

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

***Bacillus cereus* PRODUTORES DE TOXINAS DIARRÉICAS EM
SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO: ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL E DETECÇÃO NA LINHA DE PROCESSAMENTO DE
PRATOS CÁRNEOS**

CELINA MARA SOARES
MÉDICA VETERINÁRIA

PROF. DR. ARNALDO YOSHITERU KUAYE
ORIENTADOR

PROFA. DRA. RAQUEL MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO
CO-ORIENTADORA

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS.

CAMPINAS – SP
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Soares, Celina Mara
So11b *Bacillus cereus* produtores de toxinas diarreicas em serviços
de alimentação: análise da contaminação ambiental e detecção
na linha de processamento de pratos cárneos / Celina Mara
Soares. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Co-orientador: Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.*Bacillus cereus*. 2.Toxinas. 3.Alimentação – Serviços.
4.Ambiente. 5.Carne. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II.
Azeredo, Raquel Monteiro Cordeiro de. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

cars-fea

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)

Prof. Dr. Ernani Porto
(Membro)

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(Membro)

Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano
(Membro)

Dra. Maria Helena Castro Reis Passos
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
(Membro)

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pela orientação e oportunidade.

À Profa. Dra. Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo, pela sugestão do tema e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão, pelo acompanhamento e valiosas sugestões realizadas na primeira fase do projeto.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões feitas ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano e ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pelo auxílio nas análises moleculares.

Ao colega Geórgio Freesz Valadares, pela colaboração e paciência nas análises da PCR e aos demais colegas do Laboratório de Antígenos Bacterianos II do IB, Erivaldo, Mirtes, Cláudia e Monique, pela acolhida.

Aos funcionários dos restaurantes da UNICAMP (RU e HC), pela colaboração.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Higiene, Carla, Ana Lúcia, Cíntia, Ivan, Arlete, Eduardo, Andréa, Juliane, Dirce, Maria Raquel, Da. Jacinta, Denir, Talita e Maria Sílvia, pela amizade e colaboração.

Ao meu marido, Dieter, pelo apoio.

A todos que contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO GERAL.....	xiii
SUMMARY.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL	01
Objetivos	02
CAPÍTULO I	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
Doenças de origem alimentar causadas por <i>Bacillus cereus</i>	03
<i>B. cereus</i> em alimentos e no ambiente	07
Características gerais de <i>Bacillus cereus</i>	11
<i>Propriedades dos esporos</i>	15
<i>Comportamento de Bacillus cereus em inoculações experimentais</i>	17
Toxinas produzidas por <i>Bacillus cereus</i>	19
<i>Toxina emética</i>	20
<i>Toxina diarréica</i>	22
Reação da polimerase em cadeia (PCR) para detecção de genes associados à produção de enterotoxinas por <i>Bacillus cereus</i>	25
Referências bibliográficas.....	27
CAPÍTULO II	
ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E PERFIL TOXIGÊNICO DE <i>Bacillus cereus</i> ISOLADOS EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO.....	43
Resumo.....	44
1 Introdução.....	44
2 Material e métodos.....	46
<i>Amostras ambientais (ar e de superfícies)</i>	46

<i>Isolamento, confirmação e identificação de B. cereus</i>	46
<i>Avaliação da produção de enterotoxinas através da PCR e teste ELISA</i>	47
Culturas.....	47
PCR e teste ELISA.....	47
3 Resultados.....	49
<i>Confirmação dos isolados de B. cereus</i>	49
<i>Contaminação ambiental (ar e superfícies)</i>	49
<i>Produção de enterotoxinas</i>	53
4 Discussão e conclusão.....	56
5 Referências bibliográficas.....	57

CAPÍTULO III

DIAGNÓSTICO DA CONTAMINAÇÃO DE PREPARAÇÕES CÁRNEAS POR <i>Bacillus cereus</i> , em SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO.....	61
Resumo	62
1 Introdução.....	63
2 Material e métodos.....	64
<i>Amostras ambientais</i>	65
<i>Amostras de alimentos</i>	65
<i>Contagem, isolamento, confirmação e identificação de B. cereus</i>	66
<i>Análise do potencial enterotoxigênico</i>	66
3 Resultados e discussão.....	68
<i>Análise da contaminação por B. cereus</i>	68
<i>Análise do potencial enterotoxigênico</i>	70
4 Conclusões.....	75
5 Referências bibliográficas.....	76

CAPÍTULO IV

CRESCIMENTO DE <i>Bacillus cereus</i> PRODUTORES DE ENTEROTOXINAS EM SUBSTRATO CÁRNEO A 10° E 30°C.....	81
Resumo	82
1 Introdução.....	82
2 Material e métodos.....	83

<i>Microorganismos e condições de cultivo</i>	83
<i>Suspensões de esporos</i>	84
<i>Substrato cárneo, inoculação e enumeração de B. cereus</i>	85
<i>Tempo de geração</i>	86
3 Análise estatística.....	86
4 Resultados e discussão.....	86
5 Conclusão.....	93
Referências bibliográficas.....	94
CONCLUSÃO GERAL	97
APÊNDICES	99
Apêndice A Croqui do restaurante R1.....	101
Apêndice B Croqui de restaurante R2.....	103
Apêndice C Procedimento de uso do BDE-VIA; (Tecra).....	105
Apêndice D Resultados do teste BDE-VIA (Tecra) com isolados de <i>B. cereus</i>	107
Apêndice E Contagens de <i>B. cereus</i> em amostras ambientais coletadas nos restaurantes R1 e R2 (Capítulo II).....	109
Apêndice F Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras ambientais coletadas nos restaurantes R1 e R2 (Capítulo II).....	113
Apêndice G Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras coletadas durante os processamentos de pratos cárneo (Capítulo III).....	118
Apêndice H Produtos obtidos através da PRC realizada com isolado de <i>B. cereus</i> (isolado n° 348) para a detecção dos genes codificadores dos complexos HBL e NHE.....	121
Apêndice I Produtos obtidos através da PRC realizada com isolados de <i>B. cereus</i> para a detecção do gene <i>hblD</i> (410 bp).....	123
Apêndice J Produtos obtidos através da PRC realizada com isolados de <i>B. cereus</i> para a detecção do gene <i>hblC</i> (730 bp).....	125
Apêndice K Produtos obtidos através da PRC realizada com isolados de <i>B. cereus</i> para a detecção do gene <i>nheA</i> (479 bp).....	127

Apêndice L Produtos obtidos através da PRC realizada com isolados de <i>B. cereus</i> para a detecção do gene <i>nheB</i> (753 bp).....	129
Apêndice M Produtos obtidos através da PRC realizada com isolados de <i>B. cereus</i> para a detecção do gene <i>nheC</i> (563 bp).....	129
Apêndice N Contagens de <i>B. cereus</i> em substrato (Capítulo IV)	131
Apêndice O Vista geral do restaurante R1.....	133
Apêndice P Vista geral do restaurante R2.....	135

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO I

Quadro 1 Características diferenciais das espécies de <i>Bacillus</i> spp. pertencentes ao Grupo I A.....	14
---	----

CAPÍTULO II

Quadro 1 Genes e <i>primers</i> utilizados na PCR para a caracterização enterotoxigênica de isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras ambientais.....	49
Tabela 1 <i>B. cereus</i> em amostras ambientais do restaurante R1, segundo o tipo de amostra e local de coleta.....	51
Tabela 2 <i>B. cereus</i> em amostras ambientais do restaurante R2, segundo o tipo de amostra e local de coleta.....	52
Tabela 3 Perfil toxigênico dos isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras ambientais coletadas nos restaurantes R1 e R2.....	54

CAPÍTULO III

Tabela 1 Contaminação e potencial enterotoxigênico de <i>B. cereus</i> na linha de processamento de carne assada.....	72
Tabela 2 Contaminação e potencial enterotoxigênico de <i>B. cereus</i> na linha de processamento de bife rolê.....	74
Quadro 1 <i>Primers</i> utilizados na PCR para a caracterização enterotoxigênica de isolados de <i>B. cereus</i> , provenientes de amostras coletadas durante os processamentos de carne assada e bife rolê.....	75

CAPÍTULO IV

Tabela 1 Tempo de geração (<i>g</i>) em horas, para <i>B. cereus</i> em substrato cárneo mantido a 10° e 30°C.....	93
--	----

APÊNDICES

Tabela E1 Contagens de <i>B. cereus</i> em amostras de ar ambiente do restaurante R1, segundo o local de coleta.....	109
--	-----

Tabela E2 Contagens de <i>B. cereus</i> em amostras de ar ambiente do restaurante R2, segundo o local de coleta.....	110
Tabela E3 Contagens de <i>B. cereus</i> em amostras de superfícies de bancadas dos restaurantes R1 e R2, segundo o local de coleta.....	111
Tabela E4 <i>B. cereus</i> em amostras de superfícies de equipamentos dos restaurantes R1 e R2, segundo o local de coleta.....	112
Tabela F1 Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras de ar do restaurante R1.....	113
Tabela F2 Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras de superfícies do restaurante R1.....	115
Tabela F3 Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras de ar do restaurante R2.....	116
Tabela F4 Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras de superfícies do restaurante R2.....	117
Tabela G1 Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras coletadas durante o processamento de carne assada	118
Tabela G2 Resultados da PCR e do BDE-VIA (Tecra) para isolados de <i>B. cereus</i> provenientes de amostras coletadas durante o processamento de bife rolê	120
Tabela N1 Contagens de <i>B. cereus</i> (UFC/g) em substrato cárneo mantido a 30°C.....	131
Tabela N2 Contagens de <i>B. cereus</i> (UFC/g) em substrato cárneo mantido a 10°C.....	132

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO IV

Figura 1 Crescimento de <i>B. cereus</i> em substrato cárneo a 30°C.....	89
Figura 2 Crescimento de <i>B. cereus</i> em substrato cárneo a 10°C.....	91

RESUMO GERAL

Amostras ambientais e de alimentos foram coletadas em dois restaurantes institucionais da cidade de Campinas/SP para a investigação das fontes de contaminação por *Bacillus cereus* e caracterização do perfil enterotoxigênico dos isolados. A pesquisa foi realizada em três etapas: i) análise da contaminação ambiental geral; ii) diagnóstico da contaminação durante processamentos de pratos cárneos e; iii) estudo do comportamento do microrganismo em substrato cárneo mantido a 10 e 30°C. A avaliação da contaminação ambiental geral e durante os processamentos revelou a presença do microrganismo em 80 (74,8%) das 107 amostras de ar ambiente (2,0 a 38,4 UFC/m³) e em 58 (46,4%) das 125 amostras de superfícies de bancadas e de equipamentos analisadas. O microrganismo também foi identificado em amostras de carne processada (10² UFC/g a 2,4x10³ UFC/g) e de condimentos e temperos (1,0x10 a 5,0x10² UFC/g) coletadas durante os processamentos. A produção de enterotoxinas foi investigada através da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) para os genes *hblA*, *hblD* e *hblC* (codificadores da "hemolisina BL" - HBL) e para os genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (codificadores da "enterotoxina não hemolítica" - NHE). Do total de 124 isolados, 117 (94,3%) foram positivos para ao menos um dos genes pesquisados; 18 (14,5%) foram positivos para os três genes codificadores da HBL; 25 (20,2%) foram positivos para os três genes codificadores da NHE; e 7 (5,6%) foram positivos para todos os genes. Um teste imunoenzimático de detecção da NHE (kit BDE-VIA: *Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay*; Tecra) também foi utilizado. Os resultados obtidos com o BDE-VIA revelaram que 89 (71,8%) dos 124 isolados são produtores de NHE. *B. cereus* apresentou rápido crescimento em substrato cárneo mantido a 30°C, com tempo de geração entre 28,8 e 36,0 min, indicando que a carne exposta a temperaturas abusivas é propícia ao desenvolvimento do microrganismo. A 10°C, o tempo de geração oscilou entre 10,16 e 28,38 h. A presença de cepas potencialmente enterotoxigênicas observadas em amostras ambientais atestam a importância do ambiente como fonte de contaminação pelo microrganismo. Os resultados da pesquisa permitem concluir que, tanto o controle do microrganismo no ambiente de serviços de alimentação como o adequado processamento dos alimentos, são fundamentais para a redução do risco de doenças de origem alimentar associadas a *B. cereus*.

SUMMARY

Environmental and food samples were collected in two food services in the city of Campinas/SP for investigation of *Bacillus cereus* contamination sources and characterization of strains toxin profiles. The research has been made in three steps: i) analysis of general environmental contamination; ii) diagnosis of contamination during processing cooked meat; and iii) study of microorganism behavior in meat substrate stored at inappropriate temperatures. The results indicated the presence of microorganism in 80 (74.8%) of the 107 environmental air samples (2.0 to 38.4 CFU/m³) and in 58 (46.4%) of the 125 samples of equipments and benches surfaces. The microorganism also was identified in cooked meat samples (10² CFU/g to 2.4x10³ CFU/g) and in spices samples (1.0x10² CFU/g to 5.0x10² CFU/g), collected during the processing. The potential of enterotoxin production was investigated using polymerase chain reaction (PCR) methods for genes *hblA*, *hblD* e *hblC* (encoding hemolysin BL) and for genes *nheA*, *nheB* and *nheC* (encoding non-hemolytic enterotoxin - NHE). From all the 124 strains, 117 (94.3%) were positive for at least one gene; 16 (12.9%) were positive for the three HBL encoding genes; 25 (20.2%) were positive for the three NHE encoding genes; and 7 (5.6%) were positive for all genes. The *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay (BDE-VIA; Tecra) also was used for NHE detection. The results obtained with BDE-VIA revealed that 89 (71.8%) from the 124 strains are NHE producers. *B. cereus* cells showed fast growth in meat substrate stored at 30°C with generation time between 28.8 and 36.0 min, indicating that meat stored at inadequate temperatures is propitious to the microorganism development. At 10°C, the generation time varied between 10.16 and 28.38 h. The presence of potentially enterotoxigenic strains in the environmental samples confirm the importance of environment as a source of microorganism contamination. The results allow to conclude that either the control of microorganism in food services environment either the proper food processing are fundamental to reduce the risks of foodborne diseases associated to *B. cereus*.

INTRODUÇÃO GERAL

Bacillus cereus é uma bactéria Gram positiva capaz de produzir toxinas responsáveis por doenças de origem alimentar, caracterizadas por quadros clínicos diarreicos e eméticos (Kramer; Gilbert, 1989). Este microrganismo formador de esporos está amplamente distribuído no ambiente e pode ser isolado também em grande variedade de alimentos, processados ou não. Segundo pesquisadores, as doenças alimentares causadas por esta bactéria resultam do consumo de alimentos contendo mais que 10^5 células viáveis de *B. cereus*/g ou ml (Gilbert, 1979; Goepfert *et al.*, 1972; Kramer; Gilbert, 1989). Diversos tipos de alimentos têm sido relacionados às doenças alimentares atribuídas ao microrganismo (Bennet; Belay, 2001). Entretanto, surtos diarreicos são freqüentemente relacionados ao consumo de alimentos ricos em proteínas, como carnes e pescado (Valero *et al.*, 2002).

Ao contrário do que ocorre com as células vegetativas, os esporos produzidos pela bactéria são resistentes às condições ambientais adversas. Estas características, aliadas às propriedades gerais do microrganismo, dificultam a eliminação e a redução de sua presença no ambiente e, conseqüentemente, contribuem para a sua ocorrência e persistência nos alimentos e no ambiente de estabelecimentos e cozinhas industriais (Andersson *et al.*, 1995; Kotiranta *et al.*, 2000).

Em serviços de alimentação, algumas atividades (tais como: a utilização de grande variedade de ingredientes, o treinamento deficiente dos manipuladores, o *lay out* inadequado, as preparações de grandes quantidades de alimentos, entre outras) contribuem para o aumento dos riscos de contaminação dos alimentos.

Os principais fatores que contribuem para a veiculação de *B. cereus* em alimentos associados às doenças alimentares são o resfriamento inadequado após o tratamento térmico e a estocagem em temperaturas inadequadas (Harmon; Kautter, 1991; Nortjé *et al.*, 1999).

Em estabelecimentos onde alimentos são processados, a identificação das principais fontes de *B. cereus* pode contribuir para minimizar o risco potencial de contaminação dos alimentos e de veiculação do microrganismo ou de suas toxinas. No presente estudo faz-se a avaliação da contaminação por *B. cereus* no ambiente geral e durante as operações de preparo de alimentos, em dois restaurantes institucionais. A caracterização enterotoxigênica dos isolados e a posterior avaliação do desenvolvimento do microrganismo em substrato cárneo efetuadas neste trabalho constituem instrumentos para o esclarecimento da importância da carne e de seus produtos nos surtos diarreicos associados a *B. cereus*.

Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- a) avaliar a contaminação ambiental por *B. cereus*, em diferentes áreas de produção de refeições e, em particular, ao longo da linha de processamento de pratos cárneos, em restaurantes institucionais;
- b) avaliar a capacidade dos isolados de *B. cereus* para produzir toxinas diarreicas (enterotoxinas);
- c) caracterizar os isolados de *B. cereus* quanto ao potencial enterotoxigênico; e
- d) avaliar o crescimento de *B. cereus* produtor de enterotoxinas em substrato cárneo mantido em temperaturas abusivas.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Doenças de origem alimentar causadas por *Bacillus cereus*

B. cereus é freqüentemente associado a doenças de origem alimentar. Nos últimos anos, os surtos relacionados ao microrganismo têm adquirido maior importância, sobretudo em países industrializados (Kotiranta *et al.*, 2000; Borge, *et al.*, 2001). Esse microrganismo foi reconhecido pela primeira vez como agente causador de doença de origem alimentar em 1949, ocasião em que Hauge isolou a bactéria em creme de baunilha associado a um surto diarréico ocorrido num hospital em Oslo, Noruega (Hauge, 1950; 1955 *apud* Granum; Baird-Parker, 2000). Na década de 1970, ou seja, mais de vinte anos depois desse episódio, o microrganismo foi associado a um surto emético ocorrido na Inglaterra, que afetou um grupo de trabalhadores após terem consumido arroz com elevadas contagens de *B. cereus* (Mortimer; McCann, 1974).

As doenças alimentares relacionadas a *B. cereus* manifestam-se, classicamente, sob duas formas clínicas: a síndrome diarréica e a síndrome emética (Kramer; Gilbert, 1989). Os principais sintomas da síndrome diarréica são diarreia intensa e dores abdominais, raramente ocorrendo náuseas ou vômitos. A duração da doença é de 12 a 24 h e o período de incubação varia entre 8 a 16 h (Granum, 1994). Os alimentos associados aos surtos diarréicos por *B. cereus* incluem, freqüentemente, alimentos ricos em proteínas (Valero *et al.*, 2002), com contagens entre 10^5 e 10^7 células ou esporos/g ou ml (Granum; Lund, 1997). Entretanto, há relatos de alimentos implicados em surtos com contagens menores (Becker *et al.*, 1994).

Acredita-se que as enterotoxinas responsáveis pela síndrome diarréica sejam produzidas durante o crescimento das células vegetativas no intestino delgado do indivíduo, após a ingestão de células bacterianas ou de esporos (Granum *et al.* 1993b; Andersson *et al.*, 1995; Baker; Griffiths, 1995; Granum, 1997).

A síndrome emética é uma intoxicação alimentar caracterizada por um período de incubação de 1 a 5 h, seguido por vômitos e náuseas, com 6 a 24 h de duração. Esta síndrome está predominantemente associada ao consumo de alimentos amiláceos, nos quais a toxina emética (cereulídeo) encontra-se pré-formada (Minnaard *et al.*, 2001). Em alimentos implicados em doença do tipo emética por *B. cereus*, a toxina foi detectada em concentrações de 0,01 a 1,28 µg/g (Agata *et al.*, 2002).

Geralmente, tanto o quadro emético como a diarréico apresentam baixa gravidade, com resolução em 24 h, não necessitando de cuidados médicos. Entretanto, formas mais severas foram reportadas, incluindo os casos de uma morte após a ingestão de alimento contaminado com elevados teores de toxina emética e outras três mortes causadas por enterotoxina necrótica (Mahler *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 2000).

A forma diarréica mais severa pode ser caracterizada por um período de incubação mais longo com duração superior a uma semana e dose infectante menor (dose total de 10^4 - 10^5 células). Esse quadro seria decorrente da adesão de células vegetativas ou de esporos de *B. cereus* às células epiteliais do intestino delgado, seguida da germinação (no caso de esporos), crescimento e produção de enterotoxinas *in situ* (Andersson *et al.*, 1998; Kotiranta *et al.*, 2000).

A possibilidade de produção de toxina emética e diarréica por uma mesma cepa bacteriana tem sido considerada. A suspeita baseia-se na ocorrência, concomitante, de quadros clínicos característicos de ambas as síndromes em alguns indivíduos acometidos por doença alimentar causada por *B. cereus*.

Recentemente, Pirhonen *et al.* (2005) estudaram isolados do microrganismo provenientes de um alimento implicado em enfermidade severa, quando as vítimas (duas pessoas) apresentaram emese e diarreia concomitantes. A partir dos resultados obtidos em análises laboratoriais, os autores identificaram no alimento tanto cepas produtoras de toxina emética como outras, produtoras de toxina diarreica, revelando a existência de diversidade bioquímica e de produção de toxinas por *B. cereus*, em um mesmo alimento. Estes resultados corroboram o trabalho realizado por Agata *et al.* (1996), que mostraram que os sintomas eméticos são causados por uma classe específica de *B. cereus*.

De modo geral, o tipo de doença alimentar associada ao microrganismo está relacionado aos hábitos alimentares da população. A síndrome diarreica tem sido reportada com maior frequência em países como a Hungria, Finlândia, Bulgária e Noruega. A síndrome emética é mais comum em países onde o consumo de arroz é acentuado, como no Japão, Índia, Coreia e Tailândia (Kramer; Gilbert, 1989).

Segundo Kramer e Gilbert (1989), *B. cereus* é responsável por 1 a 25% do total de surtos de doenças de origem alimentar que ocorrem no mundo, entre os de etiologia conhecida. Esses pesquisadores relatam que, entre os anos de 1973 e 1985, *B. cereus* foi responsável por 17,8% do total de surtos alimentares registrados na Finlândia, 11,5% na Holanda, 0,8% na Escócia, 0,7% na Inglaterra e País de Gales, 2,2% no Canadá e 0,7% no Japão.

B. cereus foi responsável por 14,9% dos 74 surtos causados por bactérias registrados pelo Departamento de Saúde de Taiwan no ano de 1994 (Pan *et al.*, 1996). Entre 1992 e 1996, dos 530 surtos de doenças de origem alimentar ocorridos na Inglaterra e País de Gales, 4,2% foram atribuídos a espécies do gênero *Bacillus*. Entre os fatores que mais contribuíram para a ocorrência dos surtos, pode-se citar a exposição do alimento a temperaturas abusivas, a manipulação inadequada, o consumo de alimentos crus e as condições ambientais de higiene inadequadas (Panisello *et al.*, 2000). O'Brien *et al.* (2002) relataram que *B. cereus* esteve implicado em

aproximadamente 3% dos 1.426 surtos reportados no Reino Unido, entre 1992 e 1999.

No Brasil, em investigação sobre os surtos ocorridos no período de 1987 a 1993 no município de Campinas/SP, Passos e Kuaye (1996) relataram que, dos 19 surtos com comprovação laboratorial, 68,4% foram causados por *B. cereus*. Reis e Faria (1998) apontaram o microrganismo como responsável por 7% dos surtos comprovados, dentre os ocorridos no Distrito Federal entre os anos de 1994 e 1997. Em outro estudo, *B. cereus* foi apontado como responsável por 3,5% dos surtos alimentares ocorridos em Minas Gerais no período entre 1991 e 1998 (Martins-Vieira *et al.*, 1998), quadro semelhante ao descrito por Camargo *et al.* (1998), onde o microrganismo foi responsável por 4,3% dos surtos ocorridos no estado do Paraná, entre os anos de 1978 e 1997.

Mais recentemente, em estudo realizado por Câmara (2002), foi relatado que de 39 surtos confirmados laboratorialmente, ocorridos no Estado do Mato Grosso do Sul, no período compreendido entre 1998 e 2001, 10,3% foram associados a *B. cereus*. Pires *et al.* (2002), detectaram o microrganismo em 19,2% das amostras de alimentos associadas a surtos alimentares ocorridos com trabalhadores de indústrias localizadas na Região Metropolitana de Recife/PE, entre 1998 e 2001.

Embora os relatos sobre a ocorrência de surtos associados ao microrganismo sejam realizados em todo o mundo, o número real das doenças de origem alimentar causadas por *B. cereus* é desconhecido. Para isso contribui o fato de que, além de as doenças por *B. cereus* não serem de notificação obrigatória, os quadros diarréico e emético associados ao microrganismo podem ser atribuídos a outros patógenos veiculados por alimentos, capazes de determinar quadros clínicos semelhantes. A síndrome diarréica é muito semelhante à infecção alimentar produzida por *Clostridium perfringens* e o tipo emético pode ser confundido com a intoxicação estafilocócica (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Outro aspecto que deve ser considerado está relacionado ao diagnóstico das enfermidades. Nos surtos com suspeita por *B. cereus*, as análises

laboratoriais de rotina investigam somente a detecção da toxina diarréica. A ausência de métodos comerciais para a detecção da toxina emética contribui para uma provável subestimação do número de surtos alimentares por *B. cereus* (Pirhonen *et al.*, 2005).

***Bacillus cereus* em alimentos e no ambiente**

A contaminação por *B. cereus* pode ocorrer durante todas as etapas de produção dos alimentos, seja durante o processamento, manipulação, estocagem, distribuição ou comercialização. Em condições favoráveis, células vegetativas do microrganismo podem iniciar o processo de multiplicação e, no caso dos esporos, pode haver a persistência das estruturas ou sua germinação nos alimentos (Goepfert *et al.*, 1972; Bennet *et al.*, 1993; Shinagawa, 1993; Dufrenne *et al.*, 1994).

Inúmeros pesquisadores têm relatado a presença de *B. cereus* em diferentes tipos de alimentos, tais como: leite e derivados, carnes, arroz e alimentos desidratados. Nos últimos anos, têm-se destacado as pesquisas sobre a contaminação por *B. cereus* em alimentos prontos para o consumo e em vegetais minimamente processados (Choma *et al.*, 2000; Del Torre *et al.*, 2001; Sarrías *et al.*, 2002).

Em pesquisa realizada com alimentos prontos para o consumo, comercializados em Taiwan, *B. cereus* foi encontrado em 49,8% das amostras analisadas, sendo que destas, 1,3% apresentavam contagens superiores a 10^5 UFC/g (Fang *et al.*, 2003). No Brasil, Pires *et al.* (2002) detectaram o microrganismo em 19,2% das amostras de alimentos prontos para o consumo (bobó de camarão, panqueca de carne, batata *sauté*, frango e carne bovina cozida) envolvidos em surtos por *B. cereus*, ocorridos em Recife/PE. Em recente estudo com alimentos prontos para o consumo, comercializados por vendedores ambulantes da cidade de São Paulo/SP, Hanashiro *et al.* (2004) confirmaram a

presença de *B. cereus* em 12,5% das amostras, com contagens compreendidas entre $1,4 \times 10^3$ e $1,7 \times 10^4$ UFC/g de alimento.

