

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Ciências
ULisboa

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS
E TOXINA EMÉTICA DE *Bacillus cereus***

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Pedro Henrique Dobrões da Fonseca

Dissertação orientada por:

Mário Almeida Santos, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Carlos Penha Gonçalves, Instituto Gulbenkian de Ciência, Fundação Calouste
Gulbenkian

2016

“A Ciência não tem pátria, porque o conhecimento pertence à Humanidade e é a luz que ilumina o Mundo”

-

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Ao alcançar este marco académico e profissional que é a conclusão da minha dissertação de Mestrado (e muitas noites passadas no laboratório), seria impossível não agradecer a todos aqueles que me apoiaram e incentivaram ao longo destes anos de trabalho e pesquisa.

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Carlos Penha Gonçalves, Investigador Principal do Instituto Gulbenkian de Ciência e Ex-diretor do Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército (LBDB), pela oportunidade que me proporcionou de desenvolver este trabalho. Ao Professor Doutor Mário Santos, Professor Associado Aposentado da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Investigador do BioISI, pela orientação dada e por se ter disponibilizado para dispensar o seu precioso tempo sempre que necessitei.

Ao Capitão Veterinário Wilson Antunes, do LBDB, sem o apoio do qual a concretização deste projeto não teria sido possível. A sua dedicação à investigação científica inspirou-me durante todo o projeto, motivou-me a pensar sempre “fora da caixa” e incentivou-me a nunca desistir, mesmo quando as adversidades e contratempos que enfrentei me fizeram duvidar da viabilidade deste projeto.

A todos os colaboradores do LBDB, em especial o Major Veterinário Lopes João, Major Veterinário Júlio Carvalho, Major Veterinário José Freitas, Capitão Veterinário Carlos Alonso, Capitã Veterinária Inês Gomes e Tenente Bióloga Susana Rodrigues. Sempre prontos a auxiliar-me, a sua experiência e conhecimento foram um contributo valioso para a realização deste projeto. A todos os restantes, obrigado por me acolherem e me fazerem sentir bem no vosso local de trabalho.

Quero ainda agradecer aos docentes e colegas de Mestrado pela ajuda que me deram durante o 1º ano e pela paciência que tiveram comigo. Não é fácil ser estudante-trabalhador, e acaba por ser a atividade académica a que mais sofre com a falta de tempo e disponibilidade. Felizmente todos me fizeram sentir sempre integrado. Quero também agradecer aos que se tornaram, mais do que colegas, em amigos: Cindy Castelão, Stephanie Castaldo, Sílvia Antunes e Neuza Arrimar, pela ajuda, disponibilidade, convívio e apoio e, mais importante, por toda a amizade, que ajuda a suportar as adversidades e a ultrapassar as barreiras.

“*Last but not least*”, à minha mãe e à minha companheira, a quem este projeto retirou tantas horas da minha companhia, mas que nunca deixaram de me apoiar.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	0
LISTA DE ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUÇÃO.....	12
1. TAXONOMIA.....	14
2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	14
3. PATOGÊNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA	15
3.1. PATOLOGIA.....	16
3.2. TOXINAS DE <i>Bacillus cereus</i>	17
II - OBJETIVOS.....	20
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1. SELEÇÃO DAS ESTIRPES.....	20
2. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES SELECIONADAS	20
3. CULTURA DAS ESTIRPES	21
4. TESTE DE β -HEMÓLISE	21
5. DETECÇÃO DE CEREULIDA E ENTEROTOXINAS POR IMUNOCROMATOLOGIA;.....	21

5.1 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA CASEINHYDROLYSATE GLUCOSE YEAST EXTRACT BROTH (CGY);	21
5.2 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO;	22
6. CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO	22
7. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONTROLO DA INTEGRIDADE DE RNA	22
7.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL	22
7.2. DIGESTÃO DO DNA.....	23
7.3. CONTROLO DA INTEGRIDADE DO RNA.....	24
8. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE DNA COMPLEMENTAR.....	24
8.1. DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA SÍNTESE DO cDNA.....	25
9. PCR QUANTITATIVO	25
9.1. OTIMIZAÇÃO DE TEMPERATURAS DE HIBRIDAÇÃO DE <i>PRIMERS</i>	25
9.2. CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO E CÁLCULO DAS EFICIÊNCIAS DE AMPLIFICAÇÃO.....	25
9.3. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÉNICA	25
10. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSA (HPLC-MS)	26
10.1. CULTURAS MICROBIANAS.....	26
10.2. EXTRAÇÃO DE <i>Ces</i>	26
10.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC).....	27
10.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	27

IV – RESULTADOS	28
1. CARATERIZAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>B.cereus</i> DE ORIGEM ALIMENTAR	28
2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE <i>B.cereus</i> DE ORIGEM ALIMENTAR	29
3. TESTE DE β-HEMÓLISE	30
4. DETEÇÃO DE CEREULIDA E ENTEROTOXINAS POR IMUNOCROMATOGRAFIA;	30
5. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO mRNA	31
6. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PRINCIPAIS COMPLEXOS TOXINOGENICOS EM <i>B.cereus</i> DE ORIGEM ALIMENTAR	31
6.1. OTIMIZAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE HIBRIDAÇÃO;	32
6.2. DETERMINAÇÃO DAS EFICIÊNCIAS DE REAÇÃO;	33
6.3. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA;	33
7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSA (HPLC-MS)	36
7.1. QUANTIFICAÇÃO DE <i>Ces</i>	36
V – DISCUSSÃO	36
1. CLASSIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	36
2. PREVALÊNCIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE TOXINAS EM <i>B. CEREUS</i>;	37
Enterotoxina HBL	38
Enterotoxina NHE	40
Toxina Emética	42

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXO 1.....	49
ANEXO 2.....	50
ANEXO 3.....	51
ANEXO 4.....	52
ANEXO 5.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Adenina
BceT	Enterotoxina T
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
Ces	Cereulida
Ct	Ciclo limiar ou <i>threshold</i>
CytK	Citotoxina K
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNApol	DNA Polimerase
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfatados
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
EntFM	Enterotoxina FM
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
gDNA	DNA Genómico

HBL	Hemolisina BL
HCl	Ácido Clorídrico
LBDB	Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica
MLE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
mM	Milimolar
MYP	<i>Manitol-egg Yolk-phenol red-Polymixin-agar</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
NHE	Enterotoxina Não-Hemolítica
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanómetro
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OD₂₆₀	Densidade Ótica a 260nm
OD₂₈₀	Densidade Ótica a 280nm
OD₆₀₀	Densidade Ótica a 600nm
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEMBA	<i>Polymixin-pyruvate-Egg yolk-Mannitol-Bromthymol blue-Agar</i>
qPCR	PCR Quantitativo
RAPD	<i>RandomLy Amplified Polymorphic DNA</i>

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RPM	Rotações Por Minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	PCR por Transcriptase Reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
sRNA	<i>Small RNA</i>
T	Timina
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>
tRNA	RNA de transferência
UEO	Unidades, Estabelecimentos e Órgãos
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato salino
PMP	<i>Pathogen Modelling Program</i>
E	Eficiência
CGY	Casitone Glycerol Yeast Autolysate
WT	<i>Wild-type</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-** *B.cereus* em colorações de Gram de esfregaço sanguíneo (esquerda), de secção de parafina de amostra de biópsia cerebral (centro) e de esfregaço de cultura em meio de cultura sólido à base de agarose (direita). Adaptado de [17].....**15**
- Figura 2** - Culturas de *B.cereus* em meio Plate Count Agar (PCA, esquerda) e meio agar-sangue de carneiro a 5% (direita), evidenciando as zonas de β -hemólise dupla (halos) rodeando as colónias. Fotos produzidas pelo autor.**18**
- Figura 3** - Gráficos circulares representando a prevalência dos genes do operão *nhe*, operão *hbl* e do gene *ces* na amostra de 23 estirpes em estudo;**29**
- Figura 4** - Expressão dos genes do complexo *hbl* às 10 horas de crescimento bacteriano. No eixo das abcissas estão representadas as diferentes estirpes e no eixo das ordenadas o logaritmo dos valores de expressão génica obtidos pelo método Δ Ct.**34**
- Figura 5** - Expressão dos genes do complexo *nhe* às 10 horas de crescimento. No eixo das abcissas estão representadas as diferentes estirpes e no eixo das ordenadas os logaritmos dos valores de expressão génica obtidos pelo método Δ Ct.....**35**
- Figura 6** - Expressão do gene *ces* às 10 horas de crescimento. No eixo das abcissas estão representadas as diferentes estirpes e no eixo das ordenadas os logaritmos dos valores de expressão génica obtidos pelo método Δ Ct.**35**
- Figura 7** - Comparação entre os resultados da análise dos genes do operão *hbl* por PCR (Detecção) e por RT-qPCR (Expressão)**38**
- Figura 8** - Comparação entre os resultados da análise dos genes do operão *nhe* por PCR (Detecção) e por RT-qPCR (Expressão);**40**
- Figura 9** - Comparação entre os resultados da análise do gene *cesA* por PCR (Detecção) e por RT-qPCR (Expressão);**42**
- Figura 10** – Curvas de crescimento das estirpes de *B.cereus* de origem alimentar em estudo. a) Curva de crescimento com entrada na fase estacionária às 6 horas; b) c) d) Curvas de crescimento com entrada na fase estacionária às 8 horas; e) Curvas de crescimento com entrada na fase estacionária às 12 horas;**50**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de cereulida em ng por mg de massa celular extraída a partir de culturas de estirpes eméticas de <i>B.cereus</i> em meio de cultura sólido BHI-agar às 10h e às 24h de crescimento	39
Tabela 2 – Dados já existentes sobre as estirpes em estudo. Conteúdo das colunas, da esquerda para a direita na tabela: Isolado alimentar a partir do qual se obteve a estirpe; espécie de acordo com o <i>score</i> da galeria API CH50; morfologia das colônias observada em meio de cultura sólido PCA às 24h de crescimento em aerobiose a 37°C; percentagem do <i>score</i> da galeria API CH50; atividade da lecitinase; capacidade de fermentação do manitol; capacidade hemolítica; presença dos genes <i>ces</i> , <i>hblA</i> , <i>hblC</i> , <i>hblD</i> , <i>nheA</i> , <i>nheB</i> , <i>nheC</i>	49
Tabela 3 – Resultados dos testes de β -hemólise em meio de cultura agar-sangue de carneiro às 10h de crescimento, expressão dos genes dos operões <i>hbl</i> e <i>nhe</i> às 10h de crescimento e teste imunocromatográfico GLISA para a Hemolisina BL às 24h de crescimento;	51
Tabela 4 – Resultados dos testes imunocromatográficos GLISA e resultados de qPCR para os genes das toxinas Hbl, Nhe e Ces	53
Tabela 5 – Primers utilizados nas reações de qPCR.....	55
Tabela 6 – Valores de RIN obtidos através da análise com o Agilent Bioanalyzer	55
Tabela 7 - Eficiências das reações de qPCR	58

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm vindo a emergir como um problema importante no domínio da saúde pública, com importantes implicações de ordem económica.

O *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, β -hemolítica, em forma de bastonete, anaeróbia facultativa formadora de endósporos, capazes de resistir a diversos fatores físicos e químicos, como variações de temperatura, desidratação, agentes oxidantes, entre outros.

Esta bactéria é responsável por dois tipos de toxinfecção: Uma síndrome diarreica, causada pelas enterotoxinas não-hemolítica e hemolisina BL, produzidas durante o crescimento vegetativo no hospedeiro, que provocam diarreia aguda, náuseas e dores abdominais; uma síndrome emética, provocada pela toxina termorresistente cereulida, produzida pela bactéria nos alimentos, responsável por náuseas e vômitos. Estas toxinfecções apresentam baixa mortalidade e moderada morbidade, existindo no entanto vários registos de mortes associadas a elas, em especial à síndrome emética.

No presente trabalho foram estudadas 23 estirpes de *B.cereus*, provenientes de isolados obtidos a partir de amostras alimentares colhidas entre 2008 e 2010, no Exército Português. Foi realizada uma análise de expressão génica por PCR quantitativo com o objetivo de avaliar os padrões de expressão dos genes que codificam os componentes das três toxinas. Foram realizados testes de deteção indireta das três toxinas em estudo e foi realizada deteção e quantificação direta da toxina cereulida através de espectrometria de massa.

Os resultados da prevalência dos genes que codificam os componentes das toxinas não-hemolítica e hemolisina BL através da pesquisa por PCR são coincidentes com vários estudos já publicados. No entanto, concluiu-se que a utilização dos resultados do qPCR para confirmar a produção destas toxinas por uma dada estirpe deve ser abordada com cautela.

Foi desenvolvido e aplicado um teste de deteção de β -hemólise dupla para ser utilizado como teste indirecto de deteção da toxina hemolisina BL. Os resultados deste método foram promissores e apontam para um possível emprego na vertente de diagnóstico.

Foi possível constatar que todas as estirpes estudadas possuem potencial toxigenico para uma ou mais das toxinas em estudo. Estes resultados demonstram o impacto que este microorganismo pode ter no âmbito da Saúde Pública.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*; Enterotoxina não-hemolítica; Hemolisina BL; Cereulida; qPCR; HPLC-MS;

ABSTRACT

Foodborne diseases have been emerging as a relevant problem in public health with important economic implications.

Bacillus cereus is a Gram-positive, β -haemolytic, facultative anaerobe, rod-shaped bacterium. *B.cereus* is endospore-forming, and these spores are highly resistant to various forms of physical and chemical stress, such as temperature variations, dehydration and presence of oxidatives, among others.

This bacterium is responsible for two types of food poisoning: A diarrheal syndrome, caused by non-haemolytic enterotoxin and haemolysin BL, produced during vegetative growth in the host's gut, which cause acute diarrhea, nausea and abdominal cramps; an emetic syndrome, caused by the heat-resistant toxin cereulide, produced by the bacteria in foodstuffs, causing vomit and nausea. These syndromes have low mortality and moderate morbidity, but there have been fatal cases associated to them, especially the emetic syndrome.

In this work, 23 *B.cereus* strains, collected from food samples obtained in the Portuguese Army between 2008 and 2010 were studied. A quantitative PCR gene expression analysis was performed to evaluate the expression patterns of the genes coding the three toxins' components. Indirect detection tests for the three toxins studied were performed, as well as direct detection and quantification of the cereulide toxin through mass spectrometry.

The prevalence results, obtained by PCR, of the genes coding the components of the non-haemolytic and haemolysin BL toxins are in accordance with studies already published. However, we concluded that using qPCR results to confirm the production of these toxins by a given strain must be done with caution.

A double β -haemolysis detection test was developed and applied as an indirect test for detection of haemolysin BL toxin. The results obtained through this method were promising and point towards a possible usage in the diagnostics field.

Keywords: *Bacillus cereus*; Non-haemolytic enterotoxin; Haemolysin BL; Cereulide; qPCR; HPLC-MS;

I. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm vindo a emergir como um problema importante no domínio da saúde pública, com implicações de ordem económica em muitos países, ao longo das últimas décadas. Estima-se que em cada ano, as DTA afetem 76 milhões de pessoas, causando 325000 hospitalizações e 5000 mortes nos Estados Unidos da América (EUA), e afetem 2366000 pessoas, causando 21138 hospitalizações e 718 mortes no Reino Unido [1]. No ano 2000, em Portugal, foram reportados 2224 casos de DTA que resultaram em 32 hospitalizações, e o número de casos tem vindo a aumentar todos os anos [2].

