



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PESQUISA DE CEREULIDA EM ISOLADOS DO GRUPO *Bacillus cereus*
(DOCUMENTO PROVISÓRIO)

Carlos Eduardo de Sousa Alonso

ORIENTADOR

Professor Doutor Carlos Augusto Barbosa da Penha Gonçalves

CO-ORIENTADORA

Professora Doutora Marília Catarina Leal Ferreira

2008

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PESQUISA DE CEREULIDA EM ISOLADOS DO GRUPO *Bacillus cereus*
(DOCUMENTO PROVISÓRIO)

Carlos Eduardo de Sousa Alonso

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ORIENTADOR

Professor Doutor Carlos Augusto Barbosa da Penha Gonçalves

CO-ORIENTADORA

Professora Doutora Marília Catarina Leal Ferreira

2008

LISBOA

Agradecimentos

Gostaria de manifestar os meus agradecimentos às seguintes pessoas:

À Engenheira Anabela Galindro; à Doutora Verónica Ribeiro, ao Sargente-Chefe Marono, ao Sargento-Mor Barbosa, ao Tenente Wilson Antunes, ao Tenente Pedro Silva, ao Tenente José Freitas, ao Capitão Júlio Carvalho, ao Major João e ao Tenente-Coronel Penha Gonçalves pela forma como me receberam e trataram no LDBDE.

Ao Tenente Wilson Antunes, pela ajuda que me deu ao longo de todo o estágio e na elaboração desta tese.

À Professora Isabel Neto pela sua ajuda.

Ao Tenente Coronel Penha Gonçalves, pelo que me ensinou e por me pôr a pensar.

À Professora Doutora Marília Ferreira pelo seu apoio e conselhos.

Ao Hugo Rosa e ao Paulo Morouço, que sempre me acompanharam ao longo do curso.

Aos meus pais, ao meu irmão e à minha namorada pelo seu apoio incondicional e pela ajuda não só na elaboração deste trabalho, mas ao longo de todo o meu percurso.

Resumo

O *Bacillus cereus sensu stricto* é um patógeno alimentar que tem adquirido uma importância crescente nos últimos anos. Sendo uma bactéria com distribuição ubiqüitária na natureza pode contaminar várias matérias-primas e alimentos, o que associado à sua capacidade de formação de esporos resistentes a condições severas faz com que possa permanecer viável após a confecção dos alimentos. Este microrganismo é reconhecido desde o início do século XX como agente de toxinfecção alimentar devido à sua capacidade de causar um síndrome diarreico, mas actualmente sabe-se que este agente possui também a capacidade de causar um síndrome emético, associado a uma toxina termostável pré-formada nos alimentos: a cereulida. Pensa-se que a incidência de toxinfecção alimentar por *B. cereus sensu stricto* seja subestimada, uma vez que não é uma doença de declaração obrigatória e mimetiza outros agentes, contudo nos últimos anos têm sido descritos casos graves de toxinfecção alimentar causados por esta bactéria, com hospitalizações e mortes.

O objectivo deste estudo foi pesquisar a presença do gene que codifica a cereulida sintetase numa amostragem de bactérias do grupo *B. cereus* isoladas de alimentos e de vários pontos do país. Foram encontradas por PCR em tempo real 7 estirpes positivas num total de 106: 3 estirpes alimentares e 4 ambientais, tendo as estirpes positivas sido confirmadas presuntivamente como sendo *B. cereus sensu stricto*. A detecção de estirpes portadoras do gene da cereulida sintetase vem demonstrar a possibilidade de toxinfecção alimentar por estirpes eméticas *B. cereus sensu stricto* em Portugal.

Os dados deste estudo permitem propor a adopção do PCR em tempo real como metodologia de rotina para pesquisa de estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto*, já que esta é uma técnica fiável que permite uma rápida obtenção de resultados. Uma vez que esta técnica permite também a fácil distinção em relação ao *Staphylococcus aureus* pode contribuir para a elucidação sobre qual a verdadeira incidência de toxinfecção por estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto*.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*; cereulida; PCR em tempo real; toxinfecção alimentar

Abstract

Bacillus cereus sensu stricto is a food pathogen which has grown in importance over the last few years. As it is a bacterium with ubiquitous distribution in nature it can contaminate a variety of processed and raw foods. Since it has the ability to produce spores resistant to extreme conditions, it remains viable through food processing. This microorganism has been recognized as a food pathogen since early in the XXth century for its ability to cause diarrheic syndrome, but it's now known that it can also cause emetic syndrome, due to the production of a heat stable toxin in food: cereulide. The incidence of *B. cereus sensu stricto* food-poisoning is thought to be underestimated since it is not a reportable disease and mimetizes other food pathogens, but even so over the last few years severe cases have occasionally been reported involving hospitalization or even deaths.

The objective of this study was to investigate the presence of the cereulide synthetase gene in a sample of 106 strains of bacteria of the *B. cereus* group isolated from different foods and from several spots in Portugal. Using real time PCR 7 positive strains were found: 3 strains from food and 4 environmental, which were presumptively confirmed as *B. cereus sensu stricto*. The detection of strains carrying the cereulide synthetase gene shows that there is a possibility of food poisoning by emetic strains of *B. cereus sensu stricto* in Portugal.

The data from this study allows to propose real time PCR as a routine methodology for identification of emetic strains of *B. cereus sensu stricto*, since this is a reliable technique with quick results. As this technique allows easy distinction from *Staphylococcus aureus* it may contribute to determining the true incidence of the emetic type of food poisoning caused by *B. cereus sensu stricto*.

Key words: *Bacillus cereus*; cereulide; real time PCR; food poisoning

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice	IV
Índice de Tabelas	VI
Índice de Figuras	VI
Lista de Abreviaturas	VII
I. Descrição do Estágio	1
II. <i>Bacillus cereus</i>	3
1. Introdução	3
2. Taxonomia do Grupo <i>Bacillus cereus</i>	4
3. Características microbiológicas	6
4. Patogênese do <i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	8
4.1. Cereulida	9
4.2. Hemolisina BL	11
4.3. Enterotoxina Não Hemolítica	11
4.4. Citotoxina K	11
4.5. Enterotoxina BceT	11
4.6. Enterotoxina FM	12
5. Importância do <i>Bacillus cereus sensu stricto</i> como agente patogénico alimentar	13
6. Características das estirpes eméticas de <i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	16
7. Plasmídeo pCERE01	19
8. Metodologias para pesquisa de cereulida	20
8.1. Testes em animais	20
8.2. Citotoxicidade em células HEp-2	21
8.3. Teste de metabolização do MTT	21
8.4. Inibição da motilidade em esperma de varrasco	21
8.5. Liquid Chromatography – Mass Spectrophotometry	21
8.6. PCR	21
III. Pesquisa de cereulida em isolados do grupo <i>Bacillus cereus</i>	23
1. Material e Métodos	23

1.1. Selecção das Estirpes	23
1.2. Extracção e purificação do DNA	23
1.3. Confirmação da presença de DNA	24
1.4. PCR	24
1.5. Confirmação Presuntiva	25
IV. Resultados	26
1. Critérios de interpretação dos resultados	26
1.1. PCR das estirpes J1 a J26, J44, J72, J91 e J211	29
1.2. PCR das estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10 e J14	32
1.3. PCR das estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270 e J275	35
1.4. Confirmação presuntiva da identidade das estirpes positivas	37
1.5. Análise estatística	38
V. Discussão	39
VI. Conclusões	44
VII. Bibliografia	46
VIII. Anexo I – Origem das estirpes estudadas	49
IX. Anexo II – Temperaturas de melting	53

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição horária do estágio curricular	2
Tabela 2 – Características bioquímicas do grupo <i>B. cereus</i>	7
Tabela 3 – Características dos tipos de toxinfecção alimentar por <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto	13
Tabela 4 – Prevalência de <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto como agente etiológico em casos de toxinfecção alimentar (excluindo vírus)	14
Tabela 5 – Propriedades das toxinas eméticas do <i>B. cereus</i> e <i>S. aureus</i>	15
Tabela 6 – Primers utilizados neste estudo	24
Tabela 7 – Temperaturas de melting	31
Tabela 8 – Temperaturas de melting	34
Tabela 9 – Temperaturas de melting	37
Tabela 10 – Distribuição das estirpes portadoras do gene <i>ces</i>	38
Tabela 11 – Teste Exacto de Fisher	38

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da cereulida e sua estrutura 3d ao incorporar um íão de potássio	10
Figura 2 – Árvore filogenética de estirpes eméticas de <i>Bacillus cereus</i> sensu stricto	17
Figura 3 – Detecção de dna por pcr em tempo real	26
Figura 4 – Curvas de melting em pcr em tempo real	28
Figura 5 - PCR em tempo real, estirpes J1-J26, J44, J72, J91, J211 e controlos positivo, negativo e branco	29
Figura 6 – PCR em tempo real, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco	29
Figura 7 – Curvas de melting, estirpes J1-J26, J44, J72, J91, J211 e controlos positivo, negativo e branco	30
Figura 8 – Curvas de melting, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco	30
Figura 9 – PCR em tempo real, estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco	32
Figura 10 – PCR em tempo real, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco	32
Figura 11 – Curvas de melting, estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco	33
Figura 12 – Curvas de melting, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco	33
Figura 13 – PCR em tempo real, estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270 e J275 e controlos positivos, negativo e branco	35
Figura 14 – PCR em tempo real, estirpes J266, J270 e controlos positivos, negativo e branco	35
Figura 15 – Curvas de melting, estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270, J275 e controlos positivos, negativo e branco	36
Figura 16 – Curvas de melting, estirpes J266, J270 e controlos positivos, negativo e branco	36

Lista de Abreviaturas

- a_w – actividade da água
AMP – adenosil monofosfato
AMPC – AMP cíclico
BceT – *B. cereus* enterotoxin T
DNA – ácido desoxirribonucleico
DNAr – DNA ribossomal
DO – densidade óptica
FTIR – Fourier transform Infrared
GC – guanina + citosina
HBL – hemolisina
HPLC – cromatografia líquida de alta pressão
ISO – International Organization for Standardization
LDBBE – Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército
LCMS – liquid chromatography mass spectrometry
MLEE – multilocus enzyme electrophoresis
MLST – multilocus sequence typing
MYP – mannitol egg yolk polymyxin
MS – espectrofotometria de massa
MTT – bromídeo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio
NHE – enterotoxina não hemolítica
NRPS – sintetase peptídica não ribossomal
PCA – plate count agar
PCR – polymerase chain reaction
RAPD – random amplification of polymorphic DNA
RNA – ácido ribonucleico
RNAr – RNA ribossomal
RPM – rotações por minuto
TSA – agar de soja tríptica

I. Descrição do Estágio

O estágio de final de curso encontra-se inserido no tirocínio de promoção a Oficial de Medicina Veterinária da Academia Militar, que se divide em três partes: um estágio desenvolvido em Clínica de Animais de Companhia no Centro Militar de Medicina Veterinária em Benfica com a duração de meio semestre lectivo (8 de Outubro a 7 de Dezembro de 2007); um estágio de igual duração (10 de Dezembro de 2007 a 8 de Fevereiro de 2008) em Clínica de Equídeos, no Hospital Militar Veterinário de Equídeos em Mafra; e um estágio com a duração de um semestre (11 de Fevereiro a 31 de Julho de 2008) em Segurança e Microbiologia Alimentar, realizado no Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército (LBDBE) no Prior Velho. Este último corresponde ao estágio curricular que serve de base para esta dissertação de mestrado e compreendeu o desenvolvimento de actividades nas seguintes áreas:

1. Inspeção sanitária das instalações do Exército, nomeadamente aos locais de armazenagem, confecção e pontos de distribuição de géneros alimentícios ou refeições. Nesta área acompanhei as actividades inspectivas realizadas na Escola Prática de Transmissões, no Porto; no Centro de Recrutamento de Vila Real; no Regimento de Artilharia nº 5 em Vila Nova de Gaia; no Regimento de Infantaria nº 15 em Tomar; na Escola do Serviço de Saúde Militar em Lisboa; no Regimento de Infantaria nº 19 em Chaves; na Unidade de Apoio e no Grupo de Carros de Combate no Campo Militar de Santa Margarida; na Escola Prática de Cavalaria em Abrantes; no Regimento de Artilharia nº 4 em Leiria; e no Centro Militar de Electrónica em Paço de Arcos.
2. Análise microbiológica de alimentos: neste campo tive a possibilidade de acompanhar a análise laboratorial de géneros alimentícios provenientes de concurso para admissão pela Manutenção Militar e de refeições prontas a comer e zaragoas de superfícies oriundas das actividades inspectivas ou de surtos de toxinfecção alimentar, tendo sido possível contactar com as metodologias e procedimentos mais utilizados em microbiologia alimentar.
3. Defesa biológica: nesta área tive oportunidade de contactar com equipamentos e materiais utilizados na manipulação de potenciais agentes infecto-contagiosos, bem como com procedimentos de segurança em ambiente BSL 3 (*Biosafety Level* 3). Tive igualmente contacto com algumas ferramentas de biologia molecular utilizadas na detecção e identificação deste tipo de agentes.

A distribuição horária pelas diferentes actividades encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição horária do estágio curricular

	<i>Inspecção Sanitária</i>	<i>Microbiologia Alimentar</i>	<i>Defesa Biológica</i>	<i>Total</i>
Nº de Horas	86	160	658	904

Durante o estágio participei ainda em seminários semanais sobre vários microrganismos potencialmente patogénicos de origem alimentar, nomeadamente Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *E. coli* O157, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*, tendo sido para cada um destes agentes pesquisada e discutida a respectiva taxonomia, epidemiologia, patogénese e metodologias de identificação e quantificação.

Ao longo do estágio tive ainda a oportunidade de frequentar o Curso Teórico-Prático de APPCC em Estabelecimentos Alimentares, organizado pela revista “O Médico Veterinário”, de assistir ao seminário “*Salmonella* - Surveillance & Control - Concepts and Examples”, realizado na Faculdade de Medicina Veterinária, e ao 33rd World Small Animal Veterinary Association Congress / 14th Federation of European Companion Animal Veterinary Associations Conference.

II. *Bacillus cereus*

1. Introdução

A preocupação e os cuidados com a higiene e qualidade alimentar têm vindo progressivamente a aumentar nos últimos anos, ainda que o número de casos registados de toxinfecções alimentares se mantenha constante, sendo as doenças transmitidas pela água e alimentos uma causa importante de morbidade e mortalidade a nível mundial. Em países como a Finlândia e a Alemanha tem-se vindo a assistir nos últimos anos à implantação do *Bacillus cereus*, substituindo a *Salmonella sp.* e o *Campylobacter sp.* como principais microrganismos patogénicos alimentares. O *B. cereus* é uma bactéria formadora de endosporos e é causa comum de toxinfecção alimentar em vários países. Sendo uma bactéria ambiental contamina várias matérias-primas e alimentos, mas ao contrário da *Salmonella spp.* e do *Campylobacter spp.* o *B. cereus* sobrevive à maior parte dos tratamentos de confecção dos alimentos, devido à sua capacidade de produção de esporos termorresistentes (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007; Jääskeläinen, 2008).

O *B. cereus* pode causar toxinfecção por colonização do intestino delgado com produção de enterotoxinas e subsequente síndrome diarreico, ou pela produção de cereulida nos alimentos a qual causa síndrome emético após a ingestão dos alimentos. Uma vez que a cereulida tem um grau de termorresistência elevado e é difícil de inactivar, não se conhece actualmente nenhum método para destoxificar os alimentos. O síndrome emético do *B. cereus* mimetiza a toxinfecção por *Staphylococcus aureus*, contudo pode causar falência hepática aguda (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007; Jääskeläinen, 2008).

Constatada a escassez de informação sobre a importância do síndrome emético causado por *B. cereus* em Portugal, neste trabalho realizou-se a pesquisa do gene da cereulida sintetase (*ces*) numa amostragem da colecção de bactérias do grupo *B. cereus* do LDBE. Esta colecção é composta por isolados telúricos obtidos de vários pontos do país, e por isolados alimentares obtidos de diversos alimentos sujeitos a análise no LDBE. A presença do gene da cereulida sintetase numa determinada estirpe indica que essa mesma estirpe tem a informação genética necessária para a produção da cereulida.

2. Taxonomia do Grupo *Bacillus cereus*

O termo grupo *Bacillus cereus* é um termo não taxonómico frequentemente utilizado para referir um conjunto de bactérias cuja taxonomia tem sido amplamente discutida (Vilas-Bôas, Peruca & Arantes, 2007). O grupo *Bacillus cereus* constitui um *cluster* muito homogéneo dentro do género *Bacillus*. Este grupo, também chamado *B. cereus sensu lato*, é constituído por seis espécies: *B. cereus (sensu stricto)*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (Minnaard *et al.*, 2007). Neste trabalho o *B. cereus* como espécie será referido como *B. cereus sensu stricto* e o *B. cereus* como conjunto de espécies será referido por grupo *B. cereus*.

De acordo com o conceito largamente aceite, uma espécie é uma unidade taxonómica formada por grupos de populações que se reproduzem entre si e estão reprodutivamente isolados de outros grupos, constituindo-se então por um conjunto de genes protegido. Ou seja, uma espécie consiste numa população que desenvolveu adaptações e mecanismos de isolamento para proteger a sua herança genética contra a introdução de genes de outros organismos (Vilas-Bôas *et al.*, 2007).

O conceito adoptado para a sistemática bacteriana derivou daquele adoptado para os organismos superiores e como tal as bactérias foram classificadas inicialmente de acordo com critérios morfológicos e bioquímicos. Na década de 1970 surgiram técnicas de biologia molecular que começaram então a ser utilizadas para a classificação bacteriana; o método padrão utilizado inicialmente foi a hibridação DNA-DNA do genoma completo, sendo necessário um mínimo de 70% de hibridação entre genomas para considerar duas bactérias como pertencentes à mesma espécie. Actualmente, para além da hibridação DNA-DNA utiliza-se como critério de classificação taxonómica bacteriana a variação de nucleótidos no DNA ribossomal (DNAr) 16S, sendo possível que 3% de divergência nucleotídica seja o suficiente para classificar duas bactérias como pertencendo a espécies diferentes (Vilas-Bôas *et al.*, 2007).