Em pesquisa sobre a contaminação de vegetais frescos, *B. cereus* foi detectado na maioria das amostras de pepinos e de tomates analisadas (100 e 90%, respectivamente) (Valero *et al.*, 2002). Os autores da pesquisa concluíram que as contagens observadas em alguns dos vegetais (10^2 a $7,8 \times 10^3$ UFC/g) podem indicar risco para os consumidores. No Brasil, esse grupo de alimentos foi alvo de estudo realizado por Rosa *et al.* (2001), quando analisaram hortaliças minimamente processadas comercializadas em supermercados de Belo Horizonte/MG e de Campinas/SP. Os pesquisadores detectaram *B. cereus* em 33,3% das amostras.

Sobre a contaminação de arroz, alguns estudos foram realizados no país. Em estudo desenvolvido por Azeredo (1998), investigaram-se amostras de três tipos de arroz adquiridos na cidade de Viçosa/MG. Foram observados índices de contaminação de 50, 10 e 100% em amostras de arroz polido, parbolizado e integral, respectivamente. Em pesquisa realizada em restaurantes do tipo *self-service* de Campinas/SP, Vallim (1999) observou a contaminação por *B. cereus* em 19% das amostras de arroz cozido analisadas.

No Brasil, pesquisas relacionadas à contaminação da água de coco por *B. cereus* têm sido realizadas. A qualidade microbiológica de água de coco comercializada por vendedores ambulantes em Salvador/BA foi avaliada. As contagens de *B. cereus* foram de até $1,62 \times 10^5$ UFC/ml (Leite *et al.*, 2000). Em outro estudo com água de coco vendida por ambulantes no interior do Estado de São Paulo, Hoffmann *et al.* (2002) encontraram a bactéria em níveis menores de contaminação: até 10 UFC/ml.

A contaminação de condimentos pelo microrganismo é relatada com frequência por pesquisadores. Pereira *et al.* (1999) observaram a bactéria em amostras de condimentos preparados (compostos de sal, alho, noz-moscada, cravo, coentro, orégano, pimenta em pó e em pasta) utilizados em embutido

cárneo (mortadela). Recentemente, Froehlich e Giombelli (2002) analisaram amostras de pimenta-do-reino moída, coletadas em estabelecimentos comerciais de Viçosa/MG e São Paulo/SP e, segundo os pesquisadores, em 85% das amostras constatou-se a presença de *B. cereus* (contagens de até $1,9 \times 10^8$ UFC/g). Souza *et al.* (2002) pesquisaram amostras de canela, colorífico, cominho e pimenta-do-reino, comercializados em supermercados e feiras livres em Recife/PE. Os autores relataram que o microrganismo foi detectado em 16,7% das amostras analisadas.

Em leite e derivados, os estudos sobre a ocorrência do microrganismo têm adquirido importância devido ao isolamento de cepas psicrófilas produtoras de toxinas e às propriedades de adesão e termoresistência dos esporos (Christiansson *et al.*, 1989; Van Netten *et al.*, 1990; Dufrenne *et al.*, 1994; Pirttijärvi *et al.*, 1998; Svensson *et al.*, 1999). Além destes aspectos, *B. cereus* pode provocar fenômenos indesejáveis em laticínios, como a agregação da camada lipídica em leite pasteurizado (*bitty cream*) e a coagulação da caseína sem redução do pH (*sweet curdling*), ambos causados por ação das lecitinases produzidas pelo microrganismo (Andersson *et al.*, 1995).

No Brasil, Cardoso (2000) detectou o microrganismo em 48,3% das amostras de leite comercial pasteurizado (tipos A, B e C) analisadas, com contaminação na faixa de 10^2 UFC/ml. A maior ocorrência foi no leite tipo C, com 67,5% de amostras positivas. Em estudo com amostras de leite UHT integral (*ultra high temperature*) adquiridas na região de Ribeirão Preto/SP, Rezende *et al.* (2000) identificaram o grupo do *B. cereus* em 14,2% das amostras recém adquiridas e em 21,7% das amostras refrigeradas (após a permanência sob refrigeração por 48 h), com contagens de até $3,8 \times 10^4$ UFC/ml.

Alguns pesquisadores têm enfatizado a importância da presença do microrganismo ou de seus esporos em carne e produtos cárneos para a ocorrência dos surtos diarreicos (Bachhil; Jaiswal, 1988; Nortjé *et al.*, 1999; Borch; Arinder, 2002). Konuma *et al.* (1988) pesquisaram a presença e os níveis de contaminação por *B. cereus* em produtos cárneos, carne crua e aditivos.

Os resultados obtidos mostraram que 18,3 e 6,6% dos produtos cárneos e matéria-prima (carne crua), respectivamente, estavam contaminados, geralmente com níveis inferiores a 10^2 UFC/g. Com relação aos aditivos, aproximadamente 39% apresentaram contaminação, cujos valores variaram entre 10^2 e 10^4 UFC/g. Em outro estudo sobre a contaminação de carnes, Iacona *et al.* (1995) investigaram a incidência de bactérias aeróbias mesófilas e aeróbias esporuladas em carcaças e hambúrgueres de aves. Em todos os tipos de amostras foi detectada a presença de *B. cereus*. O microrganismo também foi identificado em amostras de carne de aves e embutidos (lingüiça e salame) em pesquisa realizada com produtos cárneos vendidos em supermercados da África do Sul (Nortjé *et al.*, 1999).

No Brasil, Vasconcelos e Iaria (1991) analisaram amostras de lingüiça fresca provenientes de feiras livres do município de São Paulo/SP, detectando o microrganismo em 10% das amostras. Souza *et al.* (2000) analisaram amostras de carne bovina moída *in natura* provenientes de açougues de Macapá/PA e detectaram a presença de *B. cereus* em 43,3% das amostras.

Alguns autores destacam a resistência frente à ação de antimicrobianos de *B. cereus* isolados de alimentos (Costa *et al.*, 2002; Banerjee; Sarkar, 2004).

Em relação à presença do microrganismo em ambientes onde alimentos são processados, a maior parte dos estudos realizados aborda os temas sobre a adesão de esporos e formação de biofilme em superfícies (Svensson *et al.*, 1999; Guinebretière; Nguyen-The, 2003; Guinebretière *et al.*, 2003; Jullien *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2004).

No Brasil, foram realizados alguns estudos sobre a detecção do microrganismo em bancadas que contatam alimentos. Silva Júnior (1997), em pesquisa com bancadas de cozinhas industriais de São Paulo/SP, observou a presença de espécies do grupo do *B. cereus* em 25% das amostras analisadas. Em pesquisa realizada em cozinha institucional da cidade de Viçosa/MG, Mendes *et al.* (2004) avaliaram a contaminação por *B. cereus* em superfícies de bancadas

que eventualmente entram em contato com alimento, sendo a presença do microrganismo confirmada em 27% das análises, com contagens de até 60 UFC/cm². Considerando-se as características da bactéria, os autores concluíram que a simples detecção de *B. cereus* no ambiente onde os alimentos são processados sugere que se adotem medidas para o seu controle.

Em investigação sobre um surto diarréico causado por *B. cereus* na Itália, conduzida por Ghelardi *et al.* (2002), foi relatado que, provavelmente, as fontes de contaminação do microrganismo foram algumas das bancadas que contataram o alimento associado ao surto.

Conforme os pesquisadores apontam, a contaminação de superfícies e equipamentos é variável e está relacionada à qualidade microbiana do alimento e aos programas de limpeza e sanitização empregados (Nortjé *et al.*, 1989). De modo geral, as maiores contaminações microbianas são observados nas áreas de preparo de vegetais (frutas, hortaliças e cereais) (Nascimento, 1992; Rêgo *et al.*, 1997; Mendes *et al.*, 2004).

Características gerais de *Bacillus cereus*

O gênero *Bacillus*, ao qual a espécie *B. cereus* pertence, é taxonomicamente complexo. Este gênero possui espécies mesófilas, que crescem em temperaturas ótimas entre 30 e 45°C e espécies termófilas, capazes de crescer em temperaturas maiores que 65°C, mas não a 45°C (Granum; Baird-Parker, 2000).

A divisão do gênero *Bacillus* em três grupos (Grupos I, II e III) foi proposta por Smith *et al.* (1946; 1952) citados por Goepffert *et al.* (1972) e Harmon (1992). Os critérios utilizados nesta divisão basearam-se nas características morfológicas dos esporos e esporângios produzidos pelas bactérias. As espécies de *Bacillus* causadoras de doenças de origem alimentar, incluindo *B. cereus*, pertencem ao Grupo I. Estas espécies caracterizam-se pela capacidade de formar esporos elipsoidais ou cilíndricos, geralmente, sem distensão dos esporângios.

Além destas características, a maioria dos membros do Grupo I apresenta capacidade de crescimento aeróbio e anaeróbio (Granum; Baird-Parker, 2000).

Posteriormente, o Grupo I foi subdividido de acordo com as dimensões das células vegetativas. As espécies do Grupo I A possuem células com diâmetro maior que 0,9 μm e são produtoras de glóbulos lipídicos. As espécies pertencentes a este grupo incluem *B. cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* e *Bacillus thuringiensis*. O Grupo I B contém espécies com células menores que 0,9 μm , não produtoras de glóbulos lipídicos. Este grupo é formado pelas espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis* e *Bacillus coagulans* (Gordon, 1973; Granum; Baird-Parker, 2000).

Conforme a décima edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994), a espécie *B. cereus* é descrita como um bastonete longo, Gram positivo, formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase positivo, além de possuir motilidade por meio de flagelos peritríquios.

De modo geral, cepas típicas de *B. cereus* são mesófilas, multiplicando-se a temperaturas entre 10 e 48°C, com faixa ótima situada entre 28 e 35°C (Gilbert, 1979); desenvolvem-se em alimentos com atividade de água igual ou superior a 0,95 (Raevuori; Genigeorgis, 1975; Bryan *et al.*, 1981) e multiplicam-se na faixa de pH entre 4,3 a 9,3 (Kim; Goepfert, 1971).

Nos últimos anos, pesquisadores têm constatado a existência de cepas de *B. cereus* psicrotróficas, isto é, capazes de crescer entre 4 e 7°C. A relativa frequência com que essas cepas têm sido isoladas, aliada à observação de produção de enterotoxinas a baixas temperaturas, têm despertado a atenção de estudiosos (Van Netten *et al.*, 1990; Christiansson, 1993; Granum *et al.*, 1993a; Dufrenne *et al.*, 1995; Granum, 1997; Te Giffel *et al.*, 1997; Rowan; Anderson, 1998; Cardoso, 2000). Lechner *et al.* (1998) estudaram membros mesófilos e psicrotróficos do grupo de *B. cereus* e, com base nas diferenças entre as seqüências genéticas específicas dos microrganismos, sugeriram uma nova

espécie, *Bacillus weihenstephanensis*, capaz de crescer a temperaturas entre 4 e 7°C, mas não a 43°C.

Com relação à identificação de *B. cereus*, esta pode ser realizada através de testes bioquímicos, fundamentados em propriedades comuns à maioria das cepas. Conforme esses testes, *B. cereus* possui as seguintes características: bastonete Gram positivo produtor de lecitinase, negativo para a fermentação de manitol em agar MYP (*Mannitol yolk polymyxin*), capaz de utilizar glicose anaerobiamente, redutor de nitrato a nitrito (poucas cepas são negativas), produtor de acetilmetilcarbinol, capaz de decompor L-tirosina e de crescer na presença de 0,001% de lisozima, móvel, produtor de hemólise, não produtor de cristais de endotoxina e negativo para crescimento rizóide (Bennett; Belay, 2001). Este método de identificação apresenta alguns aspectos desfavoráveis, devido às reações distintas que algumas cepas podem apresentar e à forte similaridade entre as espécies pertencentes ao grupo do *B. cereus* (D'aubert *et al.*, 1980; Priest, 1981; 1993; Rhodhamel; Harmon, 1998; Bennett; Belay, 2001). Apesar das limitações, os testes bioquímicos são amplamente utilizados para a identificação do microrganismo.

Alguns estudos sugerem que *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* devam ser considerados como subespécies de uma mesma espécie (Ash *et al.*, 1991; Ash; Collins, 1992; Carlson; Koldto, 1994). Geralmente, essas espécies apresentam forte similaridade, sendo diferenciadas por algumas características bioquímicas (Quadro 1) (Rhodhamel; Harmon, 1998; Granum; Baird-Parker, 2000; Bennett; Belay, 2001).

Recentemente, técnicas baseadas em biologia molecular têm sido desenvolvidas e aplicadas na caracterização e diferenciação de algumas espécies do Grupo I A. Dentre essas técnicas, podem-se citar: fagotipagem (Ahmed *et al.*, 1995), análise de plasmídeo (Nishikawa *et al.*, 1996), amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) (Stephan, 1996) e, reação da polimerase em cadeia (PCR) (Martar *et al.*, 1996). Essas técnicas constituem instrumentos relevantes para os estudos de *B. cereus* e sua relação com outras espécies do grupo.

Conforme pesquisadores, as análises das seqüências primárias do gene 16S rDNA atestam grande similaridade entre as espécies pertencentes ao Grupo de *B. cereus* (Ash *et al.*, 1991; Bourque *et al.*, 1995.). Em pesquisa recente, Manzano *et al.* (2003) desenvolveram um método para diferenciar as espécies de *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*, através da técnica da reação da PCR combinada com a restrição da endonuclease. A espécie descrita por Lechner *et al.* (1998), *B. weihenstephanensis*, pode ser detectada através da PCR para o gene *csp A* (Francis *et al.*, 1998).

Quadro 1 Características diferenciais das espécies de *Bacillus* spp. pertencentes ao Grupo I A

Características	Espécies				
	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. megaterium</i>
Motilidade	+/- ^a	+/- ^a	- ^b	-	+/-
Hemólise	+	+	+ ^c	- ^b	-
Crescimento rizóide	-	-	+	-	-
Produção de cristais tóxicos	-	+	-	-	-

^a 50 a 90% das cepas são positivas

^b a maioria das cepas é negativa

^c a maioria é fracamente positiva

Propriedades dos esporos

Os esporos bacterianos são estruturas fundamentais para a manutenção e dispersão de alguns microrganismos no ambiente. Para as indústrias de alimentos, bactérias formadoras de esporos constituem um problema especial (Andersson *et al.*, 1995) e, no caso de *B. cereus*, algumas das suas propriedades contribuem para a sua presença em alimentos crus e processados. Dentre essas destacam-se a elevada resistência dos seus esporos às variações de temperatura e de pH, e aos processos de desidratação e irradiação (Goepfert *et al.*, 1972; Gilbert, 1979; Kramer; Gilbert, 1989; Kotiranta *et al.*, 2000). Além dessas características, os esporos formados por esse microrganismo possuem capacidade de adesão a variados tipos de superfícies comumente observados na linha de processamento de alimentos, como o aço inoxidável (Andersson *et al.*, 1995; Jullien *et al.*, 2003).

Comparados aos esporos de outras espécies do gênero *Bacillus*, os esporos de *B. cereus* apresentam maior hidrofobicidade (Husmark; Sik, 1990; Husmark; Rönner, 1992). Essa propriedade lhes confere uma capacidade de adesão especialmente elevada em materiais hidrofóbicos (Andersson *et al.*, 1995). Acredita-se que essas características promovam a formação de biofilmes em materiais utilizados em superfícies de equipamentos e de bancadas - como o aço inoxidável - comumente empregado pelas indústrias de alimentos e cozinhas. Outras propriedades, como a presença de longos apêndices envolvendo os esporos, podem favorecer o mecanismo de adesão (Husmark; Sik, 1990; Husmark; Rönner, 1992; Andersson *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1998).

Com relação à resistência térmica, os valores relatados na literatura para esporos de *B. cereus* variam consideravelmente, provavelmente, em função de peculiaridades das cepas e da composição dos substratos onde os experimentos são efetuados. Rajkowski e Mikolajcik (1987) encontraram valores $D_{100^{\circ}\text{C}}$ entre 0,6 e 27 min; Dufrenne *et al.* (1994) registraram variações de $D_{90^{\circ}\text{C}}$ entre 4,6 e 200 min. Esporos de cepas produtoras de toxina emética parecem apresentar maior resistência térmica quando comparados aos esporos de cepas produtoras

de enterotoxinas. Em estudo realizado por Shinagawa (1993), observou-se que os esporos de cepas eméticas não foram destruídos a 100°C por 30 min ou a 105°C por 5 min, enquanto que esporos de cepas produtoras de enterotoxinas foram inativados.

Em condições favoráveis, tanto a formação como a germinação dos esporos de *B. cereus* ocorre com relativa facilidade (Dufrenne *et al.*, 1994). Conforme Johnson *et al.* (1983) a germinação de esporos pode ocorrer em temperaturas entre 5 e 50°C.

Em laticínios, a sobrevivência dos esporos ao processo de pasteurização e concomitante eliminação da microbiota competitiva favorecem a presença do *B. cereus* (Andersson *et al.*, 1995). Para alimentos minimamente processados, o processo de ativação dos esporos pode ser relevante (Collado *et al.*, 2003).

Em condições apropriadas, o processo de ativação potencializa a germinação dos esporos bacterianos, elevando a velocidade de germinação e a proporção de esporos germinados (Biocher; Busta, 1983; Cook; Pierson, 1983). Aliada à este fenômeno, a presença de cepas psicrotróficas de *B. cereus*, capazes de crescer em baixas temperaturas (4 a 6°C) têm contribuído para a presença do microrganismo em alimentos submetidos a tratamento térmico brando, mantidos sob refrigeração (Granum *et al.*, 1993a; Collado *et al.*, 2003). A ativação dos esporos pode ser desencadeada a partir de tratamentos químicos ou físicos, entretanto, o aquecimento é o mais estudado e, provavelmente, o mais eficaz (Berg; Sandine, 1970).

Conforme apontam os pesquisadores, os esporos de algumas cepas enterotoxigênicas de *B. cereus* podem aderir às células epiteliais humanas, constituindo um mecanismo suplementar de virulência. Presume-se que o crescimento e a produção da enterotoxina *in situ* seja responsável por quadros diarreicos mais severos, quando comparados aos produzidos quando a toxina é secretada, diluída e até parcialmente degradada no intestino delgado, antes de atingir as células alvo do trato intestinal. Um surto diarreico de maior gravidade,

que afetou 17 indivíduos e teve 3 vítimas hospitalizadas, com dose infectante baixa (200 esporos/g de alimento) teria sido causado pela adesão das células vegetativas ou de esporos de *B. cereus* às células epiteliais do trato intestinal das vítimas (Andersson *et al.*, 1998).

Comportamento de *Bacillus cereus* em inoculações experimentais

Inúmeros estudos sobre o comportamento de *B. cereus*, frente às suas características de germinação e inativação de esporos, crescimento das células vegetativas e de produção de toxinas, apontam para a existência de variações entre as cepas. Estas características também podem ser influenciadas por fatores extrínsecos como temperatura, pH e composição do substrato.

Raevuori e Genigeorgis (1975) conduziram um estudo sobre os efeitos da concentração de cloreto de sódio e da variação de pH e atividade de água na capacidade de células vegetativas de *B. cereus* em iniciar crescimento em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), a 30°C. Foi verificado que, quanto maior a concentração de cloreto de sódio, variação de pH e redução da atividade de água, maior era a concentração de células inoculadas necessária para iniciar o crescimento. Os autores concluíram que os efeitos do pH e cloreto de sódio no crescimento de *B. cereus* são variáveis, segundo a cepa e o meio utilizados.

Johnson *et al.* (1983) pesquisaram a germinação e o crescimento de esporos de *B. cereus*, provenientes de cepas eméticas e diarreicas, em caldo Trypticase de Soja (TSB) e numa mistura de arroz e extrato de carne, incubados em temperaturas entre 5 e 55°C. O crescimento de algumas cepas foi observado entre 15 e 50°C e uma pequena diferença foi notada entre os resultados das cepas diarreicas e eméticas.

Em pesquisa desenvolvida por Benedict *et al.* (1993) três cepas de *B. cereus* (uma produtora de toxina emética, outra de toxina diarreica e uma cepa de referência) foram inoculadas em caldo BHI em diferentes condições de temperatura, concentrações de cloreto de sódio, pH e concentrações de nitrato de

sódio. O crescimento foi observado em todos os meios entre 8 e 42°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento. A redução do pH e o aumento das concentrações de cloreto de sódio e nitrato de sódio aumentaram a fase lag e o tempo de geração do microrganismo. Os pesquisadores concluíram que a presença de conservantes e nutrientes, o pH, a temperatura e a atividade de água são fatores capazes de influenciar tanto as taxas de crescimento quanto a produção de toxinas por cepas de *B. cereus*.

Singh e Narayan (1994) analisaram o crescimento e a produção de enterotoxina por cepas de *B. cereus* isoladas de produtos cárneos (salame e lingüiça) em caldo BHI acrescentado de glicose ou sacarose. As culturas foram incubadas a 37°C e a produção de enterotoxina foi verificada através da reação de permeabilidade vascular. O crescimento foi monitorado após diferentes períodos de incubação. Os resultados do crescimento em caldo BHI mais sacarose mostraram que a fase de crescimento exponencial foi além de 24 h, diferente dos resultados observados em caldo BHI mais glicose, que indicaram crescimento exponencial até 18 h de incubação. As reações de permeabilidade vascular foram observadas com o sobrenadante de culturas celulares obtidas após 6 h de incubação, com o máximo de reação apresentado por culturas de 18 h, correspondendo à fase de crescimento exponencial do microrganismo.

Em pesquisa com leite, Cardoso (2000) analisou amostras inoculadas experimentalmente e incubadas em diferentes temperaturas. Foi verificado que em amostras mantidas entre 20 e 30°C, as populações do microrganismo atingiram rapidamente contagens na faixa de 10^7 UFC/ml, levando à deterioração do produto no segundo dia de incubação.

A preocupação com a segurança dos alimentos minimamente processados motivou um grupo de pesquisadores a investigar o comportamento do microrganismo em legumes. No trabalho, a capacidade de crescimento de cepas de *B. cereus* produtoras de toxina diarréica foi avaliada em caldo nutriente e em caldo de cenoura. Todas as cepas testadas cresceram a 12°C ou em temperaturas superiores, com diferentes taxas de crescimento, segundo as

temperaturas de incubação. Entretanto, a acidificação do caldo de cenoura com suco de limão ou ácido cítrico (pH 5,0) provou ser eficiente na inibição do crescimento de *B. cereus* a 12°C. Os resultados levaram os autores à conclusão de que a combinação dos fatores de refrigeração e acidificação é importante no controle do crescimento do microrganismo em alimentos minimamente processados (Valero *et al.*, 2000). Em contrapartida, Del Torre *et al.* (2001) reportaram que o ácido cítrico não foi eficaz na inibição do crescimento de *B. cereus* a 8°C em *gnocchi* (prato de origem italiana) moderadamente acidificado (pH 5,0). Diante desses resultados Valero *et al.* (2003) concluíram que, embora o microrganismo seja capaz de crescer em uma ampla faixa de pH (entre 4,3 e 9,0) (Lund, 1990), o valor mínimo de pH que favorece o seu crescimento varia entre cepas e depende do acidulante utilizado.

Toxinas produzidas por *Bacillus cereus*

Além das doenças de origem alimentar, *B. cereus* pode causar algumas infecções sistêmicas e locais, como septicemia, meningite e infecções oculares (Drobniewski, 1993). Estas infecções são pouco freqüentes e, geralmente, estão associadas às hemolisinas e fosfolipases produzidas pelo microrganismo (Notermans; Batt, 1998). A toxina emética responsável pela doença alimentar do tipo emético e, principalmente, as enterotoxinas causadoras do quadro diarréico, constituem os grupos de toxinas de *B. cereus* melhor caracterizados na literatura.

Ao longo dos anos, as possíveis relações entre alguns aspectos bioquímicos das diferentes cepas de *B. cereus* e a capacidade de produção de toxina emética ou diarréica têm sido alvo de investigações. Conforme alguns estudiosos consideram, as cepas produtoras de toxina emética não produzem hemólise (ou são fracamente hemolíticas) e não hidrolizam amido, enquanto as cepas produtoras de enterotoxinas são positivas para estes testes (Agata *et al.*, 1996; Pirttijärvi *et al.*, 1999; Andersson *et al.*, 2004; Pirhonen *et al.*, 2005).

Os pesquisadores sugerem que estas características sejam consideradas para efetuar-se a diferenciação entre as cepas.

Alguns pesquisadores têm apontado que outras espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produzir toxinas, causando doenças com sintomas similares aos observados nas enfermidades de origem alimentar envolvendo *B. cereus* (Granum; Baird-Parker, 2000). Esta suspeita fundamenta-se na ocorrência esporádica de incidentes implicando *B. licheniformis* e *B. subtilis* (Kramer; Gilbert, 1989; Drobniewski, 1993; Jackson *et al.*, 1995).

Geralmente, essas espécies não são consideradas como patógenas para humanos, nem são toxigênicas (Frommer *et al.*, 1989; de Boer *et al.*, 1994). Pesquisas têm sido realizadas com diferentes métodos (PCR, aplicação de testes imunoenzimáticos com *kits* comerciais e de citotoxicidade *in vitro*) na investigação de outras espécies do gênero *Bacillus* potencialmente enterotoxigênicas (Beattie; Williams, 1999; Chaithong *et al.*, 1990; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999; McKillip, 2000; Mikkola *et al.*, 2000; Rowan *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2002; Phelps; McKillip, 2002). Entretanto, os resultados são inconclusos e não há um consenso a respeito deste tema. Em contrapartida, *B. thuringiensis* e outras espécies do Grupo I A parecem ter seu papel melhor definido quanto ao potencial toxigênico frente aos testes de detecção de enterotoxinas de *B. cereus* (Jackson *et al.*, 1995; Hsieh *et al.*, 1999; Prüss *et al.*, 1999; McKillip, 2000).

Toxina emética

A toxina emética, responsável pela doença de origem alimentar associada a *B. cereus*, é um peptídeo cíclico denominado "cereulídeo" (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃ descrito por Agata *et al.* (1994). Trata-se de uma toxina de baixo peso molecular (inferior a 1,2 kDa), estável ao aquecimento (126°C por 90 min), a variações de pH (entre 2 e 11) e ao tratamento com proteases (Kramer; Gilbert, 1989; Granum *et al.*, 1993b; Granum; Lund, 1997). A toxina emética possui propriedades hepatotóxicas e de toxicidade mitocondrial (Agata *et al.*, 1995b; Mikkola *et al.*, 1999; Hoornstra *et al.*, 2003). Na síndrome emética, o cereulídeo

liga-se ao receptor (5-HT₃) e atua na estimulação do nervo vago aferente (Agata *et al.*, 1995b), provocando quadro emético por ingestão da toxina pré-formada, com período de incubação de 1 a 5 h.

A produção da toxina emética ocorre principalmente durante a esporulação da cultura bacteriana e, provavelmente, por atividade enzimática (Christiansson *et al.*, 1989; Granum; Baird-Parker, 2000; Horwood *et al.*, 2004). Pesquisadores relatam que a produção da toxina emética parece ser sensível à temperatura e pode ser influenciada pelo tipo de alimento utilizado como substrato pela cultura (Finlay *et al.*, 2000; Agata *et al.*, 2002; Häggblom *et al.*, 2002; Jääskeläinen *et al.*, 2003).

