros produtos como os lácteos, causada por uma toxina de menor peso molecular e termoestável (McKILLIP, 2000; EHLING-SCHULZ et al., 2004).

A síndrome diarreica caracteriza-se pela presença de diarreia aquosa, dores abdominais e náusea que se iniciam entre 6 a 15 horas após a ingestão do alimento e persistem por aproximadamente 24 horas. Já a síndrome emética caracteriza-se pela presença de vômito, sendo que a diarreia também pode estar presente, e inicia-se em aproximadamente 30 minutos até 6 horas após o consumo de toxinas pré-formadas. Comumente os alimentos relacionados à ocorrência de surtos possuem populações superiores a 10^6 microrganismos por grama dos produtos (FDA, 2012).

Uma mesma bactéria do grupo do *B. cereus sensu stricto* (s.s.) pode causar ambas as síndromes, possuindo perfil semelhante de enterotoxicidade quando possuem mesmo padrão genético observado utilizando técnicas moleculares (OH et al., 2012). Ainda, outras espécies pertencentes ao grupo, como o *B. weihenstephanensis*, são consideradas como potenciais produtoras de toxinas além do *B. cereus sensu stricto* (s.s.), ressaltando a complexidade das bactérias incluídas nesse grupo em relação ao real risco à saúde pública (KOVAC et al., 2016).

A produção de toxinas diarreicas termolábeis ocorre durante a multiplicação da bactéria no intestino delgado (GRANUM, 1994) e três enterotoxinas foram relacionadas com a ocorrência da síndrome diarreica: 1) Hemolisina BL (Hbl); 2) Enterotoxina não hemolítica (Nhe) e 3) Citotoxina (CytK) (EHLING-SCHULZ et al., 2004). A transcrição dos genes de produção das toxinas Hbl e Nhe está relacionada com o regulador *PlcR*, que afeta positivamente a síntese dessas toxinas (LINDBACK et al., 2004; GOHAR et al., 2008).

Tsilia et al. (2016) demonstraram a capacidade do muco intestinal (mucina) em reter células dessas bactérias, além de possivelmente proteger as enterotoxinas da degradação intestinal. Também, a proteína flagelar FlhF é essencial para a virulência dessa bactéria, provavelmente por influenciar na produção e secreção de proteínas (MAZZANTINI et al., 2016).

A Hemolisina BL (Hbl) é composta por duas subunidades L (L1 e L2) e uma subunidade B, que juntas possuem função hemolítica, citotóxica, dermonecrótica e aumentam a permeabilidade vascular. Todos esses componentes já possuem seus genes clonados e sequenciados, os quais são dispostos em um operon: 1) *hblA* que produz a subunidade B com peso de 37,8 kDA; 2) *hblC* responsável pela subunidade L2 e peso de 43,5 kDA; e 3) *hblD* da fração L1 com peso de 38,5 kDA. Somente a fração L1 aparenta ser indispensável para a observação de citotoxicidade, porém estudos demonstram que a fração B aparenta sensibilizar as células intestinais para depois a fração L realizar a citólise (MCKILLIP, 2000).

A toxina não hemolítica (Nhe), considerada por Moravek et al. (2006) como a mais importante relacionada com a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA), também é composta por 3 frações, codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, dispostos em um único operon, com produtos de 41, 39,8 e 36,5 kDA, respectivamente (GRANUM et al., 1999).

Todos esses componentes são necessários para que ocorra atividade biológica da toxina, conforme demonstrado por Didier et al. (2016). Os autores demonstraram que a formação de poros é um processo formado por cinco etapas: 1) *nheB* e *nheC* se dispõem como uma única molécula na solução enquanto *nheA* se

apresenta sozinha; 2) complexos de *nheB* e *nheC* se aderem a membrana celular formando microporos; 3) *nheA* se liga ao componente *nheB*; 4) *nheA* sofre uma alteração conformacional levando a uma perfuração irreversível da membrana; e 5) lise celular.

A citotoxina K (34 kDA) é a que demonstra maior atividade citotóxica possuindo atividade necrótica e hemolítica, sendo considerada um fator primário de virulência (ARSLAN et al., 2014). Essa se apresenta em duas formas, *CytK₁* e *CytK₂*, que são codificadas pelo *cytK1* (426 pb) e *cytK2* (585 pb), respectivamente (FAGERLUND et al., 2004).

Entretanto, Castiaux et al. (2015) avaliaram a ocorrência desses genes em isolados obtidos do ambiente e de casos clínicos, e afirmaram que a presença deles por si só aparentemente não apresenta uma relação com a síndrome diarreica, não podendo ser considerados como fator primário de virulência, e ainda sugeriram que novos estudos devem avaliar o sinergismo entre a *CytK* com outros fatores de virulência, além do potencial de expressão desse genes em diferentes condições.

As cepas que não possuem os genes do complexo *nhe* são consideradas extremamente raras e isso ocorre provavelmente devido a deleção ou transferência lateral do operon *nhe*. Entretanto, a transferência de fatores de patogenicidade como *hbl*, *cytK* e *plcR* são importantes mecanismos em relação a evolução dos mecanismos de patogenicidade do *B. cereus sensu stricto* (s.s.) (BOHM et al., 2015).

Em um trabalho desenvolvido por Jeßberger et al. (2015), os autores avaliaram a sequência dos genes produtores de toxinas, transcrição, secreção de toxinas e citotoxicidade de isolados de *B. cereus sensu stricto* (s.s.) obtidos de diferentes origens e com diferentes potenciais toxigênicos. Os autores observaram que transcrição dos genes *nheB* e *hblD* e a titulação das proteínas *Nhe* e *HbL* revelaram diferenças em relação às cepas e incongruência em relação a transcrição dos genes e a quantidade de proteína detectada. Concluíram, então, que a produção de toxinas foi mais complexa que o esperado, possivelmente envolvendo diversos fatores tais quais proteínas reguladoras da transcrição, mecanismos pós-transcrição

e pós-translação (que afetam a estabilidade do RNAm, durabilidade da proteína ou resistência à proteases), além da influência de fatores ambientais.

A importância de fatores ambientais, como aqueles observados no intestino, vem sendo estudada recentemente. Jeßberger et al. (2017) simularam as condições intestinais através da utilização de meio de cultura celular pré-incubado com células CaCo-2 e verificaram que os genes relacionados com a produção de toxinas diarreicas foram ativados e a secreção de proteínas totais pelas cepas foi acelerada, demonstrando que o sinal estimulante para a produção de toxinas é originário das células CaCo-2.

Já a ocorrência da síndrome emética está relacionada com a ação de uma toxina (peptídeo cíclico não ribossomal) pré-formada durante a esporulação dessa bactéria nos alimentos, conhecida por cereulide, que possui peso molecular de 1,2 kDA (MCKILLIP, 2000), codificada pelo gene *ces*, sendo termoestável e resistente a baixos valores de pH. Tal gene é codificado em um megaplasmídeo similar ao pXO1 do *B. anthracis* (LUCKING et al., 2015). A capacidade de cepas de *B. weihenstephanensis* produzirem cereulide também já foi comprovada (THORSEN et al., 2006).

A detecção da maior concentração dessa toxina ocorre durante o início da fase estacionária da curva de crescimento bacteriana e parece estar relacionada com uma única linhagem da bactéria (EHLING-SCHULZ et al., 2005). Atualmente, considera-se que tal bactéria é capaz de produzir pelo menos outras 18 estruturas homólogas à cereulide, dentre as quais sete são denominadas Isocereulides (A-G) e possuem atividade citotóxica, sendo que Isocereulide A e C apresentam as maiores e menores atividades citotóxicas, respectivamente. A quantidade produzida de cada tipo de Isocereulide pode estar relacionada com a gravidade dos quadros clínicos apresentados pelos pacientes (MARXEN et al., 2015).

Posteriormente, Kranzler et al. (2016) evidenciaram que a produção da toxina cereulide é altamente dependente de temperatura, que influencia nos processos de pós-transcrição do RNA e altera a composição das isoformas formadas. Os autores destacaram ainda que o risco da síndrome emética não pode ser previsto apenas

pelas populações de microrganismos ou parâmetros de multiplicação, visto que a produção de toxinas foi interrompida em temperaturas que permitiam a maior multiplicação da bactéria, e que a detecção da Isocereulide A (a que apresenta maior toxicidade) foi maior em baixas temperaturas.

Concordando com esse trabalho, Dommel et al. (2011) já haviam demonstrado que a produção de cereulide era inibida enquanto as bactérias continuavam a se multiplicar utilizando diferentes concentrações de NaCl. Estes autores concluíram também que a produção de cereulide é complexa e sofre interações de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, e também que o risco da síndrome emética não pode ser previsto apenas pela quantificação de células viáveis nos alimentos.

Apesar dos mecanismos de produção das toxinas não estarem completamente esclarecidos, seus efeitos são conhecidos há muito tempo, visto a ampla quantidade de trabalhos disponíveis na literatura que relatam surtos alimentares causados por esse grupo de bactérias. *B. cereus* foi considerado como responsável por 19% dos surtos reportados nos Estados Unidos durante os anos de 1998 a 2008 (BENNET et al., 2013), entretanto, esse número pode estar subestimado devido as dificuldades em relação às investigações de surtos (NEWELL et al., 2010).

Schimd et al. (2016) investigaram 3 surtos alimentares ocorridos na Áustria durante 2013, que acometeram 14 hóspedes de um hotel, 14 trabalhadores de uma empresa e 106 pacientes em reabilitação. Os autores utilizando métodos epidemiológicos concluíram que os alimentos que estavam relacionados com o aumento de risco de ficar doente foram purê de batata, sopa, salada de fruta, ragout de carne de cervídeos e pêras/crawberries. Ainda encontraram uma relação filogenética entre o isolado obtido de um paciente com os mesmos observados em uma manteiga de morango e creme de espinafre através da utilização de métodos moleculares, demonstrando a importância da utilização de diversas metodologias na investigação dos surtos.

Os mesmos autores ainda concluíram que a deficiência na implantação do programa de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), como o

contato com superfícies mal higienizadas ou desinfetadas, e condições de armazenamento inapropriadas permitiram a contaminação e multiplicação nos alimentos, destacando que a adoção de medidas de higiene e o controle das temperaturas durante a preparação e armazenamento dos alimentos são essenciais para a prevenção dos surtos causados por esse grupo de bactérias.

Zhou et al. (2014) reportam um outro surto ocorrido na China após o consumo de feijões pretos fermentados (*Douchi*). O surto envolveu 139 pessoas que apresentaram náusea, vômito e diarreia. Os autores mencionam que a contaminação do alimento foi por pelo menos três cepas distintas, das quais duas possuíam potencial para a produção da toxina cereulide, e a outra para a produção de toxinas diarreicas. Ainda, evidenciaram a capacidade de uma das cepas produzirem cereulide em temperaturas superiores a 37°C, o que destaca que a produção de toxinas pode também ter ocorrido no intestino dos pacientes além de estarem pré-formadas nos alimentos.

Apesar do quadro clínico causado por essa bactéria comumente ser brando, com manifestações gastrointestinais por curto período, em certas situações também pode ser fatal. Dierick et al. (2005) reportaram um caso fatal de intoxicação devido à presença de cereulide em uma salada com massa que acabou acarretando no óbito do paciente devido a falência hepática. O alimento incriminado foi conservado a 14°C em geladeira durante três dias, entretanto sabe-se que algumas cepas desse microrganismo são psicrotróficas e possuem máxima produção de cereulide entre 12 a 15°C (DIERICK et al., 2005).

Em um estudo desenvolvido no Brasil, Santos et al. (2011) concluíram que não há um perfil genético específico como a presença de um gene ou alelo em diferentes isolados obtidos de surtos alimentares, e pelo contrário, encontraram diferentes combinações genéticas codificando os fatores de virulência. Isso demonstra que são necessários estudos para melhor caracterizar a ocorrência de cepas toxigênicas e o real risco em que a população é exposta em adquirir uma toxinfecção causada por esse grupo de bactérias.

Para o controle dos surtos devido à presença dessa bactéria em alimentos podem ser adotadas algumas estratégias. Recomenda-se o preparo de alimentos em pequenas porções para evitar o longo período de armazenamento, a manutenção dos alimentos em temperaturas superiores a 55°C e a realização do resfriamento rápido dos alimentos a temperaturas inferiores a 10°C (EHLING-SCHULZ et al., 2004). Também, a utilização de programas de autocontrole como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) colaboram para reduzir os riscos decorrentes da presença desta bactéria ou suas toxinas em alimentos (KUMARI; SARKAR, 2016).

Durante a produção industrial de alimentos, algumas alternativas vêm sendo apontadas, como, por exemplo, a utilização de três diferentes autolisinas bactericidas para inibir a germinação de esporos e multiplicação de cepas com potencial emético (GENG et al., 2017), ou então a utilização de anaerobiose, pH <5,7 a 10°C ou anaerobiose e temperaturas inferiores a 8°C para prevenção da multiplicação de cepas psicrotróficas de *B. cereus sensu stricto* (s.s.) em alimentos (GUÉRIN et al., 2016).

Também, a utilização de baixos valores de pH e o monitoramento do dano causado às células através da citometria de fluxo (ANTONILOS et al., 2014), além da adição de extrato cítrico (Citrox[®]) (Tsiraki e Savvaïdis, 2016) demonstram ser alternativas úteis para tratamento e monitoramento de risco à segurança alimentar. A utilização de peptídeos naturais (AMP-js9 ou análogos) produzidos pelo *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 no controle do *B. cereus sensu stricto* (s.s.) também são recomendados na utilização em indústrias de alimentos (HAN et al., 2017). Ainda, a utilização de iluminação de LED a 460nm apresenta resultados promissores como ferramenta de controle dessa bactéria em indústrias de alimentos (KUMAR et al., 2017).

2.3 Importância para o processamento de leite e produtos lácteos

A presença de bactérias do grupo do *B. cereus* em leite cru ou derivados lácteos termicamente tratados é comumente descrita (KUMARI; SARKAR, 2016;

VIDAL et al., 2016). O risco de intoxicações pela sua presença em derivados lácteos é maior quando os mesmos são obtidos em mercados informais (YOBOUET et al., 2014), que comercializam produtos muitas vezes manipulados e/ou processados sob condições higiênicas insatisfatórias, ou não processados adequadamente conforme os padrões técnicos de identidade e qualidade e as legislações vigentes para cada tipo de produto.

A produção de toxina emética aparenta ser maior em cepas com características mesofílicas enquanto a de toxina diarreica ocorre com maior intensidade em cepas psicrotróficas (EHLING-SCHULZ et al., 2004), as quais estão mais relacionadas com o fluxograma de processamento de derivados lácteos, demonstrando o maior risco da ocorrência dessa segunda síndrome devido ao consumo de lácteos (MCKILLIP, 2000). Uma das diferenças que justifica a existência de cepas psicrotróficas e mesófilas de bactérias desse grupo é a quantidade e proporção de ácidos graxos que influenciam na permeabilidade da membrana e na tolerância observada a diferentes temperaturas (DIOMANDÉ et al., 2015).

A presença de cepas psicrotróficas no leite possui grande relevância no atual cenário da produção de leite no Brasil. De acordo com a legislação vigente, o leite cru deve ser mantido sob refrigeração a 4°C por até 48 horas após sua obtenção (BRASIL, 2011), e é sabido que muitas vezes ocorre refrigeração marginal, favorecendo a sobrevivência e multiplicação de microrganismos psicrotróficos, incluindo aqueles com potencial toxigênico como o *B. cereus* s.s. (EHLING-SCHULZ et al., 2004). Esses microrganismos podem contaminar o leite durante a ordenha e armazenamento em tanques de refrigeração e sobreviverem mesmo após a utilização de tratamentos térmicos, pelo fato de produzirem esporos (KUMARI; SARKAR, 2016).

B. cereus sensu stricto (s.s.) possui importância para a cadeia produtiva de leite não somente pelo risco à saúde pública devido aos quadros de toxiinfecções decorrentes da sua presença nos produtos, mas também por acarretar em deterioração dos mesmos e redução da vida de prateleira devido à ação de proteases, lipases, lecitinases e fosfolipases produzidas ou sintetizadas por eles (JONGHE et al., 2010; KUMARI; SARKAR, 2016). Estima-se que os laticínios sofram

perdas de até 30% devido a deterioração e perda de qualidade devido às bactérias psicotróficas, entre as quais se inclui algumas cepas de *B. cereus sensu stricto* (s.s.) (SAMARZIJA et al., 2012 *apud* MAJED et al., 2016).

A ação de suas enzimas pode levar à hidrólise da caseína com consequente coagulação da mesma, hidrólise dos triglicerídeos resultando numa maior concentração de ácidos graxos livres e degradação da gordura. Como consequência de sua ação, podem ser observados diversos defeitos tecnológicos nos produtos, tais como rancidez, sabores indesejados como o amargo, alterações no período de coagulação da caseína e redução do rendimento industrial (KUMARI; SARKAR, 2016). Recentemente, também foi demonstrada a capacidade de cepas de *B. mycoides* e de *B. weihenstephanensis* causarem uma coloração rósea em ricota (SATTIN et al., 2016). Em um trabalho realizado por Montanhini et al. (2013), os autores observaram que todos os isolados de *B. cereus sensu stricto* (s.s.) obtidos de leite pasteurizado, UAT e em pó carregavam o gene *npr*, que codifica a metalopeptidase, cuja atividade proteolítica é maior em temperatura ambiente.

A presença dessa bactéria já foi verificada em lácteos, como leite *in natura*, pasteurizado (BARTOSZEWICZ et al., 2008), leite tratado por ultra alta temperatura (UAT) (VIDAL et al., 2016), leite em pó (REZENDE-LAGO et al., 2007), leite fermentados (WONG et al., 1988), soro de leite (PIRTTIJARVI et al., 1998) e queijos (FADDA et al., 2012). A presença de cepas psicotróficas também é relatada em sorvetes, sendo que os isolados observados possuíam potencial toxigênico e deteriorante (ARSLAN et al., 2014).

Sua presença em derivados lácteos ocorre principalmente devido à contaminação da matéria prima e resistência dos esporos ao processamento térmico, inclusive até ao duplo tratamento térmico utilizado no fluxograma de produção do leite UAT (VIDAL et al., 2016). A presença desse grupo de bactérias é relatada em leite pasteurizado (REZENDE-LAGO et al., 2007), demonstrando a capacidade desses microrganismos em sobreviverem à pasteurização do leite, a qual é comumente realizada por processos rápidos utilizando temperatura dentro do intervalo de 72 a 75°C por 15 a 20 segundos (BRASIL, 2011). Também, a produção de toxinas diarreicas por cepas obtidas de leite termicamente tratado foi

demonstrada por Vidal-Martins et al. (2006) e Rezende-Lago et al. (2007), demonstrando o potencial risco à saúde dos consumidores. Isso ressalta a importância dessa pesquisa, que fornece subsídios para melhor compreender a ecologia e diversidade dos microrganismos contaminantes na cadeia produtiva do leite e também os mecanismos genéticos envolvidos com sua sobrevivência da fazenda ao produto final.