Apesar dos membros do grupo *B. cereus* se distinguirem facilmente de outras bactérias aeróbias formadoras de endosporos constantes da “*Approved Lists of Bacterial Names*”, é difícil distingui-los fenotipicamente entre si. A maioria das reacções típicas deste grupo (crescimento rizóide do *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*, formação de cristais do *B. thuringiensis*, patogenicidade do *B. anthracis*) são dependentes do meio de cultura e/ou codificadas em plasmídeos. Um *B. mycoides* ou *B. pseudomycoides* não rizóide, um *B. thuringiensis* não formador de cristais ou um *B. anthracis* não patogénico são virtualmente indistinguíveis de um *B. cereus sensu stricto* (Fritze, 2004).

O facto das bactérias do grupo *B. cereus* serem classicamente consideradas espécies diferentes deve-se principalmente às suas diferenças fenotípicas, especialmente aos seus padrões de patogenicidade específicos. Contudo, a informação obtida a partir de sequências genéticas e dos genomas sequenciados, vieram confirmar que estas espécies são bastante próximas, como demonstrado pelo alto nível de semelhança e sintenia¹ dos seus cromossomas (Tourasse, Helgason, Okstad, Hegna & Kolsto, 2006).

Foi obtida uma homologia de 50 a 60 % (hibridações DNA/DNA) entre as estirpes tipo das espécies do grupo *B. cereus* e algumas das sequências de RNAr 16S são virtualmente idênticas. Relativamente ao *B. anthracis*, hibridações DNA/DNA entre diferentes estirpes revelaram mais de 90% de homologia, o que está de acordo com a ausência de polimorfismo nesta espécie (Fritze, 2004). Análises de *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) que compararam os padrões de alozima de 10 a 20 genes *housekeeping*², mostraram que o *B. cereus sensu stricto* e o *B. thurigiensis* são indistinguíveis em termos genéticos (Ko *et al.*, 2004). Estudos de filogenia mostraram ainda que existem estirpes de *B. cereus* e *B. thurigiensis* que estão mais próximas do *B. anthracis* do que de quaisquer estirpes de *B. cereus* e *B. thurigiensis* testadas nesses mesmos estudos, assim como existem estirpes de *B. cereus* que filogeneticamente se inserem em linhagens de *B. thurigiensis* (Priest, Barker, Baillie, Holmes & Maiden, 2004; Tourasse *et al.*, 2006).

O dilema na análise e classificação do grupo *B. cereus* consiste no facto dos estudos de filogenia utilizarem marcadores cromossomais, enquanto a definição tradicional das espécies se baseia principalmente em características codificadas em plasmídeos. A transferência de plasmídeos dentro do grupo *B. cereus* é um facto conhecido e sabe-se que os genes que codificam as toxinas estão muito frequentemente localizados em plasmídeos, existindo contudo alguns plasmídeos que parecem ser estáveis em certos complexos clonais como é o caso dos plasmídeos pXO1 e pXO2 no *B. anthracis* e o plasmídeo pCERE01 nas estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* (Tourasse *et al.*, 2006).

Segundo estudos genéticos de população e análises comparativas de genoma por Tourasse *et al.* em 2006, o grupo *B. cereus* constitui uma população coerente na qual os membros estão unificados pela presença de elementos genéticos específicos e ubíquos cujas sequências nucleotídicas e localizações genómicas não permitem distinguir entre

¹ Sintenia – é a co-localização física de diferentes *loci* genéticos no mesmo cromossoma num determinado indivíduo ou espécie.

² Gene *housekeeping* – é um gene envolvido nas funções básicas para a manutenção celular. Os genes *housekeeping* são constantemente expressos na maioria das células, se não em todas.

os vários membros do grupo. Existem várias sequências nucleotídicas repetidas que são comuns a todos os genomas sequenciados do grupo *B. cereus* e que não são encontradas em nenhum outro organismo conhecido. A informação obtida por MLST (*multilocus sequence typing*) nestes mesmos estudos indica que a população do grupo *B. cereus* é bastante dinâmica. Não obstante a existência de uma base genética comum algumas estirpes do grupo evoluem para formar complexos clonais, possivelmente adaptados a hospedeiros e/ou ambientes específicos, e podendo eventualmente exibir características fenotípicas específicas. Um mecanismo que pode contribuir para a formação de complexos clonais e para o aparecimento de estirpes virulentas pode ser a aquisição de plasmídeos com determinantes específicos que conferem vantagem adaptativa num determinado nicho ou hospedeiro, como os plasmídeos pXO1 e pXO2 no *B. anthracis* e o plasmídeo pCERE01 nas estirpes eméticas de *B. cereus* (Tourasse *et al.*, 2006).

Actualmente não existe consenso sobre se os vários elementos do grupo *B. cereus* devem ser consideradas espécies separadas ou variantes especializadas de uma mesma espécie; enquanto alguns estudos recentes sugerem que o *B. cereus*, *B. thurigiensis* e *B. anthracis* deveriam ser considerados como uma única espécie, outros estudos afirmam ter obtido uma diferenciação genética entre estas espécies (Rasko *et al.*, 2004; Vilas-Bôas *et al.*, 2007).

3. Características microbiológicas

O *B. cereus sensu stricto* é um bastonete Gram positivo caracterizado pela formação de esporos, tendo duas formas morfológicas: endosporo e célula vegetativa. Em condições normais, esta bactéria produz rapidamente esporos caracterizados pelo não engurgitamento do esporângio, elipsóides, e com localização central ou pericentral; contêm uma *signature molecule* - o ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridinedicarboxílico), que é essencial para a esporulação, germinação e estrutura dos esporos. Esta forma não tem actividade metabólica e é resistente a vários factores ambientais e condições adversas tais como aquecimento, congelamento, desidratação e radiação; a exposição ao ar não reprime a esporulação e os esporos podem permanecer viáveis durante vários anos. Os esporos são importantes para a disseminação do *B. cereus sensu stricto* e sabe-se que os de algumas estirpes aderem a células epiteliais humanas, o que se pensa ser um mecanismo de virulência adicional (Kotiranta, Lounatmaa & Haapasalo, 2000; Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007; Jääskeläinen, 2008).

As células vegetativas são bastonetes aeróbios facultativos, que variam entre 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento e tendem a crescer em cadeias. Durante a fase inicial de crescimento são Gram positivos, no entanto podem ser Gram negativos durante o crescimento tardio (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007).

A maioria das estirpes é móvel apresentando flagelos peritricos, apesar de existirem estirpes não móveis. A sua temperatura de crescimento varia entre 4 a 55 °C, com a temperatura óptima entre os 25 e os 37 °C. Existe uma fracção considerável de estirpes psicrotróficas capazes de crescer a 4-5° C que são mais frequentemente encontradas no leite e laticínios. O *B. cereus sensu stricto* cresce em valores de pH entre 4.3 e 9.3 e a actividade da água (a_w) mínima é de 0,93. Esta bactéria tem uma necessidade absoluta de três L-aminoácidos, treonina, leucina e valina, como factores de crescimento mas não precisa de vitaminas (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007; Jääskeläinen, 2008). Existem características bioquímicas que podem ser utilizadas para caracterizar o *B. cereus sensu stricto* e distingui-lo dos outros membros do grupo *B. cereus*, como se pode ver na Tabela 2.

Tabela 2 – características bioquímicas do grupo *B. cereus*

	<i>B. cereus</i>	<i>B. thurigiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. mycoides</i>
Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Reacção da gema de ovo	+	+	+	(+)
Mobilidade	(+/-)	(+/-)	-	-
Ácido a partir do manitol	-	-	-	-
Hemólise (eritrócitos de ovelha)	+	+	-	(+)
Cristais de toxina	-	+	-	-
Utilização anaeróbia da glucose	+	+	+	+
Redução do nitrato	v	+	+	v
Reacção VP	+	+	+	+
Decomposição da tirosina	+	+	(+)	(+)
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Cápsula	v	-	-	+
Hidrólise da ureia	v	+	-	v
Sensibilidade à penicilina	-	-	+	-

Legenda: +, positivo; -, negativo; v, variável; (+/-), normalmente positivo mas ocasionalmente negativo; (+), a maioria é fracamente positivo

Adaptado de Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007

Classicamente, as características que distinguem o *B. cereus sensu stricto* de outras bactérias aeróbias formadoras de endosporos são a sua incapacidade para produzir ácido a partir do manitol e o facto de produzir lecitinase (Fritze, 2004). O método para enumeração de *B. cereus* em alimentos foi padronizado pela International Organization for Standardization (ISO) e é baseado no crescimento em agar com D-manitol, gema de ovo e polimixina B (Mannitol egg Yolk Polymyxin – MYP). A polimixina B é um agente selectivo que inibe bactérias Gram-negativas, o agar contém D- manitol como substrato de fermentação e vermelho de fenol como indicador para detectar a formação de ácido a partir do manitol. Como o *B. cereus sensu stricto* não consegue fermentar o manitol não há formação de ácido e as suas colónias ficam cor-de-rosa devido ao vermelho de fenol. A gema de ovo produz uma zona de precipitação em torno das colónias com capacidade de produzir lecitinase, como é o caso da maior parte das estirpes de *B. cereus sensu stricto*. A maior parte das estirpes de *B. cereus sensu stricto* também é hemolítica, pelo que em agar sangue as suas colónias apresentam um halo de hemólise (Jääskeläinen, 2008).

4. Patogénese do *Bacillus cereus sensu stricto*

O *B. cereus sensu stricto* é um microrganismo com distribuição ubiqüitária na natureza estando presente no solo, poeiras e água e podendo o leite, carne, especiarias e condimentos estar contaminados com esporos. Devido à sua capacidade para formar esporos resistentes a condições severas, o *B. cereus sensu stricto* permanece viável durante longos períodos de tempo no ambiente e nos alimentos (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007).

A presença de *B. cereus sensu stricto* nos alimentos pode causar toxinfecção alimentar que se pode manifestar tanto na forma emética como na forma diarreica (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007). Ambas as formas são geralmente ligeiras e auto-limitantes, contudo têm sido descritos casos severos com hospitalização e mesmo morte (Ehling-Schulz *et al.*, 2006b). Apesar de ter sido considerado um microrganismo saprófita inócuo durante bastante tempo, o seu papel como um potencial agente patogénico associado a toxinfecção alimentar foi reconhecido na Europa em 1906. Plazikowski foi dos primeiros autores a reportar este síndrome com precisão e as suas descobertas foram confirmados por vários outros investigadores europeus no início da década de 1950, passando então o *B. cereus sensu stricto* a ser considerado um agente importante de toxinfecção alimentar. O primeiro surto documentado nos Estados Unidos data de 1969 e na Grã-Bretanha foi registado em 1971 (Jay, 2000; Rajkowski & Bennett,

2003). Aparentemente todas as populações são susceptíveis a toxinfecção alimentar por este agente.

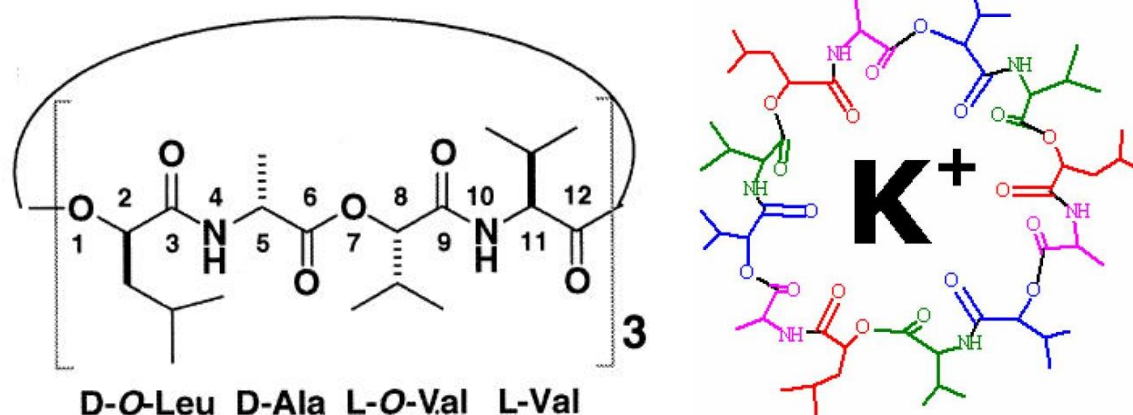
Para além de toxinfecção alimentar o *B. cereus sensu stricto* também pode causar infecções sistémicas e locais (especialmente em pessoas imunodeprimidas, neonatos, toxicodependentes e pacientes com história de feridas traumáticas e cirúrgicas e cateteres) nomeadamente endoftalmite, queratite e panoftalmite, infecções cutâneas primárias, infecção de feridas ortopédicas, osteomielite, periodontite, infecções pleuropulmonares, endocardite, infecção urinária, meningite pós-operatória e infecções sistémicas (Kotiranta *et al.*, 2000; Rajkowski & Bennett, 2003; Ehling-Schulz, Fricker & Scherer, 2004a; Bhunia, 2007).

O *B. cereus sensu stricto* pode produzir várias toxinas e enzimas responsáveis pelo seu efeito patogénico, incluindo a toxina emética e as enterotoxinas diarreicas. Existem pelo menos três enterotoxinas associadas a surtos de toxinfecção alimentar: a hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não hemolítica (NHE) e a citotoxina K. Para além destas toxinas o *B. cereus sensu stricto* também produz uma citolisina de ligação ao colesterol (cereolisina O ou hemolisina I), hemolisina II, hemolisina III e hemolisina IV. As enzimas produzidas por este microrganismo incluem fosfolipases, lecitinase, esfingomielinase, colagenase, protease, amilase e β -lactamase. A β -lactamase inactiva a penicilina tornando o *B. cereus* resistente a este antibiótico (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007; Minnaard *et al.*, 2007). As principais características da cereulida (toxina emética) e das enterotoxinas são descritas seguidamente.

4.1. Cereulida

A cereulida (toxina emética) possui uma massa molecular de 1,2 kDa e consiste em três repetições de quatro aminoácidos modificados (d-O-Leu-d-Ala-l-O-Val-l-Val) que formam uma estrutura em anel (dodecapsipéptido). É um ionóforo de potássio semelhante à valinomicina produzida pelo *Streptomyces griseus*, contudo tem um potencial tóxico bastante superior ao desta. Esta toxina é produzida por um complexo enzimático multidomínio não ribossomal e é altamente hidrofóbica. É bastante termostável (150°C durante 100 min), activa num intervalo alargado de pH (pH 2.0-11.0), não é digerida pela pepsina ou pela tripsina e não é antigénica (Granum & Lund, 1997; Rajkowski & Bennett, 2003; Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Bhunia, 2007; Rajkovic *et al.*, 2008). Andersson *et al.* (2006) propuseram que o dano causado pela cereulida aos gradientes de potássio celulares e à função mitocondrial são a principal causa para a citotoxicidade e inibição da proliferação celular, da síntese de RNA e da motilidade em células animais e humanas.

Figura 1 – Estrutura da cereulida e sua estrutura 3D ao incorporar um íon de potássio



Adaptado de Kusea *et al.*, 2000 e Jääskeläinen, 2008

A produção máxima de toxina parece ocorrer em culturas incubadas entre 12 e 22 °C, durante o início da fase estacionária do crescimento, ainda que variando entre estirpes. A quantidade de cereulida produzida é dependente da temperatura de incubação e do meio de cultura, bem como de outros factores extrínsecos como o pH, presença de oxigénio e de aminoácidos específicos; a glucose tende a suportar a produção de cereulida enquanto a presença de quantidades excessivas de leucina, isoleucina e ácido glutâmico reprimem significativamente a sua síntese. Uma vez que os esporos de *B. cereus sensu stricto* sobrevivem, em geral, à pasteurização ou à confecção do alimento e germinam em células vegetativas quando a temperatura lhes é favorável, a cereulida é geralmente produzida durante o armazenamento prolongado dos alimentos (Rajkowski & Bennett, 2003; Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Bhunia, 2007).

Esta toxina tem acção mitocondrial e provoca vacuolização em culturas de células HEp-2 e HeLa, causando também ingurgitamento da cabeça de espermatozóides e impedindo a sua motilidade o que demonstra a sua capacidade citotóxica. Alguns estudos mostraram que a cereulida inibe a actividade citotóxica e produção de citoquinas por linfócitos *natural killer* humanos e como tal pode ter um efeito imunomodulador (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007; Jääskeläinen, 2008).

4.2. Hemolisina BL

A HBL é uma enterotoxina termolábil composta por três proteínas: B (37,8 kDa), L1 (38,5 kDa) e L2 (43,5 kDa). Os genes que codificam os três elementos estão organizados num operão cuja transcrição é regulada pelo regulador pleiotrópico³ PlcR. O elemento B é o componente de ligação à célula alvo, enquanto os elementos L1 e L2 têm função lítica, sendo os três elementos necessários para a actividade da toxina. A HBL produz um padrão típico de hemólise incompleta em agar sangue. Esta toxina é considerada um importante factor de virulência para o *B. cereus* uma vez que é hemolítica, citotóxica, dermonecrótica e induz permeabilidade vascular, como demonstrado em estudos em ansa ileal de coelho (Rajkowski & Bennett, 2003; Ehling-Schulz *et al.*, 2006b; Bhunia, 2007).

4.3. Enterotoxina Não Hemolítica

A NHE também é composta por três proteínas: a NheA (41kDa), a NheB (39,8 kDa) e a NheC (36,5 kDa). Os três genes que codificam estas proteínas estão codificados num operão que, tal como na HBL, tem a expressão regulada pelo regulador pleiotrópico PlcR. Tal como descrito para a HBL, também esta toxina precisa dos três elementos presentes para ter actividade enterotóxica (Rajkowski & Bennett, 2003; Lindbäck, Fagerlund, Rødland & Granum, 2004; Bhunia, 2007).

4.4. Citotoxina K

A citotoxina K é uma proteína de 34 kDa da qual estão descritas duas formas: citotoxina k-1 e citotoxina k-2. Esta toxina foi implicada em surtos de doença com diarreia sanguinolenta e mortes por enterite necrótica associadas a *B. cereus sensu stricto* (Rajkowski & Bennett, 2003; Ehling-Schulz *et al.*, 2006b; Bhunia, 2007).