O tamanho extremamente pequeno do cereulídeo e, conseqüentemente, sua não antigenicidade, tem gerado dificuldades para o desenvolvimento de métodos rápidos de detecção da toxina. Geralmente, os métodos utilizados para esse fim são laboriosos, inviáveis ou inadequados para aplicação em análises de rotina. Dentre esses métodos, pode-se citar os testes com alimentação de primatas e ensaios *in vitro* com células HEp-2 (Agata *et al.*, 1994b; Finlay *et al.*, 1999; McKillip, 2000; Agata *et al.*, 2002; Horwood *et al.*, 2004). Um teste alternativo, fundamentado em ensaio de motilidade espermática, foi desenvolvido por Andersson *et al.* (1998b). Neste teste foram observadas a perda de motilidade e expansão mitocondrial dos espermatozóides frente à ação do cereulídeo. A técnica requer culturas de 10 dias, as quais são expostas às células espermáticas por um período de 1 a 4 dias. Recentemente, Andersson *et al.* (2004) descreveram uma adaptação desse método: o microensaio espermático. Segundo os pesquisadores, trata-se de um método simples e rápido capaz de detectar o cereulídeo, obtendo-se resultados qualitativos (Andersson *et al.*, 2004). Em outro estudo, visando o desenvolvimento de testes rápidos, Horwood *et al.* (2004) desenvolveram um provável método para a detecção de cepas eméticas baseado em PCR.

Toxina diarréica

Atualmente, entende-se que a doença alimentar do tipo diarréica atribuída a *B. cereus* é causada por enterotoxinas liberadas no intestino, após a ingestão de alimentos contaminados com populações de aproximadamente 10^5 células viáveis/g ou ml. Na maioria dos casos, o quadro clínico é caracterizado por um período de incubação compreendido entre 8 e 16 horas, com sintomas de diarréia intensa e dores abdominais.

Vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de isolar e caracterizar com precisão as enterotoxinas; entretanto, ainda permanecem dúvidas quanto a estrutura, tamanho e número de componentes dos fatores enterotóxicos (Lund; Granum, 1996). De modo geral, as toxinas diarréicas são termolábeis, sensíveis ao tratamento térmico de 56°C/5 min. Sua produção ocorre durante a fase de crescimento exponencial, em pH entre 6,0 e 8,5 (com produção ótima entre 7,0 e 7,5) e temperatura ótima entre 18 a 43°C (Johnson, 1984).

Cinco enterotoxinas produzidas por *B. cereus* são relatadas na literatura: a hemolisina BL (HBL) (Beecher; Macmillan, 1991; Beecher *et al.*, 1995), a enterotoxina não-hemolítica (NHE) (Lund; Granum, 1996), a enterotoxina K (CytK) (Lund *et al.*, 2000), a enterotoxina FM (EntFM) (Asano *et al.*, 1997) e a enterotoxina T (BceT) (Agata *et al.*, 1995a). As três primeiras já foram identificadas em surtos, mas a maioria dos incidentes foram atribuídos às enterotoxinas complexas (HBL e NHE).

A CytK tem sido considerada como responsável por uma enfermidade semelhante à enterite necrótica causada pela β -toxina produzida por *C. perfringens* tipo C. Esta citotoxina foi isolada por Lund *et al.* (2000), a partir de um surto envolvendo 44 pessoas, ocorrido na França em 1998. *B. cereus* foi identificado como o agente causal deste surto, quando seis pacientes tiveram diarréia sanguinolenta e três vítimas vieram ao óbito. Os pesquisadores relataram que a toxina envolvida foi a CytK - uma proteína simples de 34 kDa, capaz de causar enterite necrótica. Quanto à BceT e EntFM, não há evidências da sua

importância na determinação de surtos alimentares e sua atividade citotóxica é discutida (McKillip, 2000; Choma; Granum, 2002).

O complexo HBL é formado por três componentes denominados B, L₁ e L₂ (pesos moleculares de 35, 36 e 45 kDa, respectivamente), descrito inicialmente por Beecher e MacMillan (1991). Este complexo enterotoxigênico requer os três componentes para tornar máximas as atividades hemolítica, citotóxica e dermonecrótica, a ação de permeabilidade vascular e o acúmulo de fluido em alças intestinais de coelho (Beecher *et al.*, 1995).

O complexo NHE é composto por três proteínas de pesos moleculares 39, 45 e 105 kDa e também requer todos os componentes para a sua máxima toxicidade em ensaios com células Vero (*african green monkey kidney*) e com culturas de células Caco-2 (*human intestinal epithelial cells*) (Lund; Granum, 1996).

Provavelmente, as enterotoxinas produzidas por *B. cereus* atuam estimulando o AMPc nas células intestinais e conseqüente acúmulo de fluido (Turnbull, 1976). Estudos apontam a ocorrência de lise celular (Beecher; McMillan, 1991). Entretanto, as pesquisas sobre o mecanismo de ação das enterotoxinas são escassas.

A capacidade de produção das enterotoxinas parece variar consideravelmente segundo as diferentes cepas de *B. cereus* (Kotiranta *et al.*, 2000). Frequentemente, é observada a produção de diferentes enterotoxinas por uma mesma cepa de *B. cereus*.

As enterotoxinas podem ser detectadas através de ensaios de citotoxicidade em culturas celulares, ensaios biológicos, métodos clássicos de imunoprecipitação, métodos baseados na PCR ou através de *kits* comerciais baseados em técnicas de imunoensaio, sendo estes últimos disponíveis para os complexos HBL e NHE (Kniehl *et al.*, 2003).

O kit da Oxoid (*B. cereus* Enterotoxin - Reversed Passive Latex Agglutination - BCET-RPLA) detecta o componente L₂ da HBL. O outro kit, o *Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay* (BDE-VIA) da Tecra (*Bioenterprises* Pty. Ltd., Roseville, NSW, Austrália) utiliza o teste de ELISA (ensaio imunoadsorvente enzima-associado) e detecta principalmente a proteína de peso molecular 45kDa da NHE (Beecher e Wong, 1994; Lund; Granum, 1996; 1997). Estes kits são amplamente utilizados em pesquisas de detecção das enterotoxinas complexas, devido à sua rapidez e praticidade. Muitos estudos foram realizados comparando-se os resultados de ambos os kits com os resultados de outros métodos como a PCR e os ensaios de citotoxicidade. A maioria das pesquisas confirma a eficiência dos kits (Christiansson, 1993; Granum *et al.*, 1993a; Buchanan; Schultz, 1992; Notermans; Tatini, 1993; Buchanan; Schultz, 1994; Day *et al.*, 1994; Dufrenne *et al.*, 1994; Rusul; Yaacob, 1995; Fermanian *et al.*, 1996; Andersson *et al.*, 1998a; In't Veld *et al.*, 2001).

Alguns estudos atestam a produção de enterotoxinas por cepas psicrotróficas de *B. cereus* (Christiansson *et al.*, 1989; Griffiths, 1990; Van Netten *et al.*, 1990; Meer *et al.*, 1991; Granum *et al.*, 1993a; Beuchat *et al.*, 1997; Rowan; Andersson, 1998; In't Veld *et al.*, 2001). A natureza psicrotrófica de algumas cepas, aliada à capacidade de produção de enterotoxinas, eleva o risco de doença alimentar por *B. cereus* (McKillip, 2000).

Dentre as espécies do grupo de *B. cereus* potencialmente produtoras de enterotoxinas, destaca-se também *B. thuringiensis*, comumente utilizado como bioinseticida devido à sua capacidade de produção de cristais tóxicos a algumas espécies de insetos. Conforme pesquisas indicam, essa bactéria também é capaz de produzir algumas das toxinas diarréicas associadas ao *B. cereus* (Jackson *et al.*, 1995; Damgaard *et al.*, 1996; Hsieh *et al.*, 1999; Hansen; Hendriksen, 2001).

Pesquisas recentes confirmam o potencial enterotoxigênico de *B. weihenstephanensis* através de testes de citotoxicidade e da aplicação dos kits da Tecra e Oxoid, além da detecção de genes associados à produção de enterotoxinas por PCR (Prüss *et al.*, 1999; Stenfors *et al.*, 2002).

Reação da polimerase em cadeia (PCR) para detecção de genes associados à produção de enterotoxinas por *Bacillus cereus*

A técnica da PCR tem sido utilizada para avaliar o potencial toxigênico de *B. cereus* e de outras espécies de *Bacillus* spp. As toxinas diarreicas associadas ao microrganismo são alvo freqüente destes estudos. Os genes codificadores das toxinas formadas por proteínas simples - enterotoxinas T, EntFM e CytK - foram caracterizados e seqüenciados por Agata *et al.* (1995a); Asano *et al.* (1997) e Lund *et al.* (2000), respectivamente.

Com relação às enterotoxinas complexas, o gene codificador do componente B da HBL, denominado por *hblA*, foi seqüenciado por Heinrichs *et al.* (1993), e os genes associados às frações L₁ e L₂ foram seqüenciados por Ryan *et al.* (1997) e denominados, respectivamente, *hblD* e *hblC*. Os genes que codificam as três proteínas que compõe a NHE (peso molecular 45, 39 e 105 kDa) foram seqüenciados por Granum *et al.* (1999), e denominados, respectivamente, *nheA*, *nheB* e *nheC*. A proteína codificada pelo gene *nheA* é o principal componente detectado através do *kit* BDE-VIA (Lund; Granum, 1996).

Em estudo recente desenvolvido por Borge *et al.* (2001) onze cepas de *B. cereus* provenientes de alimentos (duas delas associadas a surtos diarreicos) foram investigadas através da PCR quanto a presença dos genes que codificam os complexos HBL, NHE e enterotoxina T. Todas as cepas foram citotóxicas em ensaios biológicos (testes com células Vero) e PCR positiva para os genes codificadores da NHE. Seis cepas foram positivas para os genes codificadores da HBL e dez para a enterotoxina T. A produção de *hblD* (L₂) para as seis cepas *hbl*-positivas e de *nheA* para todas as cepas foi confirmada com métodos imunológicos (*kits* BCET-RPLA e BDE-VIA).

Alguns autores apontam a ocorrência dos genes associados às enterotoxinas em outras espécies do gênero (Hsieh *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2000; Rowan *et al.*, 2001; Phelps; McKillip, 2002). Em estudo desenvolvido com diversas espécies, incluindo *B. mycoides*, *Bacillus pasteurii* e *B. thuringiensis*, Mäntynen e Lindström

(1998) relataram resultados positivos para a presença do gene *hblA* para todas as espécies estudadas, exceto para duas espécies termofílicas.

Hansen e Hendriksen (2001) investigaram cepas de *B. cereus* e de *B. thuringiensis* quanto à presença dos genes associados a HBL e NHE. Os genes codificadores da HBL foram detectados por PCR na maioria (70,7%) das 41 cepas de *B. thuringiensis* e em metade das 22 cepas de *B. cereus* investigadas. Resultados semelhantes foram observados para os genes codificadores da NHE: 80,5% das cepas de *B. thuringiensis* e 59% das cepas de *B. cereus* foram positivas para estes genes.

A presença dos genes que codificam as enterotoxinas também foi relatada em estudos com cepas psicotróficas de *B. cereus* e com *B. weihenstephanensis* (Borge *et al.*, 2001; Stenfors; Granum, 2001; in't Veld *et al.*, 2001; Stenfors *et al.*, 2002).

Outras técnicas baseadas em biologia molecular foram utilizadas no rastreamento de *B. cereus* em linhas de processamento de alimentos (Pirttijärvi *et al.*, 1998; Svensson *et al.*, 1999; Guinebrètiere; Nguyen-The, 2003) e, de modo geral, observou-se elevada heterogeneidade entre os isolados. Essa condição também foi relatada em pesquisas sobre a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas, refletindo a diversidade dos fatores de virulência entre as cepas de *B. cereus* e em outras espécies de *Bacillus* spp. Acredita-se que a diversidade genotípica favoreça a persistência do microrganismo no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATA, N.; MORI, M.; OHTA, M.; SUWAN, S.; OHTANI, I.; ISOBE, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. **FEMS Microbiol Letters**, v. 121, n. 1, p. 31-34, aug. 1994.

AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M. Production of emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. **Current Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 67-69, jul. 1996.

AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 23-27, feb. 2002.

AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. **Microbiology Reading**, v. 141, n. 4, p. 983-988, apr. 1995a.

AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, n. 1, p. 17-20, 1995b.

AHMED, R.; SANKAR-MISTRY, P.; JACKSON, S.; ACKERMANN, H. W.; KASATIYA, S. S. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 636-640, mar. 1995.

ANDERSSON, A.; GRANUM, P. E.; RÖNNER, U. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, n. 1-2, p. 93-99, jan. 1998a.

ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 145-155, dec. 1995.

ANDERSSON, M. A.; JÄÄSKELÄINEN, E. L.; SHAHEEN, R.; PIRHONEN, T.; WIJNANDS, L. M.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. A bioassay for rapid detection of cereulide producing *Bacillus cereus* in food and related environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 175-183, jul. 2004.

- ANDERSSON, M. A.; MIKKOLA, R.; HELIN, J.; ANDERSSON, M. C.; SALKINOJA-SALONEN, M. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1338-1343, apr. 1998b.
- ASANO, S.I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUCA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, mar. 1997.
- ASH, C.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequence of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 94, n. 1-2, p. 75-80, jul. 1992.
- ASH, C.; FARROW, J. A.; DORSC, M.; STEKEBRAND, E.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16 rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 343-346, jul. 1991.
- AZEREDO, R. M. C. **Estimativa de riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus***. Campinas, 1998. 138 p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BACHHIL, V. N.; JAISWAL, T. N. *Bacillus cereus* in meats: incidence, prevalence and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 371-372, nov./dec. 1988.
- BAKER, J. M.; GRIFFITHS, M. W. Evidence for increased thermostability of *Bacillus cereus* enterotoxin in milk. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 4, p. 443-445, apr. 1995.
- BANERJEE, M.; SARKAR, P. K. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 335-342, jun. 2004.
- BEATTIE, S. B.; WILLIAMS, A. G. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, n.3, p.221-225, mar. 1999.
- BECKER, H.; SCHALLER, G; WIESE, W.; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 1-15, set. 1994.
- BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1778-1784, may 1991.

BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4423-4428, nov. 1995.

BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin immunoassay kits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4614-4616, dec. 1994.

BENEDICT, R. C.; PARTRIDGE, T.; WELLS, D.; BUCHANAN, R. L. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 3, p. 211-214, mar. 1993.

BENNETT, R. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4^o ed., Washington: APHA, 2001. Chap. 32, p. 311-316.

BENNETT, R. W.; MURTHY, G.; KAYLOR, L.; COX, S.; HARMON, S. M. Biological characterisation and serological identification of *Bacillus cereus* diarrhoeal factor. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 105-120, 1993.

BERG, R. W.; SANDINE, W. E. Activation of bacterial spores. A review. **Journal Milk Food Technology**, v.33, p.435-441. 1970.

BEUCHAT, L. R.; CLAVERO, M. R. S.; JAQUETTE, C. B. Effects of nisin and temperature on survival, growth and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p.1953-1958, may 1997.

BIOCHER, J. C. e BUSTA, F. F. Bacterial spore resistance to acid. **Food Technology**, v.37, p.87-89. 1983.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well control measures. **Meat Science**, v. 62, n. 2, p. 381-390, nov. 2002.

BORGE, G. A.; SKEIE, M.; SORHAUG, T.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P. E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 237-246, sept. 2001.

BOURQUE, S. N.; VALERO, J. R.; LAVOIE, M. C.; LEVESQUE, R. C. Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.4, p. 1623-1626, apr. 1995.

BRYAN, F. L.; BARTLESON, C. A.; CHRISTOPHERSON, N. Hazard analysis, in reference to *Bacillus cereus*, of boiled and fried rice in cantonese-style restaurants. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 7, p. 500-512, july 1981.

BUCHANAN, R. L.; SCHULTZ, F.J. Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 353-356, 1994.

BUCHANAN, R. L.; SCHULTZ, F.J. Evaluation of the OXOID BCET-RPLA kit for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin as compared to cell culture cytotoxicity. **Journal of Food Protection**, v. 55; n. 6, p. 440-443, june 1992.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado do Mato Grosso do Sul, no período de 1998-001**. Campo Grande, 2002. 79 p. Trabalho realizado para a obtenção do grau de Especialista. Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser. Disponível em: <<http://www.saudepublica.bvs.br/p/teses/MHespec5.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2003.

CAMARGO, N. J.; SOUZA, I. L.; PUZYNA, I. P.; PESTANA, A.; NERVINO, C. V.; HIROOKA, E. Y.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no estado no Paraná entre 1978 e 1997. In: V CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 1998, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia-SP, 1998. p. 67.

CARDOSO, A. L. M. P. **Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarreica por cepas mesófilas e psicrótróficas de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado**. Campinas, 2000. 95 p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CARLSON, C. R. D. A.; KOLDTO, A. B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1719-1725, june 1994.

CHAITHONG, T.; ROWAN, N. J.; HUNTER, I. S. A molecular genetic study of some pathogenicity factors associated with foodborne *Bacillus* spp. In: SGM Leeds Meeting, 1990. **Abstracts...**, 1990. p. 39.

CHOMA, C.; GRANUM, P. E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 115-119, nov. 2002.

CHOMA, C.; GUINEBRETIÈRE, M. H.; CARLIM, F.; SCHMITT, P.; VELGE, P.; GRANUM, P. E.; NGUYEN-THE, C. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n. 4, p.617-625, apr. 2000.

CHRISTIANSSON, A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: a comparison of methods for toxin detection. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 79-87, 1993.

CHRISTIANSSON, A.; NAIDA, A. S.; NILSSON, I.; WADSTRÖM, T.; PETTERSON, H. E. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolated in milk at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p.2595-2600, oct. 1989.

COLLADO, J.; FERNÁNDEZ, A.; RODRIGO, M.; CAMATS, J.; LOPEZ, A. M. Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. **Food Microbiology**, v.20, n.5, p. 545-548, oct. 2003.

COOK, F. M.; PIERSON, M. D. Inhibition of bacterial spores by antimicrobials. **Food Technology**, v.37, p.115-126. 1983.

COSTA, F. N., LIMA, R M S.; RABELO, R N. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus coagulase positivo*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92/93, p. 80-83, jan-fev. 2002.

DAMGAARD, P. H.; LARSEN, H. D.; BRESCIANI, J.; JORGENSEN, K. Enterotoxin producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 146-150, sept.1996.

D'AUBERT, S.; ABBATI, P.; CANTONI, C. Sull'intossicazione alimentare da *Bacillus cereus*. **Industrie Alimentare**, v. 19, n. 12, p. 913-926, dic.1980.

DAY, T. L.; TATINI, S. R.; NOTERMANS, S.; BENNET, R. W. A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p 9-13, 1994.

DE BOER, A. S.; PRIEST, F.; DIDERICHSEN, B. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: A review. **Applied Microbiology Biotechnol.**, v. 40, p. 595-598. 1994.

DEL TORRE, M.; DELLA CORTE, M.; STECCHINI, M. L. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. **International Journal of Food Microbiology** , v. 63, n.3, p. 199-207, feb. 2001.

DROBNIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, oct. 1993.

DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 2/3, p. 175-183, oct. 1995.

- DUFRENNE, J.; SOENTORO, P.; TATINI, S.; DAY, T.; NOTERMANS, S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 99-109, sept. 1994.
- EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 2, p. 189-195, mar. 2004.
- EVANS, J. A.; RUSSEL, S. L.; JAMES, C.; CORRY, J. E. L. Microbial contamination of food refrigeration equipament. **Journal of Food Engineering**, v.62, n. 3, p. 225-232, may 2004.
- FANG, T. J.; WEI, Q-K.; LIAO, C-W.; HUNG, M-J.; WANG, T-H. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 241-250, feb. 2003.
- FERMANIAN, C.; LAPEYRE, C.; FRÉMY, J. M.; CLAISSE, M. Production of diarrhoeal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 345-358, july 1996.
- FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, n.5, p. 385-389, nov. 2000.
- FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1811-1812, apr. 1999.
- FRANCIS, K. P.; MAYR, R.; VON STETTEN, F.; STEWART, G. S.; SCHERER, S. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.9, p. 3524-3529, sept. 1998.
- FROEHLICH, A.; GIOMBELLI, A. Ocorrência de bactérias aeróbias mesófilas e de *Bacillus cereus* em pimenta-do-reino. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 66-69, jun. 2002.
- FROMMER, W.; AGER, B.; ARCHER, L.; BRUNIUS, B.; COLLINS, C. H.; DONIKIAN, R.; FRONTALI, C. F.; HAMP, S.; HOUWINK, E. H.; KUENZI, M. T.; KRAMER, P.; LAGAST, H.; LUND, S.; MAHLER, J. L.; NORMAND-PLESSIER, F.; SARGEANT, K.; TUIJNENBURG MUIJS, G.; VRANCH, S. P.; WERNER, R. G. Safe biotecnology. III. Safety precautions for handling microorganisms of different classes. **Applied Microbiology Biotechnol.**, v.30, p.541-552. 1989.
- GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 129-134, feb. 2002.

GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: RIEMANN, H.; BRYAN, L. F., eds. **Foodborne Infections and intoxications**. 2 ed. New York: Academic Press, 1979. p. 495-518.

GOEPFERT, J. M.; SPIRA, W. M.; KIM, H. U. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 35, n. 4, p. 213-226, 1972.

GORDON, R. E. The genus *Bacillus*. In: LASKIN, A. I.; LEICHEVALIER, H. A., eds. **Handbook of Microbiology**. Cleveland: CRC Press, v. 1, 1973, p. 71-88.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 61S-66S, Symposium Supplement 1994.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L.R. MONTVILLE, T.J. (Eds.), **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 327-336.

GRANUM, P. E.; BAIRD-PARKER, T. *Bacillus* species. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. **The microbiological safety and quality of food**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. 2000. Vol. II. Chap. 39, p. 1029-1039.

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

GRANUM, P. E.; BRYNESTAD, S.; O'SULLIVAN, K.; NISSEN, H. Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterisation. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 63-70, 1993b.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, n. 2, p. 223-228, dec. 1997.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.177, n. 2, p. 225-229, aug. 1999.

GRIFFITHS, M. W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 9, p. 790-792, sep. 1990.

GUINEBRETIERE, M. H.; GIRARDIN, H.; DARGAIGNARATZ, C.; CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 1; p. 223-232, may 2003.

GUINEBRETIERE, M. H.; NGUYEN-THE, C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 2, p. 207-215, mar. 2003.

HÄGGBLUM, M. M.; APETROAIE, C.; ANDERSSON, M. A.; SALKINOJA-SALONEM, M. S. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2479-2483, may 2002.

HANASHIRO, A.; MORITA, M.; MATTE, G. R.; MATTE, M. H.; TORRES, E. A. F. S. Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of São Paulo city, Brazil. **Food Control**. In Press.
Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09567135>>. Acesso em: 09/set/04

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 185-189, jan. 2001.

HARMON, S. M. New method for differentiating members of the *Bacillus cereus* group: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, n. 5, p. 1134-1139, may 1992

HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready to serve foods. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 5, p. 372-374, may 1991.

HEIRICHS, J. H.; BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterisation of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 6760-6766, 1993.

HOFFMANN, L. F.; COELHO, A. R.; MANSOR, A. P.; TAKAHASHI, C. M.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de amostras de água de coco vendidas por ambulantes na cidade de São José de Rio Preto-SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 87-92, jun. 2002.

HOLT, J. G.; KRIG, N. R.; SNEATH, P. H.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Genus *Bacillus*. In: HOLT, J. G., editor-in-chief. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. v. II, p. 1105-1139.

HOORNSTRA, D.; ANDERSSON, M. A.; MIKKOLA, R.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. **Toxicology In Vitro**, v.17, n. 5-6, p.745-751, oct.-dec. 2003.

HORWOOD, P. F.; BURGUESS, W. G.; OAKEY, H. J. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2; p. 319-324, jul. 2004.

HSIEH, Y. M.; SHEU, S. J.; CHEN, Y. L.; TSEN, H. Y. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n.4, p. 481-490, oct. 1999.

HUSMARK, U.; RÖNNER, U. The influence of hydrophobic electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. **Biofouling**, v.5. p. 335-344, 1992.

HUSMARK, U.; SIK, U. R. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 4, p. 557-562, oct. 1990.

IACONA, V. A.; SIMONETTA, A. C.; RENZULLI, P. M. Bactérias del genero *Bacillus* en canales y hamburguesas de pollo. **Revista Argentina Microbiologia**, v. 27, n. 1, p. 21-27, jan.-mar. 1995.

IN'T VELD; P. H.; RITMEESTER, W. S.; ASCH, E. H. M. D.; DUFRENNE, J. B.; WERNARS, K.; SMIT, E.; VAN LEUSDEN, F. M. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxin by HBL blood plates and imunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 63-70, feb. 2001.

JÄÄSKELÄINEN, E.; HÄGGBLON, M. M.; ANDERSSON, M. A.; VANNE, L.; SALKINOJA-SALONEN, M. Potential of bakery products for producing cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin quantitative analysis by chemic and biological methods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 6, p. 1047-1054, jun. 2003.

JACKSON, S. G.; GOODBRAND, R. B.; AHMED, R.; KASATIYA, S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 2, p.103-105, aug. 1995.

JOHNSON, K. M. *Bacillus cereus* foodborne illness - an update. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 2, p. 145-153, feb. 1984.

JOHNSON, K. M.; NELSON, C. L.; BUSTA, F. F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and rice. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 1, p. 286-287, jan./feb. 1983.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, B.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 1, p. 77-87, jan. 2003.

KIM, H. U.; GOEPFERT, J. M. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 581-587, oct. 1971.

KNIEHL, E.; BECKER, A.; FORSTER, D. H. Pseudo-outbreak of toxigenic *Bacillus cereus* isolated from stools of three patients with diarrhoea after oral administration of a probiotic medication. **Journal of Hospital Infection**, v. 55, N. 1, p. 33-38, sept. 2003

KONUMA, H.; SHINAGAWA, K.; TOKUMARO, M.; ONOUE, Y.; KONNO, S.; FUJINO, N.; SHIGEHISA, T.; KURATA, H.; KUWABARA, Y.; LOPES, C. A. M. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat products additives. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 4, p. 324-326, apr. 1988.

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

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M. P., ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 21-69.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRÜSS, M.; KAPLAN, T.; WIEßNER-GUNKEL, E.; STEWART, G. S. A. B.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, pt. 4, p. 1373-1382, oct. 1998.

LEITE, C. C.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; SANT'ANA, M. E. B.; SANTANA, L. R. R. Avaliação microbiológica da água de coco produzida e comercializada na cidade de Salvador-BA. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 70, p. 64-66, mar. 2000.

LUND, B. M. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. **The Lancet**, v. 336, n. 8721, p. 982-986, oct. 1990.

LUND, T., DE BUYSER, M. L., GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v.38, n. 2, p.254– 261, oct. 2000.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, aug. 1996.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology Reading, England**), v. 143, pt. 4, p. 3329-3336, oct. 1997.