Sabe-se que a presença desta bactéria no leite recebido pelos laticínios é mais frequente na época chuvosa, possivelmente por uma maior contaminação ambiental e menor higiene dos animais ordenhados (SVENSSON et al., 2004). Portanto, medidas de higiene durante a obtenção da matéria prima (leite cru refrigerado) também se fazem necessárias para reduzir as perdas para os laticínios, visto que sua presença é muito frequente no leite de tanques de resfriamento das fazendas leiteiras, e, após a contaminação, o processamento utilizado pelas indústrias não resultará em sua inviabilização, permitindo sua sobrevivência até o produto final. O grupo do *B. cereus* foi considerado o mais prevalente e importante microrganismo causador de DTA em leite cru e ambientes de fazenda de leite na Austrália (MCAULEY et al., 2008).

Em fazendas leiteiras, Vissers et al. (2007) destacaram como possíveis fontes de contaminação do leite os tetos das vacas a serem ordenhadas contendo sujidades do solo e o alimento fornecido aos animais. Já Magnusson et al. (2007) consideraram a cama utilizada para os animais e a água utilizada para lavagem dos equipamentos também como pontos chave para contaminação. Portanto, boas práticas de higiene durante a obtenção e manutenção do leite cru refrigerado são essenciais para minimizar os impactos decorrentes desta bactéria.

Ainda, além da importância da obtenção higiênica do leite, destaca-se a necessidade de monitoramento e correta higienização de equipamentos das indústrias, visto que tal bactéria possui capacidade de formação de biofilmes nas tubulações de aço inoxidável, sendo compostos por exopolissacarídeos, proteínas e DNA. Isso faz com que os biofilmes sejam pontos de contaminação do leite durante seu processamento, acarretando tanto em problemas tecnológicos já apresentados como também em risco à saúde pública (KUMARI; SARKAR, 2016).

Em relação aos biofilmes formados por esse grupo de bactérias, ainda existem muitas controvérsias e dúvidas quanto aos mecanismos que regulam sua formação. Os determinantes genéticos para a construção da porção de polissacarídeos e seus mecanismos regulatórios ainda não são compreendidos. O mecanismo que permite a grande quantidade de DNA extracelular nos biofilmes e a importância dos plasmídeos para formação dos mesmos também ainda permanecem não elucidados (MAJED et al., 2016).

Hayrapetyan et al. (2015) demonstraram a maior formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável comparativamente a materiais de poliestireno e justificaram o fato possivelmente devido a quantidade de ferro livre disponível, visto que isso afeta a formação de biofilmes por essa bactéria. Esporos obtidos de biofilmes secos apresentaram menor resistência ao calor comparativamente aos biofilmes úmidos, demonstrando que fatores ambientais afetam os processos de esporulação e a capacidade de sobrevivência dos mesmos (HAYRAPETYAN et al., 2016).

Os procedimentos operacionais padronizados de higienização adotados dentro das indústrias devem ser eficientes para remoção dos biofilmes desse microrganismo, o que muitas vezes é difícil, visto que apresentam resistência à lavagem com água quente tanto alcalina ($\text{pH} > 13$) e ácida ($\text{pH} < 1$) (SHAHEEN et al., 2010). Alguns trabalhos foram realizados avaliando a eficácia do sistema de “Clean in Place” (CIP) utilizado pelos laticínios. O sistema padrão utilizado (rinçar água, lavagem com solução de hidróxido de sódio a 1% a 65°C por 10 minutos, seguido por solução de ácido nítrico 1% por 10 minutos, e nova rinçagem de água) foi ineficiente no controle de biofilmes (BREMER et al., 2006). Outro sistema de CIP similar ao já apresentado, porém com uma etapa posterior, de exposição a sanitizantes clorados, também se mostrou ineficaz na remoção total (DUFOUR et al., 2004). Portanto, pode-se verificar que os biofilmes dessa bactéria são um importante problema para as indústrias de alimentas e a busca de novas soluções devem ser incentivadas para redução dos riscos (MAJED et al., 2016).

Entretanto, outras metodologias vêm sendo estudadas e contribuindo para a busca de alternativas. Em uma delas, Pechook et al. (2015) apresentaram uma nova

abordagem para prevenção da adesão de biofilmes através da utilização de materiais super hidrofóbicos como parafina e cristais de cera, os quais formam “bolsas” de ar e reduzem o contato entre a bactéria com a superfície, interrompendo a adesão bacteriana, considerado o estágio inicial da formação de biofilmes. Também, Evelyn e Silva (2015) apresentaram a possibilidade da utilização de tratamento térmico combinado com tratamento de alta pressão para inativação de esporos de cepas psicrotróficas de *B. cereus sensu stricto* (s.s.). Ainda, a utilização de dióxido de cloro gasoso em superfícies de aço inoxidável apresenta resultados promissores (NAM et al., 2014).

Diante do exposto, justifica-se a realização desse estudo a fim de fornecer subsídios em relação à ecologia e ao potencial risco à saúde pública das espécies do grupo do *B. cereus* na cadeia produtiva do leite e produtos lácteos, e também quanto aos mecanismos envolvidos na produção de toxinas diarreicas após a pasteurização do leite.

Assim, o presente estudo objetivou especificamente:

- Realizar a caracterização genômica populacional de isolados do grupo do *B. cereus* obtidos da cadeia produtiva de leite e derivados e avaliar o potencial toxigênico dos isolados através da detecção dos genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK*, *cesA* e *cesB*.
- Avaliar a viabilidade do processo de tindalização de leite cru refrigerado, afim de contaminá-lo experimentalmente.
- Verificar se o processo de pasteurização do leite influencia na expressão dos genes relacionados à produção das toxinas diarreicas pelo *B. cereus* s.s. em leite experimentalmente contaminado.

REFERÊNCIAS

ANTONILOS, V.; ESTEBAN, M. D.; ROS-CHUMILLAS, M.; HUERTAS, J. P.; PERIAGO, P. M.; PALOP, P.; FERNÁNDEZ, P.S. Assessment of the of acid shock

effect on viability of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* using flow cytometry. **Food Research International**, v. 66, p. 306–312, 2014.

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

BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B. M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 588-596, 2008.

BENNET, S. D.; WALSH, K. A.; GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* — United States, 1998–2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n.3, p. 425-433, 2013.

BOHM, M. E.; HUPTAS, C.; KREY, V. M.; SCHERER, S. Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, p. 246, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62. Diário Oficial da União, 29 de Dezembro de 2011.

BREMER, P. J., FILLERY, S., MCQUILLAN, A. J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006.

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

DIDIER, A.; DIETRICH, R.; MAËRTLBAUER, E. Antibody binding studies reveal conformational flexibility of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) A-component. **PLoS ONE**, v. 11, n.10, e0165135, 2016.

DIOMANDÉ, S. E.; GUINEBRETIÉRE, M. H.; SARRAU, B.; NGUYEN-THE, C.; BROUSSOLLE, V.; BRILLARD, J. Fatty acid profiles and desaturase-encoding genes are different in thermo- and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* Group. **BMC Research Notes**, v.8, 239, 2015.

DOMMEL, M. K.; LUCKING, G.; SCHERER, G.; EHLING-SCHULZ, M. Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. **Food Microbiology**, v. 28, p. 284-290, 2011.

DUFOUR, M., SIMMONDS, R. S., BREMER, P. J. Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of “natural” antimicrobials against dairy biofilms. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 7, p. 1438-1443, 2004.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 479-487, 2004.

EHLING-SCHULZ, M.; SVENSSON, B.; GUINEBRETIERE, M. H.; LINDBA, T.; ANDERSSON, M.; SCHULZ, A.; FRICKER, M.; CHRISTIANSSON, A.; GRANUM, P. E.; MARTLBAUER, E.; NGUYEN-THE, C.; SALKINOJA-SALONEN, M.; SCHERER, S. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. **Microbiology**, n.151, p.183-197, 2005.

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

FADDA, A.; DELOGU, A.; MURA E.; NOLI A. C.; PORQUEDDU G.; ROSSI, M. L.; TERROSU, G. Presenza di *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e Enterobacteriaceae in ricotta fresca e salata: controlli ufficiali in el periodo 2009 – 2012. **Italian Journal of Food Safety**, v. 1 n. 5, p. 43-45, 2012.

FAGERLUND, A., WEEN, O., LUND, T., HARDY, S. P., GRANUM, P.E. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. **Microbiology**, n. 150, p. 2689-2697.

FDA, Food and Drug Administration. **The Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**, Ed. 2, 2012. Disponível em:<<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornellnessContaminants/UCM297627.pdf>>, Acesso em 05 dezembro de 2016.

GENG, P.; HU, Y.; ZHOU, G.; YUAN, Z.; HU, X. Characterization of three autolysins with activity against cereulide-producing *Bacillus* isolates in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.241, p. 291–297, 2017.

GRANUM, P. E., *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 76, p. 61-66.

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

GUÉRIN, A.; DARGAIGNARATZ, C.; BROUSSOLLE, V.; CLAVEL, T.; NGUYEN-THE, C. Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*. **Food Microbiology**, v. 59, p. 119-123, 2016.

GUINEBRETIERE, M. H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v.10, p.851-865, 2008.

GUINEBRETIERE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., & DEBUYSER, M. L., 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies

according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. **Journal of Clinical Microbiology** v.48, p.3388-3391, 2010.

GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; SARRAU B.; BUYSER, M. L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; LARECLUS, D.; VOS, P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 63, p. 31–40, 2013.

GOHAR, M.; FAEGRI, K.; PERCHAT, S.; RAVNUM, S.; OKSTAD, O. A.; GOMINET, M.; KOLSTO, A. B.; LERECLUS, D. The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, e2793.,2008.

HAN, J.; GAO, P.; ZHAO, S.; BIE, X.; LU, Z.; ZHANG, C.; LV, F. iTRAQ-based proteomic analysis of LI-F type peptides produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 mode of action against *Bacillus cereus*. **Journal of Proteomics**, v. 150, n. 6, p. 130-140, 2017.

HAYRAPETYAN, H.; MULLER, L.; TEMPELAARS, M.; ABEE, T.; GROOT, M.N.; Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. **International Journal of Food Microbiology**, n. 200, p. 72–79, 2015.

HAYRAPETYAN, H.; ABEE, T.; GROOT, M. N. Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. **Food Control**, v. 60, p. 493-499, 2016.

HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KOLSTO, A.N. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.

HOFFMASTER, A. R., RAVEL, J., RASKO, D. A., CHAPMAN, G. D., CHUTE, M. D., MARSTON, C. K., SACCHI, C.T.; FITZGERALD, C.; MAYER, L. W.; MAIDEN, M. C. J.; PRIEST, F. G.; CER, R. Z.; GALLOWAY, D. R.; READ, T. D.; POPOVIC, T.; FRASER, C. M. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 22, p. 8449-8454, 2004.

JEßBERGER, N.; KREY, V. M.; RADEMACHER, C.; BÖHM, M. E.; MOHR, A. K.; EHLING-SCHULZ, M.; SCHERER, S.; MÄRTLBAUER, E. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.560, 2015.

JEßBERGER, N., REDEMACHER, C., KREY, K.M., DIETRICH, R., MOHR, A.K., BOHM, M.E., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M., MARTLBAUER, M., 2017.

Simulating intestinal growth conditions enhances toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.627, 2017.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KAMPFER, P.; KOLSTO, A. B.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J.F.; CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383-391, 2013.

JONGHE, V.; COOREVITS, A.; BLOCK, J.; COILLIE, E. V.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 318-325.

JUNG, M. Y.; PAEK, W. K.; PARK, I. S.; HAN, J.R.; SIN, Y., PAEK, J., RHEE, M. S.; KIM, H.; SONG, H. S.; CHANG, Y. H. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 867-871, 2010.

JUNG, M. Y.; KIM, J. S.; PAEK, W. K.; LIM, J.; LEE, H.; KIM, P. I.; MA, J. Y.; KIM, W.; CHANG, Y. H. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1027-1032, 2011.

KOVAC, J.; MILLER, R. A.; CARROLL, L. M.; KENT, D. J.; JIAN J.; BENO, S. M.; WIEDMANN, M. Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. **BMC Genomics**, v. 17, n.581, 2016.

KUMARI, S.; SARKAR, P. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p. 20-29, 2016.

KRANZLER, M.; STOLLEWERK, K.; ROUZEAU-SZYNALSKI, K.; BLAYO, L.; SULYOK, M.; EHLING-SCHULZ. Temperature exerts control of *Bacillus cereus* emetic toxin production on post-transcriptional levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1640, 2016.

KUMAR, A.; GHATE, V.; KIM, M. J.; ZHOU, W.; KHOO, G. H.; YUK, H. G. Inactivation and changes in metabolic profile of selected foodborne bacteria by 460 nm LED illumination. **Food Microbiology**, v. 63, p. 12-21, 2017.

LINDBÄCK, T.; FAGERLUND, A., RODLANDT, M. S.; GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. **Microbiology**, n. 150, p. 3959-3967, 2004.

LIU, B.; LIU, G. H.; HU, G. P.; CETIN, S.; LIN, N. Q.; TANG, J. Y.; TANG, W. Q.; LIN, Y. Z. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 3, p. 501-510, 2014.

LIU, Y.; LAI, Q.; GÖKER, M.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; WANG, M.; SUN, Y., WANG, L.; SHAO, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**, v. 5, n.14082, 2015.

LÜCKING, G., FRENZEL, E., RÜTSCHLE, A., MARXEN, S., STARK, T. D., HOFMANN, T., SCHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M. Ces locus embedded proteins control the non-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n.1001, 2015.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2745-2754, 2007.

MAJED, R.; FAILLE, C.; KALLASSAY, M. GOHAR, M. *Bacillus cereus* biofilms – same, only different. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, . 1054, 2016.

MARSTON, C. K.; IBRAHIM, H.; LEE, P.; CHURCHWELL, G.; GUMKE, M.; STANEK, D.; GEE, J. E.; BOYER, A. E.; GALLEGOS-CANDELA, M.; BARR, J. R.; LI, H.; BOULAY, D.; CRONIN, L.; QUINN, C. P.; HOFFMASTER, A. R. Anthrax toxin-expressing *Bacillus cereus* isolated from an anthrax-like eschar. **Plos ONE**, v. 11, n. 6, e0156987, 2016.

MARXEN, S.; STARK, T. D.; FRENZEL, E.; RUSTCHLE, A.; LUCKING, G.; PURSTINGER, G. POHL, E. E.; SCHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M.; HOFFMAN, T. Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 9, p. 2439-2453, 2015.

MAZZANTINI, D.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; GUYEYE, S. A.; LUPETTI, A.; SENESI, S.; GHELARDI, E. FlhF is required for swarming motility and full pathogenicity of *Bacillus cereus*. **Fronties in Microbiology**, v. 7, p. 1644.

MCKILLIP, J, L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 4, p. 393-399, 2000.

MCAULEY, C. M.; MCMILLAN, K.; MOORE, S. C.; FEGAN, N.; FOX, E. M. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7402-7412, 2014.

MILLER, R. A.; KENT, D. J.; WATTERSON, M. J.; BOOR, K. J.; MARTIN, N. H.; WIEDMANN, M. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8492-8504, 2015.

MILLER, R. A.; BENO, S. M.; KENT, D. J.; CARROLL, L. M; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; KOVAC, J. *Bacillus wiedmannii* sp. nov. is a new psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 4744-4753, 2016.

MONTANHINI, M. T. M.; COLOMBO, M.; NERO, L. A.; BERSOT, L. S. Short communication: Presence of metallopeptidase (npr) gene and proteolytic activity of

Bacillus cereus isolated from dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 9, p. 5641-5643.

MORAVEK, M.; DIETRICH, R.; BUERK, C.; BROUSSOLLE, V.; GUINEBRETIÈRE, M. H.; GRANUM, P. E.; NGUYEN-THE, C.; MÄRTLBAUER, E. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analysis. **FEMS Microbiology Letters**, n. 257, p. 293-298, 2006.

NAM, H.; SEO, H. S.; BANG, J.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 122-127, 2014.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J.V.D.; KRUSE, H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, suppl. 1, S13-s15, 2010.

NTERMAN, S.; BATT, A.C. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**, Symposium Supplement 1998, 84, 51S–61S.

OH, M. H.; HAM, J. S.; COX, J. M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 1-2, p. 1-8, 2012.

PATIÑO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and enviromental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in Microbiology**, v. 198, n.4, p.309-318, 2017.

PECHOOK, S., SUDAKOV, K., POLISHCHUK, I., OSTROV, I., ZAKIN, V., POKROY, B., SHEMESH, M. Bioinspired passive anti-biofouling surfaces preventing biofilm formation. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 7, p. 1371-1378, 2015.

PIRTTIJARVI, T. S. M.; AHONEN, L. M.; MAUNUKSELA, L. M.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. *Bacillus cereus* in a whey process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n.1-2, p. 31–41, 1998.

REIS, A. L. S.; MONTANHINI, M. T. M.; BITTENCOURT, J. V. M.; DESTRO, M. T.; BERSOT, L. S. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1195-1198, 2013.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; AMARAL, L. A. Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1563-1569, 2007.

RUUSUNEN, M., SALONEN, M., PULKKINEN, H., HUUSKONEN, M., HELLSTRÖM, S., REVEZ, J., HANNINEN, M. L.; AHOMAA, M. F.; LINDSTRÖM, M. Pathogenic

bacteria in Finnish bulk tank milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n. 2, p. 99-106, 2013.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v.62, p. 77-95, 2012.

SANTOS, C. A.; ALMEIDA, F. S.; GUIMARÃES, A. G.; ABRAHÃO, W. M.; ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, G. T. RE-PCR variability and toxigenic profile of food poisoning, foodborne, and soil-associated *Bacillus cereus* isolates from Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v, 151, n. 3, p.277-283, 2011.

SASAHARA, T.; HAYASHI, S.; MORISAWA, Y.; SAKIHAMA, T.; YOSHIMURA, A.; HIRAI, Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 2), p. 219-226, 2011.

SATTIN, E.; ANDREANI, N. A.; CARRARO, L.; FASOLATO, L.; BALZAN, S.; NOVELLI, E.; SQUARTINI, A.; TELATIN, A.; SIMIONATI, B.; CARDAZZO, B. Microbial dynamics during shelf-life of industrial Ricotta cheese and identification of a *Bacillus* strain as a cause of a pink discolouration. **Food Microbiology**, v. 57, p.8-15, 2016.

SCARFF, J. M.; RAYNOR, M. J.; SELDINA, Y. I.; VENTURA, C. L.; KOEHLER, T. M.; O'BRIEN, A. D. The roles of AtxA orthologs in virulence of anthrax-like *B. cereus* G9241. **Molecular Microbiology**, v. 102, n. 4, p.545-561, 2016.