4.5. Enterotoxina BceT

A BceT (*B. cereus* enterotoxin T) é um polipéptido de 41 kDa. A sua função na patogénese é controversa, uma vez que alguns estudos sugerem que tem actividade enterotóxica enquanto outros consideram que é apenas um artefacto. Não foi ainda associada a nenhum surto de toxinfecção alimentar (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007).

³ Regulador pleiotrópico – um produto genético que regula múltiplas características fenotípicas

4.6. Enterotoxina FM

A enterotoxina FM foi originalmente isolada da estirpe *B. cereus* FM-1, causadora de toxinfecção alimentar. É um polipéptido de 45 kDa que não foi implicado até à data como responsável por um surto de toxinfecção alimentar. Contudo, o gene *entFM* está presente na maioria das estirpes associadas a surtos e é o gene de enterotoxina mais prevalente em todas as estirpes de *B. cereus*. Algumas experiências em laboratório mostraram que a enterotoxina FM purificada causa acumulação de líquido em modelos de ansa ileal de coelho e de rato e que é letal em ratos (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007).

Devido à larga distribuição do *B. cereus* na natureza e à resistência dos seus esporos a condições adversas, existem vários alimentos associados a toxinfecções por esta bactéria. O síndrome emético está associado ao consumo de arroz, massas e outros alimentos ricos em amido, pudim de leite, molho de baunilha e leite em pó, enquanto que o síndrome diarreico está associado principalmente a carne, peixe, vegetais e lacticínios. A dose infecciosa é bastante variável, indo de 10^5 a 10^8 células ou esporos por grama de alimento (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007).

Como referido anteriormente, a cereulida é produzida durante o armazenamento prolongado dos alimentos (o síndrome emético está associado ao consumo de alimentos com cereulida pré-formada) e a dose emética de toxina é estimada em 30 µg/kg de peso corporal. Pensa-se que o síndrome emético esteja frequentemente associado a alimentos ricos em amido, uma vez que a maior parte das estirpes eméticas não conseguem hidrolisar o amido, e como tal o alimento vai ter aspecto e sabor normais mesmo que contenha uma quantidade elevada de *B. cereus*. A toxina liga-se aos receptores de serotonina 5-HT₃ e estimula o nervo vago aferente, induzindo vómito. Além disso, também pode causar falência hepática, pois como é um ionóforo do potássio inibe a oxidação dos ácidos gordos afectando assim a actividade mitocondrial nos hepatócitos, o que resulta na degeneração maciça destes últimos. Os sintomas típicos consistem em náusea e vómito e aparecem em média 3 horas (0,5 a 6 horas) após a ingestão dos alimentos contaminados. De referir que o síndrome emético do *B. cereus sensu stricto* mimetiza a toxinfecção por *Staphylococcus aureus* (Kotiranta *et al.*, 2000; Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007; Jääskeläinen, 2008).

As enterotoxinas são degradadas antes de chegar ao íleo, sendo o síndrome diarreico causado pela produção de toxina após a colonização do intestino delgado por *B. cereus sensu stricto* (Granum & Lund, 1997). Os mecanismos de acção das diferentes enterotoxinas incluem a estimulação da produção de AMPc (adenosil monofosfato cíclico)

e a formação de poros na membrana dos enterócitos. Consequentemente dá-se a perda de sódio, cloro e água resultando em desequilíbrio electrolítico. Os sintomas surgem 8 a 16 horas após o consumo dos alimentos, persistindo normalmente por 12 a 24 horas. Iniciam-se com diarreia ligeira, náusea e dores abdominais, seguidos de diarreia aquosa. Também pode existir vômito, contudo este é raro e a febre está normalmente ausente (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007). A Tabela 3 apresenta um resumo das principais características dos síndromes emético e diarreico causados pelo *B. cereus sensu stricto*.

Tabela 3 – Características dos tipos de toxinfecção alimentar por *Bacillus cereus sensu stricto*

	Síndrome Diarreico	Síndrome Emético
Dose infecciosa	10 ⁵ -10 ⁷ (total)	10 ⁵ -10 ⁸ (células por grama)
Toxina produzida	No intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada nos alimentos
Tipo de toxina	Proteica	Péptido cíclico
Período de incubação	8-16 h (ocasionalmente > 24 h)	0,5-6 h
Duração	12-24 h (ocasionalmente vários dias)	6-24 h
Sintomas	Dôr abdominal, diarreia aquosa e ocasionalmente náusea	Náusea, vômito e mal-estar

Adaptado de Granum & Lund, 1997

5. Importância do *Bacillus cereus sensu stricto* como agente patogénico alimentar

A incidência de toxinfecção alimentar por *B. cereus sensu stricto* está presumivelmente subestimada uma vez que não é uma doença de declaração obrigatória e os procedimentos de declaração variam entre países. De referir que nos países do norte da Europa existe uma maior declaração dos casos de toxinfecção por *B. cereus* (Granum & Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Ehling-Schulz, Fricker & Sherer, 2004b). A Tabela 4 mostra a importância relativa do *B. cereus* como agente de toxinfecção alimentar em alguns países, no entanto, o número de casos declarados nos vários países não é comparável devido a diferenças nos procedimentos de declaração.

Tabela 4 – Prevalência de *Bacillus cereus sensu stricto* como agente etiológico em casos de toxinfecção alimentar (excluindo vírus)

País	Ano	Prevalência	Fonte
Noruega	1988-1993	33%	(Granum & Lund, 1997)
Islândia	1985-1992	47%	(Granum & Lund, 1997)
Finlândia	1973-1985	17,8 %	(Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Finlândia	1992	22%	(Granum & Lund, 1997)
Holanda	1973-1985	11,5%	(Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Holanda	1991	8,5 %	(Granum & Lund, 1997)
Dinamarca	1990-1992	5%	(Granum & Lund, 1997)
Taiwan	1994	14,9%	(Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Hungria	1960-1968	15%	(Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Inglaterra e País de Gales	1973-1985	0,7 %	(Granum & Lund, 1997; Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Escócia	1973-1985	0,8%	(Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Japão	1973-1985	0,7%	(Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Estados Unidos	1972-1982	1,3%	(Granum & Lund, 1997; Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)
Canadá	1973-1985	2,2%	(Granum & Lund, 1997; Kotiranta <i>et al.</i> , 2000)

O *B. cereus sensu stricto* pode ser um problema relevante na restauração colectiva, uma vez que não é eliminado pelos tratamentos de pasteurização e higienização, além de ser consideravelmente resistente à radiação gama (Kotiranta *et al.*, 2000; Ehling-Schulz *et al.*, 2004a). A título de exemplo, uma investigação dos surtos de toxinfecção alimentar ocorridos nas Forças Armadas Alemãs, identificou o *B. cereus* como o agente patogénico mais prevalente, tendo este microrganismo sido responsável por 30% dos casos e 42% dos surtos declarados entre 1985 e 2000 (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b).

Na Noruega, Finlândia, Bulgária e Hungria a forma predominante de toxinfecção por *B. cereus sensu stricto* é o síndrome diarreico, enquanto que no Reino Unido, Estados Unidos e Japão a forma emética é predominante. Aliás, no Japão a forma emética está descrita como cerca de 10 vezes mais frequente que a forma diarreica (Granum & Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Ehling-Schulz *et al.*, 2004b).

Para além da não declaração dos surtos, outro factor que pode contribuir para que a importância do *B. cereus sensu stricto* como agente patogénico alimentar seja

subestimada é o diagnóstico não adequado, já que a doença causada por este agente pode ser confundida com outros tipos de toxinfecção alimentar. De facto, o síndrome diarreico é semelhante aos sintomas causados pelo *Clostridium perfringens*, ao passo que o síndrome emético do *B. cereus* é bastante similar ao causado pelo *Staphylococcus aureus* não sendo possível distinguir estas duas entidades sintomaticamente. Na Alemanha, em 50 casos reportados de suspeita de toxinfecção alimentar por *S. aureus* este apenas foi identificado num dos casos, tendo nos restantes casos o agente etiológico permanecido por identificar. Uma hipótese plausível é que parte dos casos em que o agente etiológico ficou por identificar tenha sido causada por *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b; Fricker, Messelhäuser, Busch, Scherer & Ehling-Schulz, 2007). As toxinas eméticas do *B. cereus* e do *S. aureus* são distinguíveis em relação ao tamanho, mecanismos de acção e de síntese, dose emética e pelos alimentos aos quais estão associadas, como se pode ver na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades das toxinas eméticas do *B. cereus* e *S. aureus*

Características	Cereulida	Enterotoxinas do <i>S. aureus</i>
Tipo e tamanho	Dodecapsipéptido, 1.2 kDa	Proteínas, 25 – 29 kDa
Síntese	Não ribossomal	Ribossomal
Mecanismo	Ionóforo, toxina mitocondrial	Superantigénios
Sintomas	Náusea e vômito; possível actividade neurotóxica	Náusea e vômito, dores abdominais; actividade mitogénica
Dose emética mínima	30 µg /kg	100 µg /kg
Período de incubação	0.5 – 6 h	0.5 – 6 h
Duração	6 – 24 h	6 – 24 h
Produção	Pré formada nos alimentos	Pré formada nos alimentos
Estabilidade	Termo estável, resistente ao ácido	Termo estável, resistente ao ácido
Digestão pela tripsina	Não digerida	Não digerida
Prevalência nos alimentos	Arroz, massas	Lacticínios, produtos de carne, produtos de pescado

Adaptado de Ehling-Schulz *et al.*, 2004a

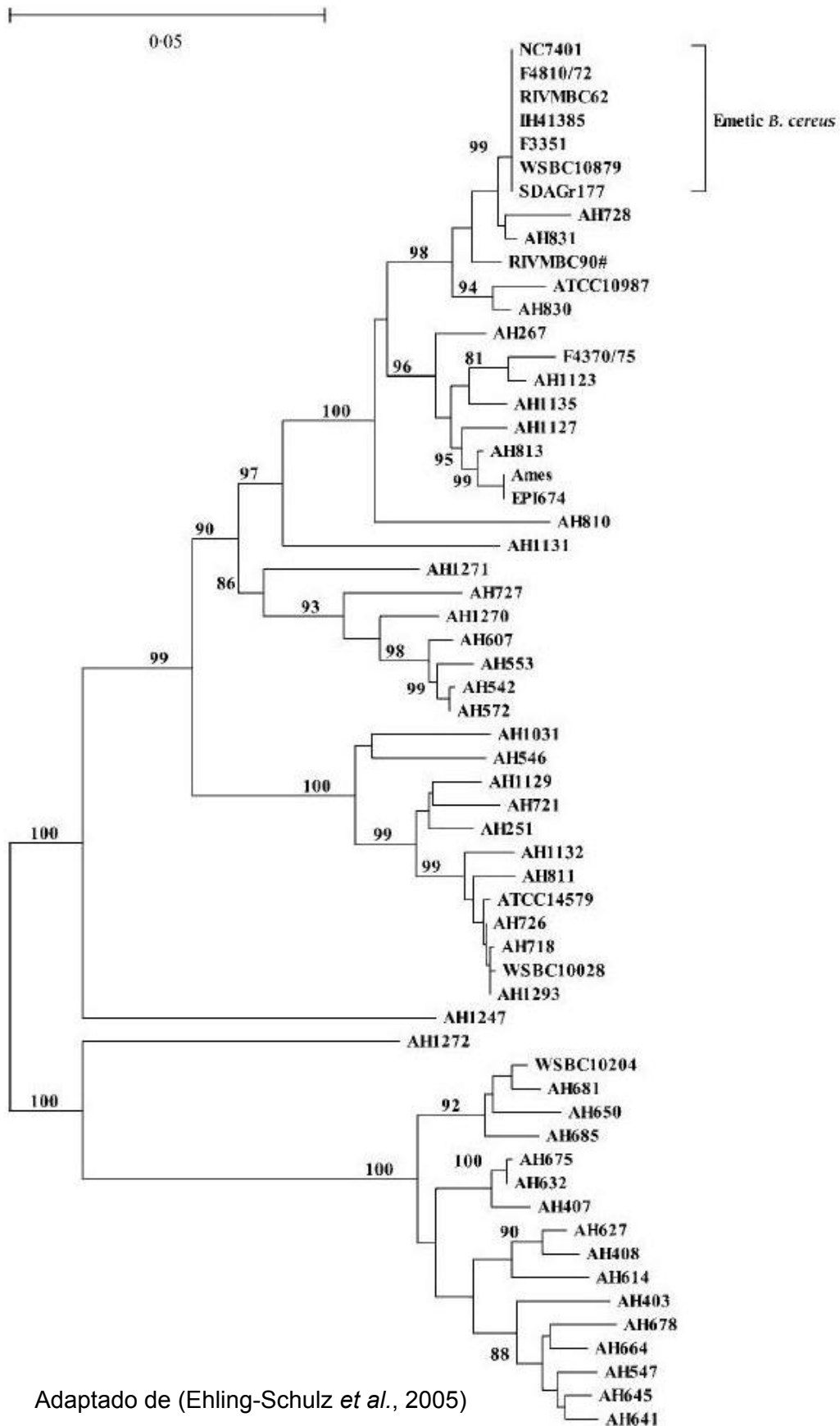
O diagnóstico correcto da toxinfecção por *B. cereus sensu stricto* é importante, pois apesar de os seus sintomas serem ligeiros e frequentemente passarem após 24h, o número de casos com maior gravidade tem aumentado nos últimos anos incluindo uma morte devido à ingestão de alimentos contaminados com cereulida e três mortes causadas por citotoxina K (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b).

6. Características das estirpes eméticas de *Bacillus cereus sensu stricto*

Ehling-Schulz *et al.* (2004a) estudaram a estrutura da população do *B. cereus sensu stricto* com base em 90 estirpes isoladas de casos clínicos, de alimentos associados a surtos de toxinfecção alimentar e de alimentos diversos. Estas estirpes foram estudadas por métodos genéticos (M13-PCR, *random amplification of polymorphic DNA* [RAPD] e MLST) e fenotípicos (Fourier transform Infrared [FTIR], perfil proteico e ensaios bioquímicos). O resultado desta análise genética e fenotípica mostrou que, ao contrário das estirpes entéricas e de outras estirpes alimentares não eméticas de *B. cereus sensu stricto* nas quais existe uma grande diversidade, as estirpes eméticas isoladas tinham uma diversidade bastante baixa. O uso dos métodos de genotipagem revelou ainda que as estirpes eméticas se agrupavam num único *cluster* distinto, composto apenas por estirpes eméticas e com sequências de DNAr idênticas. Os isolados pertencentes a este *cluster* eram negativos quanto à hidrólise do amido e à fermentação da salicilina, não possuíam os genes para a produção de HBL e exibiam hemólise fraca ou ausente. As estirpes hemolíticas e produtoras de enterotoxina mostravam um elevado grau de heterogeneidade e estavam espalhadas por vários *clusters*. Esta informação parece indicar que as estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* constituem uma população clonal, que se pode ter formado recentemente devido à aquisição de factores de virulência específicos, como o gene da cereulida sintetase. Esta hipótese é aliás suportada pela baixa diversidade molecular do gene *ces* (cereulida sintetase) (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Ehling-Schulz *et al.*, 2005).

Vassileva *et al.* (2007) efectuaram um estudo de população por MLST, uma vez que foram descritas algumas estirpes produtoras de cereulida com padrões de DNAr únicos e com uma variação do gene *housekeeping adk*. Os autores utilizaram 52 estirpes de *B. cereus sensu stricto* (produtoras e não produtoras de cereulida) isoladas de toxinfecções, de alimentos e do ambiente (Figura 2). Para além do *cluster* descrito por Ehling-Schulz *et al.* em 2005, observaram um segundo *cluster* de estirpes eméticas que representa um grupo independente e sem relação filogenética detectável com o *cluster* anterior. Também foi recentemente descrito por Thorsen *et al.* a existência de estirpes de *B.*

Figura 2 – Árvore filogenética de estirpes eméticas de *Bacillus cereus sensu stricto*



weihenstephanensis capazes de produzir cereulida. O facto da capacidade de síntese de cereulida ser partilhada por dois *clusters* de *B. cereus sensu stricto* filogeneticamente distintos e por estirpes de *B. weihenstephanensis* sugere que o plasmídeo pCERE01

possa ser transferido horizontalmente, e que as estirpes produtoras de cereulida se estão a diversificar progressivamente (Vassileva *et al.*, 2007).

Algumas estirpes de *B. cereus sensu stricto*, principalmente estirpes eméticas, não exibem a reacção típica de precipitação devido à hidrólise da lecitina em agar MYP e em agar sangue a hemólise é fraca ou ausente, como já referido anteriormente. Estas características atípicas podem ser devidas a mutações no regulador pleiotrópico PlcR. Foram recentemente descritas mutações distintas no gene *plcR* em algumas estirpes do grupo *B. cereus* que resultaram em fenótipo hemólise e lecitinase negativo; uma vez que estas estirpes não foram investigadas quanto à produção de toxinas, não se sabe se alguma delas é produtora de cereulida. O uso de meios de diagnóstico baseados na hidrólise da lecitina ou na hemólise pode conduzir a erros de identificação, o que pode ser mais uma contribuição para que se subestime a incidência da toxinfecção alimentar por *B. cereus sensu stricto* (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a).

A temperatura mínima de crescimento das estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* a que se verificou produção de cereulida foi de 12° C. A produção de toxina emética está, aliás, restringida a estirpes mesófilicas com o limite inferior de temperatura de crescimento entre 10 a 15° C. Tal deve-se ao facto das estirpes eméticas terem uma baixa taxa de germinação dos esporos a 7° C, e mesmo a 30° C os esporos das estirpes eméticas demonstram uma menor capacidade para germinar comparativamente aos esporos das estirpes entéricas e ambientais. As estirpes eméticas mostram, portanto, um desvio no crescimento para temperaturas mais altas que as estirpes entéricas, o que é também demonstrado pela capacidade das células vegetativas crescerem a 48° C e de os esporos demonstrarem uma maior termorresistência relativamente aos das estirpes entéricas e ambientais. Contudo, não se observa formação de cereulida acima dos 40° C (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Carlin *et al.*, 2006).