O *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, β -hemolítica, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete. É um microorganismo telúrico e consegue desenvolver-se com facilidade em solos pobres em nutrientes. O *B.cereus* forma endósporos, estruturas resistentes a diversos agentes físicos e químicos, como variações de temperatura, desidratação, radiação UV, agentes oxidantes, entre outros [3]. A capacidade para formar esporos permite que este agente persista durante longos períodos de tempo em ambientes adversos, garantindo ainda uma forma eficaz de o agente se disseminar facilmente, sem perder a viabilidade [4].

O *B. cereus* é causador de alguns tipos de infeções em seres humanos. É responsável por infeções oportunistas, como a panoftalmite por *Bacillus*, a sépsis associada a cateteres, endocardite, pneumonite e meningite em indivíduos imunodeprimidos [5]. No entanto, é devido a dois tipos de toxinfecção alimentar que este microorganismo é mais conhecido: A síndrome diarreica e a síndrome emética. A síndrome diarreica tem um período de incubação entre 8 e 16 horas e é causada por enterotoxinas, produzidas durante o crescimento vegetativo do *B.cereus* no intestino, que provocam diarreias agudas, náuseas e dores abdominais. Estes sintomas devem-se principalmente à disrupção da integridade da membrana plasmática das células epiteliais do intestino delgado. A síndrome emética tem um período de incubação de 1 a 5 horas e é provocada por uma toxina resistente ao calor, produzida pela bactéria nos alimentos, causando principalmente náuseas e vômitos. As toxinfecções causadas por *B.cereus* têm uma duração entre 24 e 36 horas [6, 7] e baixa mortalidade, mas existem vários registos de mortes associadas a ambas as síndromes, principalmente à síndrome emética [8-10]. As estirpes causadoras de síndrome diarreica podem também provocar a morte, decorrente de enterites necróticas e outras complicações [11].

O número exato de toxinfecções alimentares provocadas por este microorganismo não é conhecido, pois a infeção por *B.cereus* não é uma doença de notificação obrigatória e nem sempre é diagnosticada, devido ao facto de os seus sintomas serem semelhantes a toxinfecções

associadas a outros microorganismos. Além disso, pelo caráter benigno e autolimitante de grande parte destas intoxicações, muitos dos indivíduos afetados não recorrem aos hospitais [12]. Não obstante este facto, em relação ao número de casos confirmados de infecção por *B.cereus*, estão disponíveis as seguintes estatísticas: Entre 1973 e 1985, o *B.cereus* foi reportado como causador de 17.8% do total de intoxicações alimentares registadas na Finlândia, 11.5% na Holanda, 0.8% na Escócia, 0.7% na Inglaterra e País de Gales, 2.2% no Canadá, 0.7% no Japão e 15% na Hungria. Na Noruega, o *B.cereus* foi o microorganismo mais comum associado a DTA em 1990. Em 1994, 14.9% dos surtos de intoxicações alimentares em Taiwan foram causados por *B.cereus* [4]. Em Portugal, as estatísticas existentes indiciam que uma grande parte das toxinfecções alimentares não são notificadas. O número de casos reportados oficialmente à Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) de 2006 a 2011 foi de 906 a nível nacional (população = ± 10 milhões), enquanto entre 2006 e 2012 o LBDB registou 399 casos em 10 surtos só a nível do Exército (população = ± 20000), de onde se pode inferir que a notificação reportada estará longe de corresponder à realidade. Num destes surtos, ocorrido em 2010, o agente implicado foi o *B.cereus*. Foram expostos 390 indivíduos, dos quais 71 desenvolveram sintomas de toxinfecção e 42 necessitaram de receber tratamento hospitalar [13].

O *B.cereus* é facilmente encontrado no solo, ar, poeiras e água, está presente nos ambientes de produção e confecção de alimentos, maioritariamente sob a forma de esporos altamente resistentes [3]. Os esporos suportam temperaturas e pressões elevadas, tais como as empregues em processos de fabrico e conservação industrial de alimentos, (ex: pasteurização do leite), bem como baixas temperaturas, nomeadamente as de armazenamento de alimentos de fabrico industrial. Esta capacidade, associada à presença de estirpes psicrófilas, capazes de crescer entre 4°C e 6°C, é responsável pelo desenvolvimento de *B.cereus* em alimentos sujeitos a refrigeração [14].

Os esporos de *B.cereus* possuem elevada adesividade para diferentes superfícies, o que dificulta o controlo do microorganismo na indústria alimentar. Esta característica é devida à elevada hidrofobicidade dos esporos, baixa carga eléctrica superficial e morfologia. Os esporos estão revestidos de longos apêndices que aumentam a superfície de contacto. Estes fatores permitem ao *B.cereus* aderir e formar biofilmes em muitos dos materiais utilizados na produção industrial de alimentos [14].

1. TAXONOMIA

A espécie é uma subdivisão maior na taxonomia bacteriana. Cada espécie é representada por uma estirpe designada por estirpe-tipo (*type strain*) e indexada em bases de dados de referências bacterianas, como a *American Type Culture Collection* (ATCC) [15].

O termo “grupo *B. cereus*”, ou *B. cereus sensu lato*, é um termo informal mas amplamente utilizado para descrever uma subdivisão geneticamente homogênea do género *Bacillus*, que compreende seis espécies reconhecidas: *B. cereus sensu strictu*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*. A estirpe-tipo de *B. cereus sensu strictu* é a estirpe ATCC 14579, isolada a partir do ar de uma vacaria em 1887 por *Frankland & Frankland* [3].

O *B. cereus sensu lato* pertence ao Filo Firmicutes, que integra bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo GC no genoma (32 a 62%). Este Filo divide-se em três classes: Clostridia, Mollicutes e Bacilli. O *B. cereus sensu lato* insere-se na classe Bacilli, ordem Bacillales e família Bacillaceae.

Num estudo de 2000, através da análise por *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) dos padrões de aloenzimas de 13 loci enzimáticos num conjunto de 239 estirpes de *B. anthracis*, *B. thuringiensis* e *B. cereus sensu strictu*, concluiu-se que estas três espécies deveriam ser consideradas uma só. Este estudo reforçou a tese que apoia a distinção funcional destas espécies baseada em características transmitidas por genes plasmídicos [16].

Apesar dos novos dados que surgiram com o desenvolvimento da genómica, continua a adoptar-se a nomenclatura das seis espécies do género *Bacillus*.

2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

O *B. cereus* é um microorganismo Gram-positivo em forma de bastonete. É um anaeróbio facultativo, de grandes dimensões (1.0-1.2 µm por 3.0-5.0 µm), que não fermenta o manitol e produz lecitinase (fosfolipase) [3]. Exibe diferentes morfologias dependendo do meio em que é observado. Em esfregaços de fluidos corporais ou em culturas líquidas, as células vegetativas coradas pelo método de *Gram* apresentam-se como bastonetes alongados ou ligeiramente curvos com extremidades arredondadas. Estas podem ser encontradas isoladas ou em cadeias curtas, com esporos ovais localizados ao centro, que não distorcem a morfologia da célula mãe. Em secções de parafina, as formas bacilares podem exibir vacúolos de polihidroxibutirato, que não devem ser confundidos com esporos. Em preparações

extemporâneas de fluidos corporais ou em culturas líquidas, os bacilos exibem motilidade, através de flagelos peritricos (**figura 1**) [17].

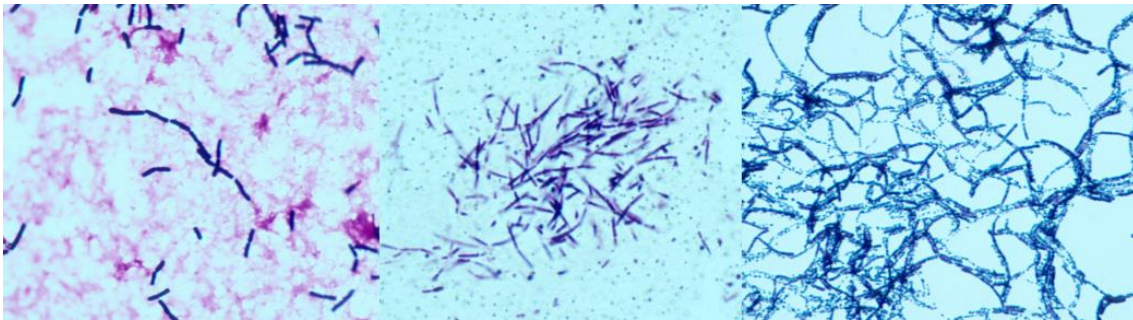


Figura 1- *B.cereus* em colorações de Gram de esfregaço sanguíneo (esquerda), de secção de parafina de amostra de biópsia cerebral (centro) e de esfregaço de cultura em meio de cultura sólido à base de agarose (direita). Adaptado de [17].

Quando cultivados em condições aeróbias em agar com 5% de sangue de carneiro, as colônias de *B.cereus* são de cor acinzentada, opacas e com uma superfície rugosa de aspeto mate vítreo (*ground glass*) e ceruminoso (comparação à qual devem o seu nome, do latim *cereus* – que se assemelha a cera). Os perímetros das colônias são irregulares e apresentam β -hemólise [17].

À medida que a forma vegetativa do microorganismo esgota os nutrientes, inicia-se a produção de endósporos inertes. No processo de produção de endósporos a divisão celular é assimétrica, formando-se dois compartimentos na célula vegetativa. O compartimento polar é denominado de pré-esporo e o compartimento maior, de célula-mãe ou esporângio. O esporângio contém DNA e nutrientes para formação do endósporo. O ciclo termina com a libertação do esporo para o exterior, após a lise da célula-mãe [18].

Vários meios de cultura são utilizados para o isolamento, detecção e contagem de *B.cereus* a partir de amostras alimentares, tais como o meio MYP (*manitol-egg yolk-phenol red-polymixin-agar*) e o meio PEMBA (*polymixin-pyruvate-egg yolk-mannitol-bromthymol blue-agar*). O *B.cereus* não fermenta o manitol, produz lecitinase (fosfolipase) e é resistente à polimixina B. Os meios de cultura acima mencionados utilizam essas características para identificar o *B.cereus* [3].

3. PATOGÉNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA

O *B.cereus* possui vários fatores de virulência. Entre os principais fatores temos enzimas degradativas, proteínas de superfície celular e toxinas [17].

Relativamente às toxinas secretadas, destacam-se quatro hemolisinas, três fosfolipasas, uma toxina emética e três toxinas formadoras de poros [17]. A capacidade de

produção destas toxinas varia consideravelmente entre estirpes, podendo estas ser produzidas individualmente ou em simultâneo [4].

3.1. PATOLOGIA

A doença causada por *B.cereus* pode ser devida a infecção ou intoxicação, o que irá desencadear a síndrome diarreica ou a síndrome emética, respectivamente. Para além das síndromes gastrointestinais, o *B.cereus* causa várias infeções locais e sistémicas, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. Entre os mais comumente afetados encontram-se os neonatos, os consumidores de drogas intravenosas, os indivíduos com feridas traumáticas ou cirúrgicas e os indivíduos cateterizados. O espectro das infeções inclui: Bacterémia fulminante; infeções do Sistema Nervoso Central (SNC) como meningites e abscessos cerebrais; endoftalmite; pneumonia e infeções cutâneas do tipo gangrena gasosa [17].

O presente trabalho irá focar-se nas síndromes gastrointestinais.

3.1.1. SÍNDROME DIARREICA

No trato gastrointestinal, mais especificamente no intestino delgado, o *B.cereus*, quando ingerido sob a forma de esporos ou células vegetativas, produz e secreta enterotoxinas proteicas termolábeis, induzindo a síndrome diarreica [17]. Nesta síndrome, após 8 a 16 horas de incubação, ocorrem dores abdominais e diarreias profusas, sintomas que se prolongam por 12 a 24 horas [4].

À síndrome diarreica estão associadas enterotoxinas. Estas toxinas possuem atividade citotóxica e dermonecrótica, provocando um aumento da permeabilidade vascular e acumulação de fluido em modelos de ansa ileal de coelho [4]. Nestes modelos pode ser observada a perda de integridade da membrana plasmática de várias células, incluindo as do epitélio da mucosa intestinal, acompanhada de diarreias profusas [19].

A quantidade mínima de microorganismos necessários para causar a síndrome diarreica é de aproximadamente $10^5 - 10^8$ *Colony-Forming Units* (CFU) por grama de alimento consumido. Os alimentos normalmente implicados são carne e derivados, sopas, vegetais, molhos e produtos lácteos [20].

3.1.2. SÍNDROME EMÉTICA

A toxina emética, denominada cereulida, é produzida pelo *B.cereus* nos alimentos e quando ingerida, causa a síndrome emética. Nesta síndrome, o tempo de incubação é mais

curto, cerca de 1 a 5 horas, manifestando-se sob a forma de náuseas e vômitos e os sintomas prolongam-se por um máximo de 24 horas [17].

A quantidade mínima de microorganismos necessários para causar a síndrome emética é aproximadamente $10^5 - 10^8$ CFU/g de alimento consumido. Porém, há relatos de intoxicações causadas pela ingestão de alimentos com apenas 10^3 CFU/g [20]. Este fenômeno ocorre devido à toxina emética permanecer nos alimentos após ser produzida por *B.cereus*. Em estudos efetuados em modelos animais, a dose necessária para desencadear a síndrome emética foi estabelecida em 30µg/Kg de peso corporal [21].

Este tipo de síndrome está normalmente ligada ao consumo de alimentos ricos em amido, como arroz e massas. Ocorre mais frequentemente quando o arroz e massa pré cozinhados são armazenados durante períodos prolongados (superiores a 4 horas) à temperatura ambiente [4].

3.2. TOXINAS DE *BACILLUS CEREUS*

As principais toxinas de *B. cereus* são: **1) Hemolisina BL (Hbl)**, complexo proteico tripartido; **2) Enterotoxina Não-Hemolítica (Nhe)**, complexo proteico tripartido; **3) Citotoxina K (CytK)**, proteína singular; **4) Enterotoxina T (BceT) e enterotoxina FM (entFM)**, duas proteínas pouco estudadas e com papel pouco definido; **5) Cereulida (Ces)**, dodecadepsípéptido, também designada por toxina emética.

Em seguida irão ser descritas as principais características das toxinas Hbl, Nhe e Ces, abordadas no presente estudo.

3.2.1. HEMOLISINA BL

A Hbl é um sistema lítico de membrana composto por três proteínas antígenicamente distintas: B, L₁ e L₂. Estas proteínas são secretadas independentemente e todas são necessárias para a atividade biológica máxima da toxina. Até à data, as atividades tóxicas atribuídas à Hbl incluem β-hemólise, aumento da permeabilidade vascular e necrose na pele de coelho, degradação *in vitro* de retina de coelho, necrose e inflamação ocular *in vivo* em coelhos. Uma característica diferenciadora da Hbl é a formação de um padrão de β-hemólise dupla descontínua (halos), visível em colónias de *B.cereus* em meio de cultura agar-sangue de carneiro (**Figura 2**).