SCHAEFER, G.; CAMPBELL, W.; JENKS, J.; BEESLEY, C.; KATSIVAS, T.; HOFFMASTER, A.; MEHTA, S. R.; REED, S. Persistent *Bacillus cereus* bacteremia in 3 persons who inject drugs, San Diego, California, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1621, 2016.

SCHMID, D.; RADEMACHER, C.; KANITZ, E. E.; FRENZEL, E.; SIMONS, E.; ALLERBERGER, F.; EHLING-SCHULZ, M. Elucidation of enterotoxigenic *Bacillus cereus* outbreaks in Austria by complementary epidemiological and microbiological investigations, 2013. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p. 80-86, 2016.

SCHLEIFER, K; WHITMAN, W. B. **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes**. 2nd ed. New York: Springer; 2009.

SHAHEEN, R.; SVENSSON, B.; ANDERSSON, M. A.; CHRISTIANSSON, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 347-355, 2010.

SPENCER, R. C. *Bacillus anthracis*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 3, p.182-187, 2003.

SVENSSON, B.; EKELUND, K.; OGURA, H.; CHRISTIANSSON, A. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants.

International Dairy Journal, v. 14, n. 1, p. 17-27, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00152-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00152-3)>.

THORSEN, L.; HANSEN, B.M.; NIELSEN, K. F.; HENDRIKSEN, N. B.; PHIPPS, R. K.; BUDDE, B. B. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5118-5121, 2006.

TSILIA, V.; KERCKHOF, F. M.; RAJKOVIC, A.; HEYNDRIKX, M.; WIELE, T. V. *Bacillus cereus* NVH 0500/00 can adhere to mucin but cannot produce enterotoxins during gastrointestinal simulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 289-296, 2016.

TSIRAKI, M. I.; SAVVAIDIS, I. N. The effects of citrus extract (Citrox[®]) on the naturally occurring microflora and inoculated pathogens, *Bacillus cereus* and *Salmonella enterica*, in a model food system and the traditional Greek yogurt-based salad Tzatziki. **Food Microbiology**, v. 53, p. 150-155, 2016.

TUSGUL, S.; PROD'HOM, G.; SENN, L.; MEULI, R.; BOCHUD, P. Y.; GIULIERI, B. S. G. *Bacillus cereus* bacteraemia: A comparison between haematological and non-haematological patients. **New Microbes and New Infections**, *in press*.

VIDAL, A. M. C.; ROSSI-JUNIOR, O. D.; ABREU, I. L.; BURGER, K. P.; VEDOVELLI, M.; GONÇALVES, A. C. S.; ROSSI, G. A. M.; ABREU, L. F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 286-292, 2016.

VISSERS, M. M. M.; TE GIFFEL, M. C.; DRIEHUIS, F.; DE JONG, P.; LANKVELD, J. M. G. Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 281-292, 2007.

WANG, A.; ASH, G. J. Whole genome phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). **Scientific Reports**, v. 5, n. 13644, 2015.

ZHOU, G.; BESTER, K.; LIAO, B.; YANG, Z.; JIANG, R.; HENDRIKSEN, N.B.. Characterization of three *Bacillus cereus* strains involved in a major outbreak of food poisoning after consumption of fermented black beans (douchi) in Yunan, China. **Foodborne Pathogens & Diseases**, v. 11, n. 10, p. 769-774, 2014.

WANG, J.; DING, T.; OH, D. H. Effect of temperatures on the growth, toxin production, and heat resistance of *Bacillus cereus* in cooked rice. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 2, 2014.

WARDA, A. K.; BESTEN, H. M. W.; SHA, N.; ABEE, T.; GROOT, M. N. N. Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 201, p. 27-34, 2015.

WARDA, A. K.; SIEZEN, R. J.; BOEKHORST, J.; WELLS-BENNIK, M. H. J.; JONG, A.; KUIPERS, O. P.; GROOT, M. N. N.; ABEE, T. Linking *Bacillus cereus* genotypes and carbohydrates utilization capacity. **Plos ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

WARDA, A. K.; TEMPELAARS, M. H.; BOEKHORST, J.; ABEE, T.; GROOT, M. N. N. Identification of CdnL, a putative transcriptional regulator involved in repair and outgrowth of heat-damaged *Bacillus cereus* spores. **Plos ONE**, v. 11, n. 2, e0148670, 2016.

WONG, H. C., CHANG, M. H., FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 699-702, 1988.

YOBOUET, B. A.; KOUAMÉ-SINA, S. M.; DADIÉ, A.; MAKITA, K.; GRACE, D.; DJÈ, K. M.; BONFOH, B. Contamination of raw milk with *Bacillus cereus* from farm to retail in Abidjan, Côte d'Ivoire and possible health implications. **Dairy Science & Technology**, v. 94, n. 1, p. 51-60, 2014.

CAPÍTULO 2 - PESQUISA COMPARATIVA GENÔMICA DE BACTÉRIAS DO GRUPO DO *Bacillus cereus* ISOLADOS NA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE E EM PRODUTOS LÁCTEOS

RESUMO

Os genomas de 69 isolados amostrados de equipamentos, leite cru e produtos lácteos no Brasil foram comparados com outros 193 disponíveis de diversas origens. A estrutura populacional dos isolados incluiu cepas pertencentes aos conhecidos grupos filogenéticos II, III, IV, V e VI, e quase todos os isolados obtidos de produtos lácteos pertenceram ao grupo III. A investigação de genes específicos revelou um grande número de isolados carregando genes associados com a produção de toxinas, incluindo *nheA* (84,06%), *nheB* (89,86%), *nheC* (84,06%), *hblA* (59,42%), *hblC* (44,93%), *hblD* (53,62%), *cytK* (53,62%), *cesA* (2,90%) e *cesB* (2,90%). Os isolados pertencentes aos grupos IV e V possuíram uma prevalência significativamente maior dos genes *hblACD* e o grupo IV do gene *cytK*. Os isolados obtidos de produtos lácteos tiveram uma prevalência significativamente menor dos genes *cytK* e *hblACD* comparadas aos isolados de equipamentos e leite cru/tanques de refrigeração. Genes relacionados ao metabolismo da sacarose foram detectados em maior frequência nos isolados oriundos do leite cru comparados aos de equipamentos e utensílios. A análise genômica populacional demonstrou a diversidade dos isolados e a variedade de funções dentro do grupo do *B. cereus* na cadeia produtiva leiteira, com grande número de isolados potencialmente capazes de causar doenças alimentares. Essa informação detalhada contribuirá para intervenções específicas a fim de reduzir a contaminação do leite e a deterioração associada ao *B. cereus*.

Palavras-chave: doenças veiculadas por alimentos, genômica populacional, leite, sequenciamento de futura geração

1. INTRODUÇÃO

As bactérias pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus* estão amplamente distribuídas no ambiente e são comumente isoladas do solo, ar, água, plantas e fezes. A ubiquidade dessas bactérias significa que elas frequentemente entram na cadeia produtiva de alimentos em que o consumo por seres humanos de células

viáveis ou toxinas pré-formadas pode resultar nas síndromes diarreica e emética. Surtos de intoxicações alimentares causados por esse patógeno oportunista vêm sendo relatados (ZHOU et al., 2014; SCHIMD et al., 2016) e *B. cereus* foi responsável por aproximadamente 19% dos surtos alimentares reportados nos Estados Unidos da América entre 1998 e 2008 (BENNET et al., 2013). Entretanto, o atual número de surtos atribuídos ao *B. cereus* pode ser maior, pois ferramentas diagnósticas específicas para a identificação de estirpes patogênicas não são comumente utilizadas nos laboratórios de microbiologia clínica (NEWELL et al., 2010).

A produção de toxinas diarreicas termolábeis ocorre durante a multiplicação da bactéria no intestino delgado sendo que até o momento três enterotoxinas foram relacionadas com a ocorrência da síndrome diarreica: 1) Hemolisina BL (Hbl – *hblA*, *hblC*, *hblD*); 2) Enterotoxina não hemolítica (Nhe – *nheA*, *nheB*, *nheC*) e 3) Citotoxina (CytK - *cytK*) (EHLING-SCHULZ et al., 2004). Já a ocorrência da síndrome emética está relacionada com a ação de uma toxina termoestável pré-formada nos alimentos, conhecida por cereulide, codificada pelo gene *cesA* e *cesB* (LÜCKING et al., 2015).

A diversidade genética dentro do grupo do *B. cereus* (RAYMOND et al., 2010) e a mobilidade de fatores de virulência por plasmídeos entre as espécies (GONZALEZ et al., 1982, OKINAKA et al., 1999, RAYMOND; BONSALL, 2013) vêm contribuindo para a dificuldade na definição da virulência específica e mecanismos de produção de toxinas nas linhagens causadoras de doenças (JEßBERGER et al., 2015). Por exemplo, a produção de cereulide e de enterotoxinas diarreicas não é exclusiva ao *B. cereus sensu stricto* (THORSEN et al., 2006; KOVAC et al., 2016) e algumas cepas podem carrear genes do *B. anthracis* e são consideradas como capazes de causar a doença antraz (MARSTON et al., 2016) e bacteremia (SASAHARA et al., 2011; SCHAEFER et al., 2016). A caracterização detalhada de populações naturais utilizando técnicas de genômica comparativa permite identificar cepas que proliferam em sistemas de produção de alimentos e os genes associados a surtos.

Os isolados do grupo do *B. cereus* vêm sendo identificados em diversos alimentos, mas as intoxicações alimentares são principalmente associadas a

alimentos termicamente tratados em que a habilidade na produção de esporos facilita sua sobrevivência às condições adversas durante o processamento (DAELMAN et al., 2013). A abundância de *B. cereus* nos animais, incluindo vacas leiteiras, o torna o mais prevalente microrganismo veiculado por alimento no ambiente das fazendas leiteiras, contaminando o leite cru pela simples transferência durante a ordenha e armazenagem do leite (MAGNUSSON et al., 2007; VISSERS et al., 2007; COOREVITS et al., 2008; MASIELLO et al., 2014, MCAULEY et al., 2014).

A pasteurização induz a esporulação e os esporos podem subsequentemente sobreviver ao processo e contaminar os derivados lácteos (BARTOSZEWICS et al., 2008; MILLER et al., 2015). A adoção de sistemas de limpeza e boas práticas de higiene durante o processamento do leite pode reduzir a contaminação pelos esporos, a proliferação de células vegetativas e a formação de toxinas (SHAHEEN et al., 2010, KUMARI; SARKAR, 2014).

A presença de fezes no ambiente de ordenha, a utilização de camas impróprias no manejo dos animais (MAGNUSSON et al., 2007) e o uso de silagem (VISSERS et al., 2007) podem contribuir para a contaminação do leite com esporos de *B. cereus*. Isso é exacerbado pela formação de biofilmes os quais podem atuar na contaminação persistente dos produtos durante o processamento (SALUSTIANO et al., 2009, KUMARI; SARKAR, 2016). Como resultado, *B. cereus* persiste como um problema para a saúde pública e para a redução da produção de alimentos devido à deterioração dos produtos. Ainda, em países como o Brasil, em que o consumo de produtos lácteos comercializados de maneira não regulamentada é alto (VIDAL-MARTINS et al., 2013), existe uma maior ocorrência de infecções humanas causadas por cepas toxigênicas de *B. cereus* em leite cru e produtos lácteos (VIDAL-MARTINS et al., 2006; SALUSTIANO et al., 2009; REIS et al., 2013, ARAGON-ALEGRO et al., 2008; CHAVES et al., 2011).

Nesse estudo, objetivou-se melhor compreender a estrutura populacional de isolados pertencentes ao grupo do *B. cereus* na cadeia produtiva do leite e produtos lácteos. Por meio da utilização de amostragem estruturada nessa cadeia (fazendas, indústrias e produtos lácteos) e técnicas genômicas comparativas, investigou-se quais linhagens específicas e genes estão significativamente associados a estágios de produção específicos e produtos. Esse estudo fornece evidências de fatores

genômicos que contribuem para a sobrevivência do *B. cereus* da fazenda à mesa dos consumidores.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem bacteriana e genomas

Um total de 466 amostras foi obtido na cadeia produtiva leiteira [fazendas leiteiras (331 amostras), indústrias (58) e produtos em supermercados (77)] no município de Pirassununga, localizado na Região Centro-Leste do Estado de São Paulo, Brasil, de julho a novembro de 2016, das quais foram obtidos 69 isolados confirmados fenotipicamente como *Bacillus cereus* s.s. pelo isolamento em placas de Ágar Manitol-Gema de Ovo Polimixina (MYP) e testes bioquímicos. Nas demais 397 amostras, não foi possível realizar a obtenção de isolados devido à ausência de bactérias pertencentes a esse grupo ou pela presença concomitante de outros microrganismos, e, portanto, o sequenciamento não foi realizado.

Um conjunto de 38 isolados foi obtido das amostras coletadas por suabes ou frascos esterilizados (leite cru) oriundos de 26 fazendas produtoras de leite na Região de Pirassununga, de amostras obtidas da superfície de tanques de refrigeração (7), balde de ordenha manual (6), tubulações dos equipamentos de ordenha (4), leite cru (6), teteiras (5) e outros equipamentos e utensílios com contato direto com o leite (10). Também, 9 isolados foram obtidos em duas indústrias processadoras localizadas na mesma região de amostras da boca de saída de leite de caminhões transportadores (2), equipamentos (3), tubulações (1) e utensílios (3) utilizados durante o processamento dos produtos lácteos. Os demais 22 isolados foram obtidos de produtos lácteos disponíveis para comercialização, como queijo minas frescal (1), bebida láctea UAT (1), creme preparado de queijo (1), cappuccino instantâneo (1) e requeijão (18). Os 69 isolados também foram categorizados em três grupos de acordo com a origem de isolamento como a seguir: (i) equipamentos e utensílios (34); (ii) leite cru e tanques de refrigeração (13); (iii) produtos lácteos (22). Ainda, os isolados foram agrupados em grupos filogenéticos previamente definidos (I ao VII) (GUINEBRETIERE et al., 2008).

Os dados do sequenciamento genômico dos 69 isolados obtidos na cadeia produtiva leiteira amostrada (Apêndice A) estão depositados no NCBI GenBank e

Short Read Archive (SRA) associado ao BioProjeto PRJNA390851. Os genomas também estão disponíveis no FigShare (10.6084/m9.figshare.5120020). Os detalhes completos e os números de acesso individuais de 193 isolados utilizados como população “background” para comparação filogenética podem ser encontrados no Apêndice B.

2.2. Isolamento bacteriano e testes bioquímicos

O pré-enriquecimento das amostras foi realizado utilizando Caldo Triptona de Soja (TSB) (Oxoid, Hampshire, UK) enriquecido com Polimixina B (20µg/mL) (STADHOUDERS, 1992), sendo a incubação realizada a 30°C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para placas contendo Agar Manitol Gema de Ovo enriquecido com Polimixina B (MYP) (MOSSEL et al., 1967) pela técnica de esgotamento e incubadas a 30°C durante 24 a 48 horas. Três a cinco colônias sugestivas foram transferidas para tubos inclinados contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) (Oxoid, Hampshire, UK) e incubadas durante 24 horas a 30°C.

Essas colônias foram caracterizadas pela coloração de Gram e testes bioquímicos. Os isolados classificados como *B. cereus* s.s. foram aqueles que apresentaram as seguintes características bioquímicas: catalase (+), fermentação da glicose em anaerobiose (+), Voges-Proskauer (+), crescimento rizoide (-), hemólise de sangue de carneiro (+), produção de cristais (-), motilidade (+/-) e redução do nitrato a nitrito (+/-) (MACFADIN, 1976; SHARIF; ALAEDDINOGLU, 1988; APHA, 2001).

2.3 Extração do DNA e sequenciamento genômico

Alíquotas da cultura bacteriana em tubos contendo TSA foram transferidas para tubos contendo TSB e incubadas durante 24 horas a 30°C. Então, 1,5 mL da cultura foram transferidos para tubos de “eppendorf” para realização da extração do DNA utilizando o Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de acordo com as instruções do fabricante para bactérias Gram positivas. A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliadas por quantificação fluorimétrica em sistema Denovix DS-11®.

As bibliotecas de DNA (“libraries”) foram preparadas utilizando Illumina Nextera® XT Library Prep Kit (v3) de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, esse processo envolve a fragmentação de 1 µg de DNA genômica pela fragmentação enzimática, ligação de adaptadores nas porções finais dos fragmentos e a realização da PCR utilizando o conjunto de primers Illumina 3 primer set. AMPure® XP esferas paramagnéticas (“paramagnetic beads”) (Beckman Coulter, Inc., USA) foram utilizadas para realizar a limpeza do DNA depois de cada etapa para remoção de pequenos fragmentos de DNA. As bibliotecas foram então normalizadas para o sequenciamento no aparelho Illumina MiSeq.

2.4 Montagem dos genomas e análises de bioinformática

As sequências contíguas (“contigs”) foram montadas utilizando o software SPAdes (BANKEVICH et al., 2012). Os genes individuais foram alinhados à cepa referência de *B. cereus* (ATCC 14579) utilizando os parâmetros padrões de BLAST da plataforma BIGSdb (JOLLEY; MAIDEN, 2010). O algoritmo BLAST foi utilizado para escanear todos os genomas para os genes ortólogos em cada *locus* do genoma de referência. Um ortólogo foi definido utilizando identidade superior a 70% e mais que 50% de diferença no alinhamento do comprimento. O software MAFFT foi utilizado para alinhar os genes ortólogos em uma abordagem gene por gene, e essas informações foram concatenadas em sequências contíguas para o genoma de cada isolado (SHEPPARD et al., 2013). A identificação de genes, exportação das sequências e alinhamentos gene a gene foram realizados pelo MUSCLE (EDGAR, 2004).

A elaboração da árvore filogenética construída pela técnica de agrupamento “Neighbour joining” foi realizada pelo rapidnj (SIMONSEN et al., 2008), incluindo 69 isolados comparados com outros 193 isolados pertencentes ao grupo do *B. cereus* cujo genomas encontram-se depositados no BIGSdb (JOLLEY; MAIDEN, 2010) (Apêndice B). Os 69 isolados obtidos no presente estudo também foram classificados de acordo com sete grupos filogenéticos baseado na sequência do gene *panC* pela ferramenta online (<https://www.tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>) (GUINEBRETIERE et al., 2008).

A sequência multilocus (MLST) de cada isolado foi definida baseada na variação alélica de sete genes *housekeeping* (*glp*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pyce*, *tpi*) pelo BIGSdb, o qual possui a funcionalidade de acessar perfis de MLST definidos pela base pubMLST (<https://pubmlst.org/bcereus/>) (PRIEST et al., 2004).

O potencial para produção de quatro toxinas (citotoxina CytK, hemolisina BL, enterotoxina não-hemolítica e cereulide) foi avaliado nos isolados. A presença de genes relacionados com a possível produção dessas quatro toxinas foi investigada nos genomas, incluindo os genes *cesA*, *cesB*, *cytK*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB* e *nheC* (EHLING-SCHULZ et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008).