Estas características de crescimento fazem com que as estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* representem um baixo risco em alimentos refrigerados, mas por outro lado a alta termorresistência dos seus esporos favorece a sua sobrevivência em alimentos sujeitos a tratamento térmico (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Carlin *et al.*, 2006).

7. Plasmídeo pCERE01

Até 2005 não se conhecia a localização dos determinantes genéticos da cereulida e Hoton *et al.* optaram por investigar uma possível localização extracromossomal, traçando o perfil plasmídico de estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* isoladas de casos de toxinfecção alimentar. Foi observada a presença de um plasmídeo de grandes dimensões em todas as estirpes eméticas testadas e o mesmo foi submetido a PCR com os *primers* descritos por Ehling-Schulz *et al.* (2004), sendo positivo para o produto de amplificação da toxina emética. Foi proposto o nome de pCERE01 para este plasmídeo cujo tamanho foi estimado em cerca de 200 kb. Para comprovar que a presença de pCERE01 estava relacionada com a produção de cereulida, os autores criaram seis derivados de uma estirpe emética sem alguns dos seus plasmídeos. Verificou-se que os isolados nos quais o pCERE01 estava ausente apresentavam PCR negativo para pesquisa da toxina emética e não inibiram a motilidade de esperma de varrasco, enquanto que os isolados com o plasmídeo pCERE01 apresentavam resultados positivos nos mesmos testes (Hoton, Andrup, Swiecicka & Mahillon, 2005).

A cereulida é um dodecapsipéptido de reduzido peso molecular, intimamente relacionado com o ionóforo de potássio valinomicina. A sua estrutura química sugere que esta toxina é sintetizada enzimaticamente por sintetases peptídicas não ribossomais (NRPSs) (Ehling-Schulz *et al.*, 2006a).

As NRPSs são grandes proteínas multifuncionais organizadas modularmente. Os módulos, que exibem uma estrutura de domínio conservada, catalizam de forma selectiva a activação e formação de uma amina, α -hidroxi ou de um monómero de ácido carboxílico. Um módulo mínimo consiste de uma adenilação (domínio A) que activa o substrato e de um domínio de tiolação (domínio T) que liga o substrato activado. O alongamento da cadeia é catalizado por domínios de condensação (domínios C), localizados na porção N-terminal dos módulos que aceitam grupos acil dos módulos precedentes. A libertação do produto peptídico final é catalizada por domínios tioesterase (domínios TE) C-terminais. A ordem dos monómeros corresponde normalmente à ordem directa dos monómeros no produto peptídico (Ehling-Schulz *et al.*, 2006a).

O complexo NRPS responsável pela síntese de cereulida foi baptizado cereulida sintetase, e a sua informação genética está localizada num operão no megaplasmídeo de 208 kb pCERE01. A estrutura química da cereulida é reflectida na organização genética deste operão que contém, além dos genes típicos essenciais para a activação da NRPS (de apoenzima para holoenzima) e dos genes estruturais responsáveis pela síntese do produto peptídico, uma tioesterase de tipo II putativa (*cesT*) que pode eventualmente remover monómeros mal sintetizados e regenerar a NRPS. Também existe uma

hidrolase putativa (*cesH*) na porção 5'-terminal do operão e um transportador ABC putativo (*cesC/D*) na porção 3'-terminal, o qual pode estar envolvido no transporte da cereulida ou conferir resistência à célula contra a própria toxina (Ehling-Schulz *et al.*, 2006a).

Foi observado que, apesar de existirem estirpes semelhantes às estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* que possuem plasmídeos de grandes dimensões semelhantes ao pCERE01, estes não apresentam o gene *ces* e como tal estas estirpes não são capazes de produzir cereulida. O *locus* do gene *ces* está inserido numa região do plasmídeo altamente conservada, e a jusante desta região está um intrão de tipo II (Ehling-Schulz *et al.*, 2006a).

À semelhança das toxinas do *B. anthracis*, que estão codificadas no plasmídeo pXO1, e das toxinas entomicidas do *B. thuringiensis* que estão codificadas em plasmídeos de grandes dimensões, também a cereulida está localizada num mega plasmídeo. Observa-se assim que todas as toxinas específicas conhecidas do grupo *B. cereus* estão codificadas em megaplasmídeos, por oposição às enterotoxinas que se encontram largamente distribuídas pelos cromossomas dos elementos do grupo *B. cereus* e de outros *Bacillus* spp.. Ehling-Schulz *et al.* (2006a) consideram que os actuais megaplasmídeos observados nas estirpes do grupo *B. cereus* podem ser derivadas de um plasmídeo ancestral, que ao diversificar-se e incorporar diferentes factores de virulência originou diferentes fenótipos causadores de doença.

8. Metodologias para pesquisa de cereulida

A cereulida tem baixo potencial antigénico e como tal é difícil de detectar imunologicamente. Não existem testes disponíveis comercialmente para a detecção da cereulida e, como tal, esta tem de ser detectada por exames laboratoriais, que são sumariamente descritos de seguida (Kotiranta *et al.*, 2000; Jääskeläinen, 2008).

8.1. Testes em animais

Tal como o homem, os primatas são altamente sensíveis à cereulida e o ensaio por administração oral a macacos Rhesus já foi considerado o *gold standard* para a detecção de cereulida, devido à elevada sensibilidade desta espécie à toxina. Contudo, de acordo com legislação Europeia em vigor desde 1 de Junho de 2007, passou a ser proibido utilizar animais vivos para testes alimentares (Andersson *et al.*, 2006; Jääskeläinen, 2008).

8.2. Citotoxicidade em células HEP-2

A cereulida causa vacuolização das mitocôndrias em células Hep-2 (carcinoma da laringe humano), o que pode ser observado ao microscópio óptico (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Jääskeläinen, 2008).

8.3. Teste de metabolização do MTT

Este é um teste de citotoxicidade em células HEP-2 modificado e mais sensível. É baseado na utilização do bromídeo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT) que detecta a desidrogenase mitocondrial, considerada um indicador da viabilidade celular (Jääskeläinen, 2008).

8.4. Inibição da motilidade em esperma de varrasco

A membrana plasmática dos espermatozóides de varrasco tem um baixo conteúdo em esteróides, sendo altamente permeável a moléculas hidrofílicas, tais como a cereulida. A motilidade dos espermatozóides está dependente do funcionamento das mitocôndrias, podendo a inibição da motilidade ser indicação de lesão mitocondrial. A inibição da motilidade pode ser observada através de microscópio óptico (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Jääskeläinen, 2008).

8.5. Liquid Chromatography – Mass Spectrophotometry

A cereulida é facilmente solúvel em solventes orgânicos, podendo ser identificada e quantificada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) combinada com espectrofotometria de massa (MS). Este é um método quantitativo e preciso, contudo necessita de preparação morosa das amostras, equipamento caro e pessoal com formação específica (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Jääskeläinen, 2008).

8.6. PCR

O PCR é um método fiável para identificar a presença do gene da cereulida sintetase. Este gene é necessário para a produção de cereulida, contudo a detecção do gene *per se* não indica se a bactéria efectivamente produz cereulida e se esta está presente nos alimentos em concentrações suficientes para causar doença (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Jääskeläinen, 2008).

Os testes de citotoxicidade em células HEP-2, de metabolização do MTT e de inibição da motilidade em esperma de varrasco são difíceis de executar por rotina e precisam de um dia a uma semana com pré-cultivo e preparação morosa das amostras.

Para além disto não detectam exclusivamente a cereulida, pois também são sensíveis a outras toxinas mitocondriais como a gramicina (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a)

A produção efectiva de cereulida é dependente da estirpe e fortemente afectada pelo meio ambiente. Para se avaliar o risco de toxinfecção alimentar por estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* é necessária a análise directa da existência de toxina nos alimentos. A análise de risco deve ser baseada na presença de toxina no alimento ou na probabilidade da sua formação no mesmo (Jääskeläinen, 2008).

III. Pesquisa de cereulida em isolados do grupo *Bacillus cereus*

1. Material e Métodos

1.1. Selecção das Estirpes

As estirpes foram seleccionadas da colecção de bactérias do grupo *B. cereus* do LBDBE. Esta colecção é composta por bactérias identificadas pelas técnicas de microbiologia alimentar como pertencendo ao grupo *B. cereus*, mas que não estão caracterizadas até ao nível de espécie. Foram seleccionadas 74 estirpes isoladas de alimentos e 32 estirpes isoladas do ambiente, num total de 106 estirpes. No Anexo 1 é indicada a proveniência de cada estirpe.

1.2. Extracção e purificação do DNA

Os isolados foram inoculados em placas de plate count agar (PCA) directamente a partir do meio de congelação (100 µl) e incubados a 37° C durante a noite, após o que foram colhidas as colónias em estudo com uma ansa (de 10 µl), suspendendo-se em TE pH 8.0 e homogeneizando até se obter uma turvação de densidade óptica $^{600}=1$ (DO^{600}). De seguida, transferiram-se 740 µl desta suspensão para um tubo eppendorf e adicionaram-se 20 µl de lisozima (100 mg/ml em 10 mM Tris Cl pH 8.0) incubando-se a suspensão durante 15 minutos a 37° C, após o que se adicionou 40 µl de 10 % SDS misturando suavemente e aguardou-se 10 minutos. Findo o tempo, adicionaram-se 8 µl de proteinase K (20 mg/ml em 50 mM Tris HCl pH 8.0, concentração final 200 µg/ml) e deixou-se incubar durante 1 h a 55°C. Seguidamente, procedeu-se à incubação a 80° C durante 15 min para inactivar a proteinase K, após o que se adicionaram 200 µl 5M NaCl (concentração final 1 M) misturando suavemente e ficando a solução em gelo durante 1 h. Por último foi feita a remoção dos resíduos bacterianos por centrifugação a 15000 rpm (rotações por minuto) a 4° C, colhendo-se o sobrenadante que foi transferido para um tubo eppendorf.

Para a purificação do DNA realizou-se a extracção em fenol:clorofórmio, adicionando um volume igual de fenol:clorofórmio à solução obtida anteriormente. Procedeu-se à homogeneização até se formar uma emulsão e esta foi centrifugada a 14500 rpm durante 3 min. Descartou-se a fase orgânica, transferindo a fase aquosa para um tubo eppendorf e repetiu-se o passo anterior mas utilizando apenas clorofórmio. Transferiu-se novamente a fase aquosa para um tubo eppendorf e adicionaram-se 3 volumes de isopropanol,

homogeneizando a mistura e deixando-a à temperatura ambiente durante 1 h. No final deste tempo recuperou-se o DNA através de centrifugação a 14500 rpm durante 20 min a 4° C, descartou-se o isopropanol e deixou-se secar o *pellet* à temperatura ambiente. Uma vez seco ressuspendeu-se o *pellet* em TE pH 8.0, ficando esta solução congelada a -18° C.

1.3. Confirmação da presença de DNA

Após a extracção, foi confirmada a presença de DNA bem como o seu grau de pureza, através do uso do espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000. Nas situações de ausência de DNA em quantidades mensuráveis ou de baixa pureza, procedeu-se novamente à respectiva extracção.

1.4. PCR

Para a pesquisa do gene da cereulida sintetase utilizou-se PCR em tempo real. O PCR foi realizado em placa de 96 poços (PCR plates 96 well BioRad®), selada com tampas de plástico (Flat cap strips BioRad®). Depositaram-se em cada poço 20 µl de solução de reacção composta por 10 µl de iQ SYBR Green Supermix (BioRad®; 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0,4 mM de cada dNTP [dATP, dCTP, dGTP e dTTP], iTaq DNA polimerase, 50 unidades/ml, 6mM MgCl₂, Sybr Green I, 20 nM fluoresceína), 2 µl do primer forward, 2 µl do primer reverse, 3 µl de água ultra pura e 3 µl da solução de trabalho do DNA a pesquisar. Como controlo positivo utilizaram-se primers universais para o gene DNAr 16S, e como controlo negativo da reacção adicionaram-se 3 µl de água ultra pura em vez do DNA alvo. Foi ainda utilizado um poço com 20 µl de água ultra pura como branco. Os primers utilizados estão listados na Tabela 6 e foram seleccionados com base em trabalhos publicados.

Tabela 6 – Primers utilizados no presente estudo

Sequência alvo	Primers no sentido 5'-3'		Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	G+C %	Fonte
Gene rDNA 16S	F	ATTAGATACCCTDGTAGTCC	721	87	53	Kuske <i>et al.</i> , 1998
	R	TACCTTGTTACGACTT				
Gene <i>ces</i>	F	CACGCCGAAAGTGATTATACCAA	176	80	35	Fricker <i>et al.</i> , 2007
	R	CACGATAAAACCACTGAGATAGTG				

O PCR em tempo real foi realizado no ICycler IQ5 (BioRad®) segundo o seguinte protocolo: 3 minutos de desnaturação a 95 °C; 40 ciclos de amplificação com 30 segundos de desnaturação a 95° C, 50 segundos de hibridação a 55°C e 1 minuto de

extensão a 70° C; e 201 ciclos de fusão com uma curva a variar entre os 55 e os 95° C com incremento de 0,2° C.

1.5. Confirmação Presuntiva

Uma vez realizado o PCR em tempo real para pesquisa do gene da cereulida sintetase em todas as estirpes confirmou-se, através das técnicas de análise microbiológica para *B. cereus*, a identidade dos isolados positivos.

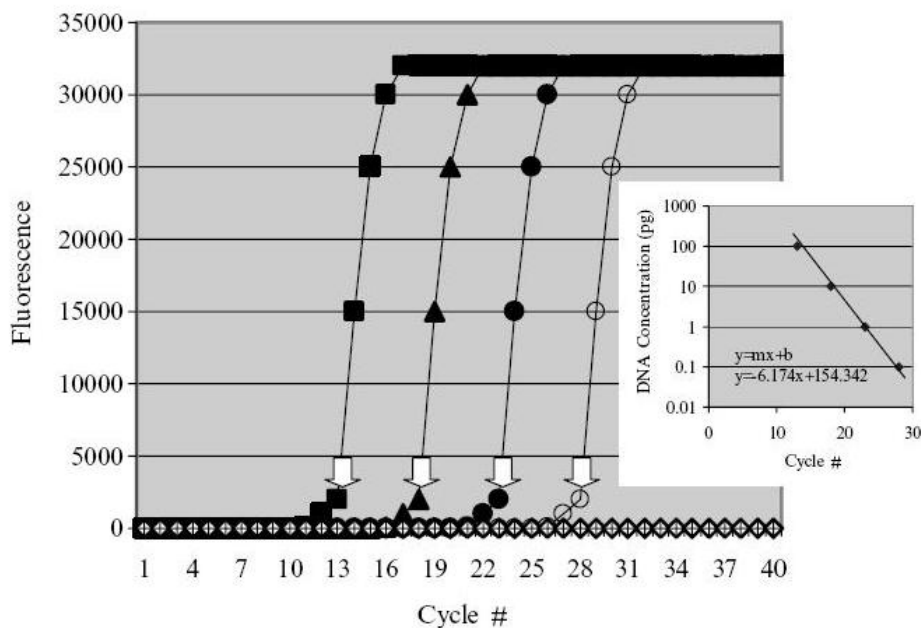
A identificação dos isolados foi realizada recorrendo às provas de microbiologia clássica, para diagnóstico presuntivo do grupo *B. cereus*. As provas consistiram na pesquisa das características microscópicas (coloração Gram, dimensões, forma, presença de esporos, tipo de associação), e nas características de cultura desenvolvidas no meio de MYP e em agar sangue. Após a sementeira, ambas as placas são incubadas a 30 °C durante 24h e são observadas quanto à presença da precipitação da lecitina e alteração da cor para rosa (MYP) bem como quanto à presença de hemólise (agar sangue).

III. Resultados

1. Critérios de interpretação dos resultados

O PCR em tempo real utiliza na solução de reacção um corante ou sonda fluorescente, os quais se ligam aos produtos sintetizados na reacção, permitindo a sua detecção e quantificação durante a progressão dos ciclos de reacção. Neste trabalho foi utilizado o SYBR Green, um corante interligante do DNA que se une às cópias de DNA sintetizadas em cada ciclo sucessivo, aumentando a fluorescência com a quantidade de DNA sintetizado em cada ciclo de reacção. O ciclo no qual a reacção atinge uma intensidade de fluorescência superior ao valor base é chamado ciclo *threshold*. Como demonstrado na Figura 3, existe uma relação linear entre o ciclo *threshold* e a quantidade de DNA presente na amostra, o que torna o PCR um método quantitativo.

Figura 3 – Detecção de DNA por PCR em tempo real



Legenda: quantidade de DNA alvo: ■ (100 pg), ▲ (10 pg), ● (1pg e 0,1 pg) e ○ (0,01 pg).

As setas indicam o ciclo *threshold* para cada quantidade de DNA.