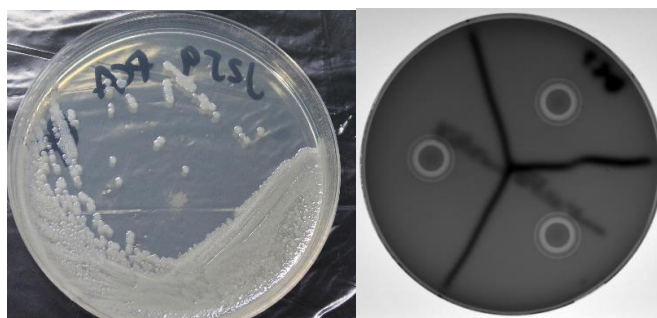


Figura 2 - Culturas de *B.cereus* em meio Plate Count Agar (PCA, esquerda) e meio agar-sangue de carneiro a 5% (direita), evidenciando as zonas de β -hemólise dupla (halos) rodeando as colônias. Fotos produzidas pelo autor.

A Hbl é considerada um fator de virulência primário na síndrome diarreica causada por *B.cereus* [19] e é secretada por cerca de 45-65% das estirpes de *B.cereus*, no entanto este valor tende a variar tanto no contexto clínico como em isolados ambientais e alimentares [22].

Foi proposto que as três proteínas codificadas no operão *hbl* se ligam aos eritrócitos independentemente e que os componentes da Hbl associados à membrana formam um complexo de ataque que causa a lise celular por um mecanismo osmótico. Este fenómeno é explicado pelo seguinte modelo: O componente B é responsável por marcar as células a lisar. Só após esta marcação é que ocorre a lise, que se dá pela combinação dos componentes L1 e L2. A lise termina com o excesso do componente L1 que inibe a reação [3].

As proteínas B, L1 e L2 da toxina Hbl são codificadas pelos genes *hblA*, *hblD* e *hblC*, respectivamente. Estes genes estão organizados num operão na ordem transcricional *hblC*, *hblD* e *hblA*. Os componentes do complexo Hbl, B, L1 e L2 têm pesos moleculares de 37.5, 38.2 e 43.5kDa, e pensa-se que sejam secretados para o exterior da célula através de uma via S-dependente (sistema Sec). A expressão dos genes do operão *hbl* é regulada pelo regulador pleiotrópico PlcR, que possui um papel de grande importância na regulação genética em *B.cereus* [19].

3.2.2. ENTEROTOXINA NÃO HEMOLÍTICA (NHE)

A enterotoxina tripartida Nhe foi identificada pela primeira vez a partir de uma estirpe de *B.cereus* isolada de amostras de alimentos implicados num surto de intoxicação alimentar, ocorrido na Noruega em 1995 [23]. As proteínas analisadas diferiam dos componentes de Hbl e não possuíam actividade hemolítica. As três proteínas Nhe são codificadas pelo operão *nhe*, composto pelos genes, *nheA*, *nheB* e *nheC*, com pesos moleculares 41.0, 39.9, e 36.5 kDa, respetivamente [3]. A expressão dos genes do operão *nhe* é também regulada pelo regulador pleiotrópico PlcR.

As proteínas do complexo Nhe são produzidas por quase 100% das estirpes de *B.cereus*, sendo a toxina com maior prevalência nesta espécie. Foi descrito que esta toxina tem acção citotóxica contra células *Vero* [24].

À semelhança da enterotoxina Hbl, as proteínas que compõem a enterotoxina Nhe são produzidas e secretadas independentemente. A atividade tóxica máxima em células *Vero* requer todos os três componentes num rácio de 10:10:1 de NheA, NheB e NheC, respectivamente. NheB é o componente de ligação do complexo Nhe e um aumento na concentração de NheC resulta num decréscimo da toxicidade [22].

A actividade citotóxica da Nhe em células epiteliais ocorre por lise osmótica, associada à formação de poros na membrana plasmática. Alguns estudos sugerem que a enterotoxina Nhe apresenta baixa atividade hemolítica quando comparada com a Hbl. Os componentes NheB e NheC de Nhe partilham características estruturais com o componente B de Hbl [22].

3.2.3. CEREULIDA (CES)

A toxina emética de *B.cereus*, denominada cereulida, é um dodecadepsipéptido cíclico com peso molecular de 1,2 kDa, quimicamente semelhante à valinomicina produzida por *Streptomyces griseus*. Provoca emese pouco tempo após a ingestão de alimentos contaminados [20].

Esta toxina estimula o nervo vago aferente através de ligação ao recetor 5-HT₃, o que provoca vômitos muito intensos. A toxina também atua como um ionóforo de potássio, de efeito análogo ao da valinomicina, inibindo a atividade mitocondrial através da supressão da oxidação dos ácidos gordos, mas tem potencial tóxico superior. Este mecanismo está implicado nos casos mortais de intoxicação por *B.cereus*. Numa experiência com ratos em que foi injetada intraperitonealmente a forma sintética da toxina, observou-se degeneração maciça dos hepatócitos [17].

A Ces é sintetizada enzimaticamente via péptido-sintetases não-ribossomais (NRPSs) [25].

Os genes de cereulida sintetase estão localizados num megaplasmídeo, designado pBCE4810, que apresenta semelhanças com o plasmídeo pXO1 de *Bacillus anthracis*. O *cluster* génico da cereulida sintetase, apresenta uma dimensão de 24Kb, e compreende 7 sequências codificantes: *cesH*, *cesP*, *cesT*, *cesA*, *cesB*, *cesC* e *cesD* [25]. Os genes estruturais são codificados pelas duas sequências de maior dimensão, *cesA* e *cesB*, com 10Kb e 8Kb, responsáveis pela activação e incorporação de dois monómeros na cadeia peptídica [25].

II - OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são os seguintes:

1. Analisar a expressão dos genes que codificam os componentes das enterotoxinas Hbl e Nhe e da toxina Ces utilizando a técnica de RT-qPCR numa amostra de bactérias do grupo *B.cereus*, da colecção do LBDB;
2. Comparar os resultados da análise de expressão génica com estudos de prevalência para os genes das toxinas, realizados na colecção do LBDB;
3. Comparar os dados de prevalência e expressão génica das toxinas com os dados existentes na literatura;
4. Deteção das toxinas através de testes indiretos e comparação dos resultados com os dados de prevalência e expressão génica das toxinas;
5. Deteção e quantificação direta da toxina Ces através de cromatografia líquida de alta pressão e espectrometria de massa (HPLC-MS) e comparação dos dados desta técnica com os dados de prevalência e expressão génica;

III - MATERIAL E MÉTODOS

1. SELEÇÃO DAS ESTIRPES

As estirpes a estudar fazem parte da colecção de bactérias do grupo *B.cereus* do LBDB. Foram seleccionadas 35 estirpes, provenientes de isolados obtidos a partir de amostras alimentares colhidas entre 2008 e 2010. As amostras são oriundas de alimentos recolhidos por equipas de segurança alimentar, durante as visitas de apoio técnico a vários refeitórios, bares e depósitos de géneros alimentares pertencentes a Unidades, Estabelecimentos e Órgãos (UEO) do Exército Português (**anexo 1, tabela 2**). As estirpes de *B.cereus* utilizadas como controlo no presente estudo foram as estirpes: F4810/72, LMG17615, NVH0391-98 (cedidas pela Dra. Monica Schulz da Universidade de Medicina Veterinária de Viena, Áustria) e a estirpe ATCC 14579.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES SELECIONADAS

As 38 estirpes em estudo foram caracterizadas para os seguintes parâmetros: Capacidade para fermentar o manitol e precipitar a lecitina em meio *Mannitol Egg Yolk Polymyxin* (MYP); perfil bioquímico utilizando a galeria API CH® (*Biomérieux*, França) para identificação até ao nível de espécie; caracterização morfológica de colónias em meio *Plate Count Agar* (PCA - *Scharlau*, Art. N° 01-161); pesquisa dos genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*,

nheB, e *nheC* por PCR [26]. Os resultados destes testes estão listados no **anexo 1, tabela 3** [26].

3. CULTURA DAS ESTIRPES

As estirpes de origem alimentar foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em vortex. Foram recolhidos 50µL de amostra, e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura PCA. As placas foram incubadas a 30°C, durante 24 horas. A seguir repicou-se uma colónia isolada de cada estirpe para um tubo de ensaio contendo 5mL de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI Broth – Scharlau, Art.Nº.02-599), utilizando uma ansa. Os tubos contendo os pré-inóculos foram agitados por vortex e incubados *overnight* (12-18h) a 30°C em aerobiose.

4. TESTE DE B-HEMÓLISE

Após 24h, retirou-se 1mL de cultura dos tubos contendo os pré-inóculos, vortexou-se e ajustou-se a OD₆₀₀ da suspensão para 0.5 utilizando o espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific*, USA). Em seguida, utilizando uma caneta dermatográfica, dividiram-se placas de Agar-Sangue (*Columbia Blood Agar – VWR Chemicals*, Ref.100253ZF) em 3 zonas e pipetou-se em cada zona 10µL das culturas de modo a obter triplicados de cada cultura por placa de Agar-Sangue. Em seguida colocaram-se as placas de Agar-Sangue na estufa a 30°C em aerobiose durante 24h. As placas foram retiradas e fotografadas às 10h e às 24h de crescimento.

5. DETEÇÃO DE CEREULIDA E ENTEROTOXINAS POR IMUNOCROMATOGRAFIA;

5.1 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA CASEINHYDROLYSATE GLUCOSE YEAST EXTRACT BROTH (CGY);

Para realizar este teste é necessário incubar o *B.cereus* em meio de cultura líquido CGY (*Merck EMD Millipore – Ref.1.01868.0100*). Preparou-se 1L deste meio de cultura dissolvendo 51g de CGY em 900mL de água destilada sob aquecimento. Após dissolução completa autoclavou-se o meio a 121°C durante 15 minutos, deixando-se arrefecer até à temperatura ambiente. Em paralelo prepararam-se 100mL de solução de glicose (D(+)-*Glucose Monohydrate – Merck EMD Millipore – Ref.1.08342.1000*) a 10% misturando 10g de glicose em 100mL de água destilada até à dissolução completa. Seguidamente esterilizou-

se a solução por filtração utilizando um filtro de 0.2µm (*Sterile syringe filter with 0.2µm polyethersulfone membrane. VWR International - Ref.28145-501*). Após este passo acrescentou-se a solução de glicose ao meio CGY e misturou-se por agitação.

5.2 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO;

Transferiram-se 50µL dos pré-inóculos em meio de cultura BHI, obtidos de acordo com o procedimento descrito no ponto 3, para tubos contendo 5mL de meio de cultura CGY, e incubaram-se durante 24h a 37°C. Em seguida retiraram-se as culturas da estufa e colocaram-se em arrefecimento até à temperatura ambiente. Após este passo as culturas foram homogeneizadas por vortex durante 5 segundos e pipetaram-se 150µL de cada para os poços do teste *Gold Labeled Immuno Sorbent Assay (GLISA) Duopath® Cereus Enterotoxins (Merck EMD Millipore – Ref.1.04146.0001)* e 150µL das culturas das estirpes 271, 317, 320, 322 e 323, para os poços do teste *GLISA Singlepath® Emetic Tox Mrk (Merck EMD Millipore – Ref.1.04154.0001)*.

No teste *GLISA Duopath® Cereus Enterotoxins* foi utilizada como controlo positivo a estirpe LMG17615 e como controlo negativo a estirpe NVH039198. Para o teste *GLISA Singlepath® Emetic Tox Mrk* foi utilizada como controlo positivo a estirpe F4810/72 e como controlo negativo a estirpe ATCC 14579. Todos os testes foram efetuados em triplicado e os resultados foram observados após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente.

6. CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Inocularam-se 5mL de BHI em tubos de ensaio com 50µL de pré-inóculo. Este procedimento foi realizado em triplicado para cada estirpe. Em seguida cada tubo foi homogeneizado por vortex e incubado a 30°C, em aerobiose. A Densidade Ótica a 600nm (OD^{600}) de cada cultura foi registada, de 2 em 2 horas até às 12h de crescimento, e novamente às 24h, utilizando o espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)*.

7. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONTROLO DA INTEGRIDADE DE RNA

7.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

Para a extração do RNA, fizeram-se culturas de *B.cereus* até às 10 horas de crescimento, segundo o método acima descrito, para um total de 20 estirpes. Para cada estirpe, transferiu-se 1,4mL de cultura para um tubo *Eppendorf* de 1.5mL e centrifugou-se durante 5 minutos a 13000 Rotações Por Minuto (RPM) utilizando uma centrífuga *ALC PM180R*. Em

seguida removeu-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* em H₂O estéril sem ressuspender. Depois adicionaram-se 500µL de H₂O estéril, *RNase-free*, homogeneizou-se e diluiu-se a solução para uma OD⁶⁰⁰ de 0.4. A seguir centrifugou-se a solução durante 2 minutos a 11000RPM e descartou-se o sobrenadante. Para efetuar a lise das bactérias adicionou-se 350µL da solução de lise (EDTA 10mM, 2.0% SDS – pH 8.0) e 3.5µL de β-mercaptoetanol ao tubo, e incubou-se 5 minutos a 4°C, após os quais se aplicou choque térmico em bloco seco a 98°C durante 10 minutos, e acrescentou-se 375µL de acetato de sódio 0.1M, 10mM EDTA para estabilizar a solução. A purificação do sobrenadante foi feita por adição de 700µL de fenol, seguido de incubação à temperatura ambiente em agitação durante 2 minutos. As fases foram separadas por centrifugação a 5000RPM durante 10 minutos. Transferiram-se 500µL da fase aquosa que contém o RNA para um *ependorf* de 1.5mL arrefecido contendo 440µL de tampão Tris.Cl 1M (pH 8.0) e 180µL de NaCl 5M. As amostras foram homogeneizadas e separadas em partes iguais para dois tubos *ependorf* de 1.5mL. Adicionaram-se em seguida 2 volumes de etanol absoluto ultrapuro à temperatura de -20°C, misturou-se o conteúdo do tubo, e armazenou-se durante 30 minutos a -20°C para facilitar a precipitação do RNA. O RNA foi precipitado por centrifugação a 11000RPM durante 10 minutos a 1°C, e seguidamente descartou-se o etanol. Os *pellets* de RNA foram secos em estufa a 40°C durante 10 minutos, para remover o etanol residual. O RNA foi seguidamente reidratado em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.0).

Após a extração e purificação do RNA total foram determinados os índices de pureza e respetiva concentração (ng/µL), por espectrofotometria. As medições foram feitas utilizando o espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (*Thermo Scientific* – EUA), segundo as indicações do fabricante.

7.2. DIGESTÃO DO DNA

A eliminação do DNA genómico (gDNA), foi efectuada por digestão das amostras com DNase (RQ1 *RNase-Free DNase*–Cat.#M6101–*Promega*, USA), segundo as instruções do fabricante, seguida de extração do RNA por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol. A solução de RNA (200µL) foi dividida em 3 alíquotas de 65µL e armazenada a -80°C. A presença de gDNA contaminante nas amostras de RNA total, após digestão pela DNase foi testada por PCR para o gene do 16S rRNA. Os resultados foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 2%.

PCR: A reacção de PCR foi realizada preparando uma mistura com os seguintes reagentes: 25µL de *master mix* (VWR Taq DNA *Polymerase Master Mix* - Cat.No.:733-2543-

VWR International), 1µL de *primer forward* e 1µL de *primer reverse* (sequências presentes no **anexo 5**), 21µL de H₂O ultrapura *RNase* e *DNase-free* e 2µL de solução de RNA, previamente normalizada a 50ng/µL. O protocolo de reação foi adaptado a partir das instruções do fabricante.

