

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

*Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Marilena Aquino de Muro e aprovada pela Comissão Julgadora em 07.07.88.
Campinas, 07 de julho de 1988.*

Presidente da Banca


Bacillus cereus: caracterização bioquímica e sorclógica, e avaliação da toxicidade de cepas isoladas de alimentos envolvidos ou não em casos de intoxicação alimentar.