Adaptado de Maurer, 2006

Algumas vantagens do PCR em tempo real são a sua alta sensibilidade com a utilização da sonda ou corante apropriados, a sua capacidade de detectar quantidades relativamente pequenas de DNA alvo e a facilidade de quantificação, uma vez que não há

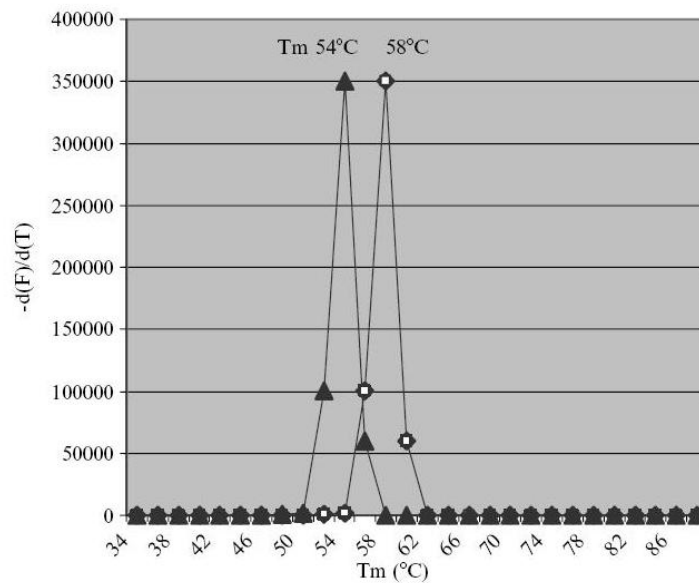
processamento pós PCR. A desvantagem do PCR em tempo real utilizando corante interligante é que este se liga a qualquer produto de dupla cadeia, incluindo primer-dimers¹ e produtos de amplificação não específicos, e origina fluorescência. Para compensar esta ligação não específica do corante, o equipamento de PCR tem a capacidade de correr uma curva de *melting* após o PCR, que consiste em aumentos sucessivos da temperatura dos poços da reacção até haver perda da fluorescência devido à desnaturação do DNA. Quando se atinge a temperatura de *melting* da sequência alvo observa-se uma quebra abrupta da fluorescência; se se observarem diminuições adicionais da fluorescência pode significar que ocorreu contaminação, ou os parâmetros do PCR podem não ter sido suficientemente específicos. A temperatura de *melting* de cada produto de amplificação depende do seu conteúdo em guanina e citosina (GC), comprimento e características da sequência, o que permite então distinguir diferentes produtos de PCR. A Figura 4 ilustra como as curvas de *melting* permitem diferenciar produtos de amplificação específicos e inespecíficos. Sendo a curva de *melting* específica para cada sequência de DNA, a curva de *melting* de um produto de amplificação específico sobrepõe-se à do controlo positivo, enquanto que um produto de amplificação não específico produz uma curva de *melting* distinta.

No PCR efectuado neste trabalho, é esperado que as amostras positivas apresentem um aumento exponencial da fluorescência após o ciclo *threshold*. O produto de amplificação formado pelos primers para o gene *ces* tem 176 pb e um conteúdo GC de 35 %, o que se traduz numa temperatura de *melting* esperada de 80,0° C.

Uma vez que as amostras de DNA não foram todas processadas simultaneamente foi efectuado um PCR após cada leva de extracção de DNA, num total de três PCRs. Para cada PCR efectuado é mostrada uma Tabela com as temperaturas de *melting* apenas das estirpes consideradas positivas ou duvidosas. A Tabela com as temperaturas de *melting* de todas as estirpes encontra-se representada no Anexo II.

¹ Primer-dimer – artefacto originado pela interacção de dois primers durante a fase de extensão do PCR, com subsequente formação de um produto de PCR pela extensão a partir da extremidade 3' de um ou de ambos os primers.

Figura 4 – Curvas de *melting* em PCR em tempo real



Legenda: produto de amplificação específico (□); controlo positivo (◆); produto de amplificação não específico (▲).

Adaptado de Maurer, 2006

1.1. PCR das estirpes J1 a J26, J44, J72, J91 e J211

As curvas obtidas da leitura da reacção de PCR das estirpes J1-J26, J44, J72, J91 e J211 e das estirpes J3, J5, J6, J7, J10 e J14 estão representadas nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

As Figuras 7 e 8 mostram as curvas de *melting* correspondentes.

Figura 5 - PCR em tempo real, estirpes J1-J26, J44, J72, J91, J211 e controlos positivo, negativo e branco

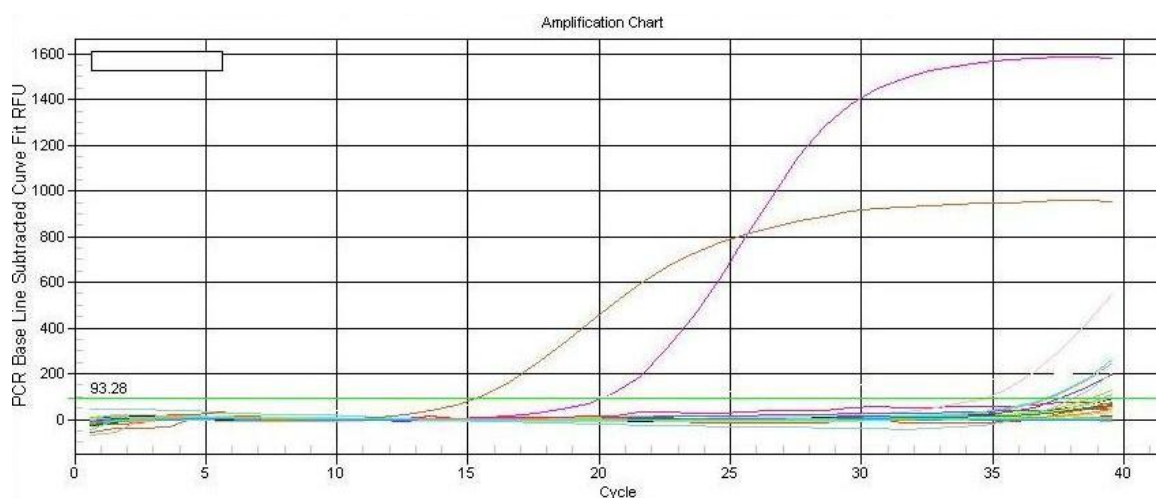


Figura 6 - PCR em tempo real, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco

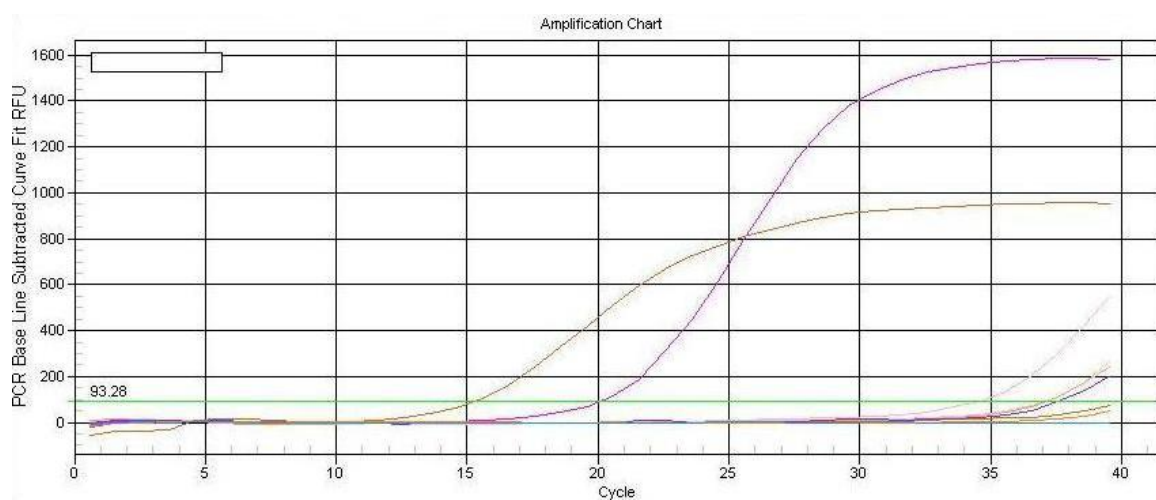


Figura 7 - Curvas de *melting*, estirpes J1-J26, J44, J72, J91, J211 e controlos positivo, negativo e branco

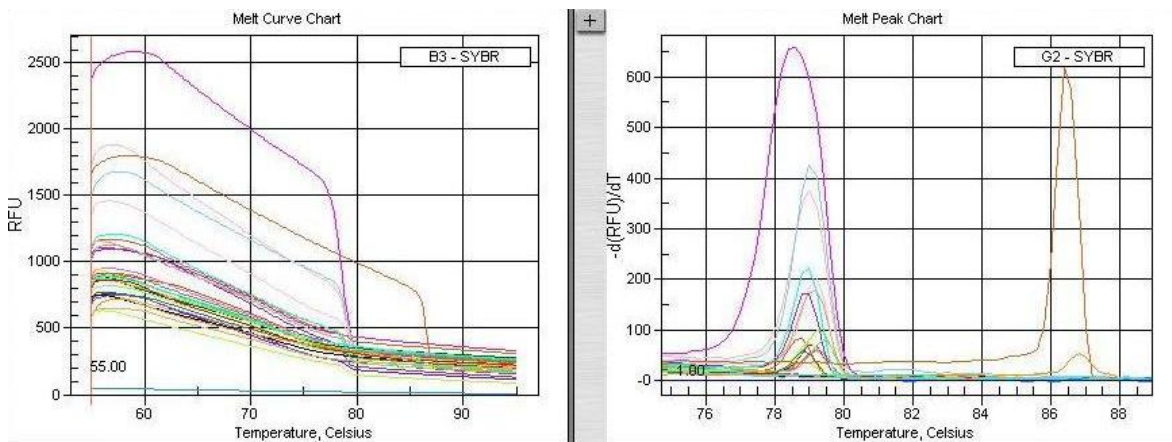


Figura 8 - Curvas de *melting*, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco

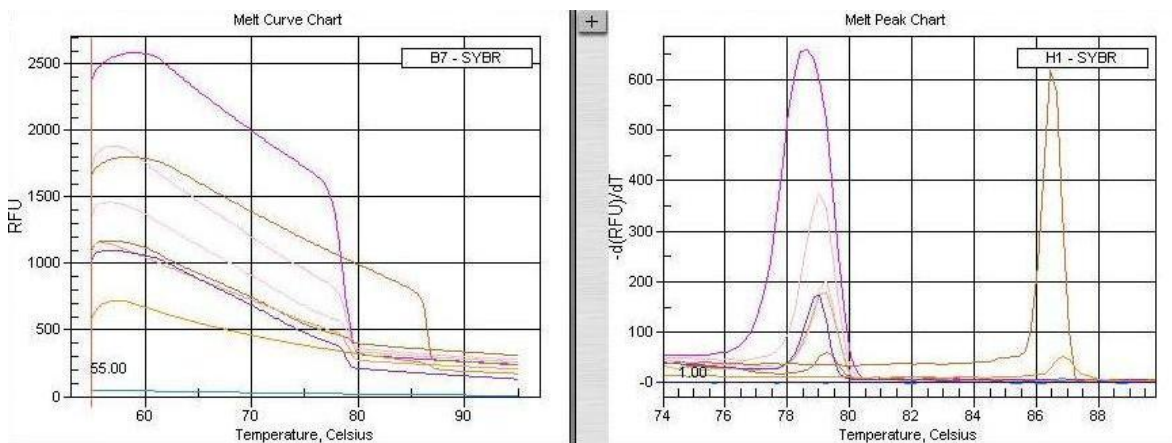


Tabela 7 – Temperaturas de *melting*

<i>Estirpe</i>	<i>Pico</i>	<i>Temperatura de melting (° C)</i>	<i>Tamanho do pico (-d.RFU/dT)</i>
J3_1	B03.0	78,60	658,74
J5_1	B05.0	79,20	202,28
J6_1	B06.0	79,00	374,90
J7_1	B07.0	61,20	45,09
J7_1	B07.1	71,40	42,91
J7_1	B07.2	72,80	44,85
J7_1	B07.3	73,60	42,36
J7_1	B07.4	76,40	28,57
J7_1	B07.5	79,20	61,52
J10_1	B09.0	79,20	178,20
J14_1	D01.0	79,00	171,91
Positivo	G01.0	86,40	618,80
Negativo	G02.0	59,80	29,25
Negativo	G02.1	60,60	27,11
Negativo	G02.2	63,20	23,59
Negativo	G02.3	64,80	21,84
Negativo	G02.4	86,80	53,41
Branco	H01.0	63,40	1,47
Branco	H01.1	64,60	2,60
Branco	H01.2	66,00	2,22
Branco	H01.3	67,40	3,16
Branco	H01.4	68,80	1,70
Branco	H01.5	70,20	2,21
Branco	H01.6	71,60	2,31
Branco	H01.7	75,00	2,01
Branco	H01.8	93,40	1,95

Da análise das Figuras 5 a 8 e da Tabela 7 ressalta que a estirpe J3 (linha cor de rosa nas Figuras) foi considerada francamente positiva, tendo uma curva de amplificação superior à do controlo positivo para o DNAr 16S e uma temperatura de *melting* de 78,6° C. As estirpes J5, J6, J7, J10 e J14 foram consideradas duvidosas, pois apenas apresentaram aumento da fluorescência próximo do ciclo 35, mas apresentaram o pico da curva de *melting* nos 79,0 ou 79,2° C. Optou-se por fazer um PCR secundário destas estirpes, sendo o produto de amplificação deste primeiro PCR utilizado como DNA alvo no PCR apresentado no ponto IV.1.2. O controlo positivo é a curva de *melting* alta próximo dos 86° C e o negativo é curva de *melting* baixa no mesmo ponto, o branco manteve-se sempre perto do valor 0.

1.2. PCR das estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10 e J14

As curvas obtidas da leitura da reacção de PCR das estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10 e J14 e das estirpes J3, J5, J6, J7, J10 e J14 estão representadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

As Figuras 11 e 12 mostram as curvas de *melting* correspondentes.

Figura 9 - PCR em tempo real, estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco

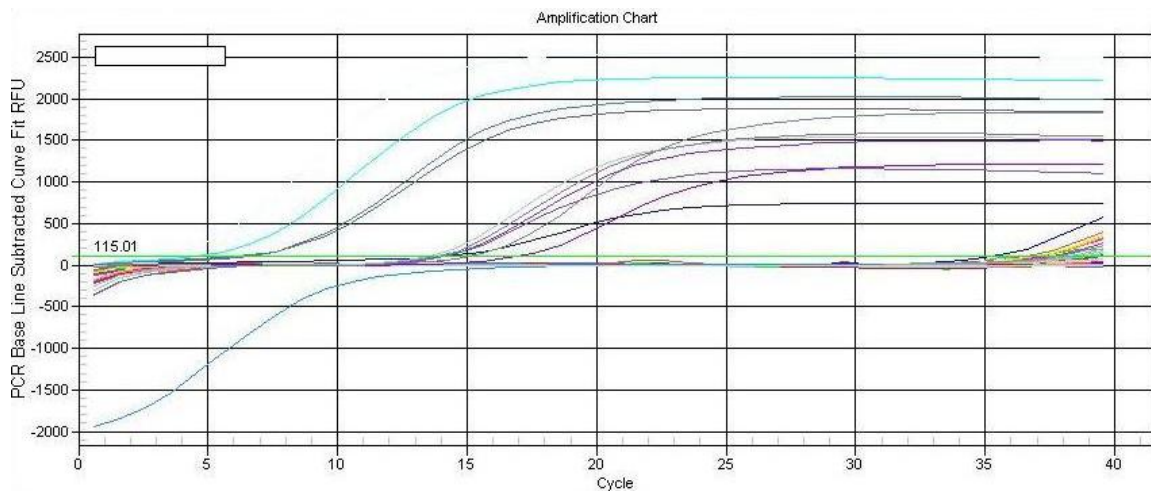


Figura 10 - PCR em tempo real, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco

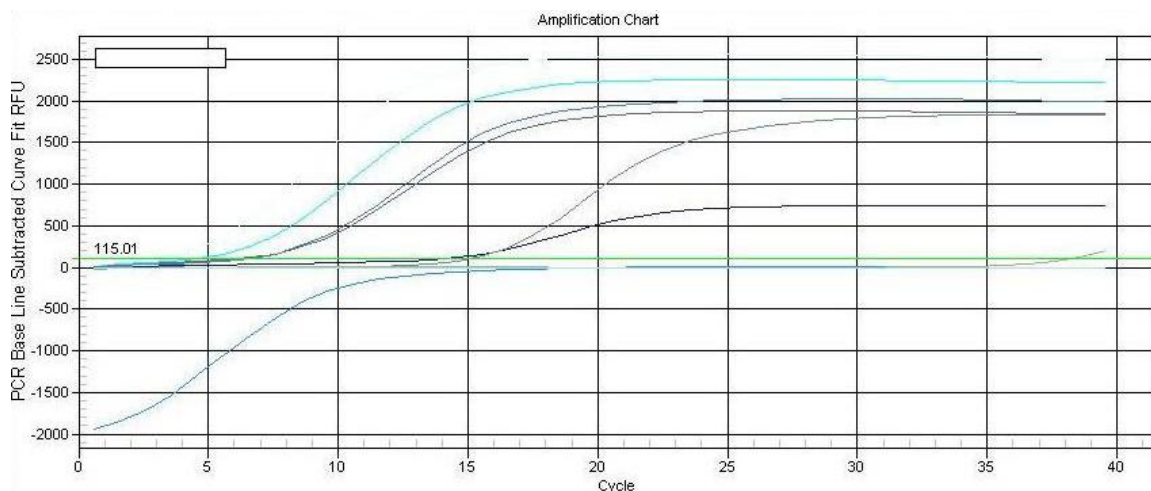


Figura 11 - Curvas de *melting*, estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco

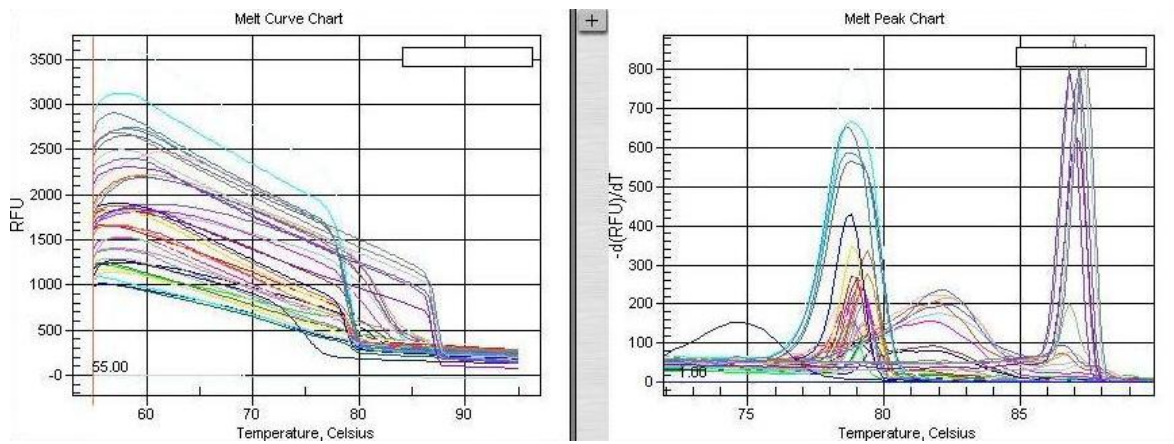


Figura 1 - Curvas de *melting*, estirpes J3, J5, J6, J7, J10, J14 e controlos positivo, negativo e branco