MAHLER, H.; PASI, A.; KRAMER, J. M.; SCHULTE, P.; SCOGING, A. C.; BÄR, W.; KRÄHENBÜHL, S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **The New England Journal of Medicine**, v.336, n. 16, p.1142-1148, apr. 1997.

MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxigenic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p.1634-1639, may 1998.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 249-254, mar. 2003.

MARTAR, G. M.; SLIEMAN, T. A.; NABBAT, N. H. Subtyping of *Bacillus cereus* by total cell protein patterns and arbitrary prime polymerase chain reaction. **European Journal of Epidemiology**, v.12, p.309-314. 1996.

MARTINS-VIEIRA, M. B. C.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M., SILVANA, M. C. C., SILVA, S. O., FERNANDES, S. H. Evolução dos surtos de toxinfecção alimentar no estado de Minas Gerais, no período entre agosto de 1991 a agosto de 1998. In: V CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 1998, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia-SP, 1998, p. 71.

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

MEER, R. R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 12, p. 969-979, dec. 1991.

MENDES, R. A.; AZEREDO, R. M. C.; COELHO, A. I. M.; OLIVEIRA, S. S.; COELHO, M. S. L. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição**, v. 7, n. 2, p. 255-261, abr/jun. 2004.

MIKKOLA, R.; KOLARI, M.; ANDERSSON, M. A.; HELIN, J.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4068-4074. 2000.

MIKKOLA, R.; SARIS, N. E.; GRIGORIEV, P. A.; ANDERSSON, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, n. 1, p.112-117, jul. 1999.

MINNAARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P. F. *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cells. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 10, p. 1535-1541, oct. 2001.

MORTIMER, P. R.; McCANN, G. Food poisoning episodes with *B. cereus* in fried rice. **Lancet**, v. 1, n. 7865, p.1043-1045, may 1974.

NASCIMENTO, D. Análise de risco e pontos críticos de controle (ARPC) de uma planta de processamento de alimentos (restaurante universitário) em Ouro Preto/MG. **Boletim da CEPPA**. v. 10, n. 2, p. 170-185, 1992.

NISHIKAWA, Y.; KRAMER, J. M.; HANOKA, H.; YASUKAWA, A. Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis and HEp-2 vacuolation factor analysis in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**. v. 31, n. 1-3, p. 149-159, aug. 1996.

NORTJÉ, G. L.; NEL, E.; JORDAN, E.; NAUDÉ, R. T.; HOLFZAFEL, W. H.; GRIMBEEK, R. J. A microbiological survey of fresh meat in the supermarket Trade. Part 1: Carcasses and contact surfaces. **Meat Science**, v. 25, p. 81-97. 1989.

NORTJÉ, G. L.; VOSTER, S. M.; GREEBE, R. P.; STEYN, P. L. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South Africa retail meats. **Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 213-217, jun. 1999.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**, Readin, v. 84, p. 51S-61S, 1998 (Supplement Symposium).

NOTERMANS, S.; TATINI, S. Characterisation of *B. cereus* in relation to toxin production. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 71-77, 1993.

O'BRIEN, S. J.; ELSON, R.; GILLESPIE, I. A.; ADAK, G. K.; COWDEN, J. M. Surveillance of foodborne outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992-1999: contributing to evidence-based food policy? **Public Health**, v. 116, p. 75-80, 2002.

PAN, T. M.; CHIOU, C. S.; HSU, S. Y.; HUANG, H. C.; WANG, T. K.; CHIU, S. I.; YEA, H. L.; LEE, C. L. Food borne disease outbreaks in Taiwan. **Journal of the Formosa Medical Association**, v. 95, n.5, p. 417-420, may 1996.

PANISELLO, P. J.; ROONEY, R.; QUANTICK, P. C.; STANWELL, S. R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n.3, p. 221-234, sept. 2000.

PASSOS, M. H. C. R.; KUAYE, A. Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovadas laboratorialmente no município de Campinas-SP, no período de 1987 a 1993. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 77-82, jan/jun. 1996.

PEDERSEN, P. B.; BJORNVAD, M. E.; RASMUSSEN, M. D.; PETERSEN, J. N. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 155-161, oct. 2002.

PEREIRA, M. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. C.; PRADO, J. C. A. Contagem, isolamento e identificação de *Bacillus cereus* em condimentos preparados, utilizados em embutido cárneo (mortadela). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 137-140, set.-dez. 1999.

PHELPS, R. J.; MCKILLIP, J. L. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3147-3151, june 2002.

PIRES, F. E.; SHINOHARA, N. K. S.; REGO, J. C.; LIMA, S. C.; STAMFORD, T. L. M. Surtos de toxinfecções alimentares em unidades de alimentação e nutrição. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 20-24, out. 2002.

PIRHONEN, T. I.; ANDERSSON, M. A.; JÄÄSKELÄINEN, E. L.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; JOHANSSON, T. M. -L. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. **Food Microbiology**, v. 22; n. 1; p. 87-91, jan. 2005. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/journal/07400020>>. Acesso em : 09 set. 04

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

PIRTTIJÄRVI, T. S. M.; ANDERSSON, M. A.; SCOGING, A. C.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food-poisoning potential among industrial and environmental contaminants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, n.1, p.133-144, feb. 1999.

PRIEST, F. G. DNA homology en the genus *Bacillus*. In: BERKELEY, R. C. W.; GOODFELLOW, M. (ed.). **The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification**. New York: Academic Press, Inc. 1981. p. 33-57.

PRIEST, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: SONESHEIN, A. L., HOCH, J. A.; LOSIK, R. (ed.). ***Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria***. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993. p. 3-16.

PRÜSS, B. M.; DIETRICH, R.; NIBLER, B.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of *the Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5436-5442, dec. 1999.

RAEVUORI, M.; GENIGEORGIS, C. Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. **Applied Microbiology**, v. 29, n.1, p. 68-73, jan. 1975.

RAJKOWSKI, K. T.; MIKOLAJCIK, E. M. Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 3, p.199-205, mar. 1987.

RÊGO J. C.; GUERRA, N. B.; PIRES, E. F. Influencia do treinamento no controle higiênico-sanitário de unidades de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição PUCCAMP**; v. 10, n. 1, p. 50-62, 1997.

REIS, J. A. P.; FARIA, N. C. Surtos de toxinfecção alimentar ocorridos no Distrito Federal no período de 1994 a 1997. **Revista Saúde Distrito Federal**, v. 9, n. 3, p. 27-31, ju.l-set. 1998.

REZENDE, N. C. M.; ROSSI JR., O. D.; AMARAL, L. A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (*ultra high temperature*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 162-166, set-dez. 2000.

RHODEHAMEL, E. J.; HARMON, S. M. *Bacillus cereus*. In: FDA. **Bacteriological Analytical Manual**. 8 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists International. 1998. Chapt. 14, p. 14.01-14.08.

RIVERA, A. M. G.; GRANUM, P. E.; PRIEST, F. G. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n.1, p. 151-155, sept. 2000.

ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P.; BEERLI, K. M.; DIONÍZIO, F. L.; RIBEIRO, A. C.; PÁDUA, L. M. Detecção de *Bacillus cereus* em hortaliças minimamente processadas. In: 6º CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80/81, p. 142, 2001.

ROWAN, N. J.; ANDERSON, G. J. Diarrhoeal enterotoxin production by psychrotrophic *Bacillus cereus* present in reconstituted milk-based infant formulate (MIF). **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 161-165, feb. 1998.

ROWAN, N. J.; DEANS, K.; ANDERSON, J. G.; GEMMELL, C. G.; HUNTER, I. S.; CHAITHONG, T. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. After growth in reconstituted infant milk formulae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3873-3881, sept. 2001.

RUSUL, G.; YAACOB, N. H. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA - VIA and BCET - RPLA. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 131-139, apr. 1995.

RYAN, P. A. ; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterisation of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2551-2556, apr. 1997.

SALKINOJA-SALONEN, M. S.; VUORIO, R.; ANDERSSON, M. A.; KÄMPFER, P.; ANDERSSON, M. C.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; SCOGING, A. C. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4637-4645, oct. 1999.

SARRÍAS, J. A.; VALERO, M.; SALMERÓN, M. C. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. **Food Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 589-595, dec. 2002.

SHINAGAWA, K. Serology and characterisation of toxigenic *Bacillus cereus*. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 89-103, 1993.

SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 2ªed. Livraria Varela, 1997, 385 p.

SINGH, D. K. ; NARAYAN, K. G. Effect of hydrogen ion concentration and sucrose on enterotoxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 338-340. 1994.

SOUZA, C. L.; JOELLE, M. R. S. P.; SILVA, E. C.; OLIVEIRA, R. I. S. R. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de carne bovina moída em açougues do município de Macapá/AP. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 72, p. 60-65, maio 2000.

SOUZA, J. C. R.; BARROS, G. C.; MEMDES, E. S.; MENDES, P. P.; ALVES, C. A. B. Perfil microbiológico de alguns condimentos mais comercializados na grande Recife-PE. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Porto Alegre/RS, 2002. **Anais**, 2002. p. 1415-1418.

STENFORS, L. P.; GRANUM, P. E. Psychotolerant species the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.197, n. 2, p.223-228, apr. 2001.

STENFORS, L. P.; MAYR, R.; SCHERER, S.; GRANUM, P. E. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 215, n. 1, p. 47-51, sept. 2002.

STEPHAN, R. Randomly amplified polymeric DNA (RAPD) assay for genomic finger printing of *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, n. 1-3, p. 311-316, aug. 1996.

SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 12, p. 903-912, dec. 1999.

TEGIFEL, M. V.; BEUMER, R. R.; GRANUM, P. E.; ROMBOUTS, F. M. Isolation and characterisation in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 307-318, mar. 1997.

TURNBULL, P. C. B. Studies on the production of enterotoxins by *Bacillus cereus*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 29, p. 941-948. 1976.

VALERO, M.; FERNÁNDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Influence of pH and temperature of *Bacillus cereus* in vegetables substrates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 71-79, apr. 2003.

VALERO, M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, L. A.; FERNÁNDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 491-499, oct. 2002.

VALERO, M.; LEONTIDIS, S.; FERNÁNDEZ, P. S.; MARTÍNEZ, A.; SALMERÓN, M. C. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 605-612, dec. 2000

VALLIM, D. B. **Detecção do grau de contaminação do arroz comercializado em restaurantes do tipo "self-service" da UNICAMP**. Campinas, 1999. p. 84. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VAN NETTEN, P.; VAN DE MOOSDIJK, A. P.; VAN HOENSEL, P.; MOSSEL, D. A. A.; PERALES, I. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal Applied Bacteriological**, v. 69, p.73-79. 1990.

VASCONCELOS, J. C.; IARIA, S. T. Condições microbiológicas (higiênico-sanitárias) das linguiças frescas comercializadas em feiras livres no município de São Paulo, SP: II - agentes etiológicos de toxinfecções alimentares. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 9, n. 2, p. 106-121, jul-dez 1991.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E PERFIL TOXIGÊNICO DE *Bacillus cereus* ISOLADOS EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

Artigo redigido segundo as normas de publicação da revista *Food Control*, para a qual será submetido para publicação.

ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E PERFIL TOXIGÊNICO DE *Bacillus cereus* ISOLADOS EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

RESUMO

A avaliação da contaminação ambiental por *Bacillus cereus* foi realizada em dois restaurantes institucionais, onde foram coletadas 90 amostras de ar ambiente e 96 amostras de superfícies de bancadas e de equipamentos. O microrganismo foi detectado em 84,4 e 44,8% das amostras de ar ambiente e de superfícies, respectivamente. Setenta isolados foram caracterizados através da PCR quanto a presença de genes que codificam as enterotoxinas HBL (*hblA*, *hblD*, *hblC*) e NHE (*nheA*, *nheB* e *nheC*). Foram identificados 35 perfis genotípicos diferentes. Dez isolados foram positivos para os três genes da HBL e 9 isolados foram positivos para os três genes da NHE. A produção de toxinas pelo complexo NHE foi verificada através do teste ELISA (*kit* BDE; Tecra) e 43 dos 70 isolados analisados foram positivos ao teste.

Palavras chave: *Bacillus cereus*, serviços de alimentação, ambiente, ar, superfícies.

1 Introdução

Bacillus cereus é um microrganismo Gram positivo amplamente distribuído na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. A presença da bactéria ou de seus esporos em alimentos é relativamente freqüente e devido a algumas propriedades dos esporos - como a sobrevivência em diferentes temperaturas e valores de pH, desidratação e irradiação e capacidade de adesão às superfícies que contatam alimentos - a indústria de alimentos encontra dificuldades para eliminar o microrganismo do ambiente industrial (Andersson *et al.*, 1995; Kotiranta *et al.*, 2000). *B. cereus* é isolado freqüentemente a partir de produtos crus e

processados, como arroz, condimentos, vegetais, carne e laticínios. O microrganismo é responsável por duas doenças transmitidas por alimentos: a síndrome emética e a síndrome diarréica (Kramer; Gilbert, 1989).

A síndrome diarréica é caracterizada por dor abdominal, diarreia e náuseas que se estendem por 12 a 24 h (Granum, 1994). Essa doença está associada a várias enterotoxinas, dentre elas, a enterotoxina hemolisina BL (HBL) e a enterotoxina não-hemolítica (NHE). Essas enterotoxinas têm sido estudadas e caracterizadas por alguns pesquisadores (Beecher; MacMillan, 1991; Heinrichs *et al.*, 1993; Lund; Granum, 1996; Ryan *et al.*, 1997; Granum *et al.*, 1999). O complexo HBL é formado por três componentes denominados B, L₁ e L₂ (pesos moleculares de 35, 36 e 45 kDa, respectivamente) (Beecher; MacMillan, 1991) e requer os três componentes para intensificar ao máximo as atividades hemolítica, citotóxica e dermonecrótica, a ação de permeabilidade vascular e o acúmulo de fluido em alças intestinais de coelho (Beecher *et al.*, 1995). O gene do componente B da HBL, denominado por *hblA*, foi seqüenciado por Heinrichs *et al.* (1993); os genes responsáveis pelas frações L₁ e L₂, foram seqüenciados por Ryan *et al.* (1997) e denominados respectivamente por *hblD* e *hblC*. O complexo NHE é composto por três proteínas de peso molecular igual a 39, 45 e 105 kDa e também requer todos os componentes para a sua máxima toxicidade em testes com células Vero (*african green monkey kidney*) e Caco-2 (*human intestinal epithelial cells*) (Lund; Granum, 1996). Os genes que codificam as três proteínas que compõem a NHE foram seqüenciados por Granum *et al.* (1999) e denominados, respectivamente, por *nheA*, *nheB* e *nheC*.

O objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação ambiental por *B. cereus* em serviços de alimentação e analisar o perfil toxigênico dos isolados, considerando-se os complexos HBL e NHE. A pesquisa foi realizada em dois restaurantes institucionais, através da análise de amostras do ar ambiente e de superfícies de bancadas e equipamentos.

2 Material e métodos

Amostras ambientais (ar e de superfícies)

Amostras ambientais foram coletadas em dois restaurantes institucionais - restaurante 1 (R1), que prepara cerca de 6 mil refeições diárias, e restaurante 2 (R2), onde são preparadas cerca de 2 mil refeições diárias. A coleta das amostras foi realizada conforme metodologia preconizada pela *American Public Health Association* (APHA, 2001).

Amostras de ar ambiente (500 l) foram aspiradas por 5 min para placas de Petri contendo meio seletivo para *B. cereus* - ágar MYP (*Mannitol yolk polymixin agar*; Difco) suplementado com 0,1% de Sulfato de Polimixina B (Sigma). As coletas foram realizadas através do equipamento *Microbiological Air Sampler* (MAS 100; Merck).

A amostragem das superfícies de bancadas e equipamentos foi realizada utilizando-se o "método de contato com esponja", através de esponjas previamente umedecidas com solução de tampão fosfato (*Butterfield's phosphate-buffered dilution water*, pH 7,2) suplementado com polisorbato e tiosulfato de sódio a 0,5%. A área amostrada por bancada foi de 60x70cm. Quanto aos equipamentos, as análises foram qualitativas. Após a amostragem, as esponjas foram "massageadas" por 15 s com diluente (solução tampão fosfato, pH 7,2). Em seguida, foram realizadas inoculações (0,1 ml) de cada uma das amostras, em placas contendo meio seletivo para *B. cereus* (ágar MYP).

Isolamento, confirmação e identificação de B. cereus

A contagem, isolamento, confirmação e identificação de *B. cereus* foi realizada conforme metodologia recomendada por Rhodehamel e Harmon (1998). Uma cepa padrão (*B. cereus* ATCC 11145) foi utilizada como controle. Após as análises para a confirmação, foram realizados testes para a diferenciação de outros membros do grupo do *B. cereus* (*Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus mycoides*).

As placas contendo ágar MYP, inoculadas com amostras ambientais, foram incubadas a 30°C/24 h. Posteriormente, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi verificado para cada uma das amostras. De cada placa, contendo colônias típicas do microrganismo (colônias não fermentadoras de manitol e produtoras de lecitinase), foram isoladas entre três e cinco colônias típicas. Esses isolados suspeitos para *B. cereus* foram mantidos em ágar nutriente (*Nutrient agar*, Merck) a 4°C e, em seguida, foram confirmados e identificados através da coloração de Gram, reação da catalase, fermentação anaeróbia da glicose, redução de nitrato, teste VP (*Voges-Proskauer*) modificado, decomposição da tirosina, resistência a lisozima, teste de motilidade, crescimento rizóide e atividade hemolítica. A detecção de cristais de toxinas para a diferenciação da espécie *B. thuringiensis* foi realizada segundo metodologia descrita por Sharif e Alaeddinoglu (1988).

Avaliação da produção de enterotoxinas através da PCR (reação da polimerase em cadeia) e teste ELISA

Culturas

Setenta isolados, com perfil clássico de *B. cereus* frente aos testes bioquímicos de confirmação e identificação da espécie e, provenientes de amostras de ar e de superfícies, foram avaliados quanto à produção de enterotoxinas. Uma cepa padrão (*B. cereus* ATCC 14579) foi utilizada como controle.

Antes da aplicação dos testes para a avaliação da produção de enterotoxinas, os isolados foram inoculados em caldo BHI (*Brain heart infusion broth*; Difco) suplementado com 0,1% de glicose e incubados a 30°C/18 h.

PCR e teste ELISA

A produção de enterotoxinas foi avaliada através de teste ELISA, utilizando-se o *Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay* (kit BDE, vs MS2207 05/01; Tecra, Roseville New South Wales, Austrália). Este kit, que detecta a proteína de 45 kDa da NHE, foi realizado conforme as instruções do fabricante.

A presença de genes que codificam os complexos HBL e NHE foi verificada através da técnica da PCR. Os iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação dos genes associados a produção das enterotoxinas estão listados na Quadro 1. A extração e as condições de amplificação do DNA foram realizadas conforme metodologia adotada por Hansen e Hendriksen (2001). Para a extração, uma alçada da massa bacteriana crescida em meio sólido foi transferida para um tubo *eppendorf*, onde foram adicionados 200 µl de água Milli-Q esterilizada. As células bacterianas foram lisadas através da incubação a 102°C por 10 min e os fragmentos foram removidos por centrifugação a 13.000 x *g* por 3 min. O sobrenadante com o DNA bacteriano foi estocado a 4°C. A amplificação do DNA foi realizada em Termociclador *Mastercycler® gradient (Eppendorf)* utilizando-se 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 s, anelamento a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 2 min. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de reação de 30 µl, contendo 1 µl da enzima Taq DNA polimerase (1 U/µl); 3 µl de tampão 10x (200mM Tris-HCl – pH 8,0; 500 mM de KCl); 1 µl de MgCl₂; 0,24 µl de dNTPs 25 mM; 1 µl de cada um dos *primers*; 7 µl do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada (q.s.p. 30 µl). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%, através do sistema de eletroforese horizontal submersa (Sambrook *et al.*, 1989).

Quadro 1 Genes e *primers* utilizados na PCR para a caracterização enterotoxigênica de isolados de *B. cereus* provenientes de amostras ambientais

Gene	<i>primer</i>	Seqüência (5'-3')	Posição do <i>primer</i>	Produto (bp)	Referência
<i>hblA</i>	HBLA1	GTG CAG ATG TTG ATG CCG AT	671-690→	300	Heinrichs <i>et al.</i> , 1993; Hansen; Hendriksen, 2001.
	HBLA2	ATG CCA CTG CGT GGA CAT AT	990-971←		
<i>hblD</i>	L1A	AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT	2854-2873→	410	Ryan <i>et al.</i> , 1997; Hansen; Hendriksen, 2001.
	L1B	CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT	3283-3264←		
<i>hblC</i>	L2A	AAT GGT CAT CGG AAC TCT AT	1448-1467→	730	Ryan <i>et al.</i> , 1997; Hansen; Hendriksen, 2001.
	L2B	CTC GCT GTT CTG CTG TTA AT	2197-2178←		
<i>nheA</i>	nheA 344 S	TAC GCT AAG GAG GGG CA	344-360→	479	Granum <i>et al.</i> , 1999; Ghelardi <i>et al.</i> , 2002.
	nheA 843 A	GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT	843-823←		
<i>nheB</i>	nheB 1500 S	CTA TCA GCA CTT ATG GCA G	1500-1518→	753	Granum <i>et al.</i> , 1999; Ghelardi <i>et al.</i> , 2002.
	nheB 2269 A	ACT CCT AGC GGT GTT CC	2269-2253←		
<i>nheC</i>	nheC 2820 S	CGG TAG TGA TTG CTG GG	2820-2836→	563	Granum <i>et al.</i> , 1999; Ghelardi <i>et al.</i> , 2002.
	nheC 3401 A	CAG CAT TCG TAC TTG CCA A	3401-3383←		

3 Resultados

Confirmação dos isolados de B. cereus

Trezentas e trinta e uma colônias presuntivas foram isoladas de amostras de ar ambiente e de superfícies e submetidas aos testes de confirmação e identificação. Deste total, 76,1% foram identificados como *B. cereus*. Outras duas espécies do grupo do *B. cereus* também foram identificadas: *B. mycoides* (4,5%) e *B. thuringiensis* (3,6%). Tal como *B. cereus*, essas espécies foram identificadas em amostras de ar ambiente e de superfícies.

Contaminação ambiental (ar e superfícies)

A presença de *B. cereus* no ar ambiente foi observada em 84,4% do total de amostras de ar coletadas em ambos os restaurantes (Tabelas 1 e 2). No R1, as contagens de *B. cereus* variaram entre 2,0 e 38,4 UFC/m³ de ar (Tabela 1). Nesse estabelecimento, as áreas onde foram observados os maiores pontos de

contaminação foram as áreas de cocção (38,4 UFC/m³), distribuição (28,0 UFC/m³) e *self-service* (27,6 UFC/m³). No R2, as contagens de *B. cereus* em amostras de ar ambiente variaram entre 2,0 e 20,0 UFC/m³ de ar (Tabela 2), sendo observado o maior valor na área recepção de gêneros (20,0 UFC/m³).

Do total de amostras de superfícies de bancadas e de equipamentos analisadas, 44,8% foram positivas para a presença do microrganismo (Tabelas 1 e 2). As maiores contaminações foram observadas nas bancadas do R1 (área de alimentos processados - carnes preparadas) com contagens compreendidas entre 0,07 e 2,20 UFC/cm² (Tabela 1).

Tabela 1 *B. cereus* em amostras ambientais do restaurante R1, segundo o tipo de amostra e local de coleta.

Tipo de amostra e locais de coleta	Amostras analisadas (Amostras positivas)	Contagem de <i>B. cereus</i> (UFC)*
<i>Ar ambiente</i>		
Áreas de alimentos não processados (de pré preparo de vegetais; pré preparo de carnes; antecâmara; recepção de gêneros; almoxarifado).	15 (12)	2,0-16,0/m ³
Áreas de alimentos processados (de carnes preparadas; cocção).	06 (06)	2,0-38,4/m ³
Áreas de alimentos prontos para o consumo (de distribuição; <i>self-service</i> ; distribuição de marmitas; monta-cargas).	12 (12)	2,0-28,0/m ³
Outros locais (de manipulação de talheres).	03 (02)	8,0-24,0/m ³
<i>Superfícies de bancadas</i>		
Áreas de alimentos não processados (de pré preparo de vegetais; pré preparo de carnes)	12 (06)	0,07-0,72/cm ²
Áreas de alimentos processados (de carnes preparadas; cocção).	12 (06)	0,07-2,20/cm ²
<i>Superfícies de equipamentos</i>		
Que contatam alimentos não processados (multiprocessador; triturador; descascador de legumes; cortador de legumes).	09 (07)	aq
Que contatam alimentos processados (fatiadores).	09 (06)	aq

* Unidade Formadora de Colônia

aq: Análise qualitativa

Tabela 2 *B. cereus* em amostras ambientais do restaurante R2, segundo o tipo de amostra e local de coleta.

Tipo de amostra e locais de coleta	Amostras analisadas (Amostras positivas)	Contagem de <i>B. cereus</i> (UFC)*
<i>Ar ambiente</i>		
Áreas de alimentos não processados (de pré preparo de vegetais; pré preparo de carnes; antecâmara; câmara de resfriamento de carnes; seleção de cereais; preparo de sobremesas; preparo de massas; preparo de sucos; preparo de dietas especiais; recepção de gêneros).	33 (25)	2,0-20,0/m ³
Áreas de alimentos processados (de cocção; preparo da cozinha dietética).	06 (06)	2,0-6,0/m ³
Áreas de alimentos prontos para o consumo (de distribuição; <i>self-service</i> ; distribuição de refeições especiais; carros de distribuição de refeições especiais).	12 (10)	2,0-8,0/m ³
Outros locais (área de entrada de funcionários).	03 (03)	5,4-8,0/m ³
<i>Superfícies de bancadas</i>		
Áreas de alimentos não processados (de pré preparo de vegetais; pré preparo de carnes)	24 (08)	0,07-0,56/cm ²
Áreas de alimentos processados (de carnes preparadas; cocção).	09 (nc)	nc
<i>Superfícies de equipamentos</i>		
Que contatam alimentos não processados (multiprocessador; descascador de legumes; cortador de legumes).	15 (06)	aq
Que contatam alimentos processados (fatiadores).	06 (04)	aq

* Unidade Formadora de Colônia

nc: ausência de colônia característica de *B. cereus*

aq: Análise qualitativa

Produção de enterotoxinas

Na análise dos resultados obtidos utilizando-se a PCR (Tabela 3) foi observado que dos 70 isolados de *B. cereus*, 14,3% foram positivos para os três genes que codificam a hemolisina BL (*hblA*, *hblD* e *hblC*); 55,7% apresentaram um ou dois desses genes e nenhum dos três genes foi detectado em 25,7% dos isolados. Os três genes que codificam o complexo NHE (*nheA*, *nheB* e *nheC*) foram detectados em 12,8% dos isolados. Um ou dois desses genes foram detectados em 60,0% dos isolados e nenhum dos três genes foi observado em 22,8% dos isolados. Os três genes da HBL e os três genes da NHE foram detectados em três isolados (4,3%), provenientes de amostras de ar ambiente coletada em área de alimentos não processados (almoxarifado), de amostras de superfícies de bancada da área de pré vegetais e de fatiador.