Eletroforese: o gel de agarose a 2% foi preparado dissolvendo-se 4g de agarose (*Certified PCR Agarose* – Bio-Rad) em 200mL de tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) a 0.5% e aquecido em banho-maria até ficar homogêneo. Antes de o gel solidificar acrescentou-se 16µL de *GelRed™* (*Biotium*), para detecção dos fragmentos de DNA. Após solidificar, o gel foi transferido para a tina de eletroforese (*Sub-Cell®* model 96, Bio-Rad) e as amostras carregadas. No primeiro poço do gel, foi adicionada uma mistura de 5µL de marcador de pesos moleculares (*ladder*) EZ load™ 100bp (*Bio-Rad, catalog number 170-8352*) e 5µL de *Gel-loading buffer* (Nº L9703448 - *Bio-rad Nucleic acid sample-loading buffer, 5X*). Nos seguintes poços adicionaram-se 10µL dos produtos de reação, previamente misturados com 4µL de *Gel-loading buffer* com *Orange G* (Nº 03756-25G - *Orange G - Sigma-Aldrich*). O gel foi submetido a 110V de tensão durante 1hora e revelado no transiluminador (*Bio-Rad Molecular Imager® Chemi-Doc™ XRS+ imaging system*). Os resultados foram avaliados e tratados no *software Image Lab v.3.1* (*Bio-Rad*).

7.3. CONTROLO DA INTEGRIDADE DO RNA

A integridade do RNA foi determinada utilizando-se o *kit Agilent RNA 6000 Nano Kit*, de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* foi utilizado no aparelho *Agilent Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*), para avaliação do RNA *Integrity Number* (RIN) para cada uma das amostras.

8. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE DNA COMPLEMENTAR

Para obter o DNA complementar (cDNA) das amostras de RNA, foi utilizado o *kit qScript™ cDNA Synthesis* (*Quanta Biosciences™ Inc. USA - Cat.No.95047-100*), numa reação de PCR por Transcriptase Reversa (RT-PCR) *two-step*. A reação foi executada no termociclador *Bio-Rad MyCycler™* e o protocolo de reação foi adaptado a partir das instruções do fabricante.

O produto de RT-PCR de cada amostra foi armazenado em duas alíquotas, tendo sido previamente normalizado para 50ng/µL, para posterior utilização no PCR quantitativo (qPCR).

8.1. DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DA SÍNTESE DO cDNA

A partir do cDNA sintetizado foi realizado a amplificação do gene 16S rRNA por PCR, para confirmar a eficácia e a qualidade do produto de RT-PCR. A amplificação dos transcritos de cDNA foi feita utilizando a *BioRad IQ™ supermix* (Catalog # 170-8862 - *BioRad Laboratories* – USA) e o protocolo de reação foi adaptado a partir das instruções do fabricante.

Os resultados foram revelados por electroforese em gel de agarose a 2%, segundo o protocolo anteriormente descrito no **ponto 1.5.2**.

9. PCR QUANTITATIVO

9.1. OTIMIZAÇÃO DE TEMPERATURAS DE HIBRIDAÇÃO DE PRIMERS

As temperaturas de hibridação para cada *primer* foram determinadas utilizando o programa de gradientes do termociclador *BioRad C1000 Touch™* em placas de 96 poços (*Bio-Rad Multiplate™ low-profile 96-well unskirted PCR plates*) seladas com adesivo (*Biorad Microseal® 'B' Adhesive Seals*), para um volume final de 20µL. Para aferir a especificidade, foi executada uma curva de fusão (ou de *melting*) em cada reação. Os protocolos de reação foram adaptados a partir das instruções do fabricante.

9.2. CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO E CÁLCULO DAS EFICIÊNCIAS DE AMPLIFICAÇÃO

A determinação das eficiências das reações de qPCR para cada par de *primers* foi efetuada realizando amplificações a partir de amostras de cDNA, diluídas sucessivamente segundo um factor de base 10. Foram feitas reações de qPCR com 1ng/µL cDNA, 10ng/µL e 100ng/µL, em triplicado. As curvas padrão e a eficiência das reações foram calculadas no *software Bio-Rad CFX Manager 2.1*.

9.3. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÉNICA

A deteção e a quantificação dos genes em estudo foi realizada utilizando os reagentes previamente enumerados e segundo os protocolos descritos nos pontos anteriores utilizando a temperatura de hibridação ótima, para cada par de *primers*.

9.3.1. CONTROLOS UTILIZADOS

Controlo Positivo Exógeno: Como controlo positivo exógeno utilizou-se gDNA das seguintes estirpes: ATCC 14579 (positiva para os genes *hblA*, *hblC*, *hblD* e *nheB*); estirpe F4810/72 (positiva para os genes *nheA*, *nheC* e *ces*); estirpe LMG17615 (positiva para o gene *cytK2*); estirpe NVH0391-98 (positiva para o gene *cytK1*).

Controlo Negativo: Como controlo negativo (*No Template Control* – NTC) adicionou-se 1µL de H₂O ultrapura *RNase* e *DNase free* em substituição da amostra. Utilizou-se ainda um poço com 20µL de H₂O ultrapura *RNase* e *DNase-free* como branco. Os *primers* utilizados foram recolhidos de trabalhos já publicados [26, 27] e sintetizados pela *Invitrogen*. Estes encontram-se listados no **anexo 5**.

A análise de expressão dos diferentes genes foi calculada pelo método ΔC^t , tendo como referência a expressão do gene 16S rRNA.

10. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO E ESPETROMETRIA DE MASSA (HPLC-MS)

10.1. CULTURAS MICROBIANAS

Foram realizados pré-inóculos através do procedimento descrito no ponto 3 para as estirpes eméticas 271, 322 e 323. O controlo positivo utilizado foi a estirpe F4810/72. Foram espalhados 100µL dos pré-inóculos em placas de BHI-Agar em triplicado e incubadas durante 10h a 30°C.

10.2. EXTRAÇÃO DE CES

Utilizando uma ansa, recolheu-se a massa celular das culturas em BHI-Agar para tubos *Falcon* de 50mL previamente tarados. Em seguida adicionou-se acetonitrilo (*HiPerSolv CHROMANORM* – *VWR Chemicals*) aos tubos *Falcon* num rácio de 12mL acetonitrilo/g de massa celular e colocaram-se os tubos num agitador orbital (*Heidolph Rotamax 120*) a 150RPM durante uma hora. Seguiu-se uma centrifugação a 1500G durante 10 minutos e recolha dos sobrenadantes para tubos de vidro. Transferiu-se em seguida 1mL de cada solução para *vials* de LC-MS.

10.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC)

10.3.1. DESCRIÇÃO DO SISTEMA

O sistema de HPLC utilizado foi um *Accela autosampler* com a uma temperatura constante de 25°C e bomba quaternária de pressão de trabalho até 600bar com desgaseificador incorporado *Accela 600 pump* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*). A separação foi realizada numa coluna *Hypersil GOLD* Pentafluorofenil (PFP) (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*), particularmente adequada para compostos que contenham anéis aromáticos substituídos, de 150mm x 2.1mm com partículas de 3µm.

Foram utilizadas três fases móveis: A, B e C. A fase móvel A foi utilizada para lavagem da sonda HESI-II e é uma solução de metanol em água ultrapura a 50%; a fase móvel B é um solvente aquoso, composto por uma solução de ácido acético a 0.1% em água ultrapura; a fase móvel C é um solvente orgânico, composto por uma solução de acetonitrilo a 0.1% em ácido acético.

10.3.2. REAGENTES UTILIZADOS

Todos os reagentes utilizados foram HPLC-*grade* com 99% de pureza. A água utilizada para a cromatografia foi LiChrosolv® (EMD-Milipore) e o acetonitrilo LiChrosolv® *Gradient Grade* (EMD-Milipore).

10.3.3. CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO

A taxa de fluxo foi de 250µL/min com eluição por programa de gradientes, que se inicia com 95% de fase móvel B e 5% de fase móvel C. Até aos 7 minutos ocorre inversão das fases (95% de fase móvel C e 5% de fase móvel B). Nos 3 últimos minutos do método ocorre novamente a inversão das fases para igualar as condições iniciais de gradiente. O tempo total de análise foi de 10 minutos. A agulha de injeção foi lavada com uma solução de metanol a 50% em água ultrapura. A coluna cromatográfica foi lavada por eluição da fase móvel B e C por um programa de gradientes.

10.4. ESPETROMETRIA DE MASSA

10.4.1. DESCRIÇÃO DO SISTEMA

O Espectrômetro de Massa utilizado é de alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometer - HRMS*) com uma resolução de 140000 na massa de 200m/z e velocidade de aquisição de um espectro por segundo, com esta resolução. O analisador de massa é um “*trap*”

orbital electrostático (FT-MS) sem necessidade de arrefecimento por azoto líquido. Possui uma fonte de ionização ESI ortogonal com gás de arrasto para remoção dos neutros.

10.4.2. DEFINIÇÕES PARA AS TRANSIÇÕES IÔNICAS

As definições comuns para todas as transições foram: Temperatura do tubo de transferências iônicas de 350°C; temperatura do vaporizador 350°C; pressão gasosa 35psi; fluxo gasoso auxiliar 10; voltagem do *spray* +3000V; consumo de azoto gasoso de 8L/minuto.

10.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO SISTEMA;

O limite de quantificação para o método aplicado foi de 25ng/mL de amostra, ou 25 partes por bilião (ppb).

IV – RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES DE *B.CEREUS* DE ORIGEM ALIMENTAR

A morfologia das colónias foi avaliada às 24 horas de crescimento a 30°C. Macroscopicamente, as colónias bacterianas apresentaram forma arredondada, de cor branco-acinzentada, bordos irregulares e superfície de aspeto rugoso. Foram identificadas duas estirpes (J240 e J418) com morfologia distinta, apresentando colónias com formato irregular e de aspeto rizóide. Em meio de cultura MYP, as vinte estirpes em estudo precipitaram a lecitina e não fermentaram o manitol.

Todas as estirpes foram tipificadas bioquimicamente através do sistema API CH50, resultando na identificação de duas espécies: *B. cereus* e *B. mycoides*. A proporção de *B. cereus*, comparativamente à de *B. mycoides* foi de 34.8% (n=8), para 52.2% (n=12), com índices de identificação a variar entre 40% e 99.3% ($\bar{x} = 76.4$; $\sigma = 13.7$). As colónias das estirpes de *B. mycoides* em meio de cultura sólido exibem um padrão de crescimento rizóide. Apenas uma das doze estirpes identificadas como *B. mycoides* pelo sistema API CH50 possuía esse padrão de crescimento. As restantes dez apresentavam uma morfologia dentro do padrão descrito para *B.cereus*.

Os resultados da deteção dos genes do operão *nhe*, operão *hbl* e gene *ces*, estão visíveis na **figura 3**.

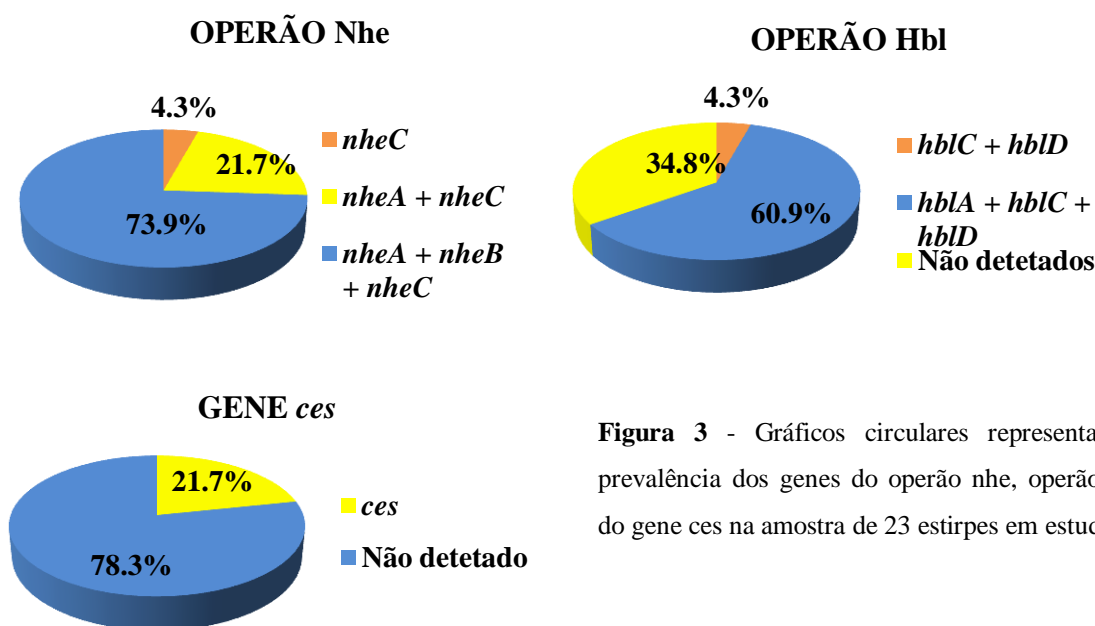


Figura 3 - Gráficos circulares representando a prevalência dos genes do operão *nhe*, operão *hbl* e do gene *ces* na amostra de 23 estirpes em estudo;

Relativamente à prevalência dos genes do operão *hbl* na nossa amostra, *hblC* e *hblD* foram detetados em conjunto em 4.3% (N=1) das estirpes. Os 3 genes deste operão foram detetados em conjunto em 60.9% (N=14) das estirpes. Em 34.8% (N=8) das estirpes não foi detetado nenhum dos genes do operão.

Relativamente à prevalência dos genes do operão *nhe*, *nheA* e *nheC* foram detetados em conjunto em 21.7% (N=5) das estirpes, os 3 genes do operão foram detetados em 73.9% (N=17) das estirpes e em 4.3% (N=1) das estirpes detetou-se apenas *nheC*.

Os operões *hbl* e *nhe* completos foram detetados em 39.1% (N=9) das 23 estirpes em estudo. O operão *nhe* é mais prevalente do que o operão *hbl*. Nas 21.7% (N=5) estirpes positivas para o gene *ces*, foi possível detetar os operões *hbl* e *nhe* completos em uma, o operão *nhe* completo em 3, e apenas o gene *nheC* em uma.

2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *B.CEREUS* DE ORIGEM ALIMENTAR

A cinética de crescimento foi determinada para todas as estirpes em estudo. A produção de toxinas pelo *B. cereus* é máxima na fase final do crescimento exponencial e início da fase estacionária [12]. Este é o momento ótimo para a extração de mRNA, com o objectivo de quantificar a expressão dos genes que codificam as diferentes toxinas por RT-qPCR.

As curvas de crescimento bacteriano foram construídas medindo os valores das OD₆₀₀ das culturas em meio líquido por espectrofotometria, durante um período de 24 horas, e podem ser consultadas no **anexo 2, figura 10**. A partir da análise destas curvas podemos constatar

que o fim da fase exponencial e o início da fase estacionária ocorre entre as 6 e as 12 horas de crescimento bacteriano. Na maioria das estirpes, o fim da fase exponencial ocorre por volta das 8 horas, no entanto na estirpe J256 o fim da fase exponencial parece ocorrer 2 horas mais cedo.

Os resultados da cinética de crescimento bacteriano obtidos para as estirpes em estudo estão de acordo com os dados da literatura publicada [29], na qual a fase final do crescimento exponencial é descrita entre as 8 e as 12 horas após a inoculação. Assim, com base nos dados obtidos, optou-se pela extração do mRNA às 10 horas de crescimento bacteriano.