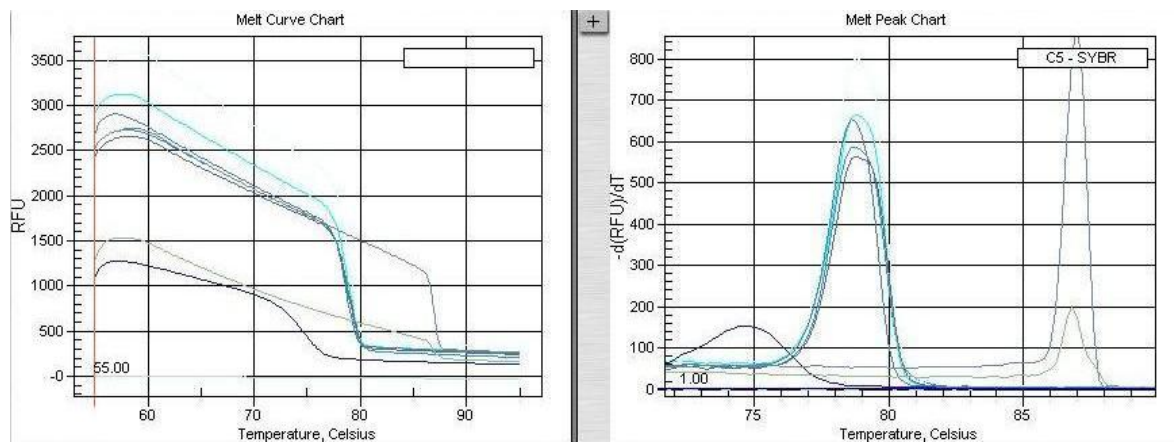


Tabela 8 – temperaturas de *melting*

<i>Estirpe</i>	<i>Pico</i>	<i>Temperatura de melting (° C)</i>	<i>Tamanho do pico (-d.RFU/dT)</i>
J3	C04.0	78,60	585,30
J5	C05.0	78,80	664,84
J6	C06.0	78,80	800,44
J7	C07.0	78,80	563,09
J10	C08.0	74,60	154,20
J14	C09.0	78,60	653,27
Positivo	C10.0	87,00	886,63
Negativo	C11.0	86,80	201,28
Branco	C12.0	65,40	1,73
Branco	C12.1	67,40	1,34
Branco	C12.2	70,60	1,22
Branco	C12.3	81,80	1,71
Branco	C12.4	84,20	2,81
Branco	C12.5	88,40	1,93

Como se pode ver nas Figuras 10 e 12 e na Tabela 8 as estirpes J3, J5, J6, J7 e J14 deram positivo neste PCR, com uma curva de amplificação típica e valores de temperatura de *melting* de 78,6 ou 78,8° C. A estirpe J10 (linha de cor preta nas Figuras) foi considerada negativa uma vez que a sua curva de *melting* foi distinta do esperado, com a temperatura de *melting* nos 74,6° C. As restantes estirpes testadas foram todas negativas. O controlo positivo é a linha que tem a curva de *melting* alta próximo dos 86° C e o negativo é a linha que tem a curva de *melting* baixa no mesmo ponto, o branco manteve-se sempre perto do valor 0.

1.3. PCR das estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270 e J275

As curvas obtidas da leitura da reacção de PCR das estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270, J275 e das estirpes J266 e J270 estão representadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

As Figuras 15 e 16 mostram as curvas de *melting* correspondentes.

Figura 2 - PCR em tempo real, estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270, J275 e controlos positivos, negativo e branco

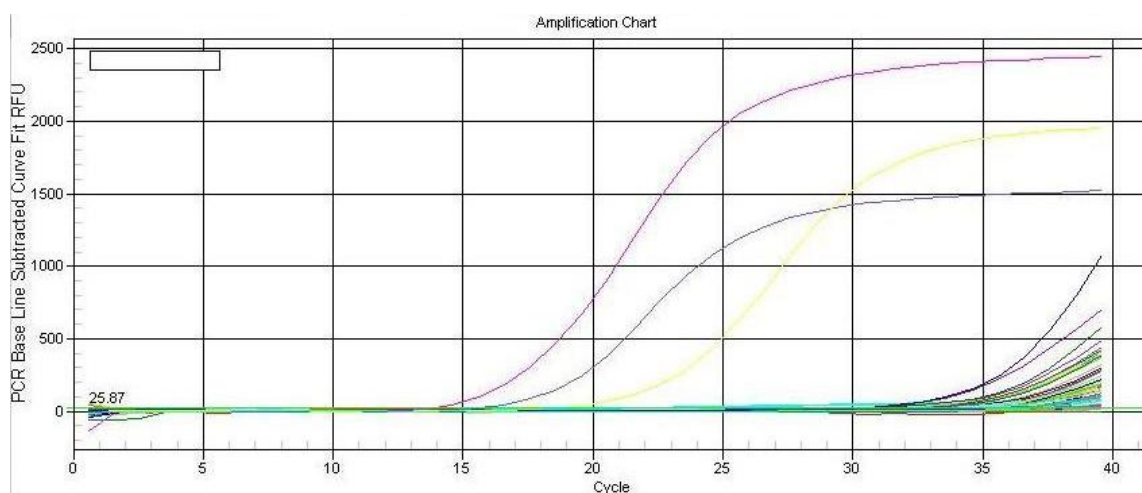


Figura 3 - PCR em tempo real, estirpes J266, J270 e controlos positivos, negativo e branco

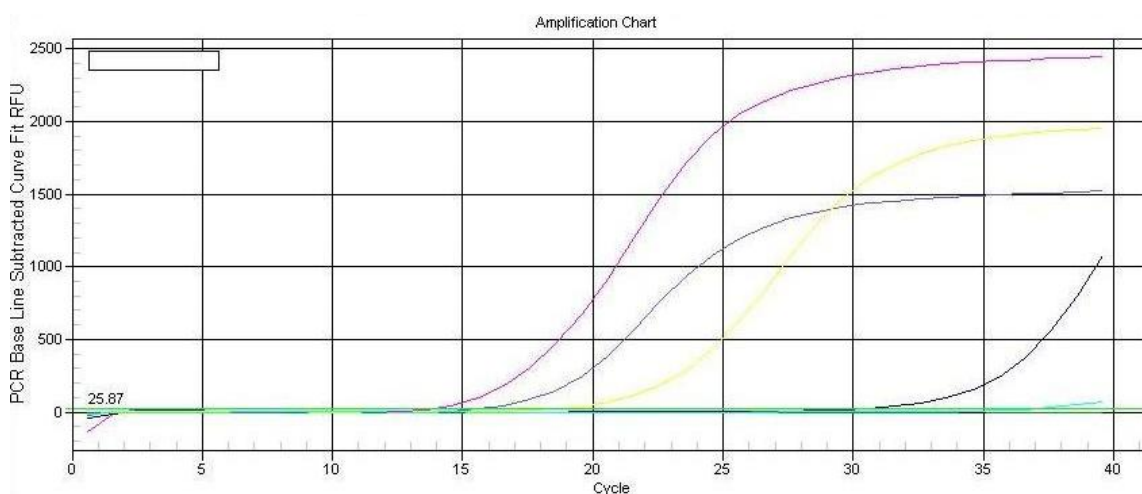


Figura 4 - Curvas de *melting*, estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270, J275 e controlos positivos, negativo e branco

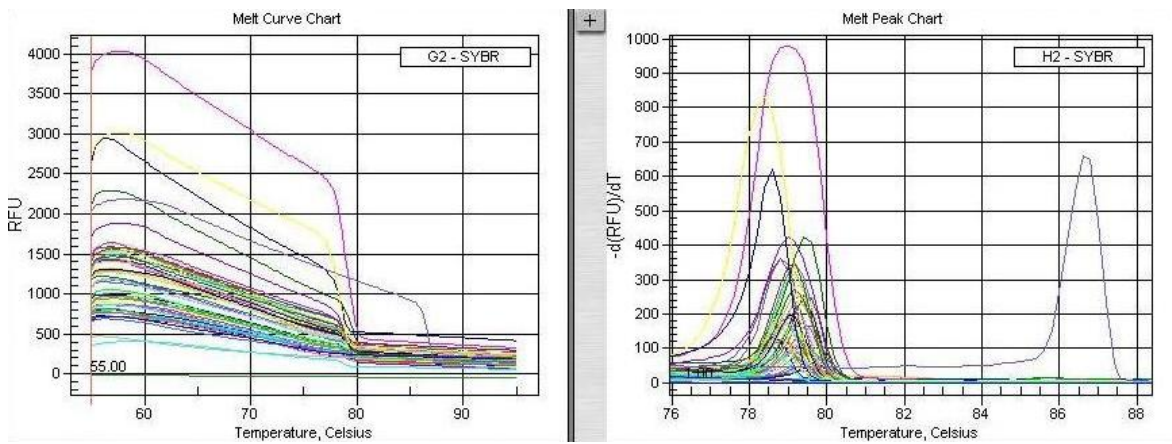


Figura 5 - Curvas de *melting*, estirpes J266, J270 e controlos positivos, negativo e branco

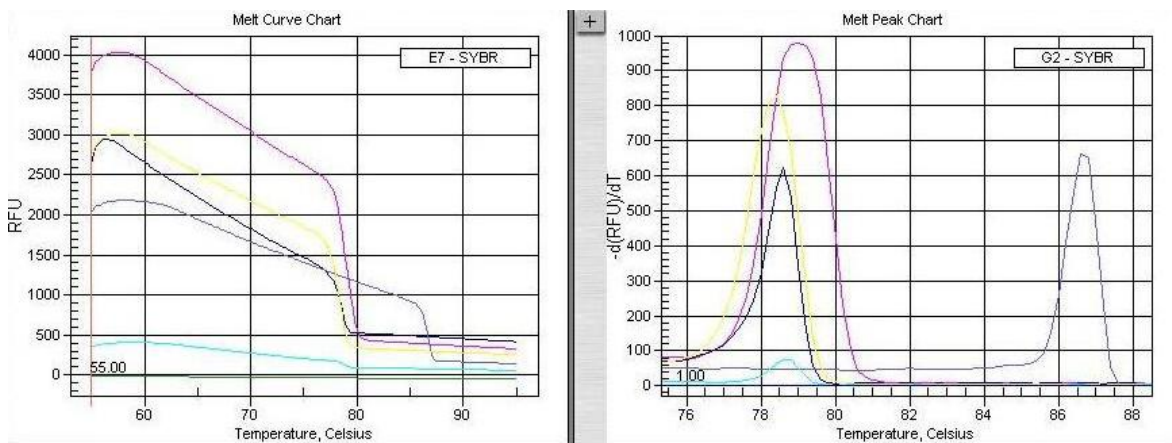


Tabela 9 – Temperaturas de *melting*

<i>Estirpe</i>	<i>Pico</i>	<i>Temperatura de melting (° C)</i>	<i>Tamanho do pico (-d.RFU/dT)</i>
J266	E05.0	79,00	979,92
J270	E07.0	78,60	622,00
Positivo DNAr 16S	G01.0	86,60	661,91
Positivo Cereulida	G02.0	78,40	827,68
Branco	H01.0	57,80	1,12
Branco	H01.1	60,40	1,73
Branco	H01.2	66,20	1,19
Branco	H01.3	68,80	1,43
Branco	H01.4	74,20	1,63
Branco	H01.5	77,80	1,78
Branco	H01.6	84,80	1,58
Branco	H01.7	85,80	1,86
Branco	H01.8	91,60	2,05
Negativo	H02.0	78,60	76,39

Tendo em conta os resultados expressos nas figuras 13 a 16 e na tabela 9, as estirpes J266 e J270 foram consideradas positivas. A estirpe J266 (linha cor de rosa nas Figuras) apresentou curva de amplificação típica e uma temperatura de *melting* de 79,0° C. A estirpe J270 (linha preta nas Figuras) apenas apresentou aumento exponencial da fluorescência próximo do ciclo 30, mas teve uma temperatura de *melting* de 78,6° C. O controlo positivo para a cereulida (estirpe J3) é a linha amarela, o controlo positivo para o DNAr 16S é a linha que tem a curva de *melting* alta próximo dos 86° C e o negativo é a linha que tem a curva de *melting* baixa no mesmo ponto, o branco manteve-se sempre perto do valor 0.

1.4. Confirmação presuntiva da identidade das estirpes positivas

Uma vez realizados todos os ensaios de PCR confirmou-se a identidade das estirpes positivas para a presença do gene *ces* (J3, J5, J6, J7, J14, J266 e J270) através de técnicas de análise microbiológica clássica. Todas as estirpes apresentaram as características microscópicas típicas de *Bacillus cereus sensu stricto* anteriormente descritas no ponto II.3, bem como precipitação da lecitina em agar MYP e hemólise em agar sangue.

1.5. Análise estatística

Obtiveram-se 7 estirpes positivas, das quais 3 têm origem alimentar (J3, J266 e J270) e 4 origem ambiental (J5, J6, J7 e J14). A Tabela 10 apresenta a distribuição das estirpes portadoras do gene *ces*.

Tabela 10 – Distribuição das estirpes portadoras do gene *ces*

	<i>Presença do gene ces</i>		<i>Total</i>	<i>Frequência Relativa (positivos)</i>
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>		
Origem ambiental	4	69	74	5,4 %
Origem alimentar	3	29	32	9,37 %
Total	7	98	106	6,6 %

A Tabela 11 representa o resultado da aplicação do Teste Exacto de Fisher. Este tem como hipótese nula testar a não existência de associação entre a proporção de positivos e negativos para a presença do gene *ces* e a origem alimentar ou ambiental das estirpes, e como hipótese alternativa a existência de associação entre a proporção de resultados positivos e negativos e a origem das estirpes.

Tabela 11 – Teste exacto de Fisher

	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Teste Exacto de Fisher	0,429	0,355

Como se pode observar, com base na análise dos dados pelo Teste Exacto de Fisher (Tabela 11) não foi encontrada associação entre a presença ou ausência do gene *ces* e a origem alimentar ou ambiental das estirpes ($p > 0,05$), tendo sido provada a hipótese nula.

IV. Discussão

Segundo Fricker *et al.* (2008), a temperatura de *melting* esperada para a cereulida é de 80,0° C. Contudo, os mesmos autores encontraram experimentalmente uma temperatura de *melting* de 79,3±0,2° C para o produto de amplificação do gene *ces*. No presente estudo, utilizando os mesmos primers que Fricker *et al.* (2008), foram observados resultados semelhantes, variando as temperaturas de *melting* para as estirpes positivas entre 78,6 e 79,2° C.

Neste trabalho, em 106 estirpes pesquisadas encontraram-se 7 estirpes positivas (3 de origem alimentar e 4 de origem ambiental) para a presença do gene *ces*, o que corresponde a uma frequência relativa de 6,6%. Tendo em conta que as 106 estirpes foram seleccionadas aleatoriamente a partir de isolados provenientes de vários pontos do país, esta frequência, não sendo muito elevada, vem demonstrar que existe a possibilidade de toxinfecção por estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* em Portugal. Não foi possível obter dados quanto à prevalência dos diferentes agentes de toxinfecção alimentar em Portugal, pelo que não é possível relacionar os dados obtidos no presente estudo sobre a prevalência do gene da cereulida sintetase com casos de toxinfecção alimentar.

As 3 estirpes isoladas de alimentos correspondem a 2,83% do total de estirpes e a 9,37% das estirpes de origem alimentar. Colavita *et al.* (2007) pesquisaram na Universidade de Molise em Itália, a presença do gene *ces* em 54 estirpes de *B. cereus* isoladas de alimentos e identificaram a sua presença em 17 estirpes, o que corresponde a uma prevalência de 31,4%. Esta diferença entre 31,4% e 9,37% pode ser devida ao facto de Colavita *et al.* (2007) terem realizado o seu estudo por PCR convencional. A menor especificidade da técnica convencional é compatível com a ocorrência de falsos positivos por amplificação de fragmentos inespecíficos semelhantes aos da sequência alvo, e com contaminação cruzada no processamento pós PCR. A discrepância nas prevalências pode, por outro lado, ter origem em diferenças de distribuição geográfica das estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto*. Contudo, uma vez que Colavita *et al.* não indicam no seu estudo a proveniência das estirpes estudadas não é possível tirar nenhuma conclusão a este respeito.

Num estudo desenvolvido em estabelecimentos de restauração na Holanda, Wijnands *et al.* (2006) averiguaram a existência de *B. cereus sensu stricto* e investigaram a presença dos genes das toxinas HBL, NHE e citotoxina K e a produção de cereulida nas estirpes isoladas. Os autores não indicam o total de estirpes isoladas, mas referem

que 8,2% das estirpes eram produtoras de cereulida, o que é um valor semelhante aos 9,37% obtidos no presente estudo. Os autores verificaram também que todas as estirpes produtoras de cereulida tinham presente os genes para uma ou mais enterotoxinas. Esta observação está de acordo com os resultados publicados por outros autores, segundo os quais as estirpes portadoras do gene *ces* tinham também presente o gene *nhe* (codifica a NHE) ou os genes *nhe* e *cytk* (codifica a citotoxina K) (Ehling-Schulz *et al.*, 2006b). Tendo em conta estes resultados, é provável que no presente estudo as estirpes que se determinaram serem portadoras do gene *ces* possuam também genes que codificam enterotoxinas. Seria interessante investigar esta hipótese, através de um PCR para pesquisa dos genes que codificam as toxinas HBL, NHE e citotoxina K.