2.5 Análises Estatísticas

Os valores de prevalência dos genes alvos entre os diferentes grupos filogenéticos e as categorias de origem do isolamento foram avaliados pelo teste exato de Fisher (5% de significância).

3. RESULTADOS

3.1 Estrutura populacional e epidemiologia de isolados do grupo do *B. cereus* associados à cadeia produtiva do leite e produtos lácteos

A estrutura da população de 262 isolados (69 da cadeia produtiva de leite e 193 da população “background”) pertencentes ao grupo do *B. cereus* geralmente concordou com a tradicional genotipagem baseada na sequência do gene *panC* (GUINEBRETIERE et al., 2008) (Figuras 1 e 2).

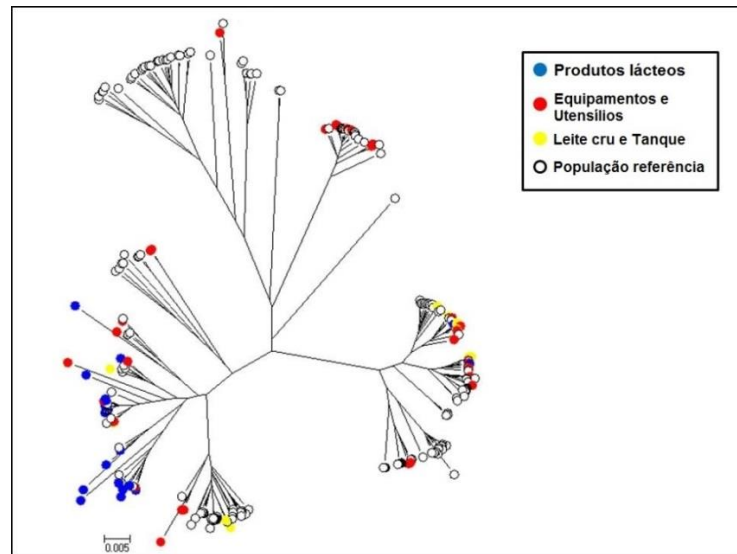


Figura 1. Estrutura populacional de 69 isolados pertencentes ao grupo do *B. cereus* obtidos na cadeia produtiva leiteira comparativamente a 193 isolados de coleções já publicadas (branco). As árvores “Neighbour joining” foram construídas utilizando o rapidnj (SIMONSEN et al., 2008) com dados do sequenciamento completo. A origem do isolado é apresentada nas folhas da árvore, classificada em produtos (azul), equipamentos e utensílios (vermelho), leite cru e tanque de refrigeração (amarelo).

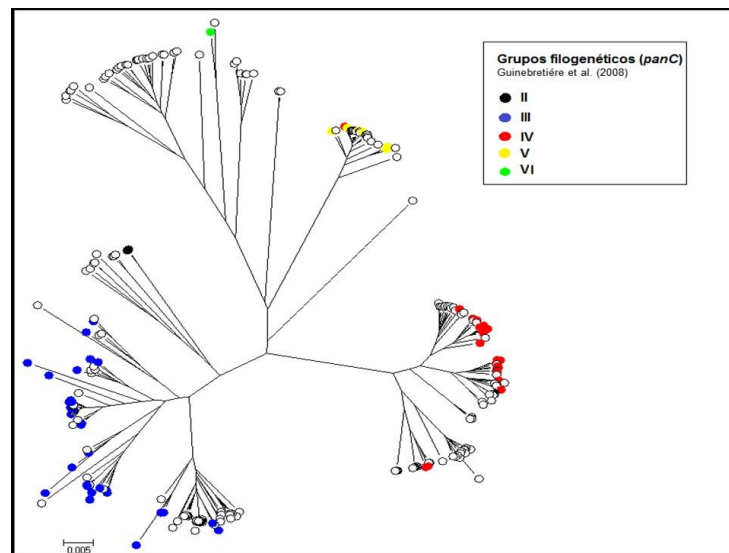


Figura 2. Estrutura populacional de 69 isolados pertencentes ao grupo do *B. cereus* obtidos na cadeia produtiva leiteira comparativamente a 193 isolados de coleções já publicadas (branco) As árvores “Neighbour joining” foram construídas utilizando o rapidnj (SIMONSEN et al., 2008) com dados do

sequenciamento completo. O grupo filogenético determinado pela genotipagem tradicional do gene *panC* (GUINEBRETIERE et al., 2008) é apresentado nas folhas da árvore, classificados em II (preto), III (azul), IV (vermelho), V (amarelo) e VI (verde).

Nenhum isolado pertencente aos grupos filogenéticos I ou VII foi detectado neste estudo, nos quais as espécies *B. pseudomycoides* e *B. cytotoxicus* estão incluídas (GUINEBRETIERE et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2010). Somente um isolado pertenceu ao grupo VI, composto por *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*. Os demais isolados obtidos de leite cru ou tanques de refrigeração, e aqueles obtidos de amostras de utensílios e equipamentos de fazendas leiteiras e indústrias, estavam distribuídos em diferentes agrupamentos pertencentes aos grupos filogenéticos II (2), III (34), IV (22) e V (8) (GUINEBRETIERE et al., 2008), e dois isolados não foi possível estabelecer o grupo filogenético. Entretanto, quase todos os isolados obtidos de produtos lácteos (principalmente requeijão) pertenceram ao grupo III, composto pelas espécies *B. cereus* s.s. (incluindo cepas eméticas), *B. thuringiensis* e *B. anthracis*.

Utilizando MLST, detectaram-se os seguintes tipos: ST18; ST46; ST144; ST182; ST223; ST247; ST554 em baldes de ordenha, teteiras e outros equipamentos e utensílios de fazendas e indústrias. Nos tanques de refrigeração, ST18, ST73 e ST144 foram detectados. Nos produtos lácteos, ST5, ST26 e ST92 foram detectados.

3.2 Avaliação do potencial toxigênico pela genotipagem

Um total de 66 (95,65%) isolados carrega pelo menos um dos genes relacionados à produção das toxinas gastroentéricas (*cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cesA* e *cesB*). Os três (4,35%) isolados que não carregavam nenhum dos genes foram obtidos de requeijão. Um elevado número de isolados carregavam os genes *cytK* (53,62%), *hblA* (59,42%), *hblC* (44,93%), *hblD* (53,62%), *nheA* (84,06%), *nheB* (89,86%) e *nheC* (84,06%). A prevalência dos genes relacionados com a possível produção de toxinas foi avaliada de acordo com a origem de isolamento (Tabela 1) e o grupo filogenético (Tabela 2).

Tabela 1. Prevalência dos genes relacionados com a produção de toxinas (*cesAB*, *cytK*, *hblACD* e *nheABC*) do grupo do *B. cereus* obtidos de equipamentos e utensílios, leite cru ou tanque de resfriamento, e produtos lácteos na Região Centro-leste do Estado de São Paulo, Brasil, durante 2016.

Gene	Equipamentos/Utensílios				Leite cru/Tanque de refrigeração				Produtos lácteos				Total		
	+	N	P (%)	I.C. 95%	+	N	P (%)	I.C. 95%	+	N	P (%)	I.C. 95%	+	N	P (%)
<i>cesA</i>	1	34	2,94	0,52 a 14,92	0	13	0,00	0,00 a 22,81	1	22	4,55	0,81 a 21,80	2	69	2,90
<i>cesB</i>	1	34	2,94	0,52 a 14,92	0	13	0,00	0,00 a 22,81	1	22	4,55	0,81 a 21,80	2	69	2,90
<i>cytK</i>	19	34	55,88	39,19 a 72,57	11	13	84,62	57,76 a 95,67	7	22	31,82	16,36 a 52,68	37	69	53,62
<i>hblA</i>	27	34	79,41	65,82 a 93,00	9	13	69,23	42,37 a 87,32	5	22	22,73	10,12 a 43,44	41	69	59,42
<i>hblC</i>	21	34	61,76	45,43 a 78,10	7	13	53,85	29,14 a 76,79	3	22	13,64	4,75 a 33,34	31	69	44,93
<i>hblD</i>	24	34	70,59	55,27 a 85,90	9	13	69,23	42,37 a 87,32	4	22	18,18	7,31 a 38,52	37	69	53,62
<i>nheA</i>	30	34	88,24	73,38 a 95,33	12	13	92,31	66,69 a 98,63	16	22	72,73	51,85 a 86,85	58	69	84,06
<i>nheB</i>	32	34	94,12	80,91 a 98,37	13	13	100,00	77,19 a 100,00	17	22	77,27	56,56 a 89,88	62	69	89,86
<i>nheC</i>	29	34	85,29	69,87 a 93,55	13	13	100,00	77,19 a 100,00	16	22	72,73	51,85 a 86,85	58	69	84,06

* + = número de isolados positivos; N = número de isolados; P= prevalência e I. C 95% = intervalo de confiança a 95%

Tabela 2. Prevalência dos genes relacionados com a produção de toxinas (*cesAB*, *cytK*, *hblACD* e *nheABC*) nos grupos filogenéticos de *B. cereus* propostos por Guinebretiére et al.(2008), na Região Centro-leste do Estado de São Paulo, Brasil, durante 2016.

Gene	II				III				IV				V				VI			
	+	N	P (%)	I.C. 95%	+	N	P (%)	I.C. 95%	+	N	P (%)	I.C. 95%	+	N	P (%)	I.C. 95%	+	N	P (%)	I.C. 95%
<i>cesA</i>	0	2	0	0,0 – 65,76	1	34	2,94	0,52 – 14,92	1	22	4,55	0,81 – 21,80	0	8	0,00	0,0 – 32,44	0	1	0	0,0 – 79,35
<i>cesB</i>	0	2	0	0,0 – 65,76	1	34	2,94	0,52 – 14,92	1	22	4,55	0,81 – 21,80	0	8	0,00	0,0 – 32,44	0	1	0	0,0 – 79,35
<i>cytK</i>	0	2	0	0,0 – 65,76	12	34	35,29	21,49 – 52,09	22	22	100,00	85,13 – 100,0	3	8	37,50	13,68 – 69,43	0	1	0	0,0 – 79,35
<i>hblA</i>	2	2	100	34,24 – 100,0	8	34	23,53	12,44 – 40,0	22	22	100,00	85,13 – 100,0	8	8	100,00	67,56 – 100,0	1	1	100	20,65 – 100,0
<i>hblC</i>	2	2	100	34,24 – 100,0	4	34	11,76	4,67 – 26,62	16	22	72,73	51,85 – 86,85	8	8	100,00	67,56 – 100,0	1	1	100	20,65 – 100,0
<i>hblD</i>	2	2	100	34,24 – 100,0	5	34	14,71	6,45 – 30,13	22	22	100,00	85,13 – 100,0	7	8	87,50	52,91 – 97,76	1	1	100	20,65 – 100,0
<i>nheA</i>	2	2	100	34,24 – 100,0	27	34	79,41	63,20 – 89,65	20	22	90,91	72,18 – 97,47	8	8	100,00	67,56 – 100,0	1	1	100	20,65 – 100,0
<i>nheB</i>	2	2	100	34,24 – 100,0	30	34	88,24	73,38 – 95,33	22	22	100,00	85,13 – 100,0	7	8	87,50	52,91 – 97,76	1	1	100	20,65 – 100,0
<i>nheC</i>	2	2	100	34,24 – 100,0	29	34	85,29	69,87 – 93,55	19	22	86,36	66,67 – 95,25	7	8	87,50	52,91 – 97,76	1	1	100	20,65 – 100,0

* + = número de isolados positivos; N = número de isolados; P = prevalência e I. C 95% = intervalo de confiança a 95%

Os isolados incluídos no grupo IV e V tiveram uma prevalência significativamente maior dos genes *hblA* ($p = 9,457 \times 10^{-11}$), *hblC* ($p = 8,846 \times 10^{-9}$) e *hblD* ($p = 2,432 \times 10^{-12}$) comparadas com aqueles incluídos no grupo III pelo teste exato de Fisher (5% de significância). Também, uma significativa ($p = 1,082 \times 10^{-7}$) maior prevalência do gene *CytK* foi observada nos isolados incluídos no grupo IV do que dos grupos III e V. O teste exato de Fisher foi também realizado para avaliar as diferenças estatísticas da prevalência dos genes entre os grupos de acordo com a origem do isolamento. *CytK* foi significativamente ($p = 0,01$) mais prevalente em isolados obtidos de amostras de leite do que daqueles de produtos lácteos. Também, *hblA* ($p = 8,312 \times 10^{-5}$), *hblC* ($p = 0,001$) e *hblD* ($p = 0,0002$) foram significativamente mais prevalente em equipamentos e utensílios do que os obtidos de produtos lácteos. A presença dos genes *cesAB*, relacionado a produção de cereulide, foi observada em dois isolados (2,89%); um de requeijão e outro de uma tubulação do equipamento de ordenha de uma fazenda.

3.3 Genes acessórios associados com os estágios da cadeia produtiva do leite e produtos lácteos

Algumas evidências de que genes específicos podem conferir vantagens para a sobrevivência através da cadeia produtiva leiteira, podem ser obtidas quantificando os genes que estão mais presentes em isolados de diferentes estágios de produção. A diferença entre as prevalências dos genes foi determinada comparando os isolados do grupo do *B. cereus* de três distintas categorias: equipamentos e utensílios; leite cru e tanques de refrigeração; e produtos lácteos.

A maior diferença na prevalência dos genes entre os isolados obtidos de leite cru e tanques de refrigeração e aqueles de equipamentos e utensílios foi observada em genes codificadores de frutoquinase (*FruC*); sacarose-6-fosfato hidrolase (*SacA*); sacarose-específico PTS (*SacP*) e repressor aberto de sacarose (*sacR*) (FOUET et al., 1987) – que obtiveram a maior diferença na prevalência entre os isolados do leite comparados com equipamentos (57%). A prevalência foi 92% em isolados do leite cru enquanto o valor foi 35% naqueles obtidos dos equipamentos. Ainda, a principal diferença (79%) comparando a prevalência de genes entre os isolados de

leite/tanques (92%) com aqueles de produtos lácteos (13%) foi observada no gene *amyS*, responsável pela produção de alfa-amilase e que permite a multiplicação em amido/glicogênio (MOLS et al., 2007).

4. DISCUSSÃO

Os isolados do grupo do *B. cereus* da cadeia produtiva do leite e produtos lácteos estavam distribuídos em diversos grupos filogenéticos conhecidos (GUINEBRETIERE et al., 2008; CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015). Dentro desses grupos filogenéticos, ST específicos vem sendo apontados como causadores de surtos alimentares (CARDAZZO et al., 2008; YANG et al., 2017). Isso inclui os ST26, ST92 e ST144, isolados de requeijão neste estudo, os quais foram previamente envolvidos em surtos alimentares (HOFFMASTER et al., 2008). ST26 e ST144 também estão associados à êmese (PRIEST et al., 2004; HOFFMASTER et al., 2008; DIDELOT et al., 2009), pneumonia (HOFFMASTER et al., 2008) e contaminantes de fórmulas infantis na China (YANG et al., 2017). Outros STs isolados nesse estudo (ST173 e ST18) estão relacionados também a surtos alimentares (HOFFMASTER et al., 2008). Com essa diversidade de STs potencialmente causadores de doenças, é impossível determinar se existe diferença entre o potencial de infecção a partir do número relativamente pequeno de amostras utilizadas nesse estudo.

Em diferentes grupos filogenéticos vem sendo mostrado o potencial para ocorrência de doenças alimentares. Por exemplo, o grupo IV quando sua origem de isolamento é relacionada à cadeia produtiva leiteira, consiste em risco devido ao elevado potencial para produção da toxina hemolisina BL (KOVAC et al., 2016). No presente estudo, os grupos filogenéticos IV e V demonstraram uma maior prevalência dos genes *hblA*, *hblC* e *hblD* comparados ao grupo III. Entretanto, a produção de toxinas é dependente de complexos mecanismos regulatórios (KOVAC et al., 2016) e das condições intestinais (JEBBERGER et al., 2017). Foi verificado que uma grande proporção de isolados pertenceu ao grupo III (principalmente isolados de requeijões). Esse grupo é considerado como de elevado risco para a ocorrência de intoxicações alimentares (GUINEBRETIERE et al., 2008), sendo composto por isolados pertencentes às espécies *B. cereus* s.s. (incluindo cepas

eméticas), *B. thuringiensis* e *B. anthracis*, incluindo linhagens citotóxicas e “altamente citotóxicas” (GUINEBRETIERE et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2010). A presença de cepas pertencentes ao grupo III em produtos termicamente tratados pode estar relacionada com a maior resistência dos esporos em cepas incluídas nesse grupo (LUU-THI et al., 2014).

O sequenciamento completo do genoma permite a identificação de genes envolvidos na ocorrência das doenças alimentares. Por exemplo, isolados carreando os genes relacionados com a produção de toxinas como os genes *nhe* e *hbl* estão relacionados com a ocorrência de síndrome diarreica (GUINEBRETIERE 2010), e vem sendo relatados em isolados oriundos de leite (GRANUM et al., 1993). Neste estudo, existiu uma prevalência elevada dos genes *cytK*, *hblA*, *hblC* e *hblD* em isolados de leite e equipamentos e utensílios comparados com aqueles oriundos de amostras de produtos lácteos. Isso indica diferentes potenciais de produção de toxinas em isolados obtidos através da cadeia produtiva amostrada, em que o consumo de leite cru representa um risco à saúde pública. O gene *ces*, associado com a produção de toxina emética, foi observado em dois isolados nesse estudo; um de requeijão e o outro de uma tubulação do equipamento de ordenha em uma fazenda leiteira. A presença de isolados eméticos na cadeia produtiva do leite é considerada rara (SVENSSON et al., 2006, CUI et al., 2016) e a detecção de um isolado com potencial emético em requeijão refrigerado é um perigo aos consumidores visto que a produção da isocereulide A, a forma mais tóxica da cereulide, é maior em baixas temperaturas (KRANZLER et al., 2014).

Em adição, a identificação dos genes relacionados com a produção de toxinas, a análise comparativa genômica permitiu a identificação de genes que podem conferir vantagens para a sobrevivência ou multiplicação na cadeia produtiva leiteira. Foi detectada uma elevada prevalência de genes relacionados com o metabolismo de sacarose nos isolados obtidos do leite cru e tanques de refrigeração comparados aqueles de equipamentos e utensílios e produtos. A utilização de sacarose vem sendo demonstrada em espécies de *B. cereus* isoladas de amostras de leite (WONG et al., 1988), mas é difícil explicar a funcionalidade visto que a sacarose não é um constituinte natural do leite (JENKINS; MCGUIRE, 2006). A sacarose é, entretanto, um carboidrato comumente encontrado em plantas e os

principais veículos de esporos do grupo do *B. cereus* são o solo, as fezes e a cama que contaminam o úbere das vacas criadas em sistema de pastejo (CHRISTIANSSON et al., 1999, MAGNUSSON et al., 2007). Isso explica a presença de isolados capazes de utilizar a sacarose em tanques de refrigeração e leite cru.