Entre os 70 isolados de *B. cereus* foram identificados 35 perfis toxigênicos distintos. Os 43 isolados provenientes do R1 foram agrupados em 24 perfis, enquanto os 27 isolados do R2 foram agrupados em 22 perfis.

O teste com o *kit* BDE (Tecra), que detecta a proteína codificada pelo gene *nheA* do complexo NHE (Lund; Granum, 1996), revelou que 61,4% dos 70 isolados de *B. cereus* produzem essa toxina. Entretanto, o gene *nheA* não foi detectado em oito desses isolados positivos.

Tabela 3 Perfil toxigênico dos isolados de *B. cereus* provenientes de amostras ambientais coletadas nos restaurantes R1 e R2.

Perfil dos isolados	Origem ^a	N° de isolados	Teste ELISA ^b	HBL ^c			NHE ^c		
			N° de positivos	<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>
Perfil I	SB, SE, A, (ATCC 14579 ^d)	3	3	+	+	+	+	+	+
Perfil II	SB, A	2	2	+	+	+	+	-	+
Perfil III	SE, SB	3	3	+	+	+	+	-	-
Perfil IV	A	3	2	+	+	+	+	+	-
Perfil V	A	1	1	+	+	-	+	+	+
Perfil VI	A	3	2	+	+	-	+	-	-
Perfil VII	A	2	1	+	+	-	-	+	-
Perfil VIII	A, SE	2	1	+	+	-	+	+	-
Perfil IX	A	4	nd	+	+	-	-	-	-
Perfil X	SE	1	1	-	+	+	-	+	+
Perfil XI	SB	1	nd	-	+	+	-	-	-
Perfil XII	SE	1	1	+	-	+	-	+	+
Perfil XIII	SE	2	nd	+	-	+	-	-	-
Perfil XIV	A, SB, SE	5	1	-	+	-	-	-	-
Perfil XV	A	3	3	-	+	+	+	+	+
Perfil XVI	A	1	nd	-	+	-	+	-	-
Perfil XVII	A	1	1	-	+	-	+	+	+
Perfil XVIII	A	1	1	-	-	+	+	+	+
Perfil XIX	A	3	2	-	-	+	+	+	-
Perfil XX	A	6	5	-	-	-	+	+	-
Perfil XXI	SB	2	2	-	-	-	+	+	+

Tabela 3 Continuação

Perfil dos isolados	Origem ^a	Nº de isolados	Teste ELISA ^b	HBL ^c			NHE ^c		
			Nº de positivos	<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>
Perfil XXII	SE	2	nd	-	-	-	-	+	+
Perfil XXIII	A, SB	3	nd	-	-	-	-	-	-
Perfil XXIV	A, SB	3	3	-	-	-	+	-	+
Perfil XXV	A	1	nd	+	+	+	-	-	-
Perfil XXVI	SE	1	1	+	+	+	-	-	+
Perfil XXVII	A	2	2	+	+	-	-	+	+
Perfil XXVIII	A	1	1	-	+	-	+	+	-
Perfil XXIX	A	1	1	-	+	+	+	-	+
Perfil XXX	A	1	1	-	+	+	-	+	-
Perfil XXXI	A	1	nd	-	-	-	+	-	-
Perfil XXXII	SE	1	1	+	-	+	+	+	+
Perfil XXXIII	SE	1	nd	-	-	-	-	+	-
Perfil XXXIV	SB	1	nd	-	+	+	-	-	+
Perfil XXXV	SB	1	1	-	+	+	+	-	-

^a SB: superfície de bancada; SE: superfície de equipamento; A: ar ambiente

^b *kit* BDE (Tecra). Os resultados foram obtidos de acordo com as instruções do fabricante.

^c +: foi observado produto da PCR com peso esperado; -: não foi observado produto do PCR com peso esperado

^d ATCC: *American Type Culture Collection*

nd: não detectado

4 Discussão e conclusão

A presença de *B. cereus* produtores de enterotoxinas observada em amostras ambientais dos serviços de alimentação indica a importância do risco de contaminação de alimentos a partir dessas fontes. A identificação dos principais locais como origens potenciais do microrganismo ou de seus esporos deve ser considerada para evitar ou reduzir a contaminação dos alimentos na linha de processamento, como relatam alguns pesquisadores (Guinebretiere; Nguyen-The, 2002). Neste trabalho, ficou evidente a importância do ar ambiente como fonte de *B. cereus* em estabelecimentos processadores de alimentos.

Estudos recentes (Svensson *et al.*, 1999; Hansen; Hendriksen, 2001; Ghelardi *et al.*, 2002; Guinebretiere; Nguyen-The, 2002; Phelps; McKilip, 2002), em que foram utilizados métodos baseados na PCR, atestam a diversidade genotípica de *B. cereus* e sua heterogeneidade quanto à presença de fatores de virulência. A diversidade entre as cepas pode aumentar as chances de persistência do microrganismo no ambiente e durante o processamento dos alimentos e, conseqüentemente, a contaminação do produto final (Guinebretiere; Nguyen-The, 2002). No presente estudo, a elevada diversidade observada entre as cepas de *B. cereus* atesta o dinamismo da sua ecologia e o alto potencial enterotoxigênico dos isolados.

Os resultados obtidos com a aplicação do *kit* BDE (Tecra) confirmam a eficiência do teste, já relatada por outros pesquisadores (Lund e Granum, 1996; Lund; Granum, 1997; Hansen; Hendriksen, 2001). Entretanto, entre os setenta isolados, oito apresentaram resultados positivos para o teste ELISA, mesmo sendo negativos para a presença do gene *nheA* utilizando-se a PCR. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que o *kit* também detecta, além da proteína de 45 kDa, o componente protéico de 105 kDa do complexo NHE, embora com sensibilidade 10 vezes menor (Granum, 1997). De fato, o gene *nheC*, que codifica esse componente, foi detectado em cinco dos oito isolados que apresentaram resultados positivos no imunoensaio. As propriedades do teste BDE e possíveis diferenças nas seqüências dos genes codificadores das enterotoxinas,

devem ser consideradas na análise comparativa entre os resultados obtidos com a aplicação do *kit* e com a pesquisa de genes do complexo NHE pela PCR, como observaram Hansen e Hendriksen (2001).

Devido à frequência com que determinadas situações são observadas em serviços de alimentação - tais como a exposição do alimento ao ar ambiente por tempo prolongado, as condições de higiene de bancadas e equipamentos inadequadas e a exposição dos alimentos a temperaturas abusivas - torna-se relevante insistir na necessidade de aprimorar procedimentos de higienização ambiental, uma vez que seu papel como fonte potencial de patógenos alimentares como *B. cereus*, tem sido evidenciado de forma indubitável.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Os autores agradecem ao Prof. Dr. Tomomasa Yano (Instituto de Biologia, UNICAMP) pelo auxílio nas análises da PCR.

5 Referências bibliográficas

ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 145-155, dec. 1995.

APHA (American Public Health Association). Microbiological monitoring of the food processing environment. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3th. ed., Washington. Chap. 3, p.51: 75. 2001.

BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1778-1784, may 1991.

BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4423-4428, nov. 1995.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A. SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *B. cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 129-134, feb. 2002.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement, n. 76, p. 61S-66S. 1994

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, D.C: ASM Press, 1997. pp. 327-336.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, n. 2, p. 225-229, aug. 1999.

GUINEBRETIERE, M. H.; NGUYEN-THE, C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurised zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v.43, n.2, p.207-215, mar. 2003.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxin *Bacillu cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 185-189, jan. 2001.

HEINRICHS, A. H.; BEECHER, D. J., MACMILLAN, J. D., ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 6760-6766, 1993.

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

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M. P. (ed.). **Food borne Bacteria Pathogens**, New York: Marcel Dekker, 1989. p. 21-69.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, aug. 1996.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 143, pt. 10, p. 3329-3336, oct. 1997.

PHELPS, R. J.; MCKILLIP, J. L. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3147-3151, june 2002.

RHODEHAMEL, E. J.; HARMON, S. M. *Bacillus cereus*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. 8 th. Arlington: Association of Official Analytical Chemists International, 1998. Chapt. 14, p. 14.01-14.08.

RYAN, P. A.; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 179, n.8, p. 2551-2556, apr. 1997.

SAMBROOK, J.; FRISTH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Clonning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Lab Press, 1989. Chapt. 6.

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

SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDENHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 12, p. 903-912, dec. 1999.

CAPÍTULO III

DIAGNÓSTICO DA CONTAMINAÇÃO DE PREPARAÇÕES CÁRNEAS POR *Bacillus cereus*, EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

Artigo redigido segundo as normas de publicação da revista Alimentos e Nutrição, para a qual será submetido para publicação.

DIAGNÓSTICO DA CONTAMINAÇÃO DE PREPARAÇÕES CÁRNEAS POR *Bacillus cereus*, EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

RESUMO

O diagnóstico da contaminação por *B. cereus* em dois restaurantes institucionais do município de Campinas/SP foi realizado através da análise de amostras ambientais e de alimentos, coletadas na linha de preparo de pratos cárneos. O microrganismo foi identificado em amostras de ar ambiente (2,0 a 20,0 UFC/m³); carne processada (10² UFC/g e 2,4x10³ UFC/g); condimentos e temperos (1,0x10 a 5,0x10² UFC/g); e, em 51,7% das amostras de superfícies analisadas. O potencial enterotoxigênico de 54 isolados foi verificado através do *kit* BDE-VIA (Tecra) e da pesquisa de genes associados aos complexos de toxinas diarréicas HBL (*hblA*, *hblD* e *hblC*) e NHE (*nheA*, *nheB* e *nheC*), aplicando-se a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR). Do total de isolados analisados, 85,2% foram positivos ao teste BDE-VIA. Os genes codificadores dos complexos NHE e HBL foram observados em cepas provenientes de amostras ambientais e de alimentos. Os resultados da PCR e do BDE-VIA revelaram o alto potencial enterotoxigênico dos isolados. O controle do microrganismo no ambiente desses estabelecimentos e o processamento adequado dos alimentos são fundamentais para a redução do risco de doenças de origem alimentar associadas a *B. cereus* em serviços de alimentação.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, ambiente, carne, toxinas, PCR.

1 Introdução

Em serviços de alimentação, o preparo de grandes quantidades de alimentos, a exposição dos alimentos a temperaturas abusivas e a utilização de programas de higienização inadequados, são exemplos de condições que contribuem para o aumento dos riscos de contaminação dos alimentos. Dentre os contaminantes de interesse à saúde pública, *B. cereus* se destaca por suas propriedades de formação de esporos, ampla distribuição no ambiente e capacidade de produção de toxinas associadas a doenças alimentares diarreicas ou eméticas.

A resistência dos esporos às condições ambientais adversas dificulta a eliminação e a redução da contaminação ambiental, favorecendo a ocorrência e a persistência do microrganismo, tanto nos alimentos quanto no próprio ambiente (Andersson *et al.*, 1995; Kotiranta *et al.*, 2000).

Geralmente, as doenças de origem alimentar atribuídas a *B. cereus* resultam do consumo de alimentos contendo mais do que 10^5 células viáveis/g ou ml de alimento (Gilbert, 1979; Goepfert *et al.*, 1972; Kramer; Gilbert, 1989). Os surtos alimentares relatados na literatura foram associados a diversos tipos de alimentos e a forma diarreica é geralmente relacionada ao consumo de alimentos ricos em proteínas, como carnes e pescado (Kramer; Gilbert, 1989; Valero *et al.*, 2002). Pesquisadores consideram que contagens elevadas de *B. cereus* em carnes, particularmente em produtos cárneos prontos para o consumo, devem ser consideradas como risco potencial para os consumidores (Bachhil; Jaiswal, 1988; Nortjé *et al.*, 1999; Borch; Arinder, 2002).

A doença do tipo diarreica associada ao microrganismo é caracterizada por diarreia intensa, dores abdominais e náuseas. A duração da doença é de 12 a 24 h e o período de incubação varia entre 8 a 16 h (Granum, 1994). Acredita-se que as enterotoxinas sejam produzidas no intestino delgado, após ingestão de células vegetativas e, ou esporos (Granum, 1997). Diferentes toxinas têm sido apontadas como potenciais causadoras da doença diarreica associada ao

microrganismo (Beecher; MacMillan, 1991; Agata *et al.*, 1995; Lund; Granum, 1996; Asano *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 2000), entretanto, a maioria dos surtos alimentares estão associados às enterotoxinas complexas HBL (enterotoxina hemolisina BL) e NHE (enterotoxina não-hemolítica).

A identificação das principais fontes de *B. cereus*, em estabelecimentos onde são processados os alimentos, pode contribuir para minimizar o risco potencial de contaminação e veiculação do microrganismo e de suas toxinas por alimentos. Este estudo tem por objetivo avaliar a contaminação e o potencial enterotoxigênico de *B. cereus* durante as operações de preparo de pratos cárneos, em dois restaurantes institucionais. A pesquisa foi efetuada a partir da análise de amostras ambientais e de alimentos, coletadas durante os processamentos. A investigação do potencial de produção de enterotoxinas por isolados do microrganismo foi realizada através do *kit* de detecção imunoenzimático *Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay* (BDE-VIA) da Tecra (*Bioenterprises* Pty. Ltd., Roseville, NSW, Austrália), além da caracterização genotípica através da reação da polimerase em cadeia (PCR).

2 Material e métodos

A coleta de amostras foi realizada em dois restaurantes (identificados como R1 e R2) de uma instituição de ensino superior, na cidade de Campinas/SP, durante o preparo de carne assada e bife rolê. A análise da contaminação por *B. cereus* na linha de processamento de carne assada foi realizada em duas ocasiões distintas no restaurante R1 (onde são preparadas cerca de seis mil refeições/dia). No restaurante R2, onde são preparadas cerca de duas mil refeições/dia, a análise foi efetuada em três ocasiões distintas, durante o processamento de bife rolê.

Amostras ambientais

As amostragens ambientais foram realizadas conforme metodologia preconizada pela *American Public Health Association* (APHA, 2001). Amostras de ar ambiente (500 l) foram aspiradas por 5 min para placas de Petri contendo ágar MYP (*Mannitol yolk polymixin agar*; Difco) suplementado com 0,1% de Sulfato de Polimixina B (Sigma). As coletas foram realizadas através do equipamento *Microbiological Air Sampler* (MAS 100; Merck). Ao todo, dezessete amostras de ar ambiente foram coletadas durante as operações de preparo dos pratos cárneos.

As amostras de superfícies (treze caixas de polietileno, quatro caixas de papelão, oito ralos de drenagem e quatro fatiadores) foram coletadas através do "método de contato com esponja", utilizando-se esponjas previamente umedecidas com solução de tampão fosfato (*Butterfield's phosphate-buffered dilution water*, pH 7,2) suplementado com polisorbato e tiosulfato de sódio a 0,5%. Após a amostragem, as esponjas foram "massageadas" por 15 s com diluente (solução tampão fosfato, pH 7,2). Em seguida, foram realizadas inoculações (0,1 ml) de cada uma das amostras, em placas contendo meio seletivo para *B. cereus* (ágar MYP). As análises de superfícies foram qualitativas.

Amostras de alimentos

Em cada uma das etapas dos processamentos dos pratos cárneos, foram coletadas cinco amostras de carne. Nas duas ocasiões em que o processamento de carne assada foi investigado, foi coletado um total de cinquenta amostras de carne. Nas três ocasiões em que o processamento de bife rolê foi acompanhado, foram coletadas quarenta e cinco amostras.

Com relação aos temperos e condimentos utilizados durante os processamentos, foi coletado um total de quinze amostras, distribuídas entre: cebola (cinco), orégano (cinco), cheiro-verde (três) e pimenta-do-reino (duas).

Para a realização das análises, as amostras de carne (50 g/amostra) e de condimentos e temperos (2 a 10 g/amostra) foram diluídas na proporção de 1:10 em tampão fosfato (*Butterfield's phosphate-buffered dilution water*, pH 7,2) e homogeneizadas em *stomacher* (modelo 400; *Stomacher Labsystem Circulator Bag* 6141) por 2 min. Alíquotas de diluições sucessivas das amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar MYP suplementado com 0,1% de Sulfato de Polimixina B e incubadas a 30°C por 24 h, em duplicata. Três a cinco colônias presuntivas de *B. cereus* (não fermentadoras de manitol e produtoras de lecitinas) foram isoladas e estocadas em ágar nutriente (*Nutrient agar*; Merck) a 4°C.

Contagem, isolamento, confirmação e identificação de B. cereus

Os isolados presuntivos de *B. cereus* foram confirmados e identificados através da coloração de Gram, reação da catalase, fermentação anaeróbia da glucose, redução de nitrato, teste VP (*Voges-Proskauer*) modificado, decomposição da tirosina, resistência a lisozima, teste de motilidade, crescimento rizóide e atividade hemolítica, conforme a metodologia recomendada por Rhodehamel e Harmon (1998). A detecção de cristais de toxinas para a diferenciação da espécie *Bacillus thuringiensis* foi realizada segundo metodologia descrita por Sharif e Alaeddinoglu (1988).

Análise do potencial enterotoxigênico

Cinquenta e quatro isolados de *B. cereus*, obtidos de diferentes origens (Tabelas 1 e 2), foram analisados quanto à produção de enterotoxinas utilizando-se o BDE-VIA da Tecra (vs MS2207 05/01) e a PCR. O *kit*, que detecta a proteína de 45 kDa do complexo NHE, foi realizado conforme as instruções do fabricante.

A técnica da PCR foi realizada para detectar a presença de genes que codificam os complexos HBL (*hbla*, *hblD* e *hblC*) e NHE (*nheA*, *nheB* e *nheC*) (Quadro 1). A extração e as condições de amplificação do DNA bacteriano foram realizadas conforme metodologia adotada por Hansen e Hendriksen (2001). Para a extração, uma alçada da massa bacteriana, crescida em meio sólido, foi transferida para um tubo *ependorf*, onde foram adicionados 200 µl de água Milli-Q esterilizada. As células bacterianas foram lisadas através da incubação a 102°C por 10 min e os fragmentos foram removidos por centrifugação a 13.000 x *g* por 3 min. O sobrenadante com o DNA bacteriano foi estocado a 4°C. A amplificação do DNA foi realizada em Termociclador *Mastercycler® gradient* (*Eppendorf*), utilizando-se 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 s, anelamento a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 2 min. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de reação de 30 µl, contendo 1 µl da enzima Taq DNA-polimerase (1 U/µl); 3 µl de tampão 10x (200mM Tris-HCl – pH 8,0; 500 mM de KCl); 1 µl de MgCl₂; 0,24 µl de dNTPs 25 mM; 1 µl de cada um dos *primers*; 7 µl do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada (q.s.p. 30 µl). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%, através do sistema de eletroforese horizontal submersa (Sambrook *et al.*, 1989). Para registro, os géis foram fotografados através do sistema *ImageMaster VDS* (*Amersham Pharmacia Biotech Inc. EUA*).

Antes da realização das análises com o BDE-VIA e a PCR, os isolados foram inoculados em caldo BHI (*Brain heart infusion broth*; Difco), suplementado com 0,1% de glicose, e incubados a 30°C/18 h. Uma cepa padrão (*B. cereus* ATCC 14579) foi utilizada como controle.

3 Resultados e discussão

Análise da contaminação por B. cereus

Os resultados relativos à contaminação por *B. cereus* na linha de processamento de carne assada e bife rolê estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

A avaliação da contaminação das superfícies por *B. cereus* permitiu observar a presença do microrganismo em 51,7% das 29 amostras analisadas. O microrganismo foi detectado em caixas de papelão, caixas de polietileno, fatiadores e em ralos de drenagem. Esse índice de frequência em estabelecimentos onde são processados alimentos está acima do relatado por outros pesquisadores, em estudos sobre a contaminação de superfícies de bancadas. Nessas pesquisas, *B. cereus* foi identificado em cerca de 25 a 30% das amostras analisadas (Silva Júnior, 1997; Mendes *et al.*, 2004).

Com relação à contaminação do ar ambiente, o microrganismo foi detectado em 82,3% das 17 amostras analisadas, em contagens compreendidas entre 2,0 e 20,0 UFC/m³ (Tabelas 1 e 2). A maior contagem de *B. cereus* em amostras de ar foi observada durante o fatiamento da carne (20,0 UFC/m³), na linha de processamento de carne assada (Tabela 1).

Durante o processamento de carne assada, o microrganismo foi detectado em 7 amostras de carne (14,0%). Essas amostras foram coletadas nas etapas subseqüentes à cocção, o que sugere que a contaminação da carne ocorreu após o processamento térmico. As contagens observadas nessas amostras, compreendidas entre 10² UFC/g e 2,4x10³ UFC/g (Tabela 1), estão próximas às reportadas por Konuma *et al.* (1988), que relataram contaminações em carne e produtos cárneos geralmente inferiores a 10² UFC/g.

No processamento deste prato cárneo, a contaminação da carne após a cocção, ou seja, nas etapas de resfriamento em temperatura ambiente, após o corte com fatiadores e durante a distribuição, pode ter ocorrido a partir das

superfícies das caixas de polietileno ou dos fatiadores utilizados no processamento do prato cárneo (Tabela 1). Este quadro pode ter sido agravado pela ausência de tratamento térmico eficiente para a destruição dos esporos de *B. cereus* nas etapas subseqüentes e pela exposição do alimento a temperaturas abusivas.

Conforme pesquisadores, a presença de *B. cereus* em produtos cárneos processados pode ocorrer devido a fatores como a elevada resistência dos esporos ao calor, a aplicação de tratamento térmico inadequado no produto e, a estocagem do alimento em temperaturas inadequadas (Bachhil; Jaiswal, 1988). Cabe ressaltar que na legislação brasileira não há limites para a contaminação por *B. cereus* em carne ou em produtos cárneos (Brasil, 2001).

Os resultados obtidos sobre a contaminação do ar indicam que também essa fonte pode ser considerada como origem da contaminação para a carne. No processamento da carne assada, o alimento é exposto ao ar ambiente por períodos relativamente longos nas etapas de resfriamento à temperatura ambiente (entre 4 e 6 h) e de fatiamento da carne cozida (entre 2 e 3 h). Pesquisas apontam que, o resfriamento inadequado e a estocagem em temperaturas abusivas constituem os principais fatores que contribuem para a veiculação de *B. cereus* em alimentos (Harmon; Kautter, 1991; Nortjé *et al.*, 1999).

Com relação ao bife rolê (Tabela 2), o microrganismo não foi identificado em nenhuma das amostras de carne analisadas. As etapas de preparo desse prato estão, provavelmente, menos expostas ao risco de contaminação pelo microrganismo. Cabe ressaltar que neste prato cárneo o bife role não foi pré-preparado no estabelecimento, sendo o processamento iniciado com a carne crua, recheada e enrolada.

Algumas pesquisas relatam a presença do microrganismo em carne crua, geralmente, com contagens inferiores a 10^2 ou 10^3 UFC/g (Konuma *et al.*, 1988; Souza *et al.*, 2000). Entretanto, esta situação não foi observada no presente estudo, em ambos os preparos.

Em relação aos condimentos e temperos adicionados aos pratos cárneos, as contagens de *B. cereus* entre as 11 amostras positivas para o microrganismo, oscilaram entre $1,0 \times 10$ e $5,0 \times 10^2$ UFC/g, (Tabelas 1 e 2). A presença do microrganismo em condimentos é relatada com frequência na literatura e, de modo geral, em contagens variáveis, devido à grande diversidade de produtos existentes (Pereira *et al.*, 1999; Froehlich; Giombelli, 2002; Souza *et al.*, 2002). A adição desses produtos aos alimentos, sem um eficiente tratamento térmico posterior, pode representar risco potencial de contaminação por *B. cereus*. Nos processamentos analisados neste estudo, a cocção do alimento parece ter sido efetiva na destruição do microrganismo (células vegetativas e de esporos), dada a ausência de *B. cereus* nas amostras de carne coletadas imediatamente após o tratamento térmico (Tabelas 1 e 2).

Análise do potencial enterotoxigênico

Do total de 122 isolados presuntivos provenientes de amostras ambientais e de alimentos coletadas durante as etapas de preparo dos pratos cárneos, 88 (72,1%) foram identificados como *B. cereus* através dos testes de confirmação e identificação. Destes, 54 foram analisados quanto ao potencial enterotoxigênico através do BDE-VIA e da pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas pela PCR. Conforme os resultados observados com o BDE-VIA, 46 (85,2%) isolados são produtores da proteína de 45 kDa do complexo NHE, embora o gene *nheA* (gene codificador desta proteína) não tenha sido identificado em 4 destes isolados. Em contrapartida, o gene *nheA* foi detectado em 2 isolados negativos ao teste BDE-VIA.

Com relação aos resultados obtidos através da PCR (Tabelas 1 e 2), ao menos um dos genes pesquisados foi detectado em 50 (92,6%) dos isolados analisados; 4 isolados foram positivos para os três genes tanto da HBL (*hblA*, *hblD* e *hblC*) quanto da NHE (*nheA*, *nheB* e *nheC*); 8 foram positivos para os três genes da HBL; 16 foram positivos para os três genes da NHE. De modo geral, a distribuição desses genes entre os isolados analisados ocorreu de forma heterogênea, não havendo predominância de um grupo genotípico em relação ao

tipo de amostra ou etapa de processamento. No processamento de carne assada, cepas de *B. cereus* potencialmente produtoras de enterotoxinas foram identificadas em todas as etapas do processamento onde o microrganismo foi isolado, destacando-se uma cepa positiva para os três genes do complexo NHE, proveniente de uma amostra de carne pronta para o consumo, coletada durante a etapa de distribuição (Tabela 1).

Embora o microrganismo não tenha sido detectado nas amostras de carne utilizada no bife rolê, a presença de cepas potencialmente produtoras dos complexos HBL e NHE foi observada em amostras de ar ambiente, em superfícies de caixas, nos condimentos e na superfície de um ralo de drenagem localizado na área de distribuição, sendo este último positivo para os seis genes pesquisados através da PCR (Tabela 2).