Existem, também, estudos que apresentam uma prevalência mais baixa de estirpes eméticas dentro da população de *B. cereus sensu stricto*. Rahmati e Labbe (2008) pesquisaram a presença de *B. cereus sensu stricto* em 347 amostras de produtos de pesca frescos e processados. Encontraram 62 estirpes, das quais apenas uma era portadora do gene *ces*, e apresentava simultaneamente os genes para as enterotoxinas NHE e HBL. Noutro estudo realizado em condimentos com fermentação alcalina (Soumbala e Bikalga) foram encontradas 6 estirpes de *B. cereus sensu stricto* em Soumbala e 3 em Bikalga, não tendo sido encontrada nenhuma estirpe emética (Ouoba, Thorsen & Varnam, 2008).

No que se refere às 4 estirpes isoladas de fontes ambientais, estas correspondem a 3,77 % do total de estirpes e a 5,4 % das estirpes telúricas. Uma das estirpes foi isolada na Figueira da Foz e as restantes em Achete, no Ribatejo. As 3 estirpes de Achete foram isoladas de amostras provenientes de locais diferentes, o que pode significar que existem estirpes portadoras do gene *ces* disseminadas nesta região. Além disso, se se considerar que estas amostras foram obtidas de estrumeiras de gado bovino, então estas estirpes estão, provavelmente, associadas a este tipo de gado. As vacas podem contaminar os úberes com esporos ou células vegetativas de *B. cereus sensu stricto*, na pastagem ou na cama, podendo o leite ser assim contaminado caso não haja uma limpeza efectiva do úbere antes da ordenha. Uma vez que os esporos resistem à pasteurização, este leite e os lacticínios produzidos a partir dele vão estar contaminados (Burgess & Horwood, 2006; Bhunia, 2007; Arnesen, Fagerlund & Granum, 2008). Neste contexto, e considerando que a estirpe J270 foi isolada a partir de gelado de baunilha, este pode ter sido o seu mecanismo de contaminação. Foi anteriormente referido que a temperatura mínima para a produção de cereulida é de 12° C. Assim sendo, mesmo que a estirpe J270 tenha a capacidade de produzir cereulida não é de esperar que tal aconteça no alimento onde foi isolada, uma vez que o gelado está armazenado a temperaturas muito inferiores a 12° C.

O síndrome emético está associado ao consumo de alimentos com cereulida pré-formada, a qual se terá produzido durante o armazenamento prolongado de alimentos mantidos a temperaturas inadequadas. Na cozinha tradicional portuguesa existe um elevado consumo de arroz, batatas e outros alimentos ricos em amido aos quais estão associadas as estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto*; no entanto, como estes alimentos são normalmente processados e de seguida consumidos o risco de formação de toxina é diminuto. Actualmente observam-se alterações na produção alimentar a nível global sendo cada vez mais comum a produção de grandes quantidades de alimento que não são consumidos de imediato o que significa que o risco de formação de cereulida se torna mais elevado. Se se considerar um serviço de restauração colectiva em que haja uma potencial falha da manutenção da temperatura dos alimentos, facilmente se percebe que esta falha predispõe à formação de cereulida, e provavelmente, à ocorrência de toxinfecção alimentar de várias pessoas. A título de exemplo, nos restaurantes asiáticos é usual efectuar-se o pré-cozimento de grandes quantidades de arroz que é mantido à temperatura ambiente para evitar a aglutinação que ocorre durante a refrigeração, sendo depois frito antes de ser servido; existem aliás vários casos de síndrome emético por *B. cereus sensu stricto* associados a restaurantes chineses (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a).

Como referido, o facto da capacidade de síntese de cereulida ser partilhada por dois *clusters* de *B. cereus sensu stricto* filogeneticamente distintos e por estirpes de *B. weihenstephanensis*, sugere que o plasmídeo pCERE01 possa ser transferido horizontalmente, e que as estirpes produtoras de cereulida se estão a diversificar progressivamente (Vassileva *et al.*, 2007). Foi recentemente demonstrado que as estirpes do grupo *B. cereus* têm capacidade de efectuar transferência de plasmídeos em alimentos, nomeadamente, observou-se a capacidade uma estirpe emética de *B. cereus sensu stricto* agir como doador ou receptor de plasmídeos com estirpes de *B. thurigiensis* (Van der Auwera, Timmery, Hoton & Mahillon, 2007). Estes autores julgam que se se provar a capacidade de transferência do plasmídeo pCERE01, fica explicado o aparecimento de novos *clusters* de *B. cereus sensu stricto* e de estirpes de *B. weihenstephanensis* produtoras de cereulida, demonstrando também a possibilidade de surgirem outras espécies do grupo *B. cereus* produtoras de cereulida. Esta capacidade de transferência de plasmídeos em alimentos possibilita durante a preparação dos alimentos, a troca de informação genética entre estirpes oriundas de diferentes nichos ecológicos o que permite além da transferência do plasmídeo pCERE01 e consequente disseminação de estirpes eméticas, que as estirpes eméticas existentes adquiram novos factores de virulência ou de resistência antimicrobiana.

É conhecido que a produção efectiva de cereulida é dependente da estirpe e fortemente afectada pelo meio ambiente. Seria interessante pesquisar se as estirpes consideradas positivas para a presença do gene *ces* neste estudo, apenas têm o gene presente ou se têm efectivamente capacidade toxinogénica e de provocar toxinfecção alimentar. Esta pesquisa poderia ser dividida em duas etapas: um primeiro passo em que se investigaria se as estirpes em causa têm a capacidade de produzir cereulida em condições óptimas; e um segundo passo em que para as estirpes produtoras de cereulida se investigaria a sua capacidade de síntese em diferentes meios de cultura e alimentos.

Foi descrito que a produção máxima de cereulida se dá entre os 20 e 25° C, e que a quantidade de toxina produzida aumenta com a adição de L-leucina e L-valina e com o aumento do rácio $[K^+]:[Na^+]$, mas apenas com concentrações constantes de glicina e sódio. É necessária a presença de oxigénio para a síntese de cereulida e existem estirpes que têm a produção aumentada se o meio de cultura for suplementado com 5% do volume em sangue (Jääskeläinen, Häggblom, Andersson & Salkinoja-Salonen, 2004; Apetroaie-Constantin *et al.*, 2008). Para pesquisar se as estirpes consideradas positivas para a presença do gene *ces* neste estudo têm capacidade de produzir cereulida, estas seriam incubadas em agar de soja tríptica (TSA) e em agar sangue a 22° C e a produção de cereulida seria monitorizada a cada 12 horas. Para detectar a presença de cereulida poder-se-ia obter os materiais para executar o teste de citotoxicidade em células HEP-2 e de inibição da motilidade em esperma de varrasco. A cromatografia líquida de alta pressão combinada com espectrofotometria de massa é o método mais fiável, no entanto não está disponível no LDBDE.

O passo seguinte seria inocular as estirpes que se mostrassem produtoras de cereulida em diferentes tipos de meios de cultura e de alimentos, variando as condições ambientais, para perceber quais seriam os limites de produção de cereulida dessas estirpes e se produzem cereulida em quantidades suficientes para causar toxinfecção alimentar.

Uma outra consideração é que, actualmente, não existe nenhum método de rotina para identificar estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto*. Os testes de citotoxicidade em células HEP-2, de metabolização do MTT e de inibição da motilidade em esperma de varrasco demoram tempo para preparar as condições necessárias e não detectam exclusivamente a cereulida. A cromatografia líquida de alta pressão combinada com espectrofotometria de massa necessita de equipamento caro e apenas está disponível em alguns laboratórios. O PCR em tempo real, tal como descrito neste estudo e por Fricker *et al.* (2007), permite a identificação do *B. cereus sensu stricto* como agente etiológico de surtos eméticos poucas horas após a obtenção de uma amostra de DNA do

alimento suspeito ou de amostras clínicas, a qual pode ser feita através de kits de extracção de DNA. No estudo de Fricker *et al.* (2007), foi demonstrado que apenas as estirpes eméticas são positivas no PCR em tempo real, não havendo reacção cruzada com outras estirpes, incluindo estirpes que possuem genes que codificam NRPSs. O PCR em tempo real permite a análise simultânea de um grande número de amostras e com a adição de *primers* para o *S. aureus* permite a distinção destes dois agentes eméticos, num só passo, através de um PCR duplex em tempo real, pois os produtos de amplificação para cada um dos agentes têm temperaturas de *melting* distintas. O PCR em tempo real é, assim, um teste rápido altamente específico e sensível para o diagnóstico de síndrome emético por *B. cereus sensu stricto*, que oferece o potencial para quantificação e cuja adopção como metodologia de rotina pode contribuir para determinar a incidência real de toxinfecção por *B. cereus sensu stricto*, uma vez que reduz a probabilidade de diagnóstico erróneo.

III. Conclusões

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da importância do *Bacillus cereus* como agente patogénico alimentar, e este agente tem sido cada vez mais implicado em surtos de toxinfecções alimentares. Sendo este microrganismo uma bactéria ambiental, tem a capacidade de contaminar várias matérias-primas e alimentos, além de que sobrevive à maior parte dos tratamentos de confecção devido à sua capacidade de produção de esporos termorresistentes.

O *B. cereus sensu stricto* é bastante conhecido por provocar um síndrome diarreico, mas através da produção da toxina termostável cereulida é também responsável por um síndrome emético que se crê ser subdiagnosticado. Actualmente não são conhecidos métodos eficazes para a inactivação da cereulida, já que esta tem um elevado grau de termorresistência.

Neste estudo realizou-se a pesquisa do gene da cereulida sintetase numa amostragem de bactérias do grupo *B. cereus* e foram encontradas, através de PCR em tempo real, 7 estirpes positivas num total de 106, das quais 3 com origem alimentar e 4 com origem ambiental. Todas as estirpes positivas foram confirmadas presuntivamente como sendo *B. cereus sensu stricto*. O facto de se terem detectado estirpes positivas para o gene em estudo demonstra que é de facto possível a toxinfecção por estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* em Portugal.

Foi observado por diversos autores que as estirpes que possuem o gene *ces* possuem simultaneamente genes que codificam enterotoxinas e seria interessante investigar se o mesmo se verifica nas estirpes portadoras do gene *ces* observadas neste estudo.

Observou-se no presente trabalho que 3 das 4 estirpes ambientais foram isoladas de amostras obtidas de estrumeiras de gado bovino, o que leva à especulação de que estarão provavelmente associadas a este tipo de gado.

Uma vez que o síndrome emético por *B. cereus sensu stricto* está associado ao consumo de alimentos com cereulida pré-formada, considera-se importante a manutenção dos alimentos a temperaturas adequadas durante todas as fases de produção, uma vez que após a cereulida ter sido formada nos alimentos não existe nenhum método que seguramente a inactive e simultaneamente mantenha a edibilidade dos alimentos.

Como a produção efectiva de cereulida é dependente da estirpe e fortemente afectada pelo meio ambiente, seria igualmente interessante pesquisar se as estirpes

positivas encontradas neste estudo apenas possuem o gene *ces* ou se têm efectivamente capacidade de produzir cereulida e de causar toxinfecção alimentar para melhor avaliar a sua importância como patogénicos alimentares.

Uma vez que actualmente não existe nenhuma metodologia de rotina para identificar estirpes eméticas de *B. cereus sensu stricto* o PCR em tempo real deveria ser ponderado como opção para preencher esta lacuna pois é um exame rápido, altamente específico e sensível e oferece o potencial para quantificação. Além disso, ao permitir a fácil distinção do *S. aureus*, a sua adopção pode contribuir para determinar a incidência real de toxinfecção por *B. cereus sensu stricto*.

IV. Bibliografia

- Andersson, M. A., Hakulinen, P., Honkalampi-Hämäläinen, U., Hoornstra, D., Lhuguenot, J.-C., Mäki-Paakkanen, J., Savolainen, M., Severin, I., Stammati, A.-L., Turco, L., Weber, A., Wright, A. v., Zucco, F. & Salkinoja-Salonen, M. (2006). Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. *Toxicon*, 49(3), 351-367.
- Apetroaie-Constantin, C., Shaheen, R., Andrup, L., Smidt, L., Rita, H. & Salkinoja-Salonen, M. (2008). Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), 60-67.
- Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A. & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Acedido em 23-07-2008, <http://www3.interscience.wiley.com/journal/120085025/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.
- Bhunja, A. K. (2007). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In A. K. Bhunia (Eds.) *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*; (1ª Edição). (276). Springer.
- Burgess, G. & Horwood, P. (2006). Development of Improved Molecular Detection Methods for *Bacillus cereus* Toxins, Rural Industries Research and Development Corporation.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Eisterkamp, S., Shaheen, R., Salonen, M. S., Nguyen-The, C. & Ehling-Schulz, M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, 109(2006), 132-138.
- Colavita, G., Rotili, M., Leone, A., Vergara, A., Sammarco, M. & Ripabelli, G. (2007). Identification of Emesis-causing *Bacillus cereus* Strains by Polymerase Chain Reaction: Preliminary Results. *Veterinary Research Communications*, 31(0), 351-353.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M. & Scherer, S. (2006a). Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiology*, 6(20).
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer, S. (2004a). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness.,
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer, S. (2004b). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.-H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M. & Svensson, B. (2006b). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 260(2), 232-40.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.-H., Lindbäck, T., Andersson, M., Schulz, A., Märtilbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M. & Scherer, S. (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151(Pt 1), 183-197.

Fricker, M., Messelhäuser, U., Busch, U., Scherer, S. & Ehling-Schulz, M. (2007). Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks.

Fritze, D. (2004). Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Acedido em 07-08-2008, <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245?cookieSet=1>.

Granum, P. E. & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology Letters, 157, 223-228

Hoton, F. M., Andrup, L., Swiecicka, I. & Mahillon, J. (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology*, 151(Pt 7), 2121-2124.

Jääskeläinen, E. (2008). Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food. Department of Applied Chemistry and Microbiology - Division Microbiology. Helsinki, University of Helsinki: 74.

Jääskeläinen, E. L., Häggblom, M. M., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004). Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 75-83.

Jay, J. M. (2000). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In J. M. Jay (Eds.) *Modern Food Microbiology*, (6ª Edição). (720). Springer.

Ko, K. S., Kim, J.-W., Kim, J.-M., Kim, W., Chung, S.-i., Kim, I. J. & Kook, Y.-H. (2004). Population structure of the *Bacillus cereus* Group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. Acedido em 12-08-2008, <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/72/9/5253>.

Kotiranta, A., Lounatmaa, K. & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2, 189-198.

Kusea, M., Franza, T., Kogaa, K., Suwana, S., Isobe, M., Agatac, N. & Ohta, M. (2000). High incorporation of L-amino acids to cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(8), 735-739.

Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, D. L., Stark, P. C., Hill, K. K. & Jackson, P. J. (1998). Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(7), 2463-2472.

Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rødland, M. S. & Granum, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150(Pt 12), 3959-3967.

Maurer, J. (Eds). (2006). *PCR methods in foods*. Springer.

Minnaard, J., Delfederico, L., Vasseur, V., Hollmann, A., Rolny, I., Semorile, L. & Pérez, P. F. (2007). Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. Acedido em 07-08-2008,

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7K-4MTC6CS-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=9275e39c3e26d39ed9fb06e38d2c0588.

Ouoba, L. I. I., Thorsen, L. & Varnam, A. H. (2008). Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 224-230.

Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W. J., Holmes, E. C. & Maiden, M. C. J. (2004). Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group. Acedido em 08-07-2008, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=15547268>.

Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., Veld, P. i. t., Denon, Q., Vérthe, R. & Debevere, J. (2008). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology*, 46(5), 536-541.

Rajkowski, K. T. & Bennett, R. W. (2003). *Bacillus cereus*. In M. D. Miliotis & J. W. Bier (Eds.) *International Handbook of Foodborne Pathogens*, (1ª Edição). (688). CRC.

Rasko, D. A., Ravel, J., Okstad, O. A., Helgason, E., Cer, R. Z., Jiang, L., Shores, K. A., Fouts, D. E., Tourasse, N. J., Angiuoli, S. V., Kolonay, J., Nelson, W. C., Kolsto, A.-B., Fraser, C. M. & Read, T. D. (2004). The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pxO1. Acedido em 07-08-2008, <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/32/3/977>.

Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Hendriksen, N. B., Phipps, R. K. & Budde, B. B. (2006). Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 5118-5121.

Tourasse, N. J., Helgason, E., Okstad, o. A., Hegna, I. K. & Kolsto, A. B. (2006). The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. Acedido em 17-06-08, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118566887/HTMLSTART>.

Van der Auwera, G. A., Timmerly, S., Hoton, F. & Mahillon, J. (2007). Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 164-172.

Vassileva, M., Torii, K., Oshimoto, M., Okamoto, A., Agata, N., Yamada, K., Hasegawa, T. & Ohta, M. (2007). A new phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1274-1277.

Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S. & Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. Acedido em 15-06-08, <http://article.pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ppv/RPViewDoc?issn=0008-4166&volume=53&issue=6&startPage=673>.

Wijnands, L. M., Dufrenne, J. B., Rombouts, F. M., Veld, P. H. i. & van Leusden, F. M. (2006). Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2587-2594.