O metabolismo de carboidratos também é relacionado à produção de toxinas (OUHIB et al., 2006). A indução de morte de macrófagos em locais de infecção, e o acesso a fontes de carbono e nutrientes para a multiplicação bacteriana, pode ocorrer por mecanismos que requerem disponibilidade de glicose e ferro (SINEVA et al., 2009; TRAN et al., 2011; GUILLEMET et al., 2013; TRAN et al., 2013). Isso fornece explicações alternativas para a maior prevalência dos genes relacionados ao metabolismo de sacarose em isolados do grupo do *B. cereus* obtidos de leite cru. Primeiro, porque a morte de macrófagos fornece vantagens competitivas dentro da comunidade microbiana estabelecida (CEUPPENS et al., 2013) do leite cru quando existem elevados números de macrófagos viáveis (LANGONI et al., 2011; LI et al., 2015). Segundo, porque vacas leiteiras infectadas com mastite subclínica, e consequentemente elevado número de macrófagos, são a principal fonte de contaminação do leite (BHATT et al., 2012). Entretanto, essas hipóteses não foram testadas nesse estudo.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, foi demonstrada a utilidade do sequenciamento completo do genoma para caracterizar a estrutura populacional de isolados potencialmente toxigênicos do grupo do *B. cereus* da cadeia produtiva do leite no Brasil. A informação detalhada sobre a diferencial abundância de isolados e genes através da cadeia produtiva fornece bases para atribuir as fontes de contaminação e a detecção de importantes elementos genéticos associados à persistência e patogenicidade. Claramente, a presença de isolados potencialmente toxigênicos na cadeia produtiva do leite e produtos lácteos no Brasil requer a adoção de práticas higiênicas e o não consumo de leite cru para melhorar a segurança dos alimentos e a deterioração dos produtos lácteos.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 2014/13104-1, 2015/20874-0 e 2016/19214-9) pelos financiamentos. Também, ao Prof. Samuel K. Sheppard, Ben Pascoe e Guillaume Méric (The Sheppard Lab) e ao Prof. Dr. Heidge Fukumasu (LOCT-FZEA) pela colaboração durante a execução das técnicas e análise dos resultados.

REFERÊNCIAS

APHA. American Public Health Association. 2001. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001.

ARAGON-ALEGRO, L.C., PALCICH, G., LOPES, G.V., RIBEIRO, V.B., LANDGRAF, M., DESTRO, M.T. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.71, n.10, p.2115-2118, 2008.

BANKEVICH A., NURK S., ANTIPOV D., GUREVICH A., DVORKIN M., KULIKOV A. S., LESIN V., NIKOLENKO S., PHAM S., PRJIBELSKI A., PYSHKIN A., SIROTKIN A., VYAHHI N., TESLER G., ALEKSEYEV M. A., PEVZNER P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v.19, n.5, p.455-477, 2012.

BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B.M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v.25, n.4, p.588-596, 2008.

BENNET, S.D.; WALSH, K.A.; GOULD, L.H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* — United States, 1998–2008. **Clinical & Infectious Diseases**, v.57, n.3, p.425-433, 2013.

BHATT, V. D., AHIR, V. B., KORINGA, P. G., JAKHESARA, S. J., RANK, D. N., NAURIYAL, D. S., KUNJADIA, A.P. JOSHI, C. G. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, n.4, p.639-650, 2012.

CAAMAÑO-ANTELO, S., FERNÁNDEZ-NO, I.C., BÖHME, K., EZZAT-ALNAKIP, M., QUINTELA-BALUJA, M., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CALO-MATA, P.. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. **Food Microbiology**, v.46, p.288-298, 2015.

CARDAZZO, B., NEGRISOLO, E., CARRARO, L., ALBERGHINI, L., PATARNELLO, T., GIACCONE, V., Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.3, p.850-860, 2008.

CEUPPENS, S., BOON, N., UYTENDAELE, M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84, n.3, p.433-450, 2013.

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.174, n.1, p.12-16, 2011.

CHRISTIANSSON, A., BERTILSSON, J., SVENSSON, B. *Bacillus cereus* Spores in Raw Milk: Factors Affecting the Contamination of Milk During the Grazing Period. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.2, p.305-314, 1999.

COOREVITS, A.; DE JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; REEKMANS, R.; HEYRMAN, J.; MESSENS, W.; VOS, P.D.; HEYNDRICKX, M. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v.31 n.2, p.126-140, 2008.

CUI, Y., LIU, Y., LIU, X., XIA, X., DING, S., ZHU, K. Evaluation of the Toxicity and Toxicokinetics of Cereulide from an Emetic *Bacillus cereus* Strain of Milk Origin. **Toxins**, v.8, n.6, 156, 2016.

DAELMAN, J., VERMEULEN, A., WILLEMYNS, T., ONGENAERT, R., JACXSENS, L., UYTENDAELE, M., DEVLIEGHERE, F.. Growth/no growth models for heat-treated psychrotrophic *Bacillus cereus* spores under cold storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.161, n.1, p.7-15, 2013.

DIDELOT, X., BARKER, M., FALUSH, D., PRIEST, F. G. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, n.2, p.81-90, 2009.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high 1072 throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.1792-1797, 2004.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 479-487, 2004.

EHLING-SCHULZ, M., VUKOV, N., SCHULZ, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, M., MA"RTLBAUER, E. SCHERER, S. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.1, p.105-113, 2005.

EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M., GRALLERT, H., RIECK, P., WAGNER, M., & SCHERER, S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. **BMC Microbiology**, v.6, n.1, p.105-113, 2006.

FOUET, A., ARNAUD, M., Klier, A., RAPOPORT, G.. *Bacillus subtilis* sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: expression in *Escherichia*

coli and homology to enzymes II from enteric bacteria. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 84, p.8773–8777, 1987

GONZALEZ J.M.; BROWN B.J.; CARLTON, B.C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.79, p.6951-6955, 1982.

GRANUM, P. E., BRYNESTAD, S., KRAMER, J. M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n.4, p.269-279, 1993.

GUILLEMET, E., TRAN, S. L., CADOT, C., ROGNAN, D., LERECLUS, D., RAMARAO, N. Glucose 6P binds and activates HlyIIIR to repress *Bacillus cereus* haemolysin hlyII gene expression. **PloS ONE**, v.8, n.2, e55085, 2013.

GUINEBRETIERE, M. H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THIE, C., HEYNDRIX, M., DE VOS, P., Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v.10, n.4, p.851-865, 2008.

GUINEBRETIERE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., & DEBUYSER, M. L., 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.3388-339, 2010.

HOFFMASTER, A. R., NOVAK, R. T., MARSTON, C. K., GEE, J. E., HELSEL, L., PRUCKLER, J. M., & WILKINS, P. P. Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. **BMC Microbiology**, v.8, n.1, 191, 2008.

JEBBERGER, N.; KREY, V. M.; RADEMACHER, C.; BÖHM, M.E.; MOHR, A.K.; EHLING-SCHULZ, M.; SCHERER, S.; MÄRTLBAUER, E. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 560, 2015.

JEBBERGER, N., REDEMACHER, C., KREY, K.M., DIETRICH, R., MOHR, A.K., BOHM, M.E., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M., MARTLBAUER, M., Simulating intestinal growth conditions enhances toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology** v.8, 627, 2017.

JENKINS, T. C., MCGUIRE, M. A., Major advances in nutrition: impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1302-1310, 2006.

JOLLEY, K.A.; MAIDEN, M.C.. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v.11, 595, 2010.

KOVAC, J., MILLER, R. A., CARROLL, L. M., KENT, D. J., JIAN, J., BENO, S. M., WIEDMANN, M. Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. **BMC Genomics**, v.17, n.1, p.581, 2016.

KRANZLER, M., STOLLEWERK, K., ROUZEAU-SZYNALSKI, K., BLAYO, L., SULYOK, M., EHLING-SCHULZ, M. Temperature exerts control of *Bacillus cereus* emetic toxin production on post-transcriptional levels. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 1640, 2016.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. **Food Control**, v.36, n.1, p.153-158, 2014

KUMARI, S.; SARKAR, P. K., *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p.20-29, 2016.

LANGONI, H., PENACHIO, D. D. S., CITADELLA, J. C., LAURINO, F., FACCIOLO-MARTINS, P. Y., LUCHEIS, S. B., MENOZZI, B.D., SILVA, A. V. D. Quality and microbiological aspects of bovin milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p.1059-1065, 2011.

LI, N., RICHOUX, R., PERRUCHOT, M. H., BOUTINAUD, M., MAYOL, J. F., GAGNAIRE, V. Flow Cytometry Approach to Quantify the Viability of Milk Somatic Cell Counts after Various Physico-Chemical Treatments. **PloS ONE**, v.10, n.12, e0146071, 2015.

LÜCKING, G., FRENZEL, E., RÜTSCHLE, A., MARXEN, S., STARK, T. D., HOFMANN, T., SCHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M. Ces locus embedded proteins control the non-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n.1001, 2015.

LUU-THI, H., KHADKA, D. B., MICHELS, C. W. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.189, p.183-188, 2014.

MACFADIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: The Willians & Willians**, p.312, 1976.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B., *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.6, p.2745-2754, 2007.

MARSTON, C.K.; IBRAHIM, H.; LEE, P.; CHURCHWELL, G.; GUMKE, M.; STANEK, D.; GEE, J.E.; BOYER, A.E.; GALLEGOS-CANDELA, M.; BARR, J. R.; LI, H.; BOULAY, D.; CRONIN, L.; QUINN, C. P.; HOFFMASTER, A.R., Anthrax toxin-expressing *Bacillus cereus* isolated from an anthrax-like eschar. **PloS ONE** v.11, n.6), e0156987, 2016.

MASIELLO, S.N.; MARTIN, N.H.; WATTERS, R.D.; GALTON, D.M.; SCHUKKEN, Y.H.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J., Identification of dairy farm management practices associated with the presence of psychrotolerant sporeformers in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.7, p.4083-4096, 2014.

MCAULEY, C.M.; MCMILLAN, K.; MOORE, S.C.; FEGAN, N.; FOX, E.M., Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.12, p.7402-7412, 2014.

MILLER, R.A.; KENT, D.J.; WATTERSON, M.J.; BOOR, K.J.; MARTIN, N.H.; WIEDMANN, M.,. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.12, p.8492-8504, 2015.

MOLS M, DE BEEN M, ZWIETERING MH, MOEZELAAR R, ABEE T. Metabolic capacity of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics. **Environmental Microbiology**, v. 9, p.2933–2944, 2007.

MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.650-653, 1967.

NEWELL, D.G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J.V.D.; KRUSE, H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v.139 (Suppl. 1), S13-s15, 2010.

NGAMWONGSATIT, P., BUASRI, W., PIANARIYANON, P., PULSRIKARN, C., OHBA, M., ASSAVANIG, A., PANBANGRED, W. 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.3, p.352-356, 2008.

OKINAKA R.T., CLOUD K., HAMPTON O., HOFFMASTER A.R., HILL K.K., KEIM P., KOEHLER, T.M., LAMKE, G., KUMANO, S., MAHILLON, J., MANTER, D., MARTINEZ, Y., RICKE, D., SVENSSON, R., JACKSON, P.J Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.6509-6515, 1999.

OUHIB, O., CLAVEL, T., SCHMITT, P. The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. **Current Microbiology** v.53 n.3, p.222-226, 2006.

PRIEST, F. G., BARKER, M., BAILLIE, L. W., HOLMES, E. C., MAIDEN, M. C. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.23, p.7959-7970, 2004.

RAYMOND, B., WYRES, K.L., SHEPPARD, S.K. ELLIS, R.J., BONSALL, M.B. Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. **Plos Pathogens**, v.6, n.5, e1000905, 2010.

RAYMOND, B., BONSALL, M.B. Cooperation and the evolutionary ecology of bacterial virulence: the *Bacillus cereus* group as a novel study system. **Bioessays**. v.35, n.8, p.706-716, 2013.

REIS, A.L.S., MONTANHINI, M.T.M., BITTENCOURT, J.V.M., DESTRO, M.T., BERSOT, L.S. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.4, p.1195-1198, 2013.

SALUSTIANO, V.C.; ANDRADE, N.J.; SOARES, N.F.F.; LIMA, J.C.; BERNARDES, P.C., LUIZ, L. M.P.; FERNANDES, P.E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v.20, n.4), p.439-442, 2009.

SASAHARA, T.; HAYASHI, S.; MORISAWA, Y.; SAKIHAMA, T.; YOSHIMURA, A.; HIRAI, Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. **European Journal of. Clinical. Microbiology & Infectious Diseases**, v.30, n.2, p.219-226, 2011.

SCHAEFER, G.; CAMPBELL, W.; JENKS, J.; BEESLEY, C.; KATSIVAS, T.; HOFFMASTER, A.; MEHTA, S.R.; REED, S. Persistent *Bacillus cereus* bacteremia in 3 persons who inject drugs, San Diego, California, USA. **Emerging and Infectious Diseases**, v.22, n.9, 1621, 2016.

SCHMID, D.; RADEMACHER, C.; KANITZ, E. E.; FRENZEL, E.; SIMONS, E.; ALLERBERGER, F.; EHLING-SCHULZ, M. Elucidation of enterotoxigenic *Bacillus cereus* outbreaks in Austria by complementary epidemiological and microbiological investigations, 2013. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p.80-86, 2016.

SHAHEEN, R.; SVENSSON, B.; ANDERSSON, M. A.; CHRISTIANSSON, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiology**, v.27, n.3, p.347-355, 2010.

SHARIF, F.A.; ALAEDDINOGLU, N.G. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.227-229, 1988.

SHEPPARD, S.K., JOLLEY, K.A., MAIDEN, M.C.J. A Gene-By-Gene Approach to Bacterial Population Genomics: Whole Genome MLST of *Campylobacter*. **Genes**, v.3, n.2, p.261-277, 2012.

SIMONSEN, M., MAILUND, T., PEDERSEN, C.N.S. Rapid Neighbour-Joining. In **Proceedings of the 8th Workshop in Algorithms in Bioinformatics (WABI)**, LNBI 5251, p.113-122, Springer Verlag, 2008.

SINEVA, E.V., ANDREEVA, Z.I., SHADRIN, A.M., GERASIMOV, Y.L., TERNOVSKY, V.I., TEPLOVA, V.V., YURKOVA, T.V., SOLONIN, A.S. Expression of *Bacillus cereus* hemolysin II in *Bacillus subtilis* renders the bacteria pathogenic for the crustacean *Daphnia magna*. **FEMS Microbiology Letters**, v.299, p.110–119, 2009.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Bulletin of International Dairy Federation**, v.75, p.15-18, 1992.

SVENSSON, B., MONTHAN, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, M. A., SALKINOJA-SALONEN, M., & CHRISTIANSSON, A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. **International Dairy Journal**, v.16, n.7, p.740-749, 2006.

THORSEN, L., HANSEN, B. M., NIELSEN, K. F., HENDRIKSEN, N. B., PHIPPS, R. K., BUDDE, B. B. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.7, p.5118-5121, 2006.

TRAN, S.L., GUILLEMET, E., NGO-CAMUS, M., CLYBOUW, C., PUHAR, A., MORIS, A., GOHAR, M., LERECLUS, D., RAMARAO, N., Hemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. **Cell Microbiology** v.13, p.92–108, 2011.

TRAN, S. L., GUILLEMET, E., LERECLUS, D., RAMARAO, N. Iron regulates *Bacillus thuringiensis* haemolysin hlyII gene expression during insect infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.113, n.3, p.205-208, 2013.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI JR., O.D., BÜRGER, K.P.; CARDOZO, M.V., SALLOTI, B., CORTEZ, A.L.C. Enterotoxigenic *Bacillus cereus* in different phases of the UHT milk process. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, p.32-38, 2006.

VIDAL-MARTINS, A.M.C., BÜRGER, K.P., GONÇALVES, A.C.S., GRISÓLIO, A.P.R., AGUILAR, C.E., ROSSI, G.A.M. Evaluation of consumption of milk and its informal derivatives and the knowledge of population about the public health problems in a municipal district in São Paulo State, Brazil. **Boletim da Indústria Animal**, v.70, n.3, p.221-227, 2013.

VISSERS, M.M.M.; TE GIFFEL, M.C.; DRIEHUIS, F.; DE JONG, P.; LANKVELD, J.M.G. Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.1, p.281-292, 2007.

ZHOU, G.; BESTER, K.; LIAO, B.; YANG, Z.; JIANG, R.; HENDRIKSEN, N.B. Characterization of three *Bacillus cereus* strains involved in a major outbreak of food poisoning after consumption of fermented black beans (douchi) in Yunan, China. **Foodborne Pathogens & Diseases**, v.11, n.10, p.769-774, 2014.

YANG, Y., YU, X., ZHAN, L., CHEN, J., ZHANG, Y., ZHANG, J., MEI, L. Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China. **Food Microbiology**, v.62, p.46-50, 2017.

WONG, H. C., CHANG, M. H., FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.3, p.699-702, 1988.

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO DE TOXINAS DIARREICAS DE *Bacillus cereus* s.s. DURANTE A “SHELF-LIFE” DE LEITE PASTEURIZADO PRODUZIDO COM MATÉRIA PRIMA EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADA

RESUMO

O *Bacillus cereus* s.s. é capaz de causar surtos alimentares, sendo sua ocorrência reportada em uma ampla variedade de alimentos devido à capacidade de sobrevivência dos seus esporos aos tratamentos térmicos utilizados durante o processamento de alimentos, inclusive nos produtos lácteos. Assim, objetivou-se avaliar a viabilidade do processo de tindalização de leite cru refrigerado e determinar se o processo de pasteurização do leite influencia na expressão dos genes relacionados à produção das toxinas diarreicas pelo *B. cereus* s.s. em leite experimentalmente contaminado. Para isso, realizou-se um processo de tindalização de leite cru refrigerado e então foi realizada a contaminação com inóculo de um isolado potencialmente toxigênico, e posteriormente o mesmo foi pasteurizado, envasado e mantido em refrigeração durante 10 dias. Em momentos determinados (antes da pasteurização, imediatamente após a pasteurização, e 5 e 10 dias de “shelf-life”), foram coletadas amostras do produto afim de avaliar a expressão dos genes codificadores de toxinas (*cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* e *hblD*). O protocolo de tindalização utilizado permitiu redução logarítmica da população de bactérias do grupo do *B. cereus*. Foi possível detectar a expressão do gene *hblA* em amostras de leite 5 e 10 dias após a pasteurização. Conclui-se que o modelo proposto de tindalização do leite cru e contaminação experimental com isolado potencialmente patogênico do grupo do *B. cereus* foi adequado e que a expressão do gene *hblA* não foi inibida após a realização da pasteurização do leite, demonstrando o potencial risco aos consumidores decorrentes do consumo de leite pasteurizado contaminado. Entretanto, novas repetições do experimento se fazem necessárias.