3. TESTE DE β -HEMÓLISE

Os resultados dos testes de β -hemólise podem ser consultados no **anexo 3, tabela 3**. É possível observar que em todas as estirpes se verificou a existência de β -hemólise, com diferentes graus de intensidade, com exceção das estirpes 240 e 413. No entanto, o padrão característico de dupla hemólise associado à presença da toxina Hbl só se verificou em 56.5% (n=13) das estirpes. Apenas em duas das estirpes (246 e 256) foi detetada a expressão dos 3 genes do operão hbl por RT-qPCR, tendo as restantes 11 exibido expressão de apenas um ou dois dos genes do operão.

Nas restantes estirpes em que não se verificou o padrão de dupla hemólise, a análise por RT-qPCR não detetou expressão de nenhum dos genes do operão hbl, com exceção da estirpe 419, em que não foi detetada dupla hemólise e foi detetado a expressão do gene *hblD* por RT-qPCR.

A deteção da Hemolisina BL por imunocromatografia utilizando o teste GLISA *Duopath® Cereus Enterotoxins* foi positivo nas estirpes em que verificou o padrão de dupla hemólise, e negativo nas estirpes em que este padrão não foi observado, com exceção da estirpe 419, em que não foi detetada dupla hemólise e o resultado do teste GLISA *Duopath® Cereus Enterotoxins* foi positivo.

4. DETEÇÃO DE CEREULIDA E ENTEROTOXINAS POR IMUNOCROMATOGRÁFIA;

Os resultados dos testes GLISA foram consistentes entre os triplicados (ver **anexo 4, tabela 4**). É possível observar que a toxina Nhe foi detetada em todas as estirpes e a toxina Hbl em apenas 60.9% (n=14). As estirpes em estudo produziram a toxina Nhe mesmo quando apenas foi possível detetar por qPCR um ou dois dos genes do operão nhe. Do mesmo modo, nas estirpes em que se obteve resultado positivo no teste GLISA para a toxina Hbl também foi

possível observar que 78.5% (n=11) destas obtiveram resultados positivos apenas para um ou dois dos genes do complexo hbl por qPCR. Relativamente à toxina Ces, as estirpes que obtiveram resultados positivos no teste GLISA foram também positivas para o gene *ces* por qPCR.

5. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO mRNA

As concentrações finais dos produtos de extração de RNA foram determinadas por espectrofotometria, e variaram entre 148ng/μL e 425ng/μL (\bar{x} =234ng/μL; σ = ±84 ng/μL). Os graus de pureza situaram-se entre 1.9 e 2.1 (rácio A_{260}/A_{280}). Este intervalo no rácio A_{260}/A_{280} , assegura uma boa pureza do RNA, garantindo a ausência de inibidores da reação de PCR.

O RNA tratado com DNase foi despistado para a presença de vestígios de gDNA, através de PCR para a sequência do 16S rRNA seguido de eletroforese em gel de agarose. Nenhuma das amostras apresentou bandas no gel na região do 16S rRNA, garantindo assim a ausência de contaminação dos extraídos de RNA com moléculas de gDNA, passíveis de enviesar positivamente os resultados da expressão.

A integridade do RNA das diferentes amostras foi avaliado após o tratamento com DNase, determinando os índices RIN por electroforese capilar em “*chip*”, no *Bioanalyzer* 2100 da Agilent. Este índice varia entre 1 e 10, onde o valor mais baixo corresponde ao estado de maior degradação do RNA e o valor mais alto ao de maior integridade do RNA. Apenas as amostras com índices de RIN superiores a 5 podem ser utilizadas em estudos de expressão, garantindo resultados fidedignos [30].

Os valores de RIN obtidos para as 20 estirpes em estudo, situaram-se entre os 5,5 e os 7,5 e podem ser consultados no **anexo 5, tabela 6**.

6. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS PRINCIPAIS COMPLEXOS TOXINOGENICOS EM *B.CEREUS* DE ORIGEM ALIMENTAR

O processo analítico que visa determinar a expressão dos principais complexos toxinogénicos em *B.cereus* de origem alimentar é efetuado segundo um fluxo de trabalho que envolve três grandes fases: **1)** Otimização das temperaturas de hibridação para os diferentes *primers*; **2)** Determinação das eficiências de reação para cada par de *primers*; e **3)** Quantificação da expressão por qPCR.

6.1. OTIMIZAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE HIBRIDAÇÃO

A otimização das temperaturas de hibridação tem por objectivo determinar o ciclo limiar (ou ciclo *threshold* - Ct), a partir do qual a amplificação do DNA alvo segue uma função exponencial tipo $f(x) = 2^n$. Este é um passo importante para a determinação da eficiência das reações, necessária para garantir a fidelidade dos resultados de análise de expressão por qPCR.

As temperaturas ótimas de hibridação foram determinadas realizando uma reação de qPCR com gradiente de temperaturas de hibridação para os diferentes pares de *primers*. Para este fim, os *primers* são submetidos a diferentes temperaturas de hibridação durante a mesma reação de amplificação. Neste estudo foram selecionadas oito temperaturas de hibridação e realizadas reações de qPCR utilizando cada uma das temperaturas de hibridação para cada par de *primers*. No final foi escolhida uma temperatura ótima para cada par de *primers* tendo em conta dois critérios: **1)** Ciclo mais baixo a partir do qual existe amplificação; **2)** Presença de produto de amplificação específico.

A determinação da presença de um produto de amplificação específico fez-se recorrendo ao método de análise das curvas de fusão ou de *melting*. Cada produto de amplificação possui uma temperatura de fusão ou de *melting* específica (T_m), de acordo com a sua composição em nucleótidos (G, C, A, T). As diferentes temperaturas de fusão para cada par de *primers* foram calculadas, após determinação do comprimento em pares de bases dos fragmentos amplificados, utilizando o programa MELTING, versão 5.0 [31, 32].

Os comprimentos dos fragmentos amplificados foram determinados, recorrendo às seguintes ferramentas bioinformáticas: PCR *in silico* [33] para os genes 16 *rRNA*, *hblA*, *hblD* e *nheB* utilizando como referência a estirpe ATCC 14579; *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para o gene *nheA* utilizando como referência a estirpe NVH 391-98; BLAST para o gene *hblC* utilizando como referência a estirpe BAG5X12-1; BLAST para o gene *nheC* utilizando como referência a estirpe HuA2-1; BLAST para o gene *cesA* utilizando como referência a estirpe NC7401 [34]. Os resultados podem ser consultados no **anexo 5, tabela 5**.

Todas as reações de PCR tiveram resultados satisfatórios. Todos os fragmentos amplificados foram submetidos à análise das temperaturas de fusão, coincidindo com as temperaturas calculadas pelo programa MELTING, versão 5.0, demonstrando a especificidade dos *primers*. Os resultados da otimização das temperaturas de hibridação estão presentes na **tabela 5** do **anexo 5**.

6.2. DETERMINAÇÃO DAS EFICIÊNCIAS DE REAÇÃO

A eficiência das reações de qPCR foram calculadas para cada par de *primers*, utilizando o método das diluições seriadas de fator 10. Neste método são realizadas pelo menos quatro diluições seriadas de fator 10, a partir de uma amostra positiva para cada gene alvo. Cada uma das diluições do gene alvo é amplificada e o Ct para cada uma é registrado e representado num gráfico, que relaciona o número do Ct (representado no eixo das ordenadas) com a respectiva diluição (representada no eixo das abcissas). O gráfico resultante será uma reta com declive negativo, que será utilizado para calcular a eficiência da reação segundo a fórmula:

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{declive}}}$$

A determinação da eficiência da reação de qPCR é um ponto essencial, que deve ser sempre efetuado quando se pretende desenvolver estudos de expressão génica. A eficiência é o melhor indicador de robustez e de reprodutibilidade da reação de qPCR, que nos permite ter confiança nos resultados obtidos. Os valores de eficiência aceitáveis para reações de qPCR, devem situar-se entre o intervalo de 90 a 105% e traduzem-se na percentagem de DNA alvo amplificado, em cada ciclo de reação [35].

As eficiências das reações obtidas para cada par de *primers* das diferentes toxinas em estudo, situaram-se entre os 95% e os 104,9%, sendo consideradas aceitáveis para efetuar estudos de expressão (ver **tabela 7** do **anexo 5**).

6.3. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÉNICA

A expressão génica foi quantificada utilizando o método Δ Ct, tendo como gene referência o 16S rRNA. Este método é uma variação do método de *Livak* que utiliza a seguinte fórmula para calcular a expressão génica:

$$\text{Rácio (gene referência / gene alvo)} = 2^{\text{Ct (gene referência)} - \text{Ct (gene alvo)}}$$

O valor 2 deve ser utilizado na equação quando a eficiência (E) da reação é 100%. Sempre que o valor da E seja superior ou inferior a 100% deverá substituir-se o valor 2 na equação pelo valor correspondente, calculado através da equação abaixo:

$$(2 \times E) / 100$$

As amostras em estudo foram processadas em triplicado para cada estirpe e os resultados das reações de qPCR foram concordantes entre os triplicados experimentais. Todas as reações de qPCR foram validadas por electroforese em gel de agarose. A partir dos valores de Ct obtidos para cada gene em estudo, foi determinada a expressão segundo a equação $2^{\Delta\text{Ct}}$

para cada uma das réplicas. No final foi feita a média dos valores da expressão para cada gene e efectuada uma transformação logarítmica de base 10, para facilitar a representação gráfica dos resultados da expressão.

6.3.1. EXPRESSÃO DOS GENES DO OPERÃO HBL

As estirpes 246 e 256 foram as únicas que apresentaram expressão simultânea dos três genes do operão hbl, para além dos seus níveis de expressão serem os mais elevados (**Figura 4**). No entanto a estirpe 256 atingiu a fase estacionária duas horas mais cedo (6 horas de crescimento), comparativamente à maioria das estirpes em análise.

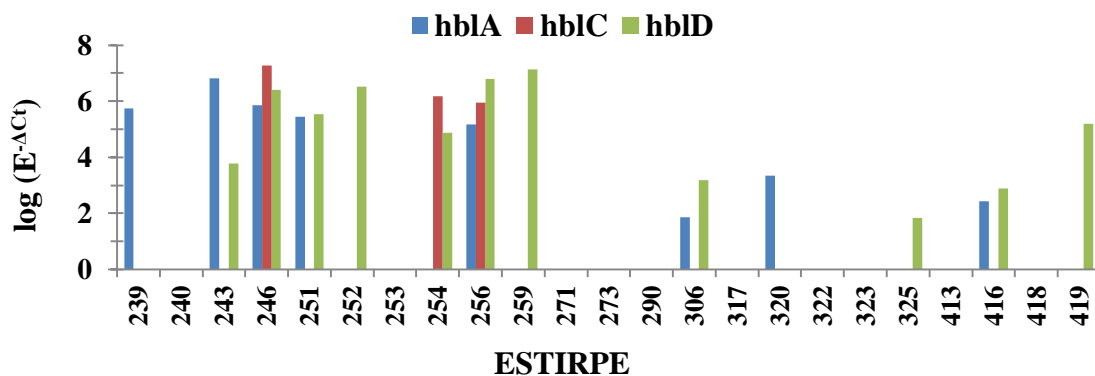


Figura 4 - Expressão dos genes do complexo hbl às 10 horas de crescimento bacteriano. No eixo das abcissas estão representadas as diferentes estirpes e no eixo das ordenadas o logaritmo dos valores de expressão génica obtidos pelo método ΔCt .

6.3.2. EXPRESSÃO DOS GENES DO OPERÃO NHE

As estirpes em estudo foram analisadas por PCR, para a presença/ausência dos genes do operão nhe, à semelhança do que foi feito para o operão hbl (ver **anexo 1, tabela 2**). As prevalências dos diferentes genes do operão nhe foram de 100% (n=23) para *nheA* e *nheC*; e 78,2% para *nheB* (n=18).

Em 26.1% (n=6), 4.3% (n=1) e 65.2% (n=4) das estirpes, os genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente, foram detetados através de PCR convencional mas não foi possível detetar expressão dos mesmos por qPCR (**Figura 5**).

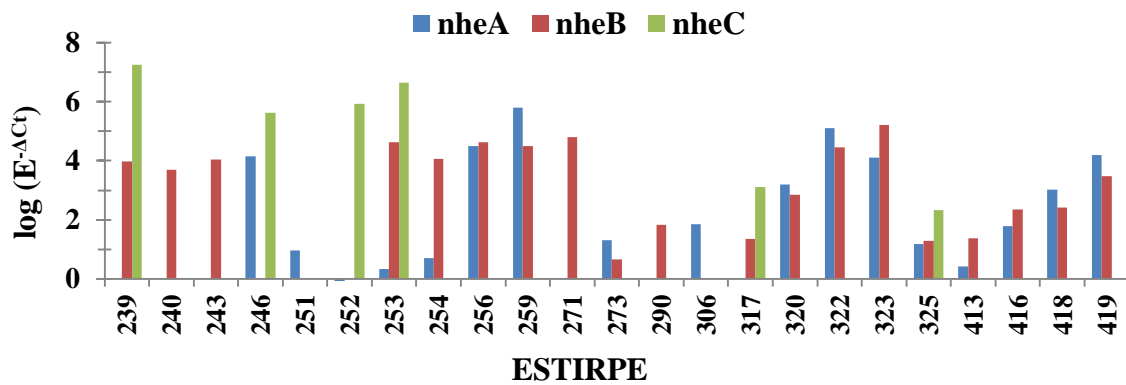


Figura 5 - Expressão dos genes do complexo nhe às 10 horas de crescimento. No eixo das abcissas estão representadas as diferentes estirpes e no eixo das ordenadas os logaritmos dos valores de expressão génica obtidos pelo método ΔCt .

O gene *nheB* foi detetado por qPCR na estirpe 243, tendo sido dado como negativo no estudo de prevalência. No presente estudo foi o único caso em que se verificou um resultado negativo no teste de prevalência e um resultado positivo na análise de expressão.

Neste estudo todas as estirpes apresentaram resultado positivo para Nhe no teste GLISA *Duopath® Cereus Enterotoxins*, mas apenas as estirpes 253 e 325 expressaram os 3 genes do operão nhe.

6.3.3. EXPRESSÃO DO GENE CESA

A análise da expressão para o gene *cesA*, que codifica um dos componentes da cereulida sintetase, foi efectuada para as estirpes 271, 317, 320, 322 e 323, as únicas em que o gene foi detetado no estudo de prevalência. Os resultados são visíveis na **figura 6**.

As estirpes 317 e 320, apesar de terem sido identificadas como positivas para o gene *cesA*, não apresentaram expressão para este gene por qPCR. No teste GLISA *Singlepath® Emetic Tox Mrk* os resultados foram também negativos, ao fim de 24h de crescimento. As restantes estirpes apresentaram níveis variados de expressão do gene, tendo sido a estirpe 322 a única a apresentar sobre-expressão do gene relativamente ao 16S rRNA. Todas as restantes estirpes apresentaram resultados positivos no teste GLISA *Singlepath® Emetic Tox Mrk*.