III. Anexo I – Origem das estirpes estudadas

	Isolados Telúricos	Isolados Alimentares
J1		PHLS
J2		PHLS
J3		PHLS
J4		Arroz doce; às provas negativo ao VP e Nitrato
J5	Achete	
J6	Achete	
J7	Achete	
J8	Achete	
J9	Achete	
J10	Achete	
J11	Achete	
J12	Figueira da Foz	
J13	Figueira da Foz	
J14	Figueira da Foz	
J15	Figueira da Foz	
J16	Pocariça	
J17	Achete	
J18	Telheira	
J19	Telheira	
J20	Pocariça	
J21	Telheira	
J23	Viseu	
J24	Viseu	
J25	Achete	
J26	Achete	
J27	Achete	
J28	Achete	
J29	Achete	
J30	Achete	
J31	Achete	
J32	Achete	
J33	Achete	
J34	Achete	

J35	Achete
J36	Achete
J37	Achete
J38	Viseu
J39	Torre do Bispo
J40	Torre do Bispo
J41	Torre do Bispo
J42	Torre do Bispo
J43	Torre do Bispo
J44	Torre do Bispo
J45	Torre do Bispo
J46	Torre do Bispo
J47	Torre do Bispo
J48	Torre do Bispo
J49	Messejana
J50	Messejana
J51	Messejana
J52	Messejana
J53	Messejana
J54	Messejana
J55	Messejana
J56	Messejana
J57	Messejana
J58	Messejana
J59	Messejana
J60	Messejana
J61	Messejana
J62	Messejana
J63	Messejana
J64	Messejana
J65	Messejana
J66	Messejana
J67	Messejana
J68	Messejana
J69	Messejana
J70	Torre do Bispo

J71	Torre do Bispo	
J72	Messejana	
J73	Messejana	
J74	Póvoa do Varzim	
J75	Póvoa do Varzim	
J76	Póvoa do Varzim	
J77	Esposende	
J92	Tavira	
J211	Palmela	
J239		Salada de alface, cenoura, tomate e cebola
J240		Corvina no forno com batata cozida
J241		Gelado de morango
J242		Gelado de chocolate
J243		Bife da vazia crú
J245		Salada de alface e cebola
J246		Gelado de chocolate
J247		Gelado de baunilha
J249		PHLS
J250		Salada de alface e tomate
J251		Ração para cavalos (granulado)
J252		Ração para cavalos (granulado)
J253		Ração para cavalos (granulado)
J254		Ração para cavalos (granulado)
J255		Bacalhau espiritual
J256		Bacalhau espiritual
J257		Salada mista
J258		Salada mista
J259		Bifinhos com cogumelos e arroz
J260		Dourada grelhada com legumes
J261		Zaragatoa de placa de corte
J262		Dourada grelhada com legumes
J263		Alheira com batata, ovo e grelos salteados
J264		Aveia
J266		Coelho à caçador
J269		Gelado de morango
J270		Gelado de baunilha

J275		Farinha
Total	74	32
	106	

IV. Anexo II – Temperaturas de melting

Temperaturas de melting das estirpes J1 a J26, J44, J72, J91 e J211

<i>Estirpe</i>	<i>Pico</i>	<i>Temperatura de melting (° C)</i>	<i>Tamanho do pico (-d.RFU/dT)</i>
J1_1	B01.0	71,40	35,57
J1_1	B01.1	72,80	36,10
J1_1	B01.2	78,80	83,82
J2_1	B02.0	62,20	38,23
J2_1	B02.1	63,60	36,34
J2_1	B02.2	66,40	35,05
J2_1	B02.3	68,00	35,56
J2_1	B02.4	71,00	41,89
J2_1	B02.5	73,60	42,71
J3_1	B03.0	78,60	658,74
J4_1	B04.0	61,20	33,46
J4_1	B04.1	63,40	30,41
J4_1	B04.2	65,80	30,86
J4_1	B04.3	67,60	30,57
J4_1	B04.4	71,40	34,25
J4_1	B04.5	73,00	36,85
J4_1	B04.6	79,20	59,65
J5_1	B05.0	79,20	202,28
J6_1	B06.0	79,00	374,90
J7_1	B07.0	61,20	45,09
J7_1	B07.1	71,40	42,91
J7_1	B07.2	72,80	44,85
J7_1	B07.3	73,60	42,36
J7_1	B07.4	76,40	28,57
J7_1	B07.5	79,20	61,52
J8_1	B08.0	58,60	25,79
J8_1	B08.1	59,40	26,33
J8_1	B08.2	64,40	23,79
J8_1	B08.3	65,40	26,63
J8_1	B08.4	68,60	26,36
J8_1	B08.5	70,80	31,38
J8_1	B08.6	71,60	31,36
J8_1	B08.7	72,80	33,42
J8_1	B08.8	73,80	31,90
J8_1	B08.9	77,20	15,70
J10_1	B09.0	79,20	178,20
J11_1	B10.0	57,20	14,67
J11_1	B10.1	58,60	20,06
J11_1	B10.2	61,00	21,79

J11_1	B10.3	62,00	20,88
J11_1	B10.4	66,00	20,34
J11_1	B10.5	69,40	21,84
J11_1	B10.6	70,80	24,11
J11_1	B10.7	72,40	26,79
J11_1	B10.8	76,00	18,31
J12_1	B11.0	57,60	21,88
J12_1	B11.1	59,40	22,28
J12_1	B11.2	60,60	20,79
J12_1	B11.3	62,20	21,14
J12_1	B11.4	63,40	20,00
J12_1	B11.5	64,40	20,28
J12_1	B11.6	66,00	20,41
J12_1	B11.7	67,60	21,19
J12_1	B11.8	69,20	22,60
J12_1	B11.9	71,20	25,80
J12_1	B11.10	72,80	27,64
J12_1	B11.11	79,20	23,49
J13_1	B12.0	56,60	27,41
J13_1	B12.1	57,60	32,69
J13_1	B12.2	58,60	34,61
J13_1	B12.3	59,80	30,15
J13_1	B12.4	61,40	28,55
J13_1	B12.5	62,60	26,14
J13_1	B12.6	64,20	27,39
J13_1	B12.7	67,00	27,63
J13_1	B12.8	68,60	28,45
J13_1	B12.9	71,20	31,33
J13_1	B12.10	73,20	32,09
J13_1	B12.11	77,20	19,30
J13_1	B12.12	78,80	36,02
J14_1	D01.0	79,00	171,91
J15_1	D02.0	60,80	32,93
J15_1	D02.1	62,00	31,89
J15_1	D02.2	70,80	29,16
J15_1	D02.3	79,00	71,37
J17_1	D03.0	60,80	32,20
J17_1	D03.1	63,00	27,03
J17_1	D03.2	68,20	25,81
J17_1	D03.3	73,20	33,57
J18_1	D04.0	59,60	32,41
J18_1	D04.1	64,00	27,50
J18_1	D04.2	68,40	26,59
J18_1	D04.3	69,80	28,80
J18_1	D04.4	73,20	35,22
J19_1	D05.0	60,80	34,38

J19_1	D05.1	67,80	30,04
J19_1	D05.2	69,80	31,42
J19_1	D05.3	73,20	38,05
J21_1	D06.0	59,40	34,37
J21_1	D06.1	60,60	38,16
J21_1	D06.2	61,60	37,79
J21_1	D06.3	64,20	35,86
J21_1	D06.4	66,00	34,55
J21_1	D06.5	70,40	39,99
J21_1	D06.6	71,40	42,80
J21_1	D06.7	74,00	41,84
J21_1	D06.8	79,40	81,78
J23_1	D07.0	57,60	35,84
J23_1	D07.1	58,60	31,85
J23_1	D07.2	62,20	25,14
J23_1	D07.3	66,80	24,28
J23_1	D07.4	70,20	26,17
J23_1	D07.5	71,00	27,99
J23_1	D07.6	72,00	29,45
J23_1	D07.7	74,00	27,68
J23_1	D07.8	75,80	19,25
J24_1	D08.0	60,20	30,99
J24_1	D08.1	63,00	27,04
J24_1	D08.2	67,60	27,09
J24_1	D08.3	69,40	29,76
J24_1	D08.4	70,80	32,43
J24_1	D08.5	72,20	33,67
J24_1	D08.6	73,40	33,80
J24_1	D08.7	74,40	31,77
J24_1	D08.8	75,60	25,50
J24_1	D08.9	77,40	15,36
J25_1	D09.0	59,40	27,91
J25_1	D09.1	64,20	24,87
J25_1	D09.2	66,60	25,01
J25_1	D09.3	71,60	31,37
J25_1	D09.4	73,40	33,75
J26_1	D10.0	79,20	100,26
J44_1	D11.0	79,00	76,32
J72_1	D12.0	58,00	25,03
J72_1	D12.1	59,00	24,71
J72_1	D12.2	61,60	21,28
J72_1	D12.3	62,80	20,93
J72_1	D12.4	64,00	21,54
J72_1	D12.5	66,00	20,73
J72_1	D12.6	71,60	25,08
J72_1	D12.7	73,60	24,81

J92_1	F01.0	62,20	26,98
J92_1	F01.1	63,40	28,11
J92_1	F01.2	65,20	27,14
J92_1	F01.3	78,80	59,18
J211_1	F02.0	79,00	221,65
Positivo	G01.0	86,40	618,80
Negativo	G02.0	59,80	29,25
Negativo	G02.1	60,60	27,11
Negativo	G02.2	63,20	23,59
Negativo	G02.3	64,80	21,84
Negativo	G02.4	86,80	53,41
Branco	H01.0	63,40	1,47
Branco	H01.1	64,60	2,60
Branco	H01.2	66,00	2,22
Branco	H01.3	67,40	3,16
Branco	H01.4	68,80	1,70
Branco	H01.5	70,20	2,21
Branco	H01.6	71,60	2,31
Branco	H01.7	75,00	2,01
Branco	H01.8	93,40	1,95

Temperatura de melting das estirpes J9, J16, J20, J27-J51, J3, J5, J6, J7, J10 e J14

<i>Estirpe</i>	<i>Pico</i>	<i>Temperatura de melting (° C)</i>	<i>Tamanho do pico (-d.RFU/dT)</i>
J9	A01.0	78,80	152,61
J16	A02.0	79,40	118,88
J20	A03.0	78,20	110,61
J20	A03.1	82,00	177,68
J27	A04.0	67,80	32,88
J27	A04.1	69,80	36,71
J27	A04.2	71,00	40,36
J27	A04.3	72,00	42,10
J27	A04.4	73,80	42,72
J27	A04.5	79,60	83,50
J28	A05.0	78,60	189,54
J28	A05.1	81,80	156,52
J29	A06.0	79,00	262,95
J30	A07.0	79,00	101,03
J30	A07.1	81,80	81,08
J31	A08.0	82,20	198,48
J32	A09.0	79,60	148,04
J33	A10.0	79,40	125,96
J34	A11.0	79,40	113,30
J35	A12.0	78,80	269,31
J37	B01.0	77,80	95,11
J37	B01.1	81,80	204,71
J38	B02.0	79,20	244,26
J39	B03.0	79,20	238,13
J40	B04.0	79,20	146,01
J41	B05.0	62,00	40,48
J41	B05.1	63,40	40,44
J41	B05.2	64,80	38,23
J41	B05.3	66,40	39,11
J41	B05.4	67,40	38,88
J41	B05.5	69,60	43,09
J41	B05.6	72,60	46,55
J41	B05.7	73,80	46,01
J41	B05.8	79,40	75,51
J42	B06.0	78,40	192,44
J42	B06.1	81,80	222,96
J43	B07.0	79,40	334,92
J44	B08.0	79,40	278,40
J45	B09.0	82,40	214,59
J46	B10.0	79,20	153,68
J47	B11.0	79,00	283,21
J48	B12.0	78,80	345,12
J49	C01.0	78,80	430,64

J50	C02.0	82,00	235,91
J50	C02.1	86,60	96,17
J51	C03.0	79,20	200,12
J3	C04.0	78,60	585,30
J5	C05.0	78,80	664,84
J6	C06.0	78,80	800,44
J7	C07.0	78,80	563,09
Positivo	C10.0	87,00	886,63
Negativo	C11.0	86,80	201,28
Branco	C12.0	65,40	1,73
Branco	C12.1	67,40	1,34
Branco	C12.2	70,60	1,22
Branco	C12.3	81,80	1,71
Branco	C12.4	84,20	2,81
Branco	C12.5	88,40	1,93

Temperatura de melting das estirpes J52-J76, J77, J79, J239-J243, J245-J247, J249-J264, J266, J269, J270 e J275

<i>Estirpe</i>	<i>Pico</i>	<i>Temperatura de melting (° C)</i>	<i>Tamanho do pico (-d.RFU/dT)</i>
J52	A01.0	79,00	86,25
J53	A02.0	79,20	125,21
J54	A03.0	69,40	27,95
J54	A03.1	70,60	29,50
J54	A03.2	73,40	33,83
J54	A03.3	74,40	31,63
J54	A03.4	79,60	55,77
J55	A04.0	59,40	18,45
J55	A04.1	63,80	21,97
J55	A04.2	65,40	26,32
J55	A04.3	67,20	29,48
J55	A04.4	70,20	31,38
J55	A04.5	71,60	34,94
J55	A04.6	73,40	36,14
J55	A04.7	79,60	42,60
J56	A05.0	58,60	47,00
J56	A05.1	59,40	52,75
J56	A05.2	61,40	48,09
J56	A05.3	63,00	49,38
J56	A05.4	65,40	46,73
J56	A05.5	67,00	46,19
J56	A05.6	68,40	48,36
J56	A05.7	70,60	49,88
J56	A05.8	73,40	58,13
J56	A05.9	79,40	111,56
J57	A06.0	79,40	255,04
J58	A07.0	62,40	23,58
J58	A07.1	63,40	25,40
J58	A07.2	66,60	30,07
J58	A07.3	70,60	35,39
J58	A07.4	73,40	39,06
J58	A07.5	74,60	37,13
J58	A07.6	75,80	29,84
J58	A07.7	79,60	57,89
J59	A08.0	79,60	162,54
J60	A09.0	79,40	136,01
J61	A10.0	57,00	21,19
J61	A10.1	61,40	27,42
J61	A10.2	63,00	28,80
J61	A10.3	68,00	37,20
J61	A10.4	70,40	37,98

J61	A10.5	71,60	38,27
J61	A10.6	74,20	37,34
J61	A10.7	75,20	30,26
J61	A10.8	79,40	33,41
J62	A11.0	58,00	18,45
J62	A11.1	58,80	20,91
J62	A11.2	60,40	20,91
J62	A11.3	63,40	22,91
J62	A11.4	64,40	25,54
J62	A11.5	65,60	26,54
J62	A11.6	71,00	31,49
J62	A11.7	72,40	35,33
J62	A11.8	74,20	33,21
J63	A12.0	79,00	189,79
J64	B01.0	78,80	126,86
J65	B02.0	79,20	108,29
J66	B03.0	63,00	32,66
J66	B03.1	65,40	32,69
J66	B03.2	67,40	33,10
J66	B03.3	68,80	34,88
J66	B03.4	70,40	38,94
J66	B03.5	72,40	42,00
J66	B03.6	74,20	40,20
J66	B03.7	79,40	53,61
J67	B04.0	63,00	25,75
J67	B04.1	64,60	26,30
J67	B04.2	67,60	26,99
J67	B04.3	69,20	27,76
J67	B04.4	71,60	35,33
J67	B04.5	73,20	39,70
J68	B05.0	64,40	54,92
J68	B05.1	66,20	55,73
J68	B05.2	67,60	55,88
J68	B05.3	69,60	59,47
J68	B05.4	71,60	67,54
J68	B05.5	73,40	68,79
J68	B05.6	74,40	65,18
J68	B05.7	79,40	142,77
J69	B06.0	61,40	38,40
J69	B06.1	70,60	37,79
J69	B06.2	71,60	38,77
J69	B06.3	79,20	96,62
J70	B07.0	79,20	123,62
J71	B08.0	61,40	40,61
J71	B08.1	63,40	44,37
J71	B08.2	66,40	46,09

J71	B08.3	71,20	55,31
J71	B08.4	73,20	60,97
J71	B08.5	79,40	94,10
J72	B09.0	79,20	257,87
J73	B10.0	58,20	18,27
J73	B10.1	60,00	19,91
J73	B10.2	63,80	16,48
J73	B10.3	71,00	9,81
J74	B11.0	59,80	31,50
J74	B11.1	64,20	34,56
J74	B11.2	65,60	35,28
J74	B11.3	67,00	35,66
J74	B11.4	68,40	36,62
J74	B11.5	70,80	40,58
J74	B11.6	72,20	43,38
J74	B11.7	79,00	66,20
J75	B12.0	78,60	179,39
J76	C01.0	78,60	131,17
J77	C02.0	61,00	29,62
J77	C02.1	79,20	73,38
J79	C03.0	79,20	91,82
J275	C04.0	79,20	346,29
J239	C05.0	60,40	32,94
J239	C05.1	61,40	32,45
J239	C05.2	64,40	29,10
J239	C05.3	66,20	29,17
J239	C05.4	71,60	37,12
J239	C05.5	72,60	39,43
J239	C05.6	77,60	16,72
J240	C06.0	79,40	117,96
J241	C07.0	78,80	362,50
J242	C08.0	79,40	238,63
J243	C09.0	61,60	27,24
J243	C09.1	62,80	24,81
J243	C09.2	68,20	23,15
J243	C09.3	69,40	24,04
J243	C09.4	72,00	27,72
J243	C09.5	73,20	28,67
J245	C10.0	79,20	225,74
J246	C11.0	79,00	170,68
J247	C12.0	78,80	204,39
J249	D01.0	78,80	362,32
J250	D02.0	79,00	425,01
J251	D03.0	79,40	176,85
J252	D04.0	79,20	213,39
J253	D05.0	59,80	36,12

J253	D05.1	61,20	30,32
J253	D05.2	66,40	25,69
J253	D05.3	73,00	32,63
J254	D06.0	79,20	236,99
J255	D07.0	79,40	423,71
J256	D08.0	71,60	39,18
J256	D08.1	72,60	39,35
J256	D08.2	73,60	38,83
J256	D08.3	79,60	92,54
J257	D09.0	79,20	284,17
J258	D10.0	79,20	320,49
J259	D11.0	73,00	63,25
J259	D11.1	79,20	152,42
J260	D12.0	79,00	195,28
J261	E01.0	79,00	159,27
J262	E02.0	79,20	275,22
J263	E03.0	59,80	49,94
J263	E03.1	79,40	115,37
J264	E04.0	61,00	27,30
J264	E04.1	63,00	23,71
J264	E04.2	64,20	23,72
J264	E04.3	68,80	23,97
J264	E04.4	71,20	27,44
J264	E04.5	72,80	30,71
J264	E04.6	75,80	21,68
J266	E05.0	79,00	979,92
J269	E06.0	79,20	346,41
J270	E07.0	78,60	622,00
Positivo RNA 16S	G01.0	86,60	661,91
Positivo Cereulida	G02.0	78,40	827,68
Branco	H01.0	57,80	1,12
Branco	H01.1	60,40	1,73
Branco	H01.2	66,20	1,19
Branco	H01.3	68,80	1,43
Branco	H01.4	74,20	1,63
Branco	H01.5	77,80	1,78
Branco	H01.6	84,80	1,58
Branco	H01.7	85,80	1,86
Branco	H01.8	91,60	2,05
Negativo	H02.0	78,60	76,39