Palavras-chave: microbiologia, qPCR, tindalização, saúde pública, segurança de alimentos

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Bacillus cereus* s.s. (*sensu stricto*) possui relevância para a saúde pública devido à possibilidade de ocorrência de surtos transmitidos por alimentos (ZHOU et al., 2014; SCHIMD et al., 2016). Segundo Bennet et al. (2013), *B. cereus* foi responsável por aproximadamente 19% dos surtos alimentares reportados nos Estados Unidos da América entre 1998 e 2008. Também, alguns isolados possuem capacidade de causar outras formas clínicas, como bacteremia e a doença antraz pela transferência de material genético, mediada por plasmídeos entre as diferentes espécies do grupo (MARSTON et al., 2016; SCARFF et al., 2016).

As síndromes gastroentéricas (diarreica e emética) observadas durante as intoxicações alimentares causadas por esses microrganismos ocorrem pela ação de pelo menos quatro toxinas distintas (EHLING-SCHULZ et al., 2004). A síndrome emética ocorre após a ingestão de uma toxina termoestável pré-formada nos alimentos (cereulide), cujos genes codificadores (*ces*) são localizados em plasmídeos (LÜCKING et al., 2015). Já a síndrome diarreica ocorre após a ingestão de alimentos contaminados com células viáveis dessas bactérias e consequente produção de três toxinas distintas no intestino - toxina hemolítica, enterotoxinas não-hemolítica e citotoxina K, codificadas pelos genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC* e *cytK* (MCKILLIP, 2000; ARSLAN et al., 2014; DIDIER et al., 2016).

Entretanto, a presença desses genes não reflete o real potencial de risco à saúde dos consumidores, visto que a produção das toxinas diarreicas é dependente de complexos mecanismos gênicos regulatórios. Jeßberger et al. (2015) observaram que transcrição dos genes *nheB* e *hblD* e a titulação das proteínas Nhe e HbL revelaram diferenças em relação às cepas e incongruência em relação a transcrição dos genes e a quantidade de proteína detectada. Concluíram, então, que a produção de toxinas possivelmente envolve diversos fatores tais quais proteínas reguladoras da transcrição, mecanismos pós-transcrição e pós-translação (que afetam a estabilidade do RNAm, durabilidade da proteína ou resistência à proteases), além de influência de fatores ambientais.

A complexidade da regulação gênica ligada à produção da toxina emética também é reportada na literatura. Kranzler et al. (2016) evidenciaram que a produção da toxina cereulide é altamente dependente de temperatura, que influencia nos processos de pós-transcrição do RNA e altera a composição das isoformas formadas. Também, Dommel et al. (2011) demonstraram que a produção de cereulide era inibida enquanto as bactérias continuavam a se multiplicar utilizando diferentes concentrações de NaCl, concluindo que essa produção é complexa e sofre interações de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos.

As toxiinfecções causadas por esses microrganismos podem ocorrer devido ao consumo de uma ampla variedade de alimentos, principalmente aqueles termicamente tratados, visto que esses microrganismos possuem capacidade de produzir esporos (DAELMAN et al., 2013), os quais poderão germinar e as novas células vegetativas se multiplicarem quando as condições intrínsecas e extrínsecas dos alimentos apresentarem-se satisfatórias. A ocorrência desses microrganismos nesses produtos implica não somente em risco à saúde dos consumidores, mas também em perdas econômicas para os laticínios devido à ação espoliativa que ocorre pela ação de proteases e lipases (KUMARI; SARKAR, 2016).

O *B. cereus* s.s. possui importância para a cadeia produtiva do leite e produtos lácteos devido à capacidade de sobrevivência dos esporos aos processos de pasteurização (EVELYN et al., 2015). Diversos trabalhos relatam a presença de bactérias do grupo do *B. cereus* em produtos lácteos, os quais foram tratados termicamente, como o leite pasteurizado (BARTOSZEWICZ et al., 2008), leite UAT (VIDAL et al., 2016), queijos (FADDA et al., 2012), leite em pó e leite fermentado (WONG et al., 1988).

Recentemente, diversas técnicas têm surgido no intuito de reduzir e/ou eliminar os esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* (LØVDAL et al., 2011; KIM et al., 2012), dentre tais a denominada tindalização. Ainda, não existe um processo utilizado industrialmente que seja capaz de eliminar os esporos desse grupo de bactérias nos alimentos, sendo a tindalização um processo capaz de reduzir as populações desses microrganismos devido à utilização de tratamentos térmicos seguidos por etapas de resfriamento, e realização de novo tratamento térmico, o que

permite a germinação dos esporos e subsequente destruição das novas células vegetativas (LØVDAL et al., 2011; KIM et al., 2012); entretanto, possui baixa aplicabilidade industrial pelos longos períodos de tempo necessários para sua eficácia.

Assim, diante do exposto, objetivou-se verificar a viabilidade da tindalização do leite cru refrigerado e determinar se o processo de pasteurização do leite influencia na expressão dos genes relacionados à produção das toxinas diarreicas pelo *B. cereus* s.s em leite experimentalmente contaminado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Inicialmente, o leite cru refrigerado foi tratado termicamente por um processo de tindalização, visando eliminar células vegetativas e esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* a fim de reduzir a possibilidade da presença desses microrganismos no leite a ser contaminado experimentalmente e interferência na análise dos resultados. Posteriormente, realizou-se a contaminação experimental do leite com um inóculo contendo 10^8 UFCL/mL de um isolado com elevado potencial toxigênico (SAMN07414939) devido à presença dos genes *cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* e *hblD*.

A partir dessa etapa, o leite experimentalmente contaminado foi pasteurizado, envasado e mantido sob refrigeração (4°C) durante 10 dias, sendo coletadas amostras nos seguintes momentos: após a tindalização (Tindalizado - T), antes da pasteurização (Tindalizada e contaminada – TC), imediatamente após a pasteurização (Contaminada e Pasteurizada – CP), cinco dias em refrigeração (CPD+5) e 10 dias em refrigeração (CPD+10). Foram realizadas três repetições (R1, R2, R3) utilizando esse modelo experimental. Como esse estudo objetiva avaliar a expressão de genes ligados à produção de toxinas por células vegetativas desse grupo de microrganismos, as amostras CP, CPD+5 e CPD+10 foram incubadas por

6 horas a 30°C com o objetivo de dar condições para os esporos sobreviventes germinarem e se tornarem novas células vegetativas.

Todas as amostras (T, TC, CP, CPD+5 e CPD+10) foram utilizadas para ser realizado o isolamento em ágar seletivo e as amostras TC, CP, CPD+5 e CPD+10 para extração de RNA e qPCR para avaliação da expressão dos genes alvos desse estudo.

2.1 Tindalização do leite e avaliação de sua eficácia

A tindalização foi realizada utilizando 30 litros de leite cru refrigerado, o qual foi contaminado com esporos de *B. cereus* s.s. (10^5 esporos/mL) em um equipamento logurteira Mec Milk® previamente sanitizado, pertencente ao laticínio da prefeitura do Campus USP Fernando Costa, localizado em Pirassununga. O protocolo de tindalização utilizado nesse experimento foi executado de acordo com o trabalho de Kim et al. (2012), modificado. Cada ciclo de tindalização consistiu em aquecer o leite em constante agitação a 80°C por 10 minutos, seguido por resfriamento a 30°C por 30 minutos para induzir a germinação dos esporos, e posterior aquecimento à 95° por 20 minutos para destruição das células vegetativas. Foram realizados três ciclos consecutivos de tindalização, sendo que uma amostra era retirada e analisada em relação à presença de *B. cereus* após cada ciclo desse processo, a fim de se avaliar a redução logarítmica da contagem de microrganismos desse grupo através dos ciclos. A tindalização do leite foi realizada em três repetições.

Para a obtenção dos esporos e contaminação do leite cru refrigerado, foram inoculados 0,1 mL de cultura de um isolado de *B. cereus* s.s. em tubo contendo TSA (tryptic soy agar) inclinado. Após incubação por sete dias a 30°C, os esporos foram lavados da superfície com água destilada estéril e centrifugados. Para destruição das células vegetativas, foi utilizado tratamento térmico a 80°C por 60 segundos em banho-maria (GIFFEL, 1997). Para determinação do volume a ser inoculado no leite, realizou-se a diluição seriada (até 10^{-9}), em que 1mL da suspensão era adicionado em 9mL de água peptonada esterilizada (0,1%), e assim sucessivamente. Alíquotas

de 0,1mL foram então transferidas para Placas de Petri contendo Ágar Bacillus Cereus ou Ágar Manitol-Gema-De-Ovo-Polimixina (MYP) e essas incubadas a 30°C por 24 horas (MOSSEL et al., 1967, STADHOUDERS, 1992), para então ser realizada a contagem de colônias sugestivas e determinar o volume do inóculo a ser utilizado para atingir a contagem de 10^5 a 10^6 esporos/mL no leite cru refrigerado (LØVDAL et al., 2011).

2.2. Contaminação experimental do leite tindalizado

O isolado SAMN07414939 (Bioprojeto PRJNA390851), pertencente ao grupo filogenético IV do grupo do *B. cereus* (GUINEBRETIÈRE et al., 2008) foi selecionado entre 69 isolados obtidos na cadeia produtiva de leite e produtos lácteos no Brasil que tiveram seus genomas sequenciados pela técnica de “next generation sequencing”. Esse isolado foi selecionado por carrear todos os genes alvos de interesse desse estudo (*cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* e *hblD*).

Nesse estudo foi utilizado um inóculo preparado com 30µL de cultura do isolado em tubos contendo 15mL de caldo BHI (brain heart infusion) após incubação por 10 horas a 30°C, foi inoculado o volume de 15mL em 30 litros de leite, o que permitiu a contaminação com 10^8 UFC/mL, a fim de se obter a quantidade necessária de material genético para realização das análises moleculares.

2.3. Pasteurização do leite

A contaminação experimental do leite tindalizado e a pasteurização do leite foram realizadas no laticínio da prefeitura do Campus USP Fernando Costa localizado em Pirassununga. Utilizou-se a pasteurização rápida (72-75°C durante 15 a 20 segundos) como tratamento térmico de 30 litros de leite tindalizado e contaminado conforme descrito em 2.2. Após a pasteurização, o leite foi envasado em embalagens de 1litro as quais foram mantidas em refrigeração a 4°C durante 10 dias.

2.4 Isolamento em Placas

Alíquotas de 0,1mL das amostras de leite T, TC, CP, CPD+5 e CP+10 foram transferidas para Placas de Petri contendo Ágar *Bacillus Cereus* ou Ágar Manitol-Gema-De-Ovo-Polimixina (MYP) e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas (MOSSEL et al., 1967, STADHOUDERS, 1992), para então ser realizada a verificação de colônias sugestivas de bactérias do grupo do *B. cereus*.

2.5 Extração do RNA e qPCR

O RNA bacteriano foi extraído diretamente de duas amostras contendo 2mL de leite mencionadas no delineamento experimental, utilizando o kit TRIzol™ Bacterial RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade de RNA extraído das amostras foi avaliada em equipamento DeNovix®. O RNA extraído foi tratado com Ambion DNase I (RNase-free) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 2%. Posteriormente, foi submetido à transcrição reversa para obtenção de cDNA utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com instruções do fabricante.

Para realização da qPCR foi utilizado o sistema SYBR GREEN (Fast SYBR™ Green Master Mix – ThermoFisher Scientific) para detecção dos diferentes *amplicons* em equipamento StepOne™ Real-Time PCR System. O gene 16s foi selecionado como controle endógeno de amplificação (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000) e quantificação relativa (comparação CT- $\Delta\Delta CT$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para fins de direcionamento dos fragmentos de genes a serem amplificados, a seleção de primers foi realizada utilizando a sequência dos genes alvo desse estudo (*nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK*) determinada pelo sequenciamento do genoma completo do isolado utilizado nesse estudo (BioSample SAMN07414939). Para elaboração dos primers, foi utilizada a ferramenta online

Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os primers utilizados no presente estudo encontram-se descritos na Tabela 1.

A eficiência dos primers foi avaliada de acordo com Livak e Schmittgen, (2001), sendo utilizados os gráficos de amplificação das amostras do isolado 07 cultivadas em caldo BHI (2mL) após incubação por 12 horas, sendo que nesses tubos foi inoculado 10µL da cultura pura desse isolado. A amplificação foi estabelecida através de cinco curvas de qPCR elaboradas com distintas quantidades de material genético, sendo a quantidade inicial utilizada de 50ng, com posterior diluição serial das amostras na proporção de 1:3 (5uL de cDNA em 10uL de água DPEC).

Tabela 1. Genes alvo e oligonucleotídeos de iniciação (primers) selecionados para a realização das reações em cadeia da polimerase (qPCR).

Genes	Primers	Produto
<i>16S_f</i>	TGATGAAGGCTTTCGGGTCG	139
<i>16S_r</i>	TGCCACCTACGTATTACCGC	139
<i>nheA_f</i>	CCGCTTATTCAAGCATACGGA	111
<i>nheA_r</i>	CTCTCGTACATTGCGCTTTGC	111
<i>nheB_f</i>	TAGTTATTGCTACGGGCGCA	89
<i>nheB_r</i>	GATACCAGCTGTACCACCGC	89
<i>nheC_f</i>	TGGCGTACTTTGCGTAGCTC	139
<i>nheC_r</i>	TACGACTTCTGCTTGTGCTCC	139
<i>hblA_f</i>	GAACAAATGCGCCAAATGCG	82
<i>hblA_r</i>	TTAGCCCCCTCCACTCCACAT	82
<i>hblC_f</i>	GCAACACCAATCGTTCAAGC	150
<i>hblC_r</i>	AGCTGGGACTTCCTCTAGCTG	150
<i>hblD_f</i>	TCAATTGGTGGTGGATTGGGA	134
<i>hblD_r</i>	ATACCAGCTGCGCCAAGAG	134
<i>cytK_f</i>	CTGCTGCTTACGCTCAAACG	148
<i>cytK_r</i>	GCGCTCGGATCATCGATAAAAG	148

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tindalização do leite e avaliação de sua eficácia

A população média de microrganismos pertencentes ao grupo do *B. cereus* observada nas três repetições de tindalização realizadas no presente estudo antes do início do primeiro ciclo foi de 3 log UFC/mL, sendo que após o primeiro, segundo e terceiro ciclos foi de 2,15; 1,18 e 0 log UFC/mL, respectivamente. No primeiro e segundo ciclos de tindalização, as reduções encontradas nas populações de bactérias do grupo do *B. cereus* foram de 0,85 log UFC/mL e 0,97 log UFC/mL,

sendo que na última etapa do processo as populações bacterianas não foram detectadas (Figura 1), demonstrando sua eficácia.

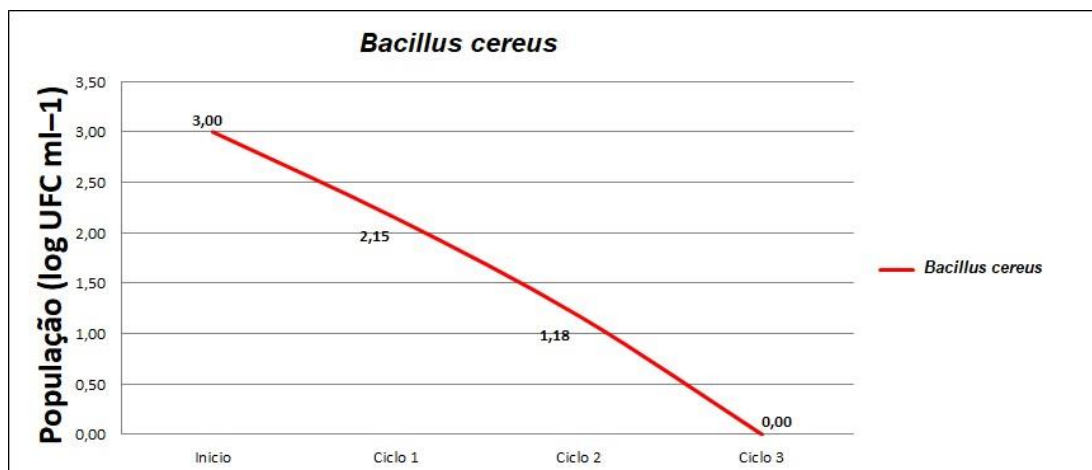


Figura 1. Contagens médias das populações de *Bacillus cereus* em três repetições de tindalização de trinta litros de leite cru refrigerado, contaminado com 10^5 esporos/mL, de acordo com o protocolo de Kim et al. (2012) modificado, sendo cada repetição composta por três ciclos sequenciais.

Também, nas amostras de leite tindalizado (T) obtidas nas três repetições do estudo (R1, R2 e R3), não se verificou a presença de colônias sugestivas de bactérias do grupo do *B. cereus*, o que permitiu a utilização no modelo experimental inicialmente proposto.

Poucos estudos que avaliaram a eficácia da tindalização na eliminação de esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* foram realizados até o momento. Outras metodologias de tindalização, com temperaturas similares as utilizadas, foram realizadas em outros tipos de alimentos (KIM et al., 2012; LØVDAL et al., 2011). Analisando a diminuição das populações de esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* em um tipo de bebida de arroz vendida na Coreia, a redução encontrada quando aplicada um ciclo de tindalização foi de 4,9 log UFC (KIM et al., 2012), demonstrando a eficácia desse método.

A análise dos resultados desse estudo permite inferir que houve uma eliminação das células vegetativas e esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* no leite tindalizado ou no mínimo uma redução a níveis indetectáveis através do método utilizado, sendo tal protocolo adequado para utilização em estudos que necessitam obter um leite não contaminado com esses microrganismos para realização de contaminação experimental.

Contaminação experimental do leite, pasteurização e isolamento em placas

O inóculo de 15mL de BHI contendo o isolado SAMN07414939 foi utilizado em três repetições do experimento, sendo que nas amostras TC, CP, CPD+5 e CPD+10 das três repetições (R1, R2 e R3) foi possível observar colônias características nas placas contendo ágar seletivo, demonstrando a sobrevivência do microrganismo ao processo de pasteurização rápida.

Eficiência dos primers e qPCR

Os gráficos de amplificação de diferentes concentrações de cDNA utilizando os primers elaborados no presente estudo para quantificação da expressão dos genes 16S, *cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* e *hblD* podem ser visualizadas na Figura 2.