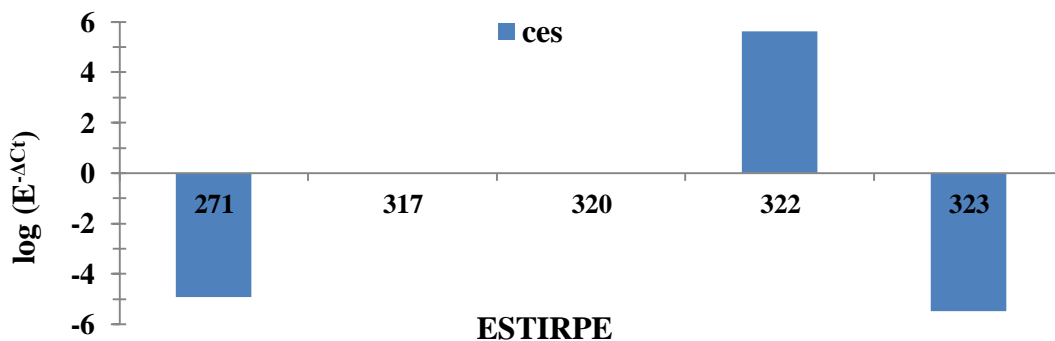


Figura 6 - Expressão do gene *ces* às 10 horas de crescimento. No eixo das abcissas estão representadas as diferentes estirpes e no eixo das ordenadas os logaritmos dos valores de expressão génica obtidos pelo método ΔCt .

A prevalência geral de estirpes produtoras de cereulida é cerca de 1.5% na população em geral, no entanto esta pode subir para os 32% em amostras alimentares [22]. Apesar de a reduzida dimensão da amostra em estudo não permitir extrapolar estes resultados, observámos 21.7% (n=5) de prevalência do gene *ces* na amostra, e 13% (n=3) de estirpes produtoras de cereulida.

7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO E ESPETROMETRIA DE MASSA (HPLC-MS)

7.1. QUANTIFICAÇÃO DE CES

As estirpes de *B.cereus* que apresentaram resultado positivo para a expressão do gene *cesA*, bem como resultados positivos no teste de GLISA *Singlepath® Emetic Tox Mrk*, foram submetidos à análise por HPLC-MS, com o intuito de quantificar a produção de cereulida, a partir de culturas em meio sólido (**tabela 1**).

Os resultados que obtivemos mostram que as estirpes que identificamos são produtoras intermédias de cereulida (180-600ng/mg massa celular às 24h de crescimento em meio de cultura sólido). Estes níveis de produção são idênticos aos níveis de cereulida produzidos pela estirpe padrão F4810/72, identificada na literatura como produtora intermédia [36].

ESTIRPE	ces ng/mg massa celular
	24h
271	259,3
322	212,0
323	181,4
F4810/72	297,8

Tabela 1 - Quantidade de cereulida em ng por mg de massa celular extraída a partir de culturas de estirpes eméticas de *B.cereus* em meio de cultura sólido BHI-agar às 10h e às 24h de crescimento;

V – DISCUSSÃO

1. CLASSIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

A classificação bioquímica das estirpes em estudo foi efectuada utilizando o sistema API CH50. O sistema API CH50 tem uma especificidade de 90% [37], na identificação de bacilos Gram-positivos até ao nível de espécie, tendo classificado 12 das estirpes em estudo como *B. mycoides*. No entanto, apenas uma apresentou colónias bacterianas com morfologia

rizóide, a característica fenotípica desta espécie. Assim, pode concluir-se que apenas uma das estirpes foi corretamente identificada como *B. mycooides*, enquanto as restantes 11 pertencem a outras espécies, dentro do grupo *B. cereus*.

O sistema API CH50 identificou também uma das estirpes como *B. anthracis*. Com o objetivo de confirmar este resultado, foi efetuada a análise dos marcadores cromossomais e plasmídicos específicos desta espécie. Os resultados destas análises foram negativos, não se tratando de *B. anthracis*. No entanto, após o estudo de pesquisa por PCR dos genes das enterotoxinas Hbl e Nhe e toxina cereulida, verificou-se que esta estirpe possui o gene *cesA*, marcador utilizado na deteção do operão que codifica a toxina cereulida. O operão *ces* está localizado num megaplasmídeo, designado por pBCE4810. Este plasmídeo apresenta semelhanças com o plasmídeo pXO1 de *B. anthracis*, onde se encontram os genes que codificam os fatores de virulência associados à doença provocada por esta bactéria, tanto no Homem como nos animais. As semelhanças entre estes elementos genéticos móveis sugerem uma ancestralidade comum nas espécies de *B. cereus*. Este é um dado importante, pois sugere que as estirpes produtoras de cereulida pertencem a um *cluster* génico filogeneticamente homogéneo e mais próximo de *B. anthracis* do que das restantes espécies do grupo *B. cereus* [38].

2. PREVALÊNCIA E EXPRESSÃO GÉNICA DE TOXINAS EM B. CEREUS;

A literatura existente sobre a prevalência dos genes dos operões hbl e nhe em isolados de *B. cereus* de origem alimentar, refere que os genes do operão hbl estão presentes em 29 a 92% das estirpes, enquanto os genes do operão nhe estão presentes em 84 a 100% das estirpes [39-42]. Na nossa amostra, através da metodologia de deteção por PCR, observamos uma prevalência do operão nhe completo em 74% das estirpes, comparativamente com 65% para o operão hbl. A presença de ambos os operões completos hbl e nhe foi observada apenas em 39.1% das estirpes, não sendo este o genótipo toxinogénico mais prevalente. Vários autores sugerem que este tipo de genótipo não tem qualquer vantagem competitiva [3, 27], no entanto determinar a sua prevalência é um dado importante na compreensão do potencial relativo de patogenicidade em *B. cereus*.

As estirpes de *B. cereus* produtoras de cereulida isoladas a partir de alimentos são muito raras, variando a sua prevalência entre os 8% e 17% [39, 43, 44]. O gene mais utilizado em estudos de prevalência de cereulida por PCR é o *cesA*, um dos genes estruturais da enzima cereulida sintetase, tendo este sido detetado na pesquisa por PCR em 21.7% das estirpes analisadas.

A prevalência dos diversos genes que compõem os operões *hbl*, *nhe* e *Ces* foi também avaliada através de estudos de expressão por RT-qPCR. Esta abordagem é necessária para determinar o potencial de patogenicidade relativo das estirpes selecionadas, visto ser impossível saber se uma estirpe produz toxinas apenas pela presença dos respectivos genes, que codificam as toxinas em análise.

2.1. ENTEROTOXINA HBL

A expressão do operão *hbl* foi analisada para cada gene individualmente e comparada com os resultados obtidos no estudo de prevalência previamente realizado (**Figura 7**). Os resultados obtidos revelaram uma prevalência mais baixa para cada gene do operão *hbl* detectado por expressão, comparativamente com o mesmo gene detectado por pesquisa simples, através de PCR.

Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por outros autores, nomeadamente num estudo de 2002, feito por Guinebretiére et al. Neste estudo, foi feita a detecção por PCR seguida de eletroforese para os genes dos operões *hbl* e *nhe*, em amostras provenientes de isolados alimentares. Guinebretiére et al. efetuaram em paralelo a detecção direta dos genes dos operões *hbl* e *nhe* por *Southern Blotting*, obtendo uma maior percentagem de positivos por esta metodologia, comparativamente com a pesquisa realizada por PCR convencional [39].

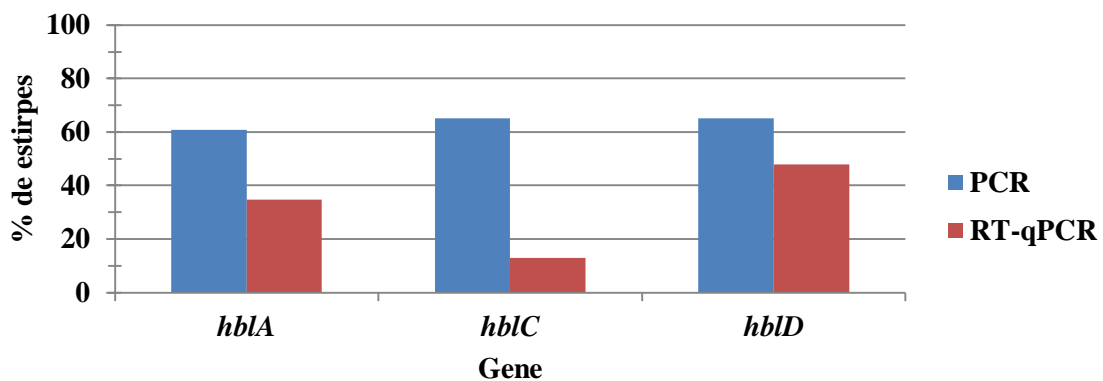


Figura 7 - Comparação entre os resultados da análise dos genes do operão *hbl* por PCR (Detecção) e por RT-qPCR (Expressão)

A existência de vários polimorfismos nos genes dos operões *hbl* e *nhe* é um fenómeno bem documentado em estudos efetuados em estirpes provenientes de amostras alimentares. Estes polimorfismos podem não afetar a funcionalidade dos componentes expressos de cada gene [40]. No entanto, a existência de polimorfismos interfere na reação de PCR, dificultando as hibridações entre os *primers* e as sequências dos genes alvo, sendo os principais

responsáveis pelo elevado número de resultados negativos obtidos por PCR convencional e por RT-qPCR. Este fenómeno dificulta a interpretação dos resultados obtidos por RT-qPCR, restringindo a utilização desta metodologia como um indicador fiável de produção da toxina hbl, em estirpes de *B.cereus*.

Assim, as diferenças observadas entre os resultados da pesquisa por PCR e da expressão génica por RT-qPCR revelaram a necessidade de recorrer a outros métodos analíticos com o intuito de melhor compreender a expressão dos genes do operão hbl, e complementar a informação sobre a produção da toxina Hbl. Assim, utilizou-se o teste imunocromatográfico GLISA Duopath® *Cereus Enterotoxins*, que deteta o componente L₁ da toxina Hbl, codificado pelo gene *hblD*. Os resultados obtidos através da análise com o teste imunocromatográfico GLISA Duopath® *Cereus Enterotoxins*, permitiram identificar o componente L₁ da toxina Hbl, codificado pelo gene *hblD*, em 78.6% das estirpes. As estirpes positivas no teste imunocromatográfico foram também positivas na análise de prevalência do operão hbl por PCR, bem como no estudo de RT-qPCR, que avaliou a expressão às 10h de crescimento, dos vários genes que compõem este operão. De igual modo, em todas as estirpes negativas para a componente L₁ da toxina Hbl no teste imunocromatográfico, não houve qualquer deteção nem expressão do gene *hblD*, pelos métodos moleculares previamente referidos. Estes resultados sugerem que o componente L₁ da toxina Hbl, codificado pelo gene *hblD*, foi expresso e traduzido, no entanto não nos permitem retirar conclusões definitivas sobre a expressão e tradução dos genes *hblA* e *hblC*. Assim, não podemos afirmar que tenha ocorrido produção de toxina Hbl biologicamente ativa, apesar de tudo indicar que as estirpes positivas para ambos os métodos moleculares, possuam elevada probabilidade de serem enterotóxicas para Hbl.

A toxina Hbl tem atividade hemolítica e está descrita na literatura pela sua capacidade em produzir um padrão típico de β-hemólise dupla, com halos descontínuos em torno das colónias bacterianas. O padrão de β-hemólise dupla descrito por Glatz et al. foi inicialmente testado para a forma purificada da toxina Hbl, em meio de cultura agar-sangue [45]. Este fenómeno foi também descrito por outros autores [46]. Partindo deste pressuposto, observou-se a distribuição da presença ou ausência do padrão de β-hemólise dupla às 10h de crescimento em meio de cultura agar-sangue nas estirpes de *B.cereus* em estudo.

Os resultados obtidos revelaram o desenvolvimento de β-hemólise dupla em 13 das 14 estirpes com resultados positivos no método imunocromatográfico para a toxina Hbl. As 13 estirpes com β-hemólise dupla também foram positivas no PCR de deteção para a presença dos genes do operão hbl. No entanto quando comparamos estes resultados com os da

expressão, não existe uma sobreposição completa para todas as estirpes. Apenas 2 das 13 estirpes são positivas para todos os testes, incluindo os de expressão dos genes do operão hbl. A estirpe com resultado positivo no teste imunocromatográfico que não apresentou β -hemólise dupla caracteriza-se ainda por ser positiva para a presença e expressão do gene *hblD* e negativa para os restantes genes do operão hbl. O padrão de β -hemólise dupla negativo, associado à positividade no teste imunocromatográfico faz sentido neste contexto, uma vez que o teste de imunocromatografia só deteta o componente HblD da toxina Hbl, encontrando-se este gene presente e a ser expresso.

Relativamente às estirpes que testaram negativo no ensaio imunocromatográfico, nenhuma delas apresentou β -hemólise dupla às 10h de crescimento. Adicionalmente, estas estirpes também não possuíam todos os genes do operão hbl, logo não estão reunidas as condições necessárias à produção de toxina biologicamente activa, requeridas para o desenvolvimento do padrão de β -hemólise dupla.

Os resultados obtidos no teste de β -hemólise sugerem haver a existência de uma ligação entre o padrão de β -hemólise dupla e a presença da toxina Hbl funcional. É possível que o padrão de β -hemólise dupla se possa constituir como um marcador fenotípico no despiste de estirpes enterotóxicas para a toxina Hbl.

2.2. ENTEROTOXINA NHE

De modo semelhante ao efetuado para o operão hbl, a expressão do operão nhe foi analisada para cada gene individualmente e comparada com os resultados do estudo de prevalência previamente realizado. Os resultados desta comparação podem ser visualizados na **Figura 8**.

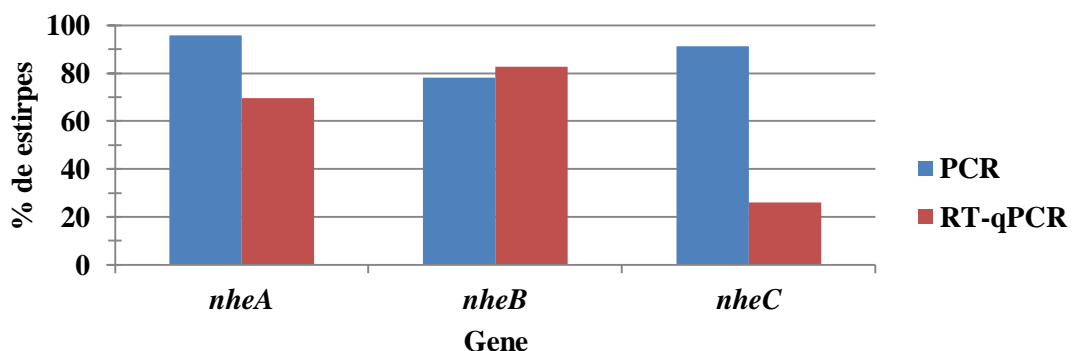


Figura 8 - Comparação entre os resultados da análise dos genes do operão nhe por PCR (Deteção) e por RT-qPCR (Expressão);

Observou-se uma prevalência mais baixa para cada gene do operão nhe detetado no estudo de expressão, comparativamente com o mesmo gene detetado por pesquisa simples,

através de PCR. Esta diferença nas prevalências é maior no gene *nheC*. Existem estudos em que se observou um nível de expressão do gene *nheC* inferior ao nível de expressão dos genes *nheA* e *nheB*. Pensa-se que a existência de uma estrutura secundária no sítio de ligação ao ribossoma poderá ser responsável pela diminuição da eficiência da tradução. Este poderá ser um mecanismo regulador, visto que os produtos proteicos dos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* proporcionam atividade máxima à toxina quando presentes num rácio de 10:10:1 [47, 48].