Tabela 1 Contaminação e potencial enterotoxigênico de *B. cereus* na linha de processamento de carne assada

Processamento	Amostras	<i>B. cereus</i>	BDE ^a	Grupo genotípico observado (n) ^b
Recepção	caixas de papelão*	+	+	-HBL ±NHE (2)
	carne (crua, congelada)	nc	nc	nc
↓				
Câmara fria 1°C (até 2 dias)				
↓				
Cocção (>90°C/120 min)	ar ambiente	até 16,0 UFC/m ³	+	±HBL ±NHE (1)
			+	±HBL +NHE (1)
	carne pós-cocção	nc	nc	nc
	cebola	nc	nc	nc
	pimenta	2,0x10 UFC/g	+	-HBL +NHE (1)
			+	-HBL ±NHE (1)
	orégano	1,0x10 a 1,5x10 UFC/g	+	±HBL ±NHE (1)
			-	-HBL -NHE (1)
↓				
Resfriamento a temperatura ambiente (4 a 6 h)	caixas de polietileno*	+	+	+HBL ±NHE (1)
			+	±HBL +NHE (2)
	ar ambiente	até 9,0 UFC/m ³	+	±HBL +NHE (1)
			-	+HBL -NHE (1)
	carne (pós-resfriamento)	até 1,0x10 ² UFC/g	+	-HBL ±NHE (1)
↓				
Armazenamento 7°C (12 a 14 h)				
↓				

Tabela 1 continuação

Processamento	Amostras	<i>B. cereus</i>	BDE ^a	Grupo genotípico observado (n) ^b
↓ Fatiamento (2 a 3 h) ↓ Aquecimento (>90°C/30 a 50min) ↓ Distribuição	fatiadores*	+	+	-HBL ±NHE (1)
			+	+HBL+NHE (1)
			-	-HBL -NHE (1)
	ar ambiente	2,0 a 20,0 UFC/m ³	+	±HBL ±NHE (1)
			-	+HBL ±NHE (1)
			+	±HBL +NHE (2)
	carne (pós-fatiamento)	2,0x10 ² a 2,4x10 ³ UFC/g	+	+HBL +NHE (1)
			+	+HBL ±NHE (2)
			+	±HBL +NHE (4)
Distribuição	ar ambiente	2,0 a 12,0 UFC/m ³	-	±HBL ±NHE (2)
			+	±HBL ±NHE (1)
	carne	1,0x10 ² UFC/g	+	-HBL ±NHE (1)
			+	-HBL +NHE (1)
	ralo de drenagem	nc	nc	nc

^a *kit* BDE-VIA (Tecra). Os resultados foram obtidos conforme as instruções do fabricante.

^b n: número de isolados

+HBL: reação da PCR positiva para os três genes da HBL

±HBL: reação da PCR positiva para um ou dois genes da HBL

+NHE: reação da PCR positiva para os três genes da NHE

±NHE: reação da PCR positiva para um ou dois genes da NHE

-HBL: reação da PCR negativa para os três genes da HBL

-NHE: reação da PCR negativa para os três genes da NHE

* análise qualitativa

nc: ausência de colônia característica de *B. cereus*

UFC: unidade formadora de colônia

Tabela 2 Contaminação e potencial enterotoxigênico de *B. cereus* na linha de processamento de bife rolê

Processamento	Amostra	<i>B. cereus</i>	BDE ^a	Grupo genotípico observado (n) ^b
Recepção	caixas de polietileno*	+	+	±HBL +NHE (2)
	bife rolê pré-preparado	nc	nc	+HBL ±NHE (1) nc
↓				
Câmara fria 1°C (3 a 5 dias)	ar ambiente	até 2,0 UFC/m ³	-	±HBL -NHE (1)
↓				
Cocção (>90°C/120 min)	ar ambiente	2,0 a 8,7 UFC/m ³	-	-HBL -NHE (2)
			+	±HBL ±NHE (1)
	ralo de drenagem*	nc	nc	nc
	carne (pós-cocção)	nc	nc	nc
	cebola	até 1x10 ² UFC/g	-	±HBL -NHE (1)
	cheiro-verde	1,0x10 ² a 3,2x10 ² UFC/g	+	±HBL +NHE (1)
			+	±HBL ±NHE (2)
Armazenamento (>65°C/3 h)			+	+HBL +NHE (1)
			+	+HBL ±NHE (1)
	orégano	5,0x10 ² UFC/g	-	±HBL -NHE (1)
			+	+HBL ±NHE (1)
Distribuição	ar ambiente	2,0 a 16,0 UFC/m ³	+	±HBL ±NHE (2)
			-	±HBL +NHE (1)
	ralo de drenagem*	+	+	+HBL +NHE (1)
			+	-HBL ±NHE (2)
	carne	nc	nc	nc

^a *kit* BDE-VIA (Tecra). Os resultados foram obtidos conforme as instruções do fabricante.

^b n: número de isolados

+HBL: reação da PCR positiva para os três genes da HBL

±HBL: reação da PCR positiva para um ou dois genes da HBL

+NHE: reação da PCR positiva para os três genes da NHE

±NHE: reação da PCR positiva para um ou dois genes da NHE

-HBL: reação da PCR negativa para os três genes da HBL

-NHE: reação da PCR negativa para os três genes da NHE

* análise qualitativa

nc: ausência de colônia característica de *B. cereus*

UFC: unidade formadora de colônia

Quadro 1 *Primers* utilizados na PCR para a caracterização enterotoxigênica de isolados de *B. cereus*, provenientes de amostras coletadas durante os processamentos de carne assada e bife rolê

Gene	Seqüência (5'-3')	Posição do primer	Produto (bp)	Referência
<i>hblA</i>	GTG CAG ATG TTG ATG CCG AT	671-690→	300	Heinrichs <i>et al.</i> , 1993; Hansen; Hendriksen, 2001.
	ATG CCA CTG CGT GGA CAT AT	990-971←		
<i>hblD</i>	AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT	2854-2873→	410	Ryan <i>et al.</i> , 1997; Hansen; Hendriksen, 2001.
	CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT	3283-3264←		
<i>hblC</i>	AAT GGT CAT CGG AAC TCT AT	1448-1467→	730	Ryan <i>et al.</i> , 1997; Hansen; Hendriksen, 2001.
	CTC GCT GTT CTG CTG TTA AT	2197-2178←		
<i>nheA</i>	TAC GCT AAG GAG GGG CA	344-360→	479	Granum <i>et al.</i> , 1999; Ghelardi <i>et al.</i> , 2002.
	GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT	843-823←		
<i>nheB</i>	CTA TCA GCA CTT ATG GCA G	1500-1518→	753	Granum <i>et al.</i> , 1999; Ghelardi <i>et al.</i> , 2002.
	ACT CCT AGC GGT GTT CC	2269-2253←		
<i>nheC</i>	CGG TAG TGA TTG CTG GG	2820-2836→	563	Granum <i>et al.</i> , 1999; Ghelardi <i>et al.</i> , 2002.
	CAG CAT TCG TAC TTG CCA A	3401-3383←		

4 Conclusões

Durante o processamento de carne assada foram observadas práticas que favorecem a contaminação, o crescimento e a persistência do microrganismo no alimento. Entre essas, destacam-se a exposição prolongada do alimento ao ar ambiente, a exposição a temperaturas abusivas, o uso de recipientes e equipamentos mal higienizados e a ausência de tratamento térmico adequado ao final do processamento do prato cárneo. Essas práticas resultam em aumento do risco de contaminação dos alimentos.

A frequência com que o microrganismo foi detectado nas amostras de ar ambiente e de superfícies sugere uma importante distribuição de *B. cereus* nos ambientes dos serviços de alimentação. A identificação de cepas produtoras de enterotoxinas, tanto em amostras ambientais como em amostras de alimentos, comprova que a contaminação dos alimentos em serviços de alimentação pode ocorrer a partir de diferentes fontes.

A pesquisa permitiu constatar que tanto o controle do microrganismo no ambiente como o processamento adequado dos alimentos, são fundamentais para a redução dos riscos de doenças de origem alimentar associadas ao microrganismo.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Os autores agradecem ao Prof. Dr. Tomomasa Yano (Instituto de Biologia, UNICAMP) pelo auxílio nas análises da PCR.

5 Referências bibliográficas

ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 145-155, dec. 1995.

APHA (American Public Health Association). Microbiological monitoring of the food processing environment. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3th. ed., Washington, 2001. Chap. 3, p.51-75.

ASANO, S.I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUCA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, mar. 1997.

BACHHIL, V. N.; JAISWAL, T. N. *Bacillus cereus* in meats: incidence, prevalence and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 371-372, nov./dec. 1988.

BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1778-1784, may 1991.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well control measures. **Meat Science**, v. 62, n. 2, p. 381-390, nov. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RDC nº12, de 12.01.01: regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rdc.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2002.

FROEHLICH, A.; GIOMBELLI, A. Ocorrência de bactérias aeróbias mesófilas e de *Bacillus cereus* em pimenta-do-reino. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 66-69, jun. 2002.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 129-134, feb. 2002.

GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: RIEMANN, H.; BRYAN, L. F., eds. **Foodborne Infections and intoxications**. 2 ed. New York: Academic Press, 1979. p. 495-518.

GOEPFERT, J. M.; SPIRA, W. M.; KIM, H. U. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 35, n. 4, p. 213-226, 1972.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 61S-66S, Symposium Supplement 1994.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, n. 2, p. 223-228, dec. 1997.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.177, n. 2, p. 225-229, aug. 1999.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 185-189, jan. 2001.

HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready to serve foods. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 5, p. 372-374, may 1991.

HEIRICHS, J. H.; BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterisation of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 6760-6766, 1993.

KONUMA, H.; SHINAGAWA, K.; TOKUMARO, M.; ONOUE, Y.; KONNO, S.; FUJINO, N.; SHIGEHISA, T.; KURATA, H.; KUWABARA, Y.; LOPES, C. A. M. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat products additives. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 4, p. 324-326, apr. 1988.

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

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M. P., ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 21-69.

LUND, T., DE BUYSER, M. L., GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v.38, n. 2, p.254– 261, oct. 2000.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, aug. 1996.

MENDES, R. A.; AZEREDO, R. M. C.; COELHO, A. I. M.; OLIVEIRA, S. S.; COELHO, M. S. L. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição**, v. 7, n. 2, p. 255-261, abr/jun. 2004.

NORTJÉ, G. L.; VOSTER, S. M.; GREEBE, R. P.; STEYN, P. L. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South Africa retail meats. **Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 213-217, jun. 1999.

PEREIRA, M. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. C.; PRADO, J. C. A. Contagem, isolamento e identificação de *Bacillus cereus* em condimentos preparados, utilizados em embutido cárneo (mortadela). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 137-140, set.-dez. 1999.

RHODEHAMEL, E. J.; HARMON, S. M. *Bacillus cereus*. In: FDA. **Bacteriological Analytical Manual**. 8 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists International. 1998. Chapt. 14, p. 14.01-14.08.

RYAN, P. A .; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A . Molecular cloning and characterisation of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2551-2556, apr. 1997.

SAMBROOK, J.; FRISTH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Lab Press, 1989. Chap. 6.

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

SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 2ºed. Livraria Varela, 1997, 385 p.

SOUZA, C. L.; JOELLE, M. R. S. P.; SILVA, E. C.; OLIVEIRA, R. I. S. R. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de carne bovina moída em açougues do município de Macapá/AP. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 72, p. 60-65, maio 2000.

SOUZA, J. C. R.; BARROS, G. C.; MEMDES, E. S.; MENDES, P. P.; ALVES, C. A. B. Perfil microbiológico de alguns condimentos mais comercializados na grande Recife-PE. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Porto Alegre/RS, 2002. **Anais**, 2002. p. 1415-1418.

VALERO, M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, L. A.; FERNÁNDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 491-499, oct. 2002.

CAPÍTULO IV

CRESCIMENTO DE *Bacillus cereus* PRODUTORES DE ENTEROTOXINAS EM SUBSTRATO CÁRNEO A 10 E 30°C

Artigo redigido segundo as normas de publicação da revista *Food Control*, para a qual será submetido para publicação.

CRESCIMENTO DE *Bacillus cereus* PRODUTORES DE ENTEROTOXINAS EM SUBSTRATO CÁRNEO A 10 E 30°C

RESUMO

O comportamento de *Bacillus cereus* produtores de enterotoxinas em carne foi investigado através da inoculação de suspensões de esporos de cinco culturas em substrato cárneo (pH 5,8), estocado a 10 e 30°C. As populações bacterianas foram avaliadas em diferentes tempos através de contagens em placas contendo ágar nutriente. Todas as culturas apresentaram crescimento a 30°C, com tempo de geração variando entre 28,8 e 36,0 min. A 10°C, três culturas apresentaram crescimento, com tempo de geração entre 10,16 e 28,38 h. Considerando-se os resultados, concluiu-se que a carne mantida em temperaturas abusivas é propícia ao desenvolvimento do microrganismo.

Palavras chave: *Bacillus cereus*, enterotoxinas, carne, crescimento.

1 Introdução

Bacillus cereus é um microrganismo formador de esporos capaz de desenvolver-se em uma ampla faixa de temperatura, pH e atividade de água (Van Netten; Kramer, 1992). Essa bactéria, freqüentemente associada a doenças de origem alimentar (Borge *et al.*, 2001), pode ser encontrada no ambiente natural (solo, água e ar) e isolada em diversos alimentos, incluindo carne e produtos cárneos (Konuma *et al.*, 1988).

Algumas enterotoxinas produzidas por *B. cereus* são causadoras de diarreia de origem alimentar, caracterizada como "síndrome diarreica" (McKillip, 2000; Lund *et al.*, 2000). Esta síndrome pode ser associada à produção de cinco

diferentes proteínas: enterotoxina hemolisina BL (HBL) (Beecher; MacMillan, 1991); enterotoxina não-hemolítica (NHE) (Lund; Granum, 1996); citotoxina K (Cyt K) (Lund *et al.*, 2000); enterotoxina T (BcET) (Agata *et al.*, 1995) e enterotoxina FM (Ent FM) (Asano *et al.*, 1997). Os sintomas podem ser observados por um período de 12 a 24 h e consistem em dor abdominal, diarreia aquosa e náuseas (Granum, 1994). Acredita-se que as enterotoxinas sejam produzidas principalmente no intestino delgado do indivíduo (Granum, 1997).

Alimentos associados aos surtos de diarreia por *B. cereus* incluem, freqüentemente, alimentos ricos em proteínas (Valero *et al.*, 2002). Pesquisadores enfatizam a importância da presença do microrganismo ou de seus esporos em carne e produtos cárneos para a ocorrência desses surtos (Bachhil; Jaiswal, 1988; Nortjé *et al.*, 1999). Práticas como o resfriamento inadequado após o tratamento térmico e a estocagem em temperaturas impróprias ao longo do processamento do alimento, são apontadas como os principais fatores que contribuem para a veiculação do microrganismo nesses alimentos (Harmon; Kautter, 1991; Nortjé *et al.*, 1999).

Com o objetivo de investigar o crescimento de *B. cereus* produtor de enterotoxinas em carne processada, o presente trabalho foi realizado utilizando-se culturas do microrganismo de diferentes origens (alimentar e ambiental) inoculadas experimentalmente em substrato cárneo mantido a 10 e 30°C.

2 Material e métodos

Microrganismos e condições de cultivo

No experimento foram utilizadas quatro culturas de *B. cereus* produtoras de enterotoxina, isoladas de amostras coletadas durante o processamento de prato cárneo em um restaurante institucional. As culturas, isoladas de ar ambiente (BcA), superfície de equipamento (BcE), condimento (BcS) e carne processada (BcM), foram confirmadas e identificadas como *B. cereus* conforme metodologia

recomendada pela *Food and Drug Administration* (1998). Além dessas, utilizou-se uma cepa de referência produtora de toxina diarréica (*B. cereus* NCTC 11145). O potencial toxigênico das cinco culturas foi confirmado através do *Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay* (kit BDE, vs MS2207 05/01; Tecra, Roseville New South Wales, Austrália), realizado conforme as instruções do fabricante. Após a identificação, as culturas foram estocadas em ágar nutriente (*Nutrient agar*, Merck) a 4°C.

Antes de serem utilizadas no experimento, cada uma das culturas estoque de *B. cereus* foi submetida a ativação celular através da inoculação em 10 ml de caldo BHI (*Brain heart infusion broth*; Difco; pH 7,4) a 30°C. Este procedimento foi repetido sucessivamente por três vezes, com a transferência de uma alçada das culturas a cada 18 h.

Suspensões de esporos

As suspensões de esporos das culturas foram preparadas conforme metodologia descrita na literatura (Mahakarnchanakul; Beuchat, 1999; Valero *et al.*, 2000; Borge *et al.*, 2001; Del Torre *et al.*, 2001). Após a ativação celular em caldo BHI, as culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio para esporulação (ágar nutriente suplementado com 0,05% de sulfato de manganês) e incubadas a 30°C por 4 dias, quando a formação de esporos foi confirmada através de exame microscópico. Com auxílio de alça drigalski e adicionando-se 10 ml de água Milli Q, a massa das culturas, com 85% ou mais de esporulação, foi removida assepticamente da superfície do meio de cultivo. O volume total das suspensões de cada uma das culturas foi transferido para um tubo esterilizado, seguido da centrifugação a 5000 x g (6°C/20 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em água Milli Q e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido por cinco vezes, sendo o *pellet* resultante ressuspenso em água Milli Q e estocado a 4°C.

Antes da inoculação no substrato cárneo, as suspensões de esporos de *B. cereus* foram submetidas a choque térmico a 75°C por 10 min e padronizadas quanto à concentração de esporos (aproximadamente 10^4 esporos/ml). Essa padronização foi realizada através de diluições decimais sucessivas em tampão fosfato (*Butterfield's phosphate-buffered dilution water*, pH 7,2), inoculação e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de Petri contendo ágar nutriente, incubadas a 30°C por 24 h. A pureza das suspensões foi verificada através da inoculação em meio seletivo para *B. cereus* (ágar MYP; *Mannitol yolk polymixin agar*; Difco).

Substrato cárneo, inoculação e enumeração de B. cereus

O crescimento das culturas de *B. cereus* foi estudado em triplicata, através da inoculação das suspensões de esporos em substrato cárneo mantido a 10 e 30°C. Aproximadamente 1 kg de lagarto bovino (músculo *semitendinosus*), obtido no mercado local varejista, foi esterilizado em autoclave sob pressão (111°C a 115°C/1 h), resfriado e armazenado a 4°C por cerca de 18 h. O pH da carne cozida foi determinado utilizando-se pHmetro (*Micronal*; modelo B-374).

Amostras da carne (10 g) foram pesadas assepticamente em bolsas estéreis para *stomacher* (modelo 400; *Stomacher Labsystem Circulator Bag* 6141) e pré-incubadas a 10 ou 30°C por cerca de 1 h antes da inoculação. Em seguida, as amostras foram inoculadas com 1 ml das suspensões de esporos (aproximadamente 10^4 esporos/ml), homogeneizadas manualmente por 15 s e incubadas a 10 e 30°C.

No experimento a 10°C as amostras inoculadas foram incubadas por 7 dias, com análise após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de incubação. No experimento a 30°C, a análise das amostras foi realizada nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h de incubação. Para a contagem bacteriana, 90 ml de tampão fosfato estéril foram adicionados às amostras para a homogeneização em *stomacher* (*Stomacher 400 Circulator*; Seward) a 200 rpm por 1 min. A população de *B. cereus* foi determinada através de diluições decimais apropriadas e inoculações (0,1 ml) em

duplicata, em placas contendo ágar nutriente e incubadas a 35°C por 20-24 h. A ausência de contaminação das amostras inoculadas foi verificada utilizando-se regularmente um meio seletivo para *B. cereus* (ágar MYP; Difco). Um controle negativo (amostra não inoculada) foi utilizado em cada um dos experimentos para verificar a ausência de contaminantes. Estes controles foram analisados após o período de incubação.

Tempo de geração

O tempo de geração (g) do microrganismo em substrato cárneo foi calculado através do coeficiente angular da reta de regressão, resultante dos valores médios das contagens bacterianas verificados nas três repetições dos experimentos, considerando-se a fase de crescimento exponencial bacteriano. A equação utilizada ($g = 0,301/\text{coeficiente angular}$) foi descrita por Madigan *et al.* (1997).

3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada calculando-se as médias das contagens bacterianas das três repetições dos experimentos, com os respectivos erros-padrão.

4 Resultados e discussão

Através dos resultados obtidos no presente estudo foi possível observar que a germinação dos esporos de *B. cereus* em substrato cárneo ocorreu tanto a 10 como a 30°C. Todas as culturas de *B. cereus* apresentaram crescimento a 30°C, sendo que nesta temperatura a população bacteriana aumentou em cerca de 5 unidades logarítmicas após 12 h de incubação (Figura 1). No experimento a 10°C, três culturas (BcA, BcE e BcS) apresentaram crescimento, com aumento máximo de 4,3 unidades logarítmicas após 168 h de incubação (Figura 2).

De modo geral, cepas típicas de *B. cereus* são mesófilas, multiplicando-se a temperaturas entre 10 e 48°C, com faixa ótima situada entre 28 e 35°C (Gilbert, 1979). Segundo a literatura, em temperaturas entre 5 e 10°C algumas cepas psicrófilas e mesófilas de *B. cereus* são capazes de atingir populações próximas à 10⁶ UFC/g e produzir toxinas em alimentos (Christiansson *et al.*, 1989; Dufrenne *et al.* 1995; Van Netten *et al.*, 1990). O pH do substrato cárneo utilizado neste estudo foi 5,80. Estudos atestam que *B. cereus* é capaz de apresentar crescimento em substratos com valores de pH entre 4,3 e 9,0 (Lund, 1990).

Considerando-se os resultados obtidos, calculou-se o tempo de geração (*g*) bacteriano nas diferentes temperaturas (Tabela 1). No experimento a 30°C, o tempo de geração do microrganismo variou entre 0,48 e 0,60 h. Harmon e Kautter (1991), em estudo com alimentos prontos para o consumo mantidos a 26°C; e Valero *et al.* (2000), em pesquisa em caldo nutriente a 30°C, relataram tempos de geração superiores aos obtidos no presente estudo: entre 0,72 e 0,97 h e entre 0,69 e 1,09 h, respectivamente. Possivelmente, estas variações são determinadas por interações entre as características da cepa testada e fatores extrínsecos, como temperatura, pH e substrato em que o microrganismo é mantido. Em estudos sobre o comportamento de *B. cereus*, foram relatadas variações quanto às taxas de germinação, crescimento, produção de toxinas e destruição do microrganismo ou de seus esporos (Raevuori; Genigeorgis, 1975; Johnson *et al.*, 1983; Benedict *et al.*, 1993; Singh; Narayan, 1994, Valero *et al.*, 2000).

No experimento a 10°C, o tempo de geração oscilou entre 10,16 e 28,38 h (Tabela 1). Estes valores são superiores aos relatados em outros experimentos com cepas de *B. cereus* mantidas em caldo BHI a baixas temperaturas. Benedict *et al.* (1993) relataram valores de tempo de geração entre 5,17 e 7,04 h em experimento em caldo BHI a 12°C, com cepas de *B. cereus* produtoras de toxinas emética e diarréica isoladas de alimentos. Borge *et al.* (2001) relataram valores de tempo de geração entre 6,7 e 13,1 h com isolados enterotoxigênicos provenientes de produtos lácteos e cárneos, incubados em caldo BHI a 7°C.

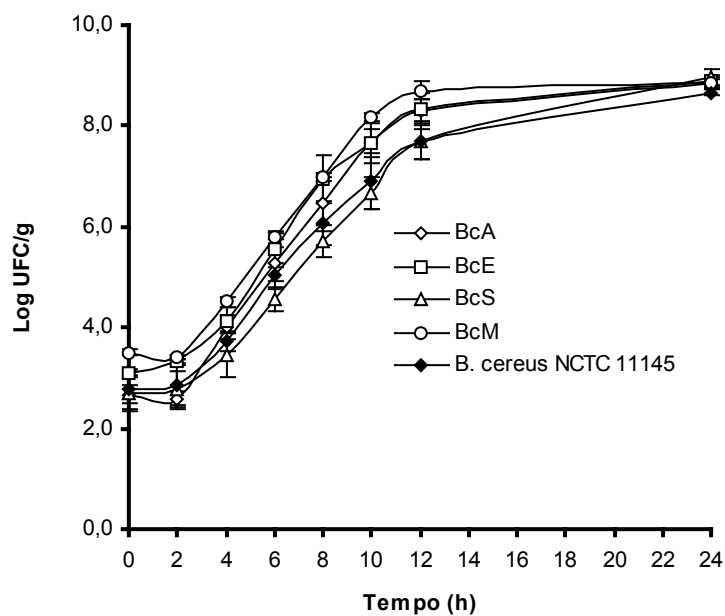


Figura 1 Crescimento de *B. cereus* em substrato cárneo a 30°C. Os símbolos representam as médias ($\pm$ erro-padrão) das três repetições dos experimentos. As barras de erros-padrão não aparecem quando os símbolos são maiores do que os valores de erros-padrão.

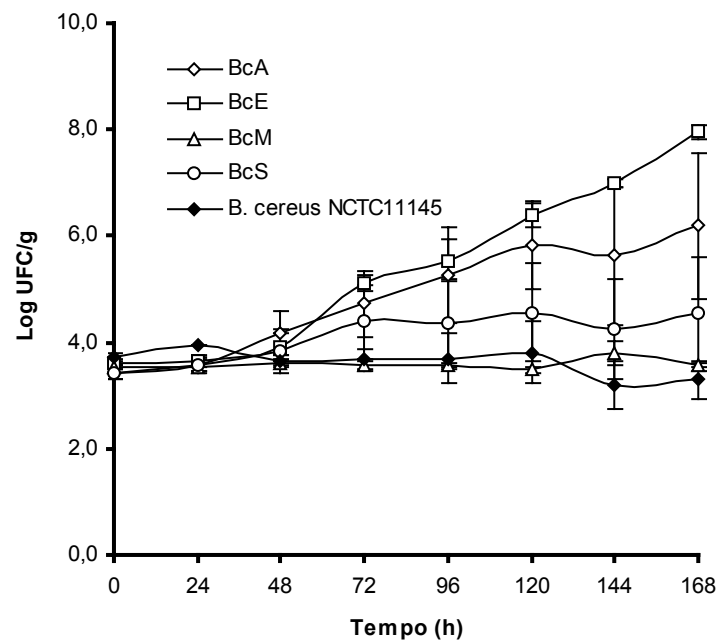


Figura 2 Crescimento de *B. cereus* em substrato cárneo a 10°C. Os símbolos representam as médias ($\pm$ erro-padrão) das três repetições dos experimentos. As barras de erros-padrão não aparecem quando os símbolos são maiores do que os valores de erros-padrão.

Tabela 1 Tempo de geração (g) em horas, para *B. cereus* em substrato cárneo mantido a 10 e 30°C

Cultura	Tempo de geração*	
	a 10°C	a 30°C
BcA	12,97 (0,999)	0,48 (0,999)
BcE	10,16 (0,970)	0,52 (0,988)
BcS	28,38 (0,890)	0,60 (0,994)
BcM	nc	0,50 (0,999)
<i>B. cereus</i> NCTC 11145	nc	0,58 (0,994)

* g (R²)

nc: não foi observado crescimento

5 Conclusão

Alimentos ricos em proteínas, como a carne e produtos cárneos, têm sido associados a surtos diarreicos de origem alimentar causados por *B. cereus*. No presente estudo, os resultados obtidos confirmam a adequação da carne a 30°C como substrato para o crescimento de *B. cereus* produtor de enterotoxinas. No experimento a 10°C, a constatação de crescimento de algumas culturas do microrganismo é relevante e deve ser considerada para minimizar o risco potencial de veiculação do microrganismo em carne exposta a temperaturas abusivas. A germinação dos esporos e aumento da população a 10°C ressalta a importância do controle do binômio tempo e temperatura durante o processamento dos alimentos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na realização deste estudo.