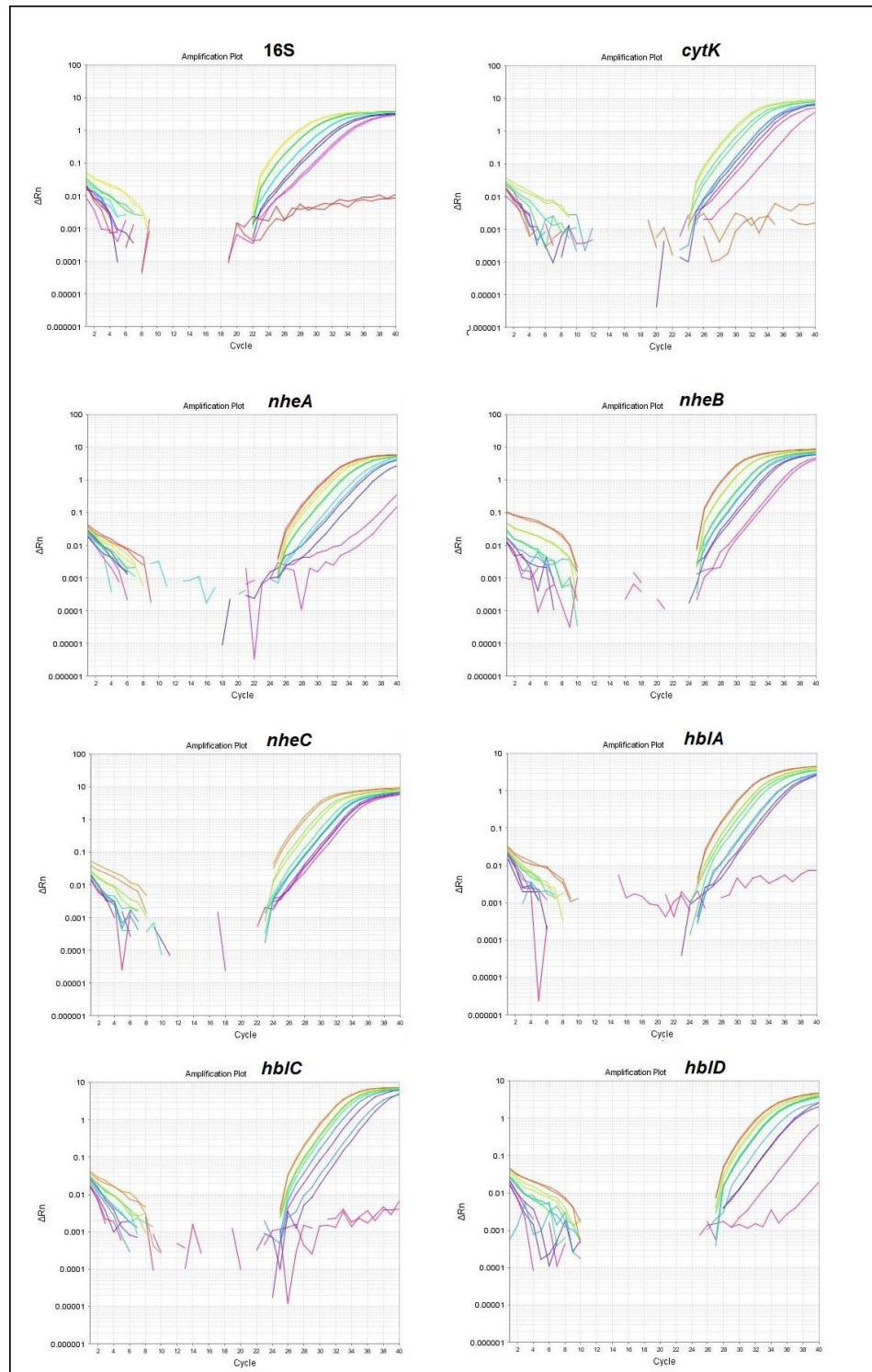


Figura 2. Amplificação de diferentes concentrações de cDNA com primers para 16S, *cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* e *hblD*.

A eficiência dos primers baseado nos valores obtidos na curva padrão foi estabelecida de acordo com Livak e Schmittgen (2001) (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência e eficiência relativa dos primers elaborados nesse estudo para realização da técnica de qPCR dos genes *16S*, *cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* e *hblD* utilizando a sequência genômica do isolado SAMN07414939 e a ferramenta Primer-BLAST.

Genes	Eficiência	Eficiência relativa
16S	98,35	-
<i>cytK</i>	107,88	0,11
<i>nheA</i>	105,47	0,0084
<i>nheB</i>	129,99	0,0071
<i>nheC</i>	145,41	0,0002
<i>hblA</i>	125,23	0,07
<i>hblC</i>	112,96	0,02
<i>hblD</i>	151,2	0,47

Após a constatação da eficiência do protocolo de tindalização e dos primers elaborados para a realização da qPCR dos genes alvos, realizaram-se três repetições do modelo experimental proposto nesse estudo, em que se contaminou o leite tindalizado com inóculo de células vegetativas de um isolado com elevado potencial toxigênico, e posteriormente realizou-se a pasteurização e conservação em refrigeração (4°C) durante 10 dias, com colheita de amostras em datas pré-determinadas (TC, CP, CPD+5 e CPD+10) a fim de se confirmar a presença do microrganismo pelo isolamento em ágar MYP ou *Bacillus cereus*, e realização da extração do RNA bacteriano das amostras.

Em todas as amostras foi observada a presença da bactéria nas placas de ágar MYP ou *Bacillus cereus*, demonstrando a capacidade de sobrevivência do isolado ao processo de pasteurização rápida, conforme reportado na literatura para bactérias desse grupo de microrganismos (VIDAL et al., 2016). Então, foi realizada a extração do RNA bacteriano diretamente das amostras de leite, sendo que a concentração nas amostras pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de RNA extraído nas amostras de leite tindalizado e contaminado (TC), contaminado e pasteurizado (CP), contaminado e pasteurizado e mantido em refrigeração por 5 dias (CPD+5) e contaminado e pasteurizado e mantido em refrigeração por 10 dias (CPD+10). Todas as amostras biológicas foram extraídas em duplicatas (1 e 2) e foram realizadas três repetições experimentais (1, 2 e 3).

REPETIÇÃO	AMOSTRA (22 uL)	CONCENTRAÇÃO (ng/uL)
1	TC(1)	100,810
1	TC(2)	81,409
1	CP(1)	94,475
1	CP(2)	127,66
1	CPD+5 (1)	234,741
1	CPD+5 (2)	161,071
1	CPD+10 (1)	521,954
1	CPD+10(2)	619,628
2	TC(1)	246,090
2	TC(2)	193,398
2	CP(1)	52,914
2	CP(2)	159,51
2	CPD+5 (1)	766,986
2	CPD+5 (2)	860,252
2	CPD+10 (1)	472,76
2	CPD+10(2)	450,94
3	TC(1)	125,284
3	TC(2)	91,434
3	CP(1)	119,227
3	CP(2)	208,593
3	CPD+5 (1)	407,31
3	CPD+5 (2)	407,34
3	CPD+10 (1)	401,33
3	CPD+10(2)	455,53

Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, sendo que em apenas três amostras foi possível verificar que o RNA extraído apresentava-se íntegro e que poderia ser utilizado para tratamento com DNase I, transcrição reversa (cDNA) e qPCR, sendo elas: CP – repetição 3 (CP.R3), CPD+5 – repetição 2 (CPD+5.R2) e CPD+10 – repetição 1 (CPD+10.R1).

O gene *hblA*, responsável pela produção da fração B da toxina hemolítica, que possui função de sensibilizar as células intestinais para posterior citólise pelas

demais frações (McKILLIP, 2000), foi selecionado para se determinar sua expressão relativa nessas amostras. Na Figura 3, pode-se observar a adequada eficiência relativa (comparação CT- $\Delta\Delta$ CT) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) dos primers *hblA* e 16S.

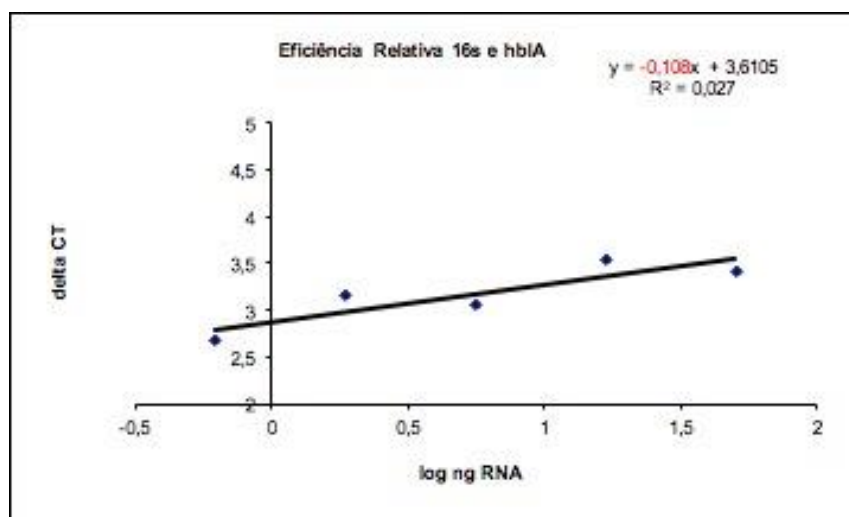


Figura 3. Eficiência relativa dos primers 16S e *hblA* elaborados nesse estudo.

Já na Figura 4 é apresentada a expressão relativa do gene *hblA* nas amostras CPD+5.R2 e CPD+10.R1 em relação à amostra CP.R3, sendo possível verificar a persistência do potencial para produção de toxina hemolítica pelo isolado selecionado nesse experimento, mesmo após a realização do processo de pasteurização do leite, demonstrando o possível risco à saúde do consumidores decorrente do consumo de produtos lácteos, mesmo que tratados termicamente, uma vez que esses se apresentem contaminados. Entretanto, novas repetições do experimento se fazem necessárias visando estabelecer o real efeito desse processamento na expressão dos genes alvos do estudo.

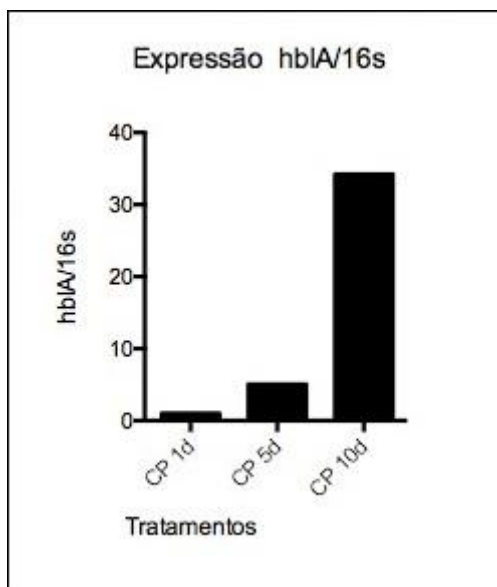


Figura 4. Expressão relativa dos genes 16S e *hblA* nas amostras CP.R2, CPD+5.R3 e CPD+10.R1 estabelecida de acordo com Livak e Schmittgen, (2001).

4. Conclusões

Conclui-se que o modelo proposto de tindalização do leite cru refrigerado e posterior contaminação experimental do leite com isolados patogênicos do grupo do *B. cereus* foi adequado. Também, que a expressão do gene *hblA* do isolado não foi inibida após a realização da pasteurização do leite, sendo a atividade detectada em até 10 dias de “shelf-life” do leite pasteurizado, demonstrando o potencial risco aos consumidores decorrentes do consumo de leite pasteurizado contaminado com esses microrganismos. Entretanto, novas repetições do experimento se fazem necessárias.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 2014/13104-1, 2015/20874-0 e 2016/19214-9).

REFERÊNCIAS

- ANKOLEKAR, C., LABBÉ, R.G. Survival during cooking and growth from spores of diarrheal and emetic types of *Bacillus cereus* in rice. **Journal of Food Protection**, V.72, p.2386–2389, 2009.
- ANTOLINOS, V.; ESTEBAN, M.D.; ROS-CHUMILLAS, M., HUERTAS, J.P.; PERIAGO, P.M.; PALOP, A.; FERNÁNDEZ P.S. Assessment of the of acid shock effect on viability of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* using flow cytometry. **Food Research International**, v.66, p.306-312, 2014.
- ARSLAN, S.; EYI, A.; KÜÇÜKSARI, R. Toxic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. **Anaerobe**, v. 25, p. 42-46, 2014.
- BANKEVICH A., NURK S., ANTIPOV D., GUREVICH A., DVORKIN M., KULIKOV A. S., LESIN V., NIKOLENKO S., PHAM S., PRJIBELSKI A., PYSHKIN A., SIROTKIN A., VYAHHI N., TESLER G., ALEKSEYEV M. A., PEVZNER P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v.19, n.5, p.455-477, 2012.
- BARTOSZEWICZ H., HANSEN B. M., SWIECICKA I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v.25, p.588-96, 2008.
- BENNET, S. D.; WALSH, K. A.; GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* — United States, 1998–2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n.3, p. 425-433, 2013.
- DAELMAN, J., VERMEULEN, A., WILLEMYNS, T., ONGENAERT, R., JACXSENS, L., UYTENDAELE, M., DEVLIEGHERE, F. Growth/no growth models for heat-treated psychrotrophic *Bacillus cereus* spores under cold storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.161, n.1, p.7-15, 2013.
- DOMMEL, M. K.; LUCKING, G.; SCHERER, G.; EHLING-SCHULZ, M. Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. **Food Microbiology**, v. 28, p. 284-290, 2011.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high 1072 throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.1792-1797, 2004.
- EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 479-487, 2004.
- FADDA, A.; DELOGU, A.; MURA E.; NOLI A. C.; PORQUEDDU G.; ROSSI M. L.; TERROSU G. Presenza di *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae* in ricotta fresca e salata: controlli ufficiali in El periodo 2009 – 2012. **Italian Journal of Food Safety**, v.1 n. 5, 2012.
- GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; LONGVELD, L. P. M.; ROMBOUTS, F. M. The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy

processing plants. **International Journal of Dairy Technology**, v.50, n2, p.43-47, 1997.

JEßBERGER, N.; KREY, V. M.; RADEMACHER, C.; BÖHM, M. E.; MOHR, A. K.; EHLING-SCHULZ, M.; SCHERER, S.; MÄRTLBAUER, E. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.560, 2015.

JOLLEY, K.A.; MAIDEN, M.C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v.11, 595, 2010.

KIM, H.; KIM, H.; BANG, J.; KIM, Y.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization process with and without carbon dioxide injection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p.218-223, 2012.

KRANZLER, M.; STOLLEWERK, K.; ROUZEAU-SZYNALSKI, K.; BLAYO, L.; SULYOK, M.; EHLING-SCHULZ. Temperature exerts control of *Bacillus cereus* emetic toxin production on post-transcriptional levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1640, 2016.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LØVDAL, I. S.; HOVDA, M. B.; GRANUM, P. E.; ROSNES, J. T. Promoting *Bacillus cereus* spore germination for subsequent inactivation by mild heat treatment. **Journal of Food Protection**, v. 74, n.12, p.2079-2089, 2011.

LÜCKING, G., FRENZEL, E., RÜTSCHLE, A., MARXEN, S., STARK, T. D., HOFMANN, T., SCHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M. Ces locus embedded proteins control the non-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 1101, 2015.

MARSTON, C. K.; IBRAHIM, H.; LEE, P.; CHURCHWELL, G.; GUMKE, M.; STANEK, D.; GEE, J. E.; BOYER, A. E.; GALLEGOS-CANDELA, M.; BARR, J. R.; LI, H.; BOULAY, D.; CRONIN, L.; QUINN, C. P.; HOFFMASTER, A. R. Anthrax toxin-expressing *Bacillus cereus* isolated from an anthrax-like eschar. **Plos ONE**, v. 11, n. 6, e0156987, 2016.

McKILLIP, J.L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.77, p.393-399, 2000.

MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.650-653, 1967.

SCARFF, J. M.; RAYNOR, M. J.; SELDINA, Y. I.; VENTURA, C. L.; KOEHLER, T. M.; O'BRIEN, A. D. The roles of AtxA orthologs in virulence of anthrax-like *B. cereus* G9241. **Molecular Microbiology**, v. 102, n. 4, p.545-561, 2016.

SCHMID, D.; RADEMACHER, C.; KANITZ, E. E.; FRENZEL, E.; SIMONS, E.; ALLERBERGER, F.; EHLING-SCHULZ, M. Elucidation of enterotoxigenic *Bacillus cereus* outbreaks in Austria by complementary epidemiological and microbiological

investigations, 2013. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p. 80-86, 2016.

SHEPPARD, S.K., JOLLEY, K.A., MAIDEN, M.C.J. A Gene-By-Gene Approach to Bacterial Population Genomics: Whole Genome MLST of *Campylobacter*. **Genes**, v.3, n.2, p.261-277, 2012.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation.**, n.275, p.15-18, 1992

VIDAL, A. M. C.; ROSSI-JUNIOR, O. D.; ABREU, I. L.; BURGER, K. P.; VEDOVELLI, M.; GONÇALVES, A. C. S.; ROSSI, G. A. M.; ABREU, L. F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 286-292, 2016

ZHOU, G.; BESTER, K.; LIAO, B.; YANG, Z.; JIANG, R.; HENDRIKSEN, N.B.. Characterization of three *Bacillus cereus* strains involved in a major outbreak of food poisoning after consumption of fermented black beans (douchi) in Yunan, China. **Foodborne Pathogens & Diseases**, v. 11, n. 10, p. 769-774, 2014.

WARDA, A. K., TEMPELAARS, M. H., BOEKHORST, J., ABEE, T., GROOT, M. N. N. Identification of CdnL, a putative transcriptional regulator involved in repair and outgrowth of heat-damaged *Bacillus cereus* spores. **PLOS One**, v.11, n.2, e0148670.

WONG, H. C., CHANG, M. H., FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 699-702, 1988.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram uma ampla diversidade de bactérias pertencentes ao grupo do *B. cereus* isoladas em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite e produtos lácteos, desde o ambiente de obtenção do leite nas propriedades rurais, nos laticínios e nos produtos disponíveis para consumo humano. Dentre os isolados obtidos nessa pesquisa, diversos apresentam elevado risco à saúde dos consumidores, como demonstrado pela alta prevalência de genes codificadores de toxinas gastroentéricas e por se tratarem de ST previamente reportados como agentes causadores de surtos de origem alimentar. As bactérias do grupo do *B. cereus* possuem importância não apenas em relação à saúde pública, mas também devido à sua ação deteriorante dos alimentos, que acarreta em perdas econômicas diretas para os laticínios.

As análises realizadas nessa pesquisa enfatizam a necessidade de controle da contaminação do leite e produtos lácteos ainda na propriedade rural até o processamento industrial, a fim de promover redução de custos com a saúde pública e das perdas econômicas. Uma vez que o leite cru pode ser contaminado com esse grupo de bactérias, existe a possibilidade da sobrevivência ao longo de toda cadeia produtiva, e consequente produção de toxinas, mesmo após processamento térmico, conforme foi demonstrado, pondo em risco à saúde dos consumidores. Portanto, a adoção de Boas Práticas de Higiene durante a ordenha e conservação do leite cru nas propriedades rurais é fundamental para mitigar os riscos decorrentes da sua presença em produtos lácteos já processados e promover a segurança alimentar.

É reportado na literatura que as principais fontes de contaminação do leite são as fezes, cama, silagem e o solo do ambiente de ordenha, concordando com a alta prevalência de genes ligados ao metabolismo da sacarose em isolados obtidos do leite cru refrigerado nesse estudo, reforçando que a possível origem da contaminação do produto consiste no próprio ambiente de ordenha e que sua higiene deve ser monitorada e sempre a mais adequada possível.