As diferenças nas prevalências observadas nos resultados de deteção por PCR e de expressão por RT-qPCR revelaram a necessidade de recorrer a outros métodos analíticos, com o intuito de melhor compreender a expressão dos genes do operão *nhe*, e complementar a informação sobre a produção da toxina Nhe. Para este fim, recorreu-se ao teste imunocromatográfico GLISA *Duopath*® *Cereus Enterotoxins*, que deteta o componente da toxina Nhe codificado pelo gene *nheB*.

Os resultados obtidos através da análise imunocromatográfica via GLISA *Duopath*® *Cereus Enterotoxins* permitiram identificar o componente da toxina Nhe, codificado pelo gene *nheB*, em todos os *B.cereus* em estudo. No entanto, só em 78.3% das estirpes foi detetado o gene *nheB* por PCR. Estes resultados sugerem que o componente B da toxina Nhe foi expresso e traduzido, mas não nos permitem retirar conclusões sobre a expressão e tradução dos genes *nheA* e *nheC*.

Os genes *nheA* e *nheB* foram detetados simultaneamente em 47.8% das estirpes analisadas, por ambas as metodologias PCR e RT-qPCR. Adicionalmente, o componente da toxina Nhe codificado pelo gene *nheB* foi também detetado por imunocromatografia, via teste GLISA *Duopath*® *Cereus Enterotoxins*. É muito provável que nestas estirpes o componente A da toxina Nhe esteja também a ser produzido. Caso este pressuposto seja verdadeiro, estas estirpes detêm um maior potencial enterotoxinogénico, pois a literatura refere existência de atividade biológica, ainda que não seja máxima, em estirpes que produzem apenas os componentes *nheA* e *nheB*, em simultâneo [49]. Neste estudo encontrámos ainda duas estirpes: a 253 e a 325, que possuem o operão *nhe* completo e a ser expresso, tendo sido detetado por ambas as metodologias: PCR e imunocromatografia. Estas estirpes detêm uma elevada probabilidade de possuírem potencial enterotoxinogénico, no entanto não podemos afirmar com certeza que a toxina Nhe possua atividade biológica completa. A determinação da enterotoxicidade destas estirpes teria de ser efetuada, recorrendo ao uso de ensaios funcionais em cultura de células.

2.3. TOXINA EMÉTICA

Estudou-se o potencial para a produção de toxina emética, cereulida, pesquisando o gene *cesA* por PCR e efectuando a análise da sua expressão através de RT-qPCR (figura 9). A sua produção foi determinada a partir do teste imunocromatográfico GLISA *Singlepath*® *Emetic Tox Mrk* e confirmada quantitativamente por HPLC-MS.

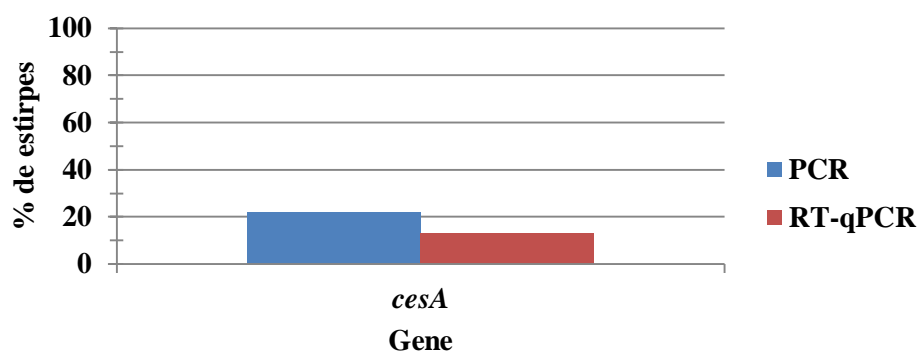


Figura 9 - Comparação entre os resultados da análise do gene *cesA* por PCR (Detecção) e por RT-qPCR (Expressão);

O gene *cesA* apresenta uma maior prevalência pelo método de PCR, comparativamente com o RT-qPCR (figura 8), padrão idêntico ao verificado nos restantes genes das enterotoxinas Hbl e Nhe. As diferenças observadas nestes resultados, determinaram o uso de métodos analíticos alternativos, para compreender a expressão do gene *cesA*. Assim, para confirmar os resultados, foi utilizado o teste imunocromatográfico GLISA *Singlepath*® *Emetic Tox Mrk*, que deteta uma proteína co-expressa com a toxina cereulida.

Os resultados obtidos através do teste imunocromatográfico GLISA *Singlepath*® *Emetic Tox Mrk* permitiram identificar a proteína co-expressa com a cereulida em 3 das 5 estirpes testadas. Este valor está de acordo com os resultados obtidos no RT-qPCR, o que nos dá uma forte probabilidade de estas estirpes estarem a produzir cereulida. Assim, a metodologia “gold standard” (HPLC-MS) foi utilizada, para confirmar definitivamente a capacidade sintética da toxina emética, por partes das estirpes identificadas. A produção da toxina nas culturas bacterianas foi testada às 24h de crescimento, tendo sido efetuada a sua extração, deteção e quantificação por HPLC-MS.

Os resultados obtidos pelo método de HPLC-MS demonstraram que as 3 estirpes positivas no teste imunocromatográfico produzem cereulida, pois foi possível detetar a sua presença por HPLC-MS. Ao analisar as quantidades de cereulida extraídas nas 3 estirpes e comparando-as com os resultados de RT-qPCR para o gene *cesA*, é possível observar que os

níveis de expressão génica foram cerca de 10 vezes superiores na estirpe 322, relativamente às estirpes 271 e 323. No entanto, os valores obtidos por HPLC-MS demonstraram que as quantidades de cereulida produzidas pelas 3 estirpes são idênticas. Uma possível explicação para este fenómeno está relacionada com o início da expressão do operão ces. Os genes do operão ces são expressos com maior intensidade na fase final do crescimento exponencial, que se situa entre as 8h e as 12h de crescimento. A cereulida produzida vai sendo depositada no meio de cultura e é detetável em quantidades crescentes a partir das 10h até às 24h de crescimento. Após as 24h de crescimento, a produção de cereulida diminui até cessar [50, 51]. A estirpe 322 provavelmente terá atingido a fase final do crescimento exponencial mais cedo, e conseqüentemente iniciado a transcrição do operão ces antes das estirpes 271 e 323. Assim, foi possível obter maior quantidade de mRNA às 10h de crescimento bacteriano, refletindo-se em valores elevados de expressão génica. No entanto, a quantidade total de cereulida produzida por esta estirpe foi semelhante à das estirpes 271 e 323.

Como foi já referido, uma das estirpes de *B.cereus* produtoras de cereulida foi classificada como *B.anthraxis* na análise bioquímica. Uma das características do *B.anthraxis* é ser não hemolítico em meio de cultura agar-sangue de carneiro. As estirpes produtoras de cereulida não possuem capacidade β -hemolítica e adicionalmente são negativas por PCR para o operão hbl [36, 52, 53]. Os resultados que obtivemos para as estirpes produtoras de cereulida, estão de acordo com estas observações, levando-nos a crer que neste caso particular, podemos estar a trabalhar com uma estirpe “borderline”. No entanto para podermos obter conclusões mais precisas, necessitamos de utilizar técnicas analíticas mais avançadas como a sequenciação completa do genoma e a comparação deste com as bases de dados de bioinformática.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de prevalência dos genes dos operões hbl e nhe através de pesquisa por PCR são coincidentes com vários estudos já publicados. No entanto, os resultados obtidos no estudo de prevalência por PCR, quando comparados com os resultados de expressão por RT-qPCR, não foram consistentes entre si. Em muitas das estirpes onde foram detetados os genes por PCR, não foi possível efetuar a sua deteção por RT-qPCR a partir dos produtos resultantes da expressão génica. Assim, a utilização dos resultados de RT-qPCR, para confirmar a produção de enterotoxinas Hbl e Nhe deve ser abordada com cautela. Visto não ter sido aplicado nenhum teste de deteção direto ou indireto, para determinar a atividade biológica da toxina Nhe, não é possível concluir com certeza, quanto à capacidade das estirpes bacterianas produzirem esta toxina às 10h de crescimento.

A produção da toxina Hbl foi testada diretamente pelo teste de β -hemólise dupla, desenvolvido no presente estudo. O protocolo desenvolvido para utilizar a β -hemólise dupla como característica patognomónica das estirpes produtoras de toxina Hbl produziu resultados promissores, que apontam um possível emprego na vertente do diagnóstico. Os resultados deste método foram consistentes com as restantes técnicas utilizadas na determinação da presença e produção da toxina Hbl. No entanto, os resultados deste teste necessitam de ser validados, para um maior número de estirpes e contra uma metodologia padrão. Achamos que o teste de β -hemólise é simples, robusto e produz resultados facilmente observáveis, o que motiva a sua exploração como método de diagnóstico no despiste de estirpes de *B.cereus* enterotoxinogénicas para Hbl.

Foi referido anteriormente que as intoxicações provocadas por *B.cereus* têm uma sintomatologia e um tratamento semelhante a outros patogénios mais comuns. Esta característica é um dos principais fatores responsáveis pela subnotificação dos surtos de toxinfecção alimentar atribuíveis ao *B.cereus*. Os dados recolhidos no presente estudo mostram que todas as estirpes de origem alimentar possuem potencial toxinogénico para uma ou mais das toxinas em estudo. Estes resultados demonstram o impacto que este microrganismo pode ter no âmbito da Saúde Pública. Assim, o presente trabalho pretende alertar para a necessidade da implementação de normas de higiene e Segurança Alimentar em todos os ambientes onde haja manipulação e confecção de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rocourt, J.M., G.; Vierk, K.; Schlundt, J.;, *The present state of foodborne disease in OECD countries*2003, Geneva: World Health Organization.
2. Organization., W.H., *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe; 8th Report 1999-2000; Country Reports: Portugal* 2001.
3. Stenfors Arnesen, L.P., A. Fagerlund, and P.E. Granum, *From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(4): p. 579-606.
4. Kotiranta, A., K. Lounatmaa, and M. Haapasalo, *Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections*. Microbes Infect, 2000. **2**(2): p. 189-98.
5. Murray, P.R.R., K.S.; Pfaller, M.A.;, *Medical Microbiology*2008: Mosby Elsevier.
6. Organization., W.H., *Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control*2008: WHO Press.
7. Granum, P.E., *Bacillus cereus and its toxins*. Soc Appl Bacteriol Symp Ser, 1994. **23**: p. 61S-66S.
8. Mahler, H., et al., *Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of Bacillus cereus*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1142-8.
9. Dierick, K., et al., *Fatal family outbreak of Bacillus cereus-associated food poisoning*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(8): p. 4277-9.
10. Naranjo, M., et al., *Sudden death of a young adult associated with Bacillus cereus food poisoning*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(12): p. 4379-81.
11. Lund, T., M.L. De Buyser, and P.E. Granum, *A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis*. Mol Microbiol, 2000. **38**(2): p. 254-61.
12. Granum, P.E. and T. Lund, *Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. FEMS Microbiol Lett, 1997. **157**(2): p. 223-8.
13. A., J., *Food-borne disease in the Portuguese Army (2006/2012)*. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 2013(108): p. 154-160.
14. Andersson, A., U. Ronner, and P.E. Granum, *What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens Bacillus cereus and Clostridium perfringens?* Int J Food Microbiol, 1995. **28**(2): p. 145-55.
15. Sohler, D., F. Berthier, and J. Reitz, *Safety assessment of dairy microorganisms: bacterial taxonomy*. Int J Food Microbiol, 2008. **126**(3): p. 267-70.
16. Helgason, E., et al., *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis--one species on the basis of genetic evidence*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(6): p. 2627-30.
17. Bottone, E.J., *Bacillus cereus, a volatile human pathogen*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(2): p. 382-98.

18. Slonczeswski, J.L. and J.W. Foster, *Microbiology - An evolving science* 2009, United States of America: W.W. Norton & Company, Inc.
19. Senesi, S. and E. Ghelardi, *Production, secretion and biological activity of Bacillus cereus enterotoxins*. *Toxins (Basel)*, 2010. **2**(7): p. 1690-703.
20. Ehling-Schulz, M., M. Fricker, and S. Scherer, *Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness*. *Mol Nutr Food Res*, 2004. **48**(7): p. 479-87.
21. Delbrassinne, L., et al., *An emetic Bacillus cereus outbreak in a kindergarten: detection and quantification of critical levels of cereulide toxin*. *Foodborne Pathog Dis*, 2015. **12**(1): p. 84-7.
22. Ceuppens, S., et al., *Regulation of toxin production by Bacillus cereus and its food safety implications*. *Crit Rev Microbiol*, 2011. **37**(3): p. 188-213.
23. Lund, T. and P.E. Granum, *Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from Bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak*. *FEMS Microbiol Lett*, 1996. **141**(2-3): p. 151-6.
24. Boonchai, N., et al., *Study on cytotoxicity and nucleotide sequences of enterotoxin FM of Bacillus cereus isolated from various food sources*. *J Med Assoc Thai*, 2008. **91**(9): p. 1425-32.
25. Ehling-Schulz, M., et al., *Cereulide synthetase gene cluster from emetic Bacillus cereus: structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1*. *BMC Microbiol*, 2006. **6**: p. 20.
26. Gomes, I., *Pesquisa de enterotoxinas em isolados alimentares do grupo Bacillus cereus*, in *Faculdade de Medicina Veterinária* 2009, Universidade Técnica de Lisboa: Lisboa.
27. Melnick, R.L., et al., *Detection and expression of enterotoxin genes in endophytic strains of Bacillus cereus*. *Lett Appl Microbiol*, 2012. **54**(5): p. 468-74.
28. Khaneja, R., et al., *Carotenoids found in Bacillus*. *J Appl Microbiol*, 2010. **108**(6): p. 1889-902.
29. Rosenfeld, E., et al., *Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen Bacillus cereus F4430/73 strain*. *Can J Microbiol*, 2005. **51**(2): p. 149-58.
30. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. *BMC Mol Biol*, 2006. **7**: p. 3.
31. Dumousseau, M., et al., *MELTING, a flexible platform to predict the melting temperatures of nucleic acids*. *BMC Bioinformatics*, 2012. **13**: p. 101.
32. Le Novere, N., *MELTING, computing the melting temperature of nucleic acid duplex*. *Bioinformatics*, 2001. **17**(12): p. 1226-7.
33. Bikandi, J., et al., *In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction*. *Bioinformatics*, 2004. **20**(5): p. 798-9.
34. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10.
35. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(6): p. 1101-8.