Referências bibliográficas

- AGATA, N.; OTHA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. **Microbiology Reading**, v. 141, n. 4, p. 983-988, apr. 1995.
- ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 145-155, dec. 1995.
- ASANO, S.I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUCA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, mar. 1997.
- BACHHIL, V. N.; JAISWAL, T. N. *Bacillus cereus* in meats: incidence, prevalence and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 371-372, nov./dec. 1988.
- BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1778-1784, may 1991.
- BENEDICT, R. C.; PARTRIDGE, T.; WELLS, D.; BUCHANAN, R. L. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 3, p. 211-214, mar. 1993.
- BORGE, G. A.; SKEIE, M.; SORHAUG, T.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P. E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 237-246, sept. 2001.
- CHRISTIANSSON, A.; NAIDA, A. S.; NILSSON, I.; WADSTRÖM, T.; PETTERSON, H. E. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolated in milk at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p.2595-2600, oct. 1989.
- DEL TORRE, M.; DELLA CORTE, M.; STECCHINI, M. L. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n.3, p. 199-207, feb. 2001.
- DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 2/3, p. 175-183, oct. 1995.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological analytical manual** (8th) Gaithersburg: FDA, 1995.

GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: RIEMANN, H.; BRYAN, L. F., eds. **Foodborne Infections and intoxications**. 2 ed. New York: Academic Press, 1979. p. 495-518.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L.R. MONTVILLE, T.J. (Eds.), **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 327–336.

HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready to serve foods. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 5, p. 372-374, may 1991.

JOHNSON, K. M.; NELSON, C. L.; BUSTA, F. F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and rice. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 1, p. 286-287, jan./feb. 1983.

KONUMA, H.; SHINAGAWA, K.; TOKUMARO, M.; ONOUE, Y.; KONNO, S.; FUJINO, N.; SHIGEHISA, T.; KURATA, H.; KUWABARA, Y.; LOPES, C. A. M. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat products additives. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 4, p. 324-326, apr. 1988.

LUND, B. M. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. **The Lancet**, v. 336, n. 8721, p. 982-986, oct. 1990.

LUND, T., DE BUYSER, M. L., GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v.38, n. 2, p.254– 261, oct. 2000.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, aug. 1996.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms** (8th). New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 1997.

MAHAKARNCHANAKUL, W.; BEUCHAT, L. R. Effect of shift in growth temperature on tolerance of psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* to heat and sodium chloride. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 57-64, 1999.

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

NORTJÉ, G. L.; VOSTER, S. M.; GREEBE, R. P.; STEYN, P. L. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South Africa retail meats. **Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 213-217, jun. 1999.

RAEVUORI, M.; GENIGEORGIS, C. Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. **Applied Microbiology**, v. 29, n.1, p. 68-73, jan. 1975.

SINGH, D. K. ; NARAYAN, K. G. Effect of hydrogen ion concentration and sucrose on enterotoxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 338-340. 1994.

VALERO, M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, L. A.; FERNÁNDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 491-499, oct. 2002.

VALERO, M.; LEONTIDIS, S.; FERNÁNDEZ, P. S., MARTÍNEZ, A.; SALMERÓN M. C. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 605-612, dec. 2000

VAN NETTEN, P.; KRAMER, J. M. Media for detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 17, p. 85-99, 1992.

VAN NETTEN, P.; VAN DE MOOSDIJK, A. P.; VAN HOENSEL, P.; MOSSEL, D. A. A.; PERALES, I. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal Applied Bacteriological**, v. 69, p.73-79. 1990.

CONCLUSÃO GERAL

A presença de *B. cereus* na maioria das amostras ambientais analisadas confirma a ampla distribuição do microrganismo no ambiente dos restaurantes institucionais pesquisados. A identificação de isolados potencialmente produtores de toxinas diarréicas no ar ambiente e nas superfícies de bancadas, equipamentos e de recipientes, realizada através da PCR e do teste imunoenzimático BDE-VIA (Tecra), atesta a importância da contaminação ambiental como fonte de contaminação para os alimentos processados em serviços de alimentação. A diversidade na distribuição dos fatores de virulência observada através da PCR sugere a heterogeneidade genotípica do microrganismo presente no ambiente.

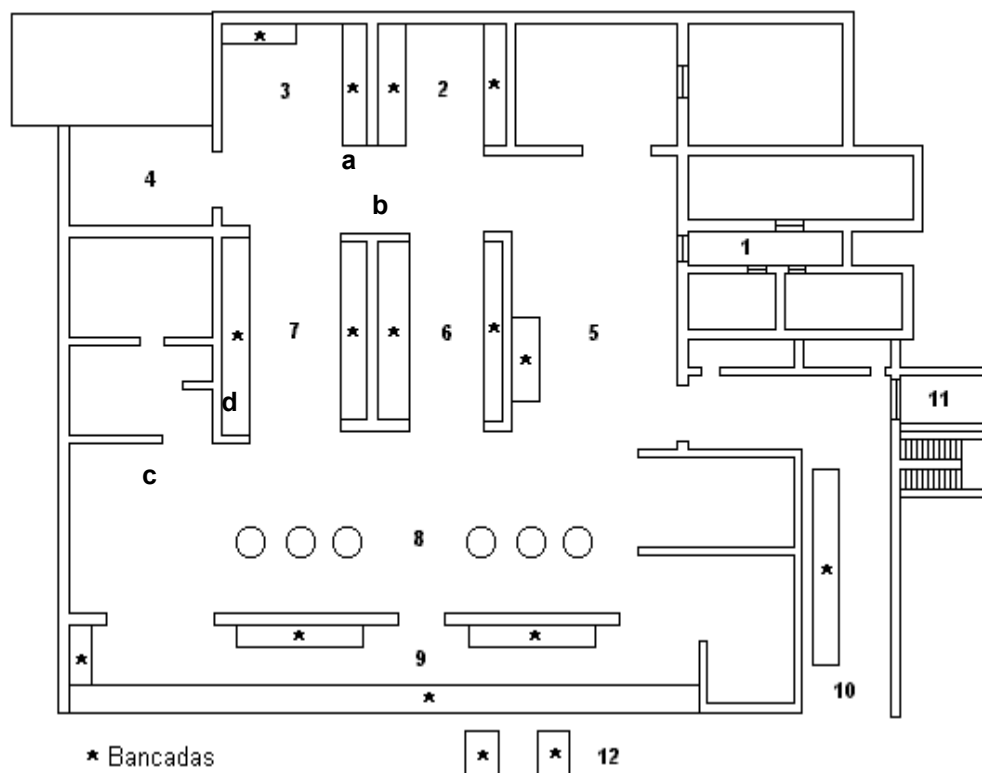
Durante as operações de preparo dos pratos cárneos foram observadas algumas práticas que favorecem a contaminação, o crescimento e a persistência de *B. cereus* no alimento, a partir da contaminação ambiental. Dentre estas atividades destacam-se a exposição do alimento ao ar ambiente por tempo prolongado, a exposição do alimento a temperaturas abusivas, o uso de recipientes e equipamentos mal higienizados, e a aplicação de tratamentos térmicos sem um controle rigoroso dos parâmetros de tempo e temperatura. O controle de *B. cereus* no ambiente é fundamental para a redução da contaminação dos alimentos e, conseqüentemente, dos riscos de doenças de origem alimentar causadas pelo microrganismo.

A pesquisa do comportamento do microrganismo em inoculações em substrato cárneo, revela a condição favorável da carne como substrato para o crescimento de *B. cereus* produtor de enterotoxinas, desde que o alimento seja exposto a temperaturas abusivas. Sendo assim, durante o processamento de alimentos à base de carne, medidas de controle devem ser tomadas nas etapas subseqüentes ao cozimento, garantindo que a de contaminação por *B. cereus* seja

mantida baixa e, conseqüentemente, os riscos de desenvolvimento de doenças de origem alimentar associadas ao microrganismo sejam minimizados.

APÊNDICES

Apêndice A Croqui do restaurante R1



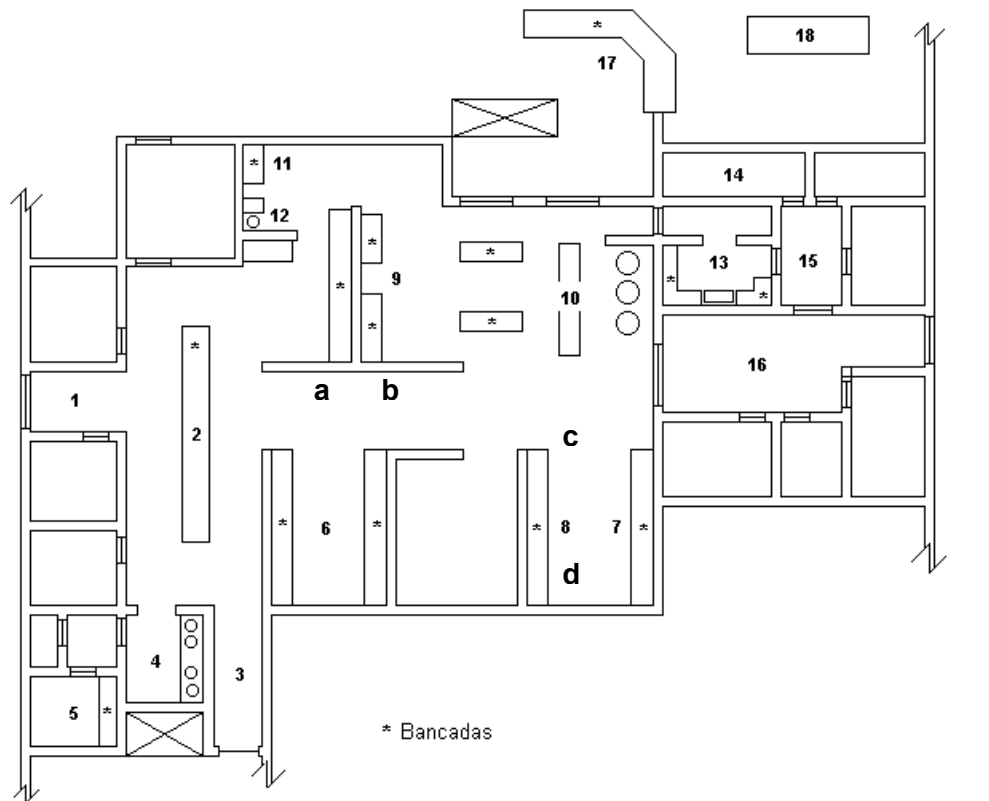
Áreas:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. antecâmara | 7. carnes preparadas |
| 2. pré preparo de vegetais | 8. cocção |
| 3. distribuição de marmitas | 9. distribuição |
| 4. almoxarifado | 10. manipulação de talheres |
| 5. recepção de gêneros | 11. monta-cargas |
| 6. pré preparo de carnes | 12. self-service |

Equipamentos:

- | | |
|---------------------------|---------------|
| a: descascador de legumes | c: triturador |
| b: multiprocessador | d: fatiadores |

Apêndice B Croqui do restaurante R2



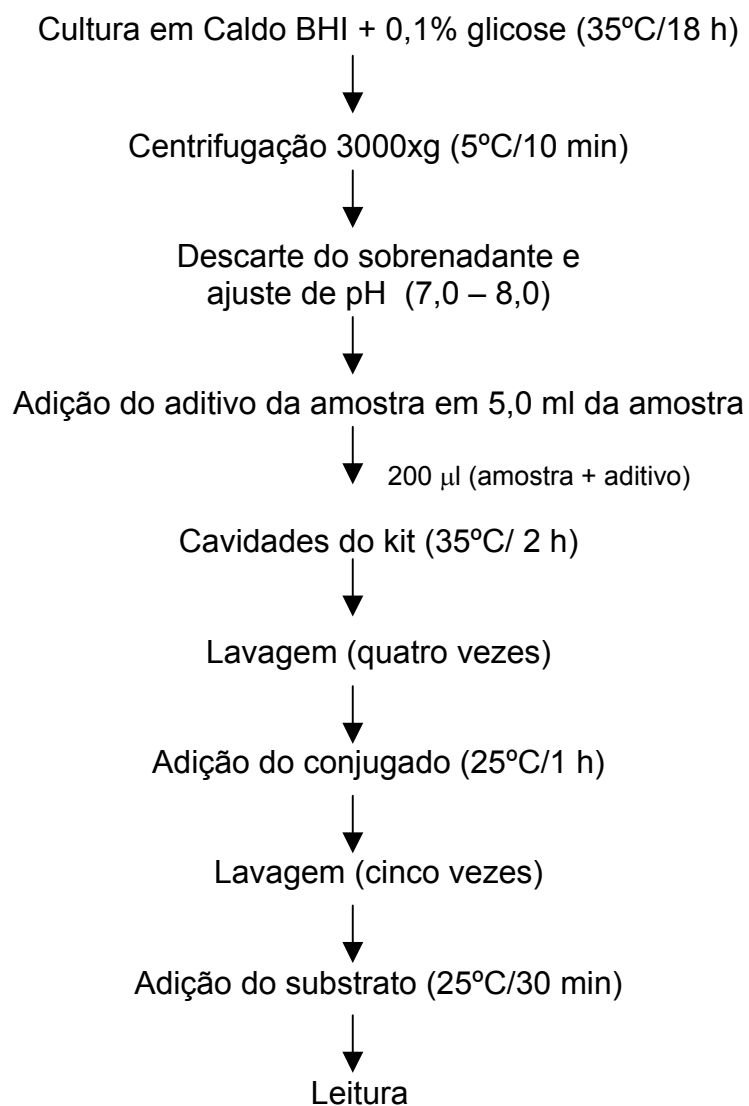
Áreas:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1. entrada de funcionários | 10. cocção |
| 2. distribuição de refeições especiais | 11. cozinha dietética – pré-preparo |
| 3. carros de distribuição de refeições especiais | 12. cozinha dietética – preparo |
| 4. preparo de sucos, chás, etc | 13. pré preparo de carnes |
| 5. preparo de dietas especiais | 14. câmara de resfriamento de carnes |
| 6. pré preparo de vegetais | 15. antecâmara |
| 7. seleção de cereais | 16. recepção de gêneros |
| 8. preparo de sobremesas | 17. distribuição |
| 9. preparo de massas | 18. <i>self-service</i> |

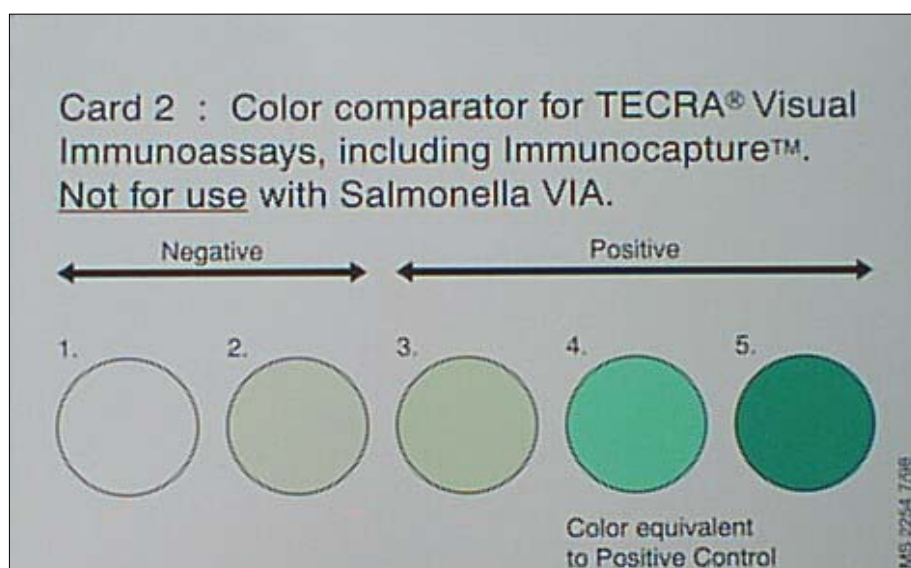
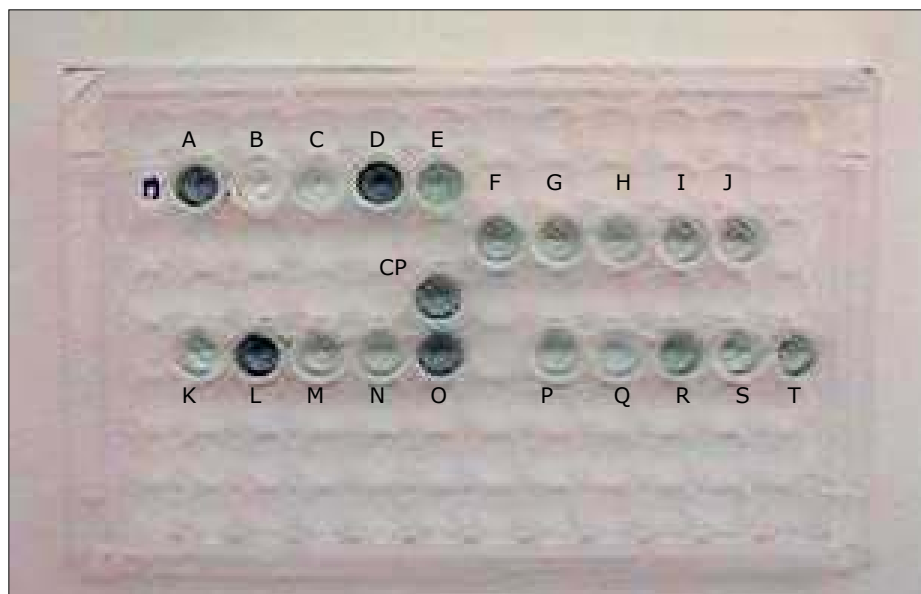
Equipamentos:

- a: multiprocessador
b: descascador de legumes
c: cortadores de legumes
d: fatiadores

Apêndice C Procedimento de uso do BDE-VIA (Tecra)



Apêndice D Resultados do teste BDE-VIA (Tecra) com isolados de *B. cereus*



Legenda: CP: controle positivo (leitura >3); A, D, E, F, G, K, L, O, R, S, e T: reações positivas (isolados n° 82, 188, 103, 146, 214, 165, 05, 158, 66, 74 e 01, respectivamente); B, C, H, I, J, M, N, P e Q: reações negativas (isolados n° 181, 11, 202, 208, 99, 24, 173, 169 e 184, respectivamente).

Apêndice E Contagens de *B. cereus* em amostras ambientais coletadas nos restaurantes R1 e R2 (Capítulo II)

Tabela E1 Contagens de *B. cereus* em amostras de ar ambiente do restaurante R1, segundo o local de coleta.

Área de coleta	Contagem (UFC/m ³)		
	1° Repetição	2° Repetição	3° Repetição
Antecâmara	4,0	10,6	nc
Pré preparo de vegetais	16,0	14,4	8,0
Distribuição de marmitas	13,6	16,8	9,0
Almoxarifado	14,0	12,0	10,0
Recepção de gêneros	2,0	10,6	nc
Pré preparo de carnes	2,0	16,0	10,0
Carnes preparadas	6,0	19,2	2,0
Cocção	17,6	38,4	18,0
Distribuição	28,0	11,2	16,8
Manipulação de talheres	8,0	24,0	nc
Monta-cargas	2,0	9,0	12,0
<i>Self-service</i>	16,0	12,0	27,6

nc: ausência de colônia característica de *B. cereus*

UFC: unidade formadora de colônia

Tabela E2 Contagens de *B. cereus* em amostras de ar ambiente do restaurante R2, segundo o local de coleta

Área de coleta	Contagem (UFC/m ³)		
	1° Repetição	2° Repetição	3° Repetição
Entrada de funcionários	8,0	5,4	6,0
Distribuição de refeições especiais	nc	8,0	4,0
Carros de distribuição de refeições especiais	6,0	2,0	4,0
Preparo de sucos, chás, etc.	14,0	4,0	3,0
Preparo de dietas especiais	8,0	2,0	2,0
Pré preparo de vegetais	nc	5,0	3,0
Seleção de cereais	nc	10,0	nc
Preparo de sobremesas	nc	8,0	8,0
Preparo de massas	4,0	2,0	2,0
Cocção	6,0	4,0	6,0
Cozinha dietética - pré-preparo	2,0	nc	2,0
Cozinha dietética - preparo	2,0	2,0	2,0
Pré preparo de carnes	nc	2,0	2,0
Câmara de resfriamento de carnes	nc	nc	nc
Antecâmara	2,0	2,0	6,0
Recepção de gêneros	20,0	2,0	8,0
Distribuição	6,0	nc	6,0
<i>Self-service</i>	3,0	4,0	3,0

nc: ausência de colônia característica de *B. cereus*

UFC: unidade formadora de colônia

Tabela E3 Contagens de *B. cereus* em amostras de superfícies de bancadas dos restaurantes R1 e R2, segundo o local de coleta

Bancadas	Contagem (UFC/cm ²)		
	1° Repetição	2° Repetição	3° Repetição
Restaurante R1			
Pré preparo de vegetais	0,07	nc	0,07
Pré preparo de vegetais	0,72	nc	0,14
Pré preparo de carnes	0,80	nc	nc
Pré preparo de carnes	0,22	nc	nc
Cocção	nc	nc	nc
Cocção	0,44	nc	nc
Carnes preparadas	0,07	0,36	2,20
Carnes preparadas	1,32	nc	0,07
Restaurante R2			
Pré-preparo de vegetais	nc	nc	0,14
Pré-preparo de vegetais	nc	nc	0,07
Pré-preparo de carnes	nc	nc	nc
Pré-preparo de carnes	0,07	nc	nc
Cocção	nc	nc	nc
Carnes preparadas	nc	nc	nc
Carnes preparadas	nc	nc	nc
Seleção de cereais	0,07	nc	0,22
Preparo de sobremesas	0,14	nc	0,07
Preparo de massas	nc	nc	nc
Massas	nc	nc	0,56

nc: ausência de colônia característica de *B. cereus*

UFC: unidade formadora de colônia

Tabela E4 *B. cereus* em amostras de superfícies de equipamentos dos restaurantes R1 e R2, segundo o local de coleta

	1° Repetição	2° Repetição	3° Repetição
Restaurante R1			
Multiprocessador	+	nc	+
Descascador de legumes	+	nc	+
Triturador	+	+	+
Fatiador	+	+	+
Fatiador	+	nc	+
Fatiador	nc	nc	+
Restaurante R2			
Multiprocessador	nc	+	+
Multiprocessador	+	nc	nc
Descascador de legumes	+	nc	+
Cortador de legumes	nc	nc	nc
Cortador de legumes	+	nc	nc
Fatiador	+	+	+
Fatiador	nc	nc	+

+: houve identificação de *B. cereus*

Apêndice F Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras ambientais coletadas nos restaurantes R1 e R2 (Capítulo II)

Tabela F1 Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras de ar do restaurante R1

Data da coleta	Área de coleta	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
07nov00	Interio da antecâmara	01	-	-	-	+	-	+	+
08nov00	Interior da antecâmara	48	+	+	-	+	+	+	+
07nov00	Pré preparo de vegetais	05	+	+	+	+	-	+	+
08nov00	Pré preparo de vegetais	53	-	-	-	+	+	-	+
10jan01	Pré preparo de vegetais	158	-	-	+	+	+	+	+
07nov00	Distribuição de marmitas	11	-	+	-	-	-	-	-
08nov00	Distribuição de marmitas	58	+	+	-	+	-	-	+
10jan01	Distribuição de marmitas	163	+	+	-	-	+	-	-
07nov00	Recepção	19	-	+	+	+	+	+	+
08nov00	Recepção	66	+	+	+	+	+	-	+
07nov00	Distribuição	32	+	+	-	+	+	-	-
07nov00	Manipulação de talheres	37	-	-	-	+	+	-	+
08nov00	Manipulação de talheres	92	+	+	+	+	+	-	+
10jan01	Manipulação de talheres	181	-	+	-	+	-	-	-
07nov00	Interior do monta - cargas	41	-	-	-	+	+	-	+

Tabela F1 continuação

Data da coleta	Área de coleta	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
08nov00	Interior do monta - cargas	95	-	-	+	+	+	-	+
10jan01	Interior do monta - cargas	184	+	+	-	+	-	-	-
08nov00	Interior do almoxarifado	63	-	-	-	+	+	-	+
10jan01	Interior do almoxarifado	165	+	+	+	+	+	+	+
08nov00	Pré preparo de carnes	74	-	-	-	+	+	-	+
10jan01	Pré preparo de carnes	169	+	+	-	-	-	-	-
08nov00	Carnes processadas	78	-	+	-	-	-	-	-
10jan01	Carnes processadas	171	+	+	-	-	-	-	-
07nov00	Carnes processadas	24	-	-	-	-	-	-	-
07nov00	Cocção	29	-	-	-	+	+	-	-
08nov00	Cocção	82	+	+	-	+	-	-	+
10jan01	Cocção	173	+	+	-	-	-	-	-
08nov00	<i>Self - service</i>	99	+	+	+	+	+	-	-
10jan01	<i>Self - service</i>	188	-	+	-	+	+	+	+

^a + foi observado produto da PCR com peso esperado; - não foi observado produto da PCR com peso esperado

^b teste imunoenzimático +: coloração >3; -: coloração <3

Tabela F2 Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras de superfícies do restaurante R1

Data da coleta	Superfícies	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
<i>Equipamentos</i>									
28jan02	Multiprocessador	320	+	+	+	+	-	-	+
28jan02	Fatiador	325	-	-	-	-	+	+	-
31jan02	Fatiador	339	-	+	-	-	-	-	-
04fev02	Fatiador	361	-	+	+	-	+	+	+
28jan02	Triturador	328	+	-	+	-	+	+	-
31jan02	Triturador	342	-	-	-	-	+	+	-
04fev02	Descascador de legumes	352	+	-	+	-	-	-	-
<i>Bancadas</i>									
29jan01	Pré preparo de vegetais	216	-	+	-	-	-	-	-
29jan01	Pré preparo de carnes	223	+	+	+	+	-	-	+
29jan01	Carnes processadas	229	+	+	+	+	-	+	+
29jan01	Carnes processadas	230	-	-	-	+	-	+	+
06mai01	Carnes processadas	242	-	+	+	-	-	-	-
29jan01	Cocção	263	-	-	-	+	+	+	+
06mai01	Cocção	264	-	-	-	+	-	+	+

^a + foi observado produto da PCR com peso esperado; - não foi observado produto da PCR com peso esperado

^b teste imunoenzimático +: coloração >3; -: coloração <3

Tabela F3 Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras de ar do restaurante R2

Data da coleta	Área de coleta	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
29nov00	Entrada de funcionários	103	-	+	+	+	+	+	+
29nov00	Corredor	195	+	+	-	-	+	+	+
04dez00	Preparo de dietas especiais	138	-	+	-	+	+	-	+
04dez00	Pré preparo de vegetais	139	-	+	+	+	-	+	+
11jan01	Pré preparo de vegetais	199	-	-	-	+	-	-	-
04dez00	Preparo de sobremesas	146	-	+	+	+	+	+	+
11jan01	Preparo de sobremesas	202	-	-	-	-	-	-	-
04dez00	Cocção	150	-	-	+	+	+	-	-
04dez00	Pré preparo de carnes	152	-	+	+	-	+	-	+
04dez00	Pré preparo de carnes	208	+	+	-	-	-	-	-
04dez00	Interior da antecâmara	153	-	-	+	+	+	-	+
11jan01	Interior da antecâmara	210	-	+	-	-	-	-	-
11jan01	Recepção	212	+	+	+	-	-	-	-
11jan01	Distribuição	213	+	+	-	-	+	-	+
11jan01	Self - service	214	+	+	-	-	+	+	+