Ainda, o modelo experimental proposto inicialmente apresenta-se adequado para avaliar a influência da pasteurização na expressão dos genes relacionados com

a produção de toxinas por essas bactérias, devido à eficácia da tindalização e sobrevivência ao processamento térmico do isolado com elevado potencial toxigênico que foi selecionado.

Entretanto, novas repetições se fazem necessárias para permitir avaliar com precisão qual é o efeito da pasteurização na expressão dos genes relacionados com produção de toxinas gastroentéricas, porém isso não foi possível em tempo hábil para ser apresentado nessa tese.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Isolado	ID BIGSDB	BioSample	Detalhes	Isolado	ID BIGSDB	BioSample	Detalhes
1	637	SAMN07414937	Teteira	36	677	SAMN07414972	Utensílio - fazenda de leite
2	638	SAMN07414938	Tubulação de ordenha - fazenda	37	678	SAMN07414973	Teteira
3	640	SAMN07414939	Tubulação de ordenha - fazenda	38	679	SAMN07414974	Teteira
4	641	SAMN07414940	Tubulação de ordenha - fazenda	39	680	SAMN07414975	Utensílio - fazenda de leite
5	642	SAMN07414941	Tubulação de ordenha - fazenda	40	681	SAMN07414976	Tanque de refrigeração
6	643	SAMN07414942	Tubulação - laticínio	41	682	SAMN07414977	Teteira
7	644	SAMN07414943	Equipamentos - laticínio	42	683	SAMN07414978	Latão de leite - fazenda
8	645	SAMN07414944	Equipamentos - laticínio	43	684	SAMN07414979	Utensílio - caminhão transp.
9	646	SAMN07414945	Caminhão transportador	44	685	SAMN07414980	Leite cru
10	647	SAMN07414946	Caminhão transportador	45	686	SAMN07414981	Tanque de refrigeração
11	649	SAMN07414947	Queijo Minas	46	687	SAMN07414982	Tanque de refrigeração
12	650	SAMN07414948	Bebida láctea UAT	47	688	SAMN07414983	Utensílio - fazenda de leite
13	652	SAMN07414949	Utensílios - laticínios	48	689	SAMN07414984	Leite cru
14	653	SAMN07414950	Utensílios - laticínios	49	690	SAMN07414985	Utensílio - fazenda de leite
15	655	SAMN07414951	Utensílio - fazenda de leite	50	691	SAMN07414986	Utensílio - fazenda de leite
16	656	SAMN07414952	Creme preparado com queijo	51	692	SAMN07414987	Leite cru
17	658	SAMN07414953	Cappuccino	52	693	SAMN07414988	Leite cru
18	659	SAMN07414954	Requeijão	53	694	SAMN07414989	Leite cru
19	660	SAMN07414955	Requeijão	54	696	SAMN07414990	Leite cru
20	661	SAMN07414956	Requeijão	55	697	SAMN07414991	Leite cru
21	662	SAMN07414957	Requeijão	56	698	SAMN07414992	Utensílio - fazenda de leite
22	663	SAMN07414958	Requeijão	57	699	SAMN07414993	Utensílio - fazenda de leite
23	664	SAMN07414959	Requeijão	58	700	SAMN07414994	Utensílio - fazenda de leite
24	665	SAMN07414960	Requeijão	59	701	SAMN07414995	Requeijão
25	666	SAMN07414961	Requeijão	60	702	SAMN07414996	Requeijão
26	667	SAMN07414962	Equipamentos - laticínio	61	703	SAMN07414997	Requeijão
27	668	SAMN07414963	Latão de leite - fazenda	62	704	SAMN07414998	Requeijão
28	669	SAMN07414964	Tanque de refrigeração	63	705	SAMN07414999	Requeijão
29	670	SAMN07414965	Utensílio - fazenda de leite	64	706	SAMN07415000	Requeijão
30	671	SAMN07414966	Balde de ordenha - fazenda	65	707	SAMN07415001	Requeijão
31	672	SAMN07414967	Latão de leite - fazenda	66	708	SAMN07415002	Requeijão
32	673	SAMN07414968	Latão de leite - fazenda	67	709	SAMN07415003	Requeijão
33	674	SAMN07414969	Leite cru	68	710	SAMN07415004	Requeijão
34	675	SAMN07414970	Latão de leite - fazenda	69	711	SAMN07415005	Leite cru
35	676	SAMN07414971	Teteira				

APÊNDICE B

(Parte 1)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
1	225	BT 10792	CM000753.1	<i>B. thuringiensis</i>	Ferida necrótica humana - Yugoslavia
2	226	BT 9727	AE017355.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera - Germany
3	227	BT407	CP003889.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
4	228	BT IS5056	CP004123.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
5	229	BT BMB171	CP001903.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
6	230	BT HD-771	CP003752.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
7	231	BT HD-789	CP003763.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
8	232	BT MC28	CP003687.1	<i>B. thuringiensis</i>	Floresta na China
9	233	BT CT-43	CP001907.1	<i>B. thuringiensis</i>	China
10	234	BT YBT-020	CP002508.1	<i>B. thuringiensis</i>	serovar finitimus
11	235	BT HD73	CP004069.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera - France
12	236	BT Al Hakam	CP009651.1	<i>B. thuringiensis</i>	Iraq
13	238	BT DAR 81934	CM001804.1	<i>B. thuringiensis</i>	Australia
14	239	BT IBL 200	CM000758.1	<i>B. thuringiensis</i>	Humano
15	240	BT IBL 4222	CM000759.1	<i>B. thuringiensis</i>	Gato
16	241	BT BGSC 4AW1	CM000754.1	<i>B. thuringiensis</i>	Espanha
17	242	BT BGSC 4BD1	CM000756.1	<i>B. thuringiensis</i>	China
18	243	BT T03a001	CM000751.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
19	244	BT BGSC 4AJ1	CM000752.1	<i>B. thuringiensis</i>	Mexico
20	245	BT t13001	CM000750.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
21	246	BT BGSC 4BA1	CM000755.1	<i>B. thuringiensis</i>	Solo - India
22	247	BT BGSC 4CC1	CM000757.1	<i>B. thuringiensis</i>	Grain Field - Pakistan
23	248	BT T04001	CM000749.1	<i>B. thuringiensis</i>	Canada
24	249	BT T01001	CM000748.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepdopitera
25	250	BT BGSC 4Y1	CM000746.1	<i>B. thuringiensis</i>	Solo - Japão
26	252	BT ATCC 35646	AAJM00000000.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
27	253	BA Ames	AE016879.1	<i>B. anthracis</i>	cepa avirulenta
28	254	BA A0248	CP001598.1	<i>B. anthracis</i>	Humano - Ohio
29	255	BA Steme	AE017225.1	<i>B. anthracis</i>	Desenvolvimento vacina
30	256	BA CDC 684	CP001215.1	<i>B. anthracis</i>	-
31	257	BA Ames Ancestor	AE017334.2	<i>B. anthracis</i>	Padrão ouro
32	258	BA A2012	AAAC01000001.1	<i>B. anthracis</i>	Doença respiratória - Florida
33	259	BA H9401	CP002091.1	<i>B. anthracis</i>	Antrax cutâneo - Humano - Korea
34	260	BA 3154	ANFF01000002.1	<i>B. anthracis</i>	Solo - Bulgaria
35	261	BA 3166	NZ_ANFG00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Solo - Bulgaria
36	262	BA A0174	NZ_ABLT00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Canada
37	263	BA A0193	NZ_ABKF00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - Dakota do Sul/USA
38	264	BA A0389	NZ_ABLB00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Indonésia
39	265	BA A0442	NZ_ABKG00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Antelope - África do Sul
40	266	BA A0465	NZ_ABLH00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - França
41	267	BA A0488	NZ_ABJC00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - UK - alta virulência
42	268	BA A1055	NZ_AAEO01000033.3	<i>B. anthracis</i>	EUA
43	269	BA Australia 94	NZ_AAES01000044.3	<i>B. anthracis</i>	Australia
44	270	BA BF-1	AMDT01000001.1	<i>B. anthracis</i>	Carcassa bovino - Alemanha
45	271	BA CNEVA-9066	NZ_AAEN01000027.3	<i>B. anthracis</i>	França
46	272	BA Carbosap	NZ_ANAO00000000.	<i>B. anthracis</i>	Vacina animal - Itália
47	273	BA Gmb1	NZ_CAVE00000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames
48	274	BA Heroin Ba4599	NZ_AGQP00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Heroína - Escócia
49	275	BA KrugerB	NZ_AAEQ00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Animal - Kruger Nat. Park/África do Sul
50	276	BA Sen2Col2	NZ_CAVC00000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames

APÊNDICE B

(Parte 2)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
51	277	BA Sen3	NZ_CAVD000000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames
52	278	BA Tsiankovskii-I	NZ_ABDN000000000.2	<i>B. anthracis</i>	Rússia
53	279	BA UR-1	ALNY000000000.1	<i>B. anthracis</i>	Usuário de heroína - Alemanha
54	280	BA Vollum	CP007666.1	<i>B. anthracis</i>	UK-Espanha-Zimbabwe
55	281	BA WesternNA USA6153	NZ_AAER000000000.1	<i>B. anthracis</i>	França e América do Norte
56	282	BC ATCC14579	AE016877.1	<i>B. cereus</i>	-
57	283	BC B4264	CP001176.1	<i>B. cereus</i>	Caso de pneumonia fatal
58	284	BC F65185	CM000736.1	<i>B. cereus</i>	Fratura aberta - Nova Iorque
59	285	BC 03BB102	CP009318.1	<i>B. cereus</i>	Pneumonia severa - USA
60	286	BC AH187	CP001177.1	<i>B. cereus</i>	Vômito humano - UK
61	287	BC AH820	CP001283.1	<i>B. cereus</i>	Região Periodontal - Noruega
62	288	BC ATCC10987	AE017194.1	<i>B. cereus</i>	Queijo - Canadá
63	289	BC E33L	CP000001.1	<i>B. cereus</i>	Carcassa de zebra - Namíbia
64	290	BC F0837/76	CP003187.1	<i>B. cereus</i>	Ferida humana
65	291	BC FRI-35	CP003747.1	<i>B. cereus</i>	-
66	292	BC G9842	CP001186.1	<i>B. cereus</i>	Amostra clínica- Nebraska
67	293	BC NC7401	AP007209.1	<i>B. cereus</i>	Síndrome emética
68	294	BC Q1	CP000227.1	<i>B. cereus</i>	Apatogênica
69	295	BC CI	CP001746.1	<i>B. cereus</i>	Caso fatal - chipamzé
70	296	BC 172560W	CM000717.1	<i>B. cereus</i>	Ferida
71	297	BC 95-8201	CM000727.1	<i>B. cereus</i>	Endocardite - UK
72	298	BC AH1271	CM000739.1	<i>B. cereus</i>	Lamp - Island
73	299	BC AH1272	CM000740.1	<i>B. cereus</i>	Fluido Amniótico - Islândia
74	300	BC AH1273	CM000741.1	<i>B. cereus</i>	Sangue humano - Islândia
75	301	BC AH603	CM000737.1	<i>B. cereus</i>	Lácteo
76	302	BC AH621	CM000719.1	<i>B. cereus</i>	Solo - Noruega
77	303	BC AH676	CM000738.1	<i>B. cereus</i>	ATCC
78	304	BC ATCC10876	CM000715.1	<i>B. cereus</i>	-
79	305	BC 4342	CM000721.1	<i>B. cereus</i>	Sensível a fago gama
80	306	BC BDRD-Bcer4	CM000726.1	<i>B. cereus</i>	-
81	307	BC BDRD-ST196	CM000725.1	<i>B. cereus</i>	-
82	308	BC BDRD-ST24	CM000723.1	<i>B. cereus</i>	-
83	309	BC BDRD-ST26	CM000724.1	<i>B. cereus</i>	-
84	310	BC BGSC 6E1	CM000716.1	<i>B. cereus</i>	-
85	311	BC F	CM001787.1	<i>B. cereus</i>	Amostra antiga de permafrost
86	312	BC MM3	CM000718.1	<i>B. cereus</i>	Alimento
87	313	BC R309803	CM000720.1	<i>B. cereus</i>	Septicemia - UK
88	314	BC Rock1-15	CM000729.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
89	315	BC Rock1-3	CM000728.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
90	316	BC Rock3-28	CM000730.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
91	317	BC Rock3-29	CM000731.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
92	318	BC Rock3-42	CM000732.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
93	319	BC Rock3-44	CM000733.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
94	320	BC Rock4-18	CM000735.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
95	321	BC Rock4-2	CM000734.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
96	322	BC m1293	CM000714.1	<i>B. cereus</i>	Cream cheese
97	323	BC mm1550	NZ_CM000722.1	<i>B. cereus</i>	Frango cru - Brasil
98	324	BC 03BB108	CP009641.1	<i>B. cereus</i>	Pneumonia - Humano
99	325	BC AH1134	NZ_ABDA000000000.2	<i>B. cereus</i>	Endoftalmite - USA
100	326	BC AND1407	NZ_AHCM000000000.1	<i>B. cereus</i>	-

APÊNDICE B

(Parte 3)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
101	327	BC B5-2	NZ_AHFW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
102	328	BC BAG1O-1	NZ_AHCN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
103	329	BC BAG1O-2	NZ_AHCO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
104	330	BC BAG1X1-1	NZ_AHCQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
105	331	BC BAG1X1-2	NZ_AHCR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
106	332	BC BAG1X1-3	NZ_AHCS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
107	333	BC BAG1X2-1	NZ_AHCT00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
108	334	BC BAG1X2-2	NZ_AHCU00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
109	335	BC BAG1X2-3	NZ_AHCV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
110	336	BC BAG2O-1	NZ_AHCW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
111	337	BC BAG2O-3	NZ_AHCY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
112	338	BC BAG2X1-1	NZ_AHCZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
113	339	BC BAG2X1-2	NZ_AHDA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
114	340	BC BAG2X1-3	NZ_AHDB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
115	341	BC BAG3O-1	NZ_AHJV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
116	342	BC BAG3O-2	NZ_AHDC00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
117	343	BC BAG3X2-1	NZ_AHDD00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
118	344	BC BAG3X2-2	NZ_AHDE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
119	345	BC BAG4O-1	NZ_AHDF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
120	346	BC BAG4X12-1	NZ_AHDG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
121	347	BC BAG4X2-1	NZ_AHDG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
122	348	BC BAG5O-1	NZ_AHDI00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
123	349	BC BAG5X1-1	NZ_AHDJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
124	350	BC BAG5X12-1	NZ_AHDK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
125	351	BC BAG5X2-1	NZ_AHDL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
126	352	BC BAG6O-1	NZ_AHDM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
127	353	BC BAG6O-2	NZ_AHDN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
128	354	BC BAG6X1-1	NZ_AHDO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
129	355	BC BAG6X1-2	NZ_AHDP00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
130	356	BC BMG1.7	NZ_AHDQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
131	357	BC BtB2-4	NZ_AHDR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
132	358	BC CER057	NZ_AHDS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
133	359	BC CER074	NZ_AHDT00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
134	360	BC G9241	NZ_CP009590.1	<i>B. cereus</i>	Anthrax-like
135	362	BC H3081.97	NZ_ABDL00000000.2	<i>B. cereus</i>	cepa emetica
136	363	BC HD73	NZ_AHDL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
137	364	BC HuA2-1	NZ_AHDV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
138	365	BC HuA2-3	NZ_AHDW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
139	366	BC HuA2-4	NZ_AHDW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
140	367	BC HuA2-9	NZ_AHDY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
141	368	BC HuA3-9	NZ_AHDZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
142	369	BC HuA4-10	NZ_AHEA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
143	370	BC HuB1-1	NZ_AHEB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
144	371	BC HuB13-1	NZ_AHEC00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
145	372	BC HuB2-9	NZ_AHED00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
146	373	BC HuB4-10	NZ_AHEE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
147	374	BC HuB4-4	NZ_AHEF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
148	375	BC HuB5-5	NZ_AHEG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
149	376	BC IS075	NZ_AHCH00000000.2	<i>B. cereus</i>	-
150	377	BC IS195	NZ_AHEH00000000.1	<i>B. cereus</i>	-

APÊNDICE B

(Parte 4)

N	ID	Cepa	Código NCBI (acesso)	Espécie	Detalhes
151	378	BC IS845/00	NZ_AHEI000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
152	379	BC ISP2954	NZ_AHEJ000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
153	380	BC ISP3191	NZ_AHEK000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
154	381	BC K-5975c	NZ_AHEL000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
155	382	BC LCT-BC244	NZ_AJGQ000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
156	383	BC MC118	NZ_AHEM000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
157	384	BC MC67	NZ_AHEN000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
158	385	BC MSX-A1	NZ_AHEO000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
159	386	BC MSX-A12	NZ_AHEP000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
160	387	BC MSX-D12	NZ_AHEQ000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
161	388	BC NVH0597-99	NZ_ABDK000000000.2	<i>B. cereus</i>	mix de temperos - Noruega
162	389	BC SJ1	NZ_ADFM000000000.1	<i>B. cereus</i>	
163	390	BC TIAC219	NZ_AHCJ000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
164	391	BC VD014	NZ_AHER000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
165	392	BC VD021	NZ_AHES000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
166	393	BC VD022	NZ_AHCK000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
167	395	BC VD048	NZ_AHEU000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
168	396	BC VD078	NZ_AHEV000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
169	397	BC VD102	NZ_AHEW000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
170	398	BC VD107	NZ_AHEX000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
171	399	BC VD115	NZ_AHEY000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
172	400	BC VD118	NZ_AHEZ000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
173	401	BC VD131	NZ_AHFA000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
174	402	BC VD133	NZ_AHFB000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
175	404	BC VD140	NZ_AHFD000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
176	405	BC VD142	NZ_AHCL000000000.2	<i>B. cereus</i>	-
177	406	BC VD146	NZ_AHFE000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
178	407	BC VD148	NZ_AHFF000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
179	408	BC VD154	NZ_AHFG000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
180	410	BC VD166	NZ_AHFI000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
181	411	BC VD169	NZ_AHFJ000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
182	412	BC VD184	NZ_AHFK000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
183	413	BC VD196	NZ_AHFL000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
184	414	BC VD200	NZ_AHFM000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
185	415	BC VD214	NZ_AHFN000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
186	416	BC VDM006	NZ_AHFT000000000.1	<i>B. cereus</i>	antrax-like
187	417	BC VDM019	NZ_AHFO000000000.1	<i>B. cereus</i>	
188	419	BC VDM022	NZ_AHFP000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
189	420	BCVDM034	NZ_AHFQ000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
190	421	BC VDM053	NZ_AHFR000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
191	422	BC VDM062	NZ_AHFS000000000.1	<i>B. cereus</i>	-
192	423	BC W	NZ_ABCZ000000000.2	<i>B. cereus</i>	-
193	424	BC Schrouff	NZ_AHCI000000000.1	<i>B. cereus</i>	-