36. Apetroaie, C., et al., *Cereulide-producing strains of Bacillus cereus show diversity*. Arch Microbiol, 2005. **184**(3): p. 141-51.
37. Vithanage, N.R., et al., *Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk*. Int J Food Microbiol, 2014. **189**: p. 26-38.
38. Hill, K.K., et al., *Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis isolates*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(2): p. 1068-80.
39. Guinebretiere, M.H., V. Broussolle, and C. Nguyen-The, *Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne Bacillus cereus strains*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 3053-6.
40. Hansen, B.M. and N.B. Hendriksen, *Detection of enterotoxic Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis strains by PCR analysis*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(1): p. 185-9.
41. Lindback, T. and P.E. Granum, *Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols*, in *Methods in Biotechnology*, C.C. Adley, Editor 2006, Humana Press Inc: Totowa, New Jersey.
42. Gaviria Rivera, A.M., P.E. Granum, and F.G. Priest, *Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **190**(1): p. 151-5.
43. Fricker, M., et al., *Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic Bacillus cereus strains in foods and recent food-borne outbreaks*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(6): p. 1892-8.
44. Ehling-Schulz, M., et al., *Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **260**(2): p. 232-40.
45. Glatz, B.A. and J.M. Goepfert, *Defined conditions for synthesis of Bacillus cereus enterotoxin by fermenter-grown cultures*. Appl Environ Microbiol, 1976. **32**(3): p. 400-4.
46. Heinrichs, J.H., et al., *Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from Bacillus cereus*. J Bacteriol, 1993. **175**(21): p. 6760-6.
47. Schlax, P.J. and D.J. Worhunsky, *Translational repression mechanisms in prokaryotes*. Mol Microbiol, 2003. **48**(5): p. 1157-69.
48. Lindback, T., et al., *Characterization of the Bacillus cereus nhe enterotoxin*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 12): p. 3959-67.
49. Sastalla, I., et al., *The Bacillus cereus hbl and nhe tripartite enterotoxin components assemble sequentially on the surface of target cells and are not interchangeable*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76955.
50. Dommel, M.K., et al., *Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in Bacillus cereus*. Food Microbiol, 2011. **28**(2): p. 284-90.
51. Apetroaie-Constantin, C., et al., *Environment driven cereulide production by emetic strains of Bacillus cereus*. Int J Food Microbiol, 2008. **127**(1-2): p. 60-7.
52. Andersson, M.A., et al., *Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing Bacillus cereus in food and related environments*. Int J Food Microbiol, 2004. **94**(2): p. 175-83.

53. Ehling-Schulz, M., et al., *Emetic toxin formation of Bacillus cereus is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains*. *Microbiology*, 2005. **151**(Pt 1): p. 183-97.

ANEXO 1

Nº	Origem	Espécie	Morfologia das colónias	% ID (API CH 50)	Lecitinase	Manitol	ces	hblA	hblC	hblD	nheA	nheB	nheC
239	salada mista	<i>B.mycooides</i>	circulares	88.5	+	-	-	+	+	+	+	+	+
240	corvina no forno com batatas cozidas	<i>B.mycooides</i>	rizóides	88.5	+	-	-	+	+	+	+	+	+
243	bife da vazia cru	<i>B.mycooides</i>	circulares	8.5	+	-	-	+	+	+	+	-	+
246	gelado de chocolate	<i>B.mycooides</i>	circulares	1.9	+	-	-	+	+	+	+	-	+
251	farinha	<i>B.mycooides</i>	circulares	8.5	+	-	-	+	+	+	+	-	+
252	farinha	<i>B.mycooides</i>	circulares	8.5	+	-	-	+	+	+	+	-	+
253	farinha	<i>B.cereus</i>	circulares	9.8	+	-	-	-	-	-	+	+	+
254	farinha	<i>B.mycooides</i>	circulares	40	+	-	-	+	+	+	+	+	+
256	bacalhau espiritual	<i>B.cereus</i>	circulares	8.9	+	-	-	+	+	+	+	+	+
259	bifes com cogumelos	<i>B.mycooides</i>	circulares	0.9	+	-	-	+	+	+	+	+	+
271	-	<i>B.cereus</i>	circulares	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
273	espaguete à bolonhesa	<i>B.cereus</i>	circulares	5.8	+	-	-	+	+	+	+	+	+
290	gelado de chocolate	<i>B.cereus</i>	circulares	9.3	+	-	-	-	-	-	+	+	+
306	peixe gratinado com arroz	<i>B.cereus</i>	circulares	3.4	+	-	-	+	+	+	+	-	+
317	gelado de morango	<i>B.cereus</i>	circulares	2.4	+	-	+	-	-	-	+	+	+
320	bolos	<i>B.mycooides</i>	circulares	9.5	+	-	+	+	+	+	+	+	+
322	-	<i>B.cereus</i>	circulares	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
323	Gelado de morango	<i>B.anthraxis</i>	circulares	7.3	+	-	+	-	-	-	+	+	+
325	arroz de peixe	<i>B.mycooides</i>	circulares	8.5	+	-	-	-	+	+	+	+	+
413	-	<i>B.cereus</i>	circulares	0.3	+	-	-	-	-	-	+	+	+
416	-	<i>B.mycooides</i>	circulares	1.9	+	-	-	+	+	+	+	+	+
418	-	<i>B.mycooides</i>	circulares	1.1	+	-	-	-	-	-	+	+	+
419	-	<i>B.cereus</i>	circulares	2.5	+	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabela 2 – Dados já existentes sobre as estirpes em estudo. Conteúdo das colunas, da esquerda para a direita na tabela: Isolado alimentar a partir do qual se obteve a estirpe; espécie de acordo com o *score* da galeria API CH50; morfologia das colónias observada em meio de cultura sólido PCA às 24h de crescimento em aerobiose a 37°C; percentagem do *score* da galeria API CH50; atividade da lecitinase; capacidade de fermentação do manitol; capacidade hemolítica; presença dos genes *ces*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*

ANEXO 2

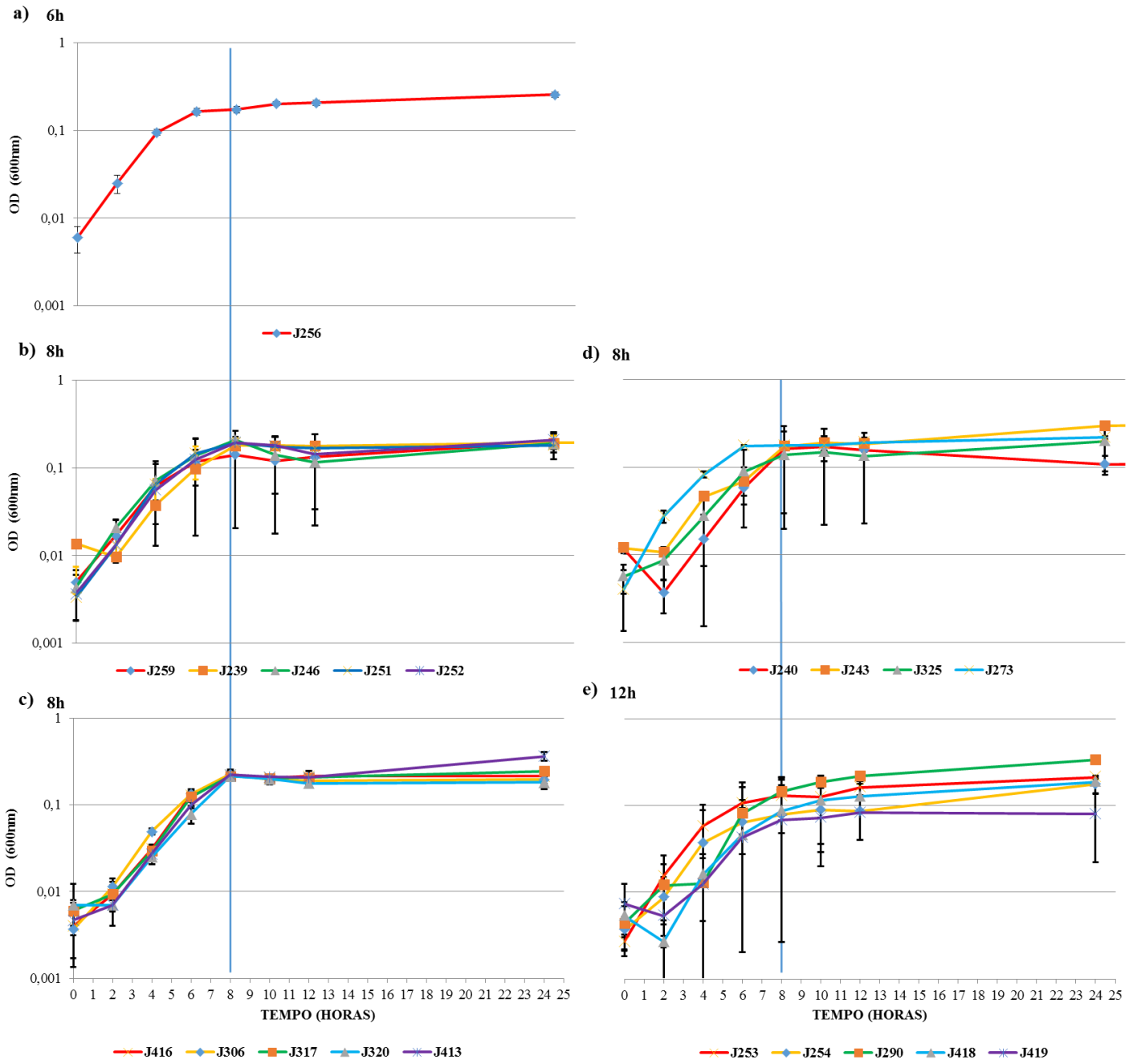


Figura 10 – Curvas de crescimento das estirpes de *B.cereus* de origem alimentar em estudo. **a)** Curva de crescimento com entrada na fase estacionária às 6 horas; **b) c) d)** Curvas de crescimento com entrada na fase estacionária às 8 horas; **e)** Curvas de crescimento com entrada na fase estacionária às 12 horas;

ANEXO 3





















ESTIRPE	FOTO COLÓNIA	DUPLA HEMÓLISE	EXPRESSÃO OPERÃO hbl			TESTE GLISA hbl
			<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	
239		sim	+	-	-	+
240		não	-	-	-	-
243		sim	+	-	+	+
246		sim	+	+	+	+
251		sim	+	-	+	+
252		sim	-	-	+	+
253		não	-	-	-	-
254		sim	-	+	+	+
256		sim	+	+	+	+
259		sim	-	-	+	+
273		sim	-	-	-	+
290		não	-	-	-	-
306		sim	+	-	+	+
317		não	-	-	-	-
320		sim	+	-	-	+
325		sim	-	-	+	+
413		não	-	-	-	-
416		sim	+	-	+	+
418		não	-	-	-	-
419		não	-	-	+	+

Tabela 3 – Resultados dos testes de β -hemólise em meio de cultura agar-sangue de carneiro às 10h de crescimento, expressão dos genes dos operões hbl e nhe às 10h de crescimento e teste imunocromatográfico GLISA para a Hemolisina BL às 24h de crescimento;

ANEXO 4

ESTIRPE	GLISA ENTEROTOXINAS		DETEÇÃO qPCR							GLISA Ces
	<i>hbl</i>	<i>nhe</i>	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>ces</i>	
239	+	+	+	-	-	-	+	+	/	/
240	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/
243	+	+	+	-	+	-	+	-	/	/
246	+	+	+	+	+	+	-	+	/	/
251	+	+	+	-	+	+	-	-	/	/
252	+	+	-	-	+	-	-	+	/	/
253	-	+	-	-	-	+	+	+	/	/
254	+	+	-	+	+	+	+	-	/	/
256	+	+	+	+	+	+	+	-	/	/
259	+	+	-	-	+	+	+	-	/	/
271	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
273	+	+	-	-	-	+	+	-	/	/
290	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/
306	+	+	+	-	+	+	-	-	/	/
317	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
320	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
322	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
323	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
325	+	+	-	-	+	+	+	+	/	/
413	-	+	-	-	-	+	+	-	/	/

416	+	+	+	-	+	+	+	-		
418	-	+	-	-	-	+	+	-		
419	+	+	-	-	+	+	+	-		
ATCC 14579 CONTROLO -										-
F4810/72 CONTROLO +										+
LMG17615 CONTROLO +	+	+								
NVH039198 CONTROLO -	-	-								

Tabela 4 – Resultados dos testes imunocromatográficos GLISA e resultados de qPCR para os genes das toxinas Hbl, Nhe e Ces

ANEXO 5

SEQUÊNCIA ALVO	PRIMERS NO SENTIDO 5'-3'		Tm DO PRIMER (°C)	CONTEÚDO G+C PRIMER (%)	DIMENSÃO PREVISTA PROD. AMPLIFICADO (pb)	Tm PREVISTA DO PROD. AMPLIFICADO (°C) c)	T de hibridação (°C)
Gene rRNA 16S (qPCR)	F	TCGAAATTGAAAGGCGGC	43	50	288 ^a	87.23	57.4
	R	GGTGCCAGCTTATTCAAC	43	50			
Gene rRNA 16S	F	ATTAGATACCCTDGTAGTCC	42	42	721 ^a	87.23	/
	R	ACCTTGTTACGACTT	42	37			
Gene hblA	F	CCTTGCAAAAGGCTGGATTA	45	45	174 ^a	76.38	62.6
	R	TCGTGTCCCAAGTAACAGC	46	53			
Gene hblC	F	TGGCAGCGTATAACAAAGG	44	47	250 ^e	81.98	62.6
	R	GCAAAAACGCCAAATGTTTT	41	35			
Gene hblD	F	GGTGCAGCTGGTATTGGTTT	47	50	234 ^a	79.79	55.0
	R	GCCATTGTATTCCATTGCT	45	45			
Gene nheA	F	TTTAATTGCGGGTTATTGG	43	40	232 ^b	80.14	55.8
	R	ACTACTCATCGCGCTCACC	48	58			
Gene nheB	F	TGCGAAGCAATGGTTAGATG	45	45	198 ^a	76.41	57.4
	R	AACTGATCCACTTGCCTTT	45	45			
Gene nheC	F	CAGCACCAAAGAGATGCAAA	45	45	250 ^d	76.80	59.7
	R	CGCGAAAAGCTTTCAAATTC	43	40			
Gene cytK1	F	CAATTCAGGGGCAAGTGTC	49	55	427 ^b	80.35	66.3
	R	CCTCGTGCATCTGTTTCATGAG	50	50			
Gene cytK2	F	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA	51	60	585 ^e	80.19	65.0
	R	GTGAGCCTGGACGAAGTTGG	51	57			
Gene cesA	F	CACGCCGAAAGTGATTATACCAA	48	43	176 ^f	77.28	62.6
	R	CACGATAAAACCACTGAGATAGTG	49	41			

a) OBTIDO A PARTIR DE PCR <i>IN SILICO</i> DA ESTIRPE ATCC 14579
b) OBTIDO A PARTIR DE <i>BLAST</i> DA ESTIRPE NVH 391-98
c) OBTIDA UTILIZANDO O PROGRAMA <i>MELTING</i> V.5.0
d) OBTIDO A PARTIR DE <i>BLAST</i> DA ESTIRPE HuA2-1
e) OBTIDO A PARTIR DE <i>BLAST</i> DA ESTIRPE BAG5X12-1
f) OBTIDO A PARTIR DE <i>BLAST</i> DA ESTIRPE NC7401

Tabela 5 – Primers utilizados nas reações de qPCR

Tabela 6 – Valores de RIN obtidos através da análise com o Agilent Bioanalyzer

AMOSTRA	RIN	AMOSTRA	RIN
J239	6.1	J273	5.9
J240	7.5	J290	6.0
J243	5.2	J306	7.4
J246	5.8	J317	6.2
J251	5.9	J320	7.1
J252	6.0	J325	6.1
J253	6.6	J413	7.0
J254	5.1	J416	5.2
J256	5.9	J418	7.0
J259	6.2	J419	5.5

Tabela 7 - Eficiências das reações de qPCR

GENE-ALVO	EFICIÊNCIA (%)
<i>hblA</i>	95
<i>hblC</i>	95.9
<i>hblD</i>	104,9
<i>nheA</i>	101.5
<i>nheB</i>	98.6
<i>nheC</i>	99
<i>ces</i>	96.4
16S rRNA	103.5