^a + foi observado produto da PCR com peso esperado; - não foi observado produto da PCR com peso esperado

^b teste imunoenzimático +: coloração >3; -: coloração <3

Tabela F4 Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras de superfícies do restaurante R2

Data da coleta	Local de coleta	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
<i>Equipamentos</i>									
29jan02	Cortador de legumes	332	+	-	+	+	+	+	+
29jan02	Fatiador	335	+	+	+	-	-	+	+
31jan02	Fatiador	348	+	+	+	+	+	+	+
06fev02	Fatiador	370	+	+	-	+	+	-	+
06fev02	Fatiador	373	+	-	+	-	-	-	-
31jan02	Multiprocessador	344	-	-	-	-	+	-	-
06fev02	Multiprocessador	366	+	+	+	+	-	-	+
<i>Bancadas</i>									
30jan01	Pré preparo de carnes	236	-	-	-	-	-	-	-
28mar01	Pré preparo de vegetais	252	+	+	+	+	+	+	+
28mar01	Seleção de cereais	235	-	-	-	+	+	+	+
28mar01	Preparo de sobremesas	253	-	+	+	-	-	+	-
28mar01	Preparo de massas	272	-	+	+	+	-	-	+

^a + foi observado produto da PCR com peso esperado; - não foi observado produto da PCR com peso esperado

^b teste imunoenzimático +: coloração >3; -: coloração <3

Apêndice G Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras coletadas durante os processamentos de pratos cárneos (Capítulo III)

Tabela G1 Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras coletadas durante o processamento de carne assada

Data da coleta	Local de coleta	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
11set02	Caixa de polietileno	406	+	+	+	+	+	-	+
11set02	Caixa de polietileno	407	-	+	+	+	+	+	+
26set02	Caixa de polietileno	473	-	+	+	+	+	+	+
26set02	Caixa de papelão	468	-	-	-	+	-	+	+
26set02	Caixa de papelão	471	-	-	-	-	+	+	+
11set02	Ar – área de cocção	416	-	+	+	+	+	-	+
11set02	Ar – área de cocção	428	-	+	+	+	+	+	+
11set02	Ar – área de resfriamento	421	-	+	+	+	+	+	+
11set02	Ar – área de resfriamento	422	+	+	+	-	-	-	-
12set02	Ar – área de fatiamento	448	-	+	-	+	+	-	+
12set02	Ar – área de fatiamento	449	+	+	+	+	+	-	-
12set02	Ar – área de fatiamento	450	-	+	+	+	+	+	+
27set02	Ar – área de fatiamento	481	-	+	+	+	+	+	+
12set02	Ar – área de distribuição	443	-	+	-	+	+	-	+
12set02	Ar distribuição	444	+	+	-	-	+	-	+
27set02	Ar distribuição	484	+	+	-	+	-	+	+

Tabela G1 continuação

Data da coleta	Local de coleta	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
12set02	Fatiador	456	-	-	-	-	-	+	+
12set02	Fatiador	457	+	+	+	+	+	+	+
12set02	Fatiador	458	-	-	-	-	-	-	-
11set02	Pimenta	435	-	-	-	+	+	+	+
11set02	Pimenta	436	-	-	-	+	-	+	+
11set02	Orégano	439	-	+	+	+	+	-	+
26set02	Orégano	467	-	-	-	-	-	-	-
26set02	Carne pós resfriamento	475	-	-	-	+	-	+	+
12set02	Carne pós fatiamento	461	+	+	+	+	+	+	+
12set02	Carne pós fatiamento	462	+	+	+	-	+	+	+
12set02	Carne pós fatiamento	463	-	+	+	+	+	+	+
12set02	Carne pós fatiamento	464	-	+	+	+	+	+	+
12set02	Carne pós fatiamento	465	-	+	+	+	+	+	+
12set02	Carne pós fatiamento	466	-	+	+	+	+	+	+
27set02	Carne pós fatiamento	476	+	+	+	+	-	+	+
12set02	Carne - distribuição	451	-	-	-	+	+	-	+
27set02	Carne - distribuição	479	-	-	-	+	+	+	+

^a + foi observado produto da PCR com peso esperado; - não foi observado produto da PCR com peso esperado

^b teste imunoenzimático +: coloração >3; -: coloração <3

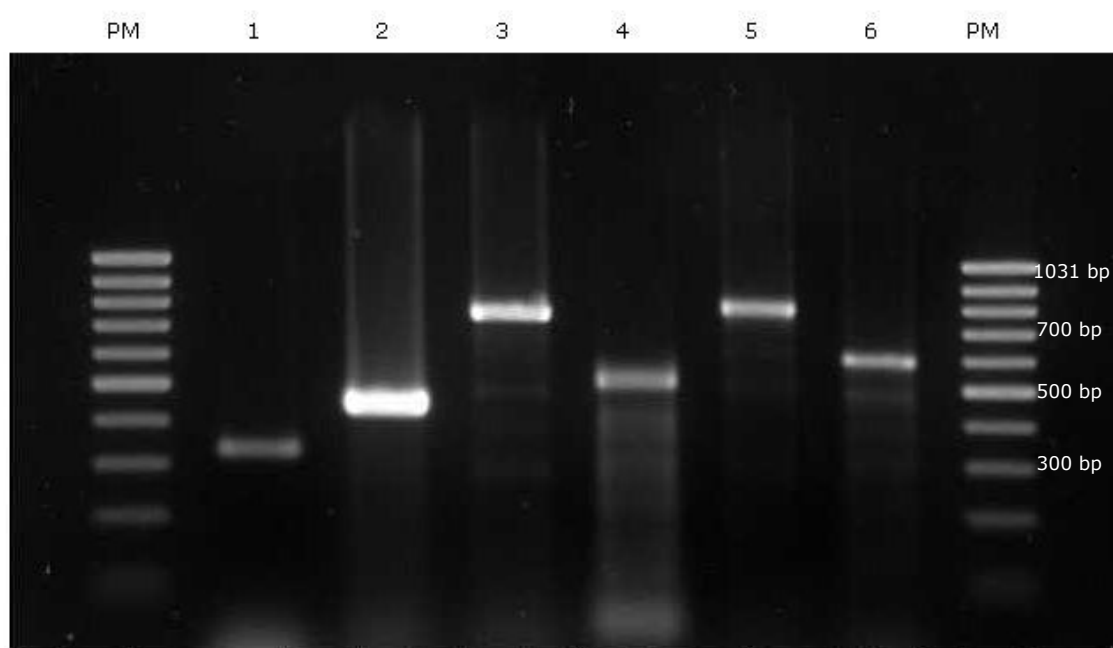
Tabela G2 Resultados da PCR e do BDE - VIA (Tecra) para isolados de *B. cereus* provenientes de amostras coletadas durante o processamento de bife rolê

Data da coleta	Local de coleta	Identificação do isolado	Genes ^a						BDE ^b
			<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
10set01	Caixa plástica	290	+	+	-	+	+	+	+
10set01	Caixa plástica	375	+	-	+	+	+	+	+
10set01	Caixa plástica	376	+	+	+	-	-	+	+
14set01	Ar - area de cocção	293	-	-	-	-	-	-	-
14set01	Ar - area de cocção	294	-	-	-	-	-	-	-
14set01	Ar - area de cocção	395	+	+	-	+	+	-	+
14set01	Ar - área de distribuição	297	-	+	+	+	+	-	+
14set01	Ar - área de distribuição	315	-	+	+	+	-	-	-
14set01	Ar - área de distribuição	316	-	+	+	+	+	+	-
14set01	Ar – interior da câmara fria	374	+	-	-	-	-	-	-
14set01	Ralo de drenagem	302	+	+	+	+	+	+	+
14set01	Ralo de drenagem	399	-	-	-	+	-	-	+
14set01	Ralo de drenagem	400	-	-	-	+	-	-	+
14set01	Cheiro verde	292	+	+	-	+	+	+	+
14set01	Cheiro verde	319	-	+	-	+	-	-	+
14set01	Cheiro verde	385	+	+	-	+	+	-	+
14set01	Cheiro verde	386	+	+	+	+	+	+	+
14set01	Cheiro verde	387	+	+	+	+	-	+	+
14set01	Cebola	382	+	+	-	-	-	-	-
14set01	Orégano	403	+	-	-	-	-	-	-
14set01	Orégano	405	+	+	+	+	-	+	+

^a + foi observado produto da PCR com peso esperado; - não foi observado produto da PCR com peso esperado

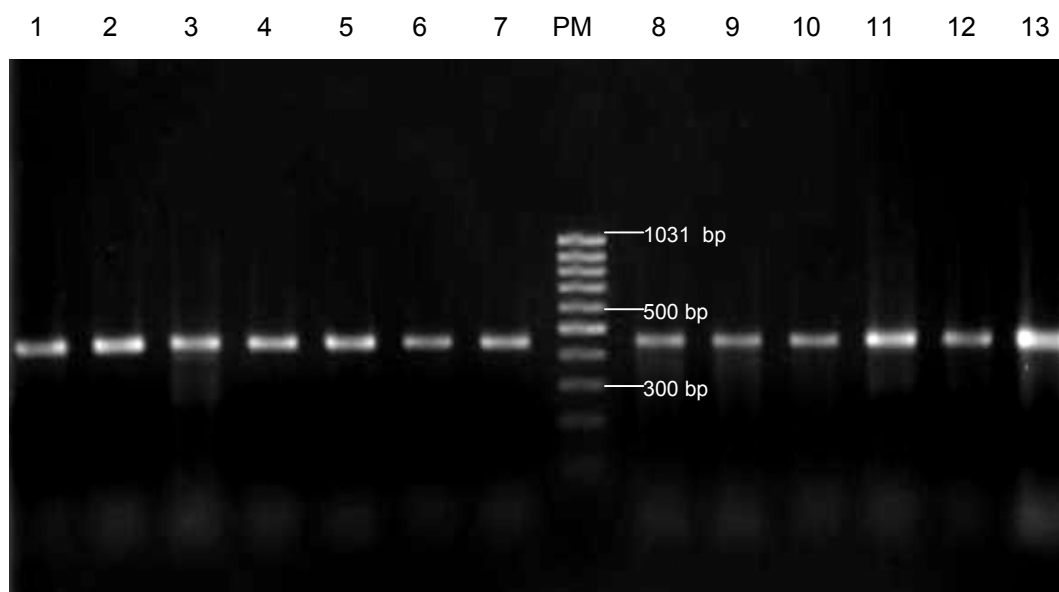
^b teste imunoenzimático +: coloração >3; -: coloração <3

Apêndice H Produtos obtidos através da PCR realizada com isolado de *B. cereus* (isolado n° 348) para detecção dos genes codificadores dos complexos HBL e NHE.



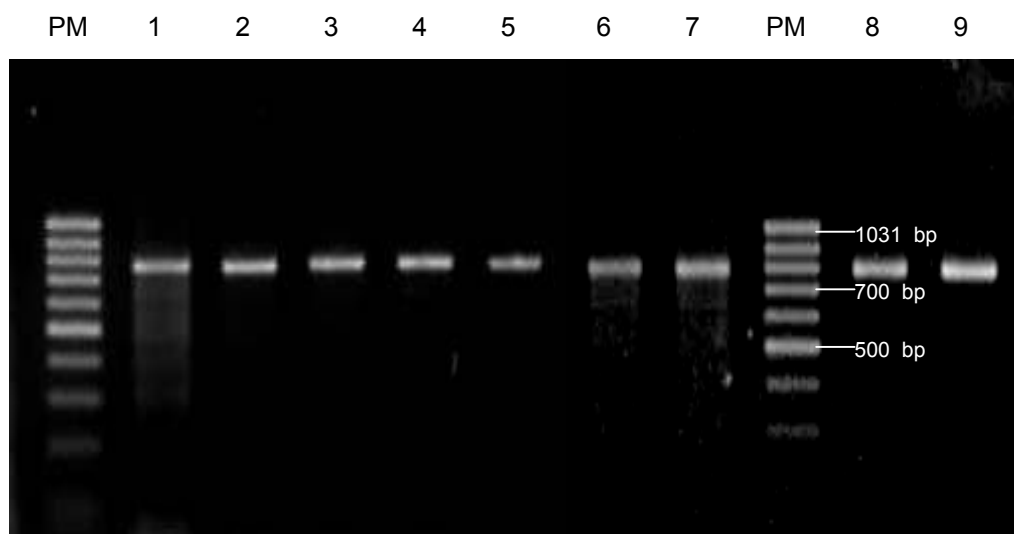
Legenda: PM: marcador 100 bp; 1: positivo para o gene *hblA* (300 bp); 2: positivo para o gene *hblD* (410 bp); 3: positivo para o gene *hblC* (730 bp); 4: positivo para o gene *nheA* (479 bp); 5: positivo para o gene *nheB* (753 bp); 6: positivo para o gene *nheC* (563 bp).

Apêndice I Produtos obtidos através da PCR realizada com isolados de *B. cereus* para detecção do gene *hblD* (410 bp)



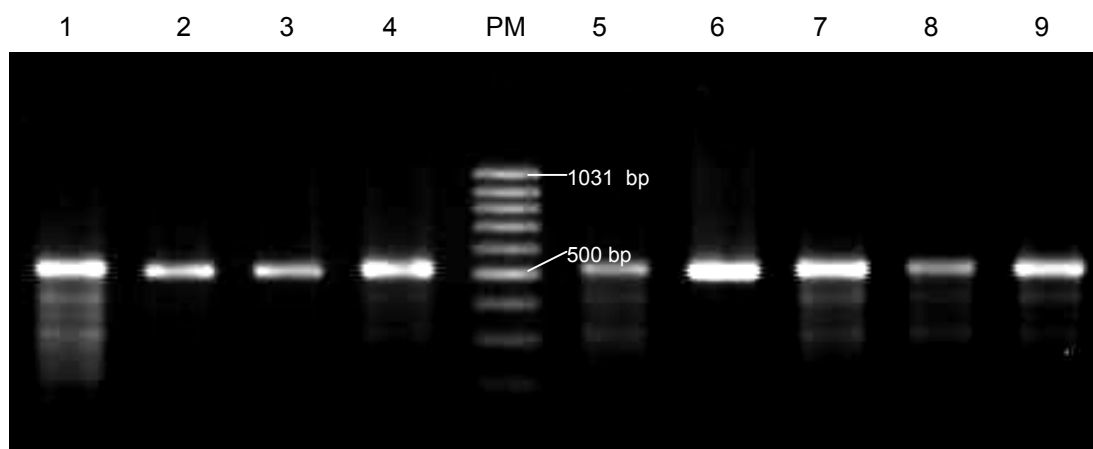
Legenda: PM: marcador 100 bp; 1: isolado n° 66; 2: isolado n° 173 ; 3: isolado n° 361; 4: isolado n° 242; 5: isolado n° 139; 6: isolado n° 208; 7: isolado n° 213; 8: isolado n° 348; 9: isolado n° 252 ; 10: isolado n° 406 ; 11: isolado n° 422 ; 12: isolado n° 461 ; 13: isolado n° 395.

Apêndice J Produtos obtidos através da PCR realizada com isolados de *B. cereus* para detecção do gene *hblC* (730 bp).



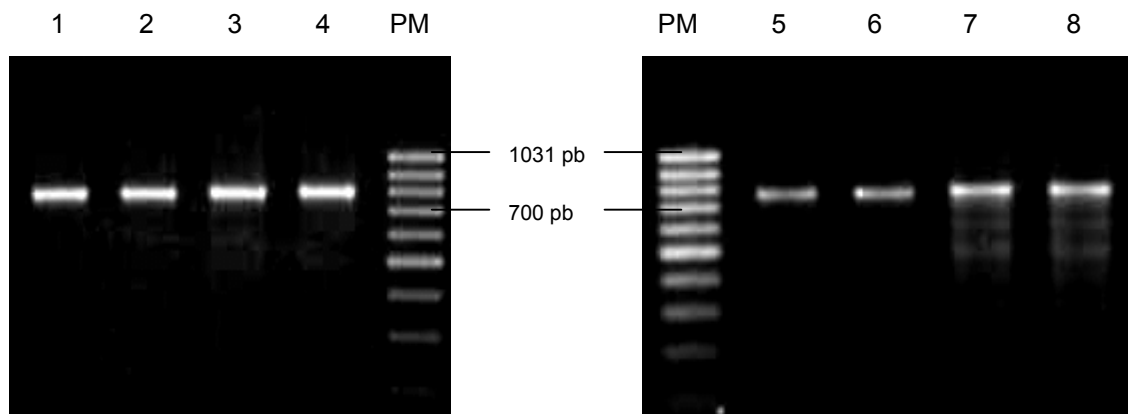
Legenda: PM: marcador 100 bp; 1: isolado n° 158; 2: isolado n° 99 ; 3: isolado n° 361; 4: isolado n° 229; 5: isolado n° 150; 6: isolado n° 272; 7: isolado n° 407; 8: isolado n° 450; 9:isolado n° 465.

Apêndice K Produtos obtidos através da PCR realizada com isolados de *B. cereus* para detecção do gene *nheA* (479 bp).



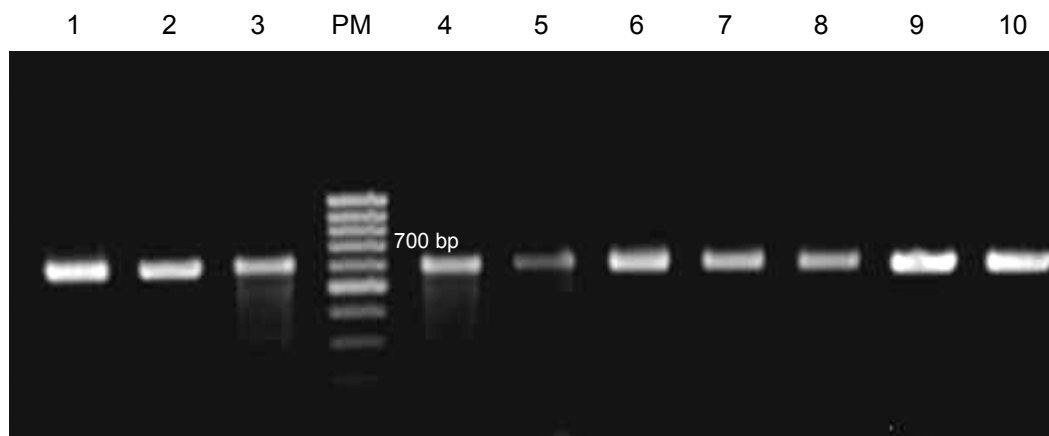
Legenda: PM: marcador 100 bp; 1: isolado n° 473; 2: isolado n° 29 ; 3: isolado n° 297; 4: isolado n° 366; 5: isolado n° 32; 6: isolado n° 387; 7: isolado n° 272; 8: isolado n° 165; 9: isolado n° 05

Apêndice L Produtos obtidos através da PCR realizada com isolados de *B. cereus* para detecção do gene *nheB* (753).



Legenda: PM: marcador 100 bp; 1: isolado n° 165; 2: isolado n° 328 ; 3: isolado n° 252; 4: isolado n° 463; 5: isolado n° 465; 6: isolado n° 188; 7: isolado n° 138; 8: isolado n° 406

Apêndice M Produtos obtidos através da PCR realizada com isolados de *B. cereus* para detecção do gene *nheC* (563 bp)



Legenda: PM: marcador 100 bp; 1: isolado n° 316; 2: isolado n° 435 ; 3: isolado n° 214; 4: isolado n° 19; 5: isolado n° 229; 6: isolado n° 253; 7: isolado n° 466; 8: isolado n° 479; 9: isolado n° 471; 10: isolado n° 332.

Apêndice N Contagens de *B. cereus* em substrato cárneo (Capítulo IV)

Tabela N1 Contagens de *B. cereus* (UFC/g) em substrato cárneo mantido a 30°C

Cultura*	Tempo de incubação (horas)							
	0	2	4	6	8	10	12	24
BcA	7,50 x10 ²	5,50 x10 ²	1,58 x10 ⁴	3,05 x10 ⁵	7,65 x10 ⁶	9,43 x10 ⁷	3,40E+08	8,50 x10 ⁸
	2,00 x10 ²	2,00 x10 ²	3,50 x10 ³	4,00 x10 ⁴	2,50 x10 ⁵	7,50 x10 ⁶	4,00 x10 ⁷	4,00 x10 ⁸
	6,50 x10 ²	5,50 x10 ²	1,90 x10 ⁴	5,30 x10 ⁵	1,20 x10 ⁷	1,45 x10 ⁸	6,00 x10 ⁸	9,50 x10 ⁸
BcE	1,60 x10 ³	2,10 x10 ³	9,50 x10 ³	3,50 x10 ⁵	1,85E+07	6,50E+07	2,05 x10 ⁸	5,00 x10 ⁸
	1,00 x10 ³	1,60 x10 ³	6,50 x10 ³	8,50 x10 ⁴	1,10 x10 ⁶	1,35E+07	9,00 x10 ⁷	8,45 x10 ⁸
	1,15 x10 ³	2,70 x10 ³	4,40 x10 ⁴	1,49 x10 ⁶	3,40 x10 ⁷	1,08 x10 ⁸	5,05 x10 ⁸	1,13 x10 ⁹
BcS	1,65 x10 ³	1,15 x10 ³	2,20 x10 ⁴	8,50 x10 ⁴	1,95 x10 ⁶	2,00 x10 ⁷	2,28 x10 ⁸	1,70 x10 ⁹
	8,00 x10 ²	1,65 x10 ³	1,00 x10 ³	3,50 x10 ⁴	4,00 x10 ⁵	2,00 x10 ⁶	2,50 x10 ⁷	4,80 x10 ⁸
	1,00 x10 ²	1,00E+02	1,00 x10 ³	1,50 x10 ⁴	1,75 x10 ⁵	2,50 x10 ⁶	2,00 x10 ⁷	1,07 x10 ⁹
BcM	2,55 x10 ³	3,10 x10 ³	2,30 x10 ⁴	8,05 x10 ⁵	1,06 x10 ⁷	1,98 x10 ⁸	1,01E+09	6,00 x10 ⁸
	4,25 x10 ³	2,45 x10 ³	4,85 x10 ⁴	5,46 x10 ⁵	1,17 x10 ⁷	1,08 x10 ⁸	4,80 x10 ⁸	5,60 x10 ⁸
	3,00 x10 ³	2,40 x10 ³	3,20 x10 ⁴	5,79 x10 ⁵	7,25 x10 ⁶	1,55 x10 ⁸	2,75 x10 ⁸	1,01 x10 ⁹
<i>B. cereus</i> NCTC 11145								
	1,95 x10 ³	2,25 x10 ³	9,00 x10 ³	2,10 x10 ⁵	5,30 x10 ⁶	7,93 x10 ⁷	1,66 x10 ⁸	5,50 x10 ⁸
	1,10 x10 ³	1,60 x10 ³	8,00 x10 ³	1,65 x10 ⁵	1,90 x10 ⁶	6,00 x10 ⁶	8,00 x10 ⁷	5,10 x10 ⁸
	1,00 x10 ²	1,00 x10 ²	2,20 x10 ³	3,60 x10 ⁴	1,75 x10 ⁵	1,00 x10 ⁶	1,00 x10 ⁷	3,50 x10 ⁸

* BcA: cultura isolada de ar ambiente

BcE: cultura isolada de equipamento

BcS: cultura isolada de condimento

BcM: cultura isolada de carne

Tabela N2 Contagens de *B. cereus* (UFC/g) em substrato cárneo mantido a 10°C

Cultura*	Tempo de incubação (dias)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
BcA	4,85 x10 ³	2,10 x10 ³	1,50 x10 ⁴	1,67 x10 ⁵	2,35 x10 ⁶	3,00 x10 ⁶	7,00 x10 ⁶	1,85 x10 ⁷
	2,60 x10 ³	6,30 x10 ³	8,00 x10 ⁴	3,00 x10 ⁵	8,30 x10 ⁵	6,60 x10 ⁶	1,00 x10 ⁷	6,50 x10 ⁷
	1,60 x10 ³	4,15 x10 ³	3,00 x10 ³	3,00 x10 ³	3,00 x10 ³	1,55 x10 ⁴	1,10 x10 ³	3,00 x10 ³
BcE	3,50 x10 ³	5,15 x10 ³	1,10 x10 ⁴	2,15 x10 ⁵	5,50 x10 ⁵	4,10 x10 ⁶	1,50E+07	9,00 x10 ⁷
	4,75 x10 ³	6,55 x10 ³	2,00 x10 ⁴	1,50 x10 ⁵	1,28 x10 ⁶	4,00 x10 ⁶	8,00 x10 ⁶	1,55 x10 ⁸
	4,20 x10 ³	2,60 x10 ³	2,50 x10 ³	6,50 x10 ⁴	5,80 x10 ⁴	9,00 x10 ⁵	8,00 x10 ⁶	5,25 x10 ⁷
BcS	2,20 x10 ³	2,30 x10 ³	1,30 x10 ⁴	7,40 x10 ⁴	2,70 x10 ⁵	4,20 x10 ⁵	4,40 x10 ⁵	1,13 x10 ⁶
	1,90 x10 ³	6,50 x10 ³	2,20 x10 ⁴	1,95 x10 ⁵	8,00 x10 ⁴	2,40 x10 ⁵	4,00 x10 ⁴	1,20 x10 ⁵
	4,00 x10 ³	3,15 x10 ³	1,00 x10 ³	1,00 x10 ³	5,00 x10 ²	5,00 x10 ²	3,00 x10 ²	3,00 x10 ²
BcM	4,00 x10 ³	3,60 x10 ³	5,00 x10 ³	2,55 x10 ³	3,10 x10 ³	3,75 x10 ³	1,76 x10 ⁴	4,40 x10 ³
	2,75 x10 ³	2,50 x10 ³	2,90 x10 ³	4,90 x10 ³	3,85 x10 ³	2,40 x10 ³	4,30 x10 ³	3,00 x10 ³
	3,75 x10 ³	4,40 x10 ³	4,40 x10 ³	4,30 x10 ³	4,30 x10 ³	3,20 x10 ³	3,45 x10 ³	3,85 x10 ³
<i>B. cereus</i> NCTC 11145	4,65 x10 ³	9,00 x10 ³	3,70 x10 ³	1,20 x10 ⁴	4,00 x10 ⁴	1,00 x10 ⁵	1,00 x10 ⁴	1,00 x10 ⁴
	6,75 x10 ³	9,20 x10 ³	7,00 x10 ³	3,00 x10 ³	1,00 x10 ³	1,50 x10 ³	1,35 x10 ³	1,20 x10 ³
	4,95 x10 ³	8,55 x10 ³	3,50 x10 ³	3,00 x10 ³	3,00 x10 ³	1,80 x10 ³	3,00 x10 ²	6,50 x10 ²

* BcA: cultura isolada de ar ambiente

BcE: cultura isolada de equipamento

BcS: cultura isolada de condimento

BcM: cultura isolada de carne

Apêndice O Vista geral do restaurante R1



Área de cocção



Área de cocção



Área de pré
preparo de carnes

Bancadas

Multiprocessador

Apêndice P Vista geral do restaurante R2



Área de pré
preparo de
carnes

Caixas de
polietileno



Área de preparo
de sobremesas

Bancadas



Área de seleção
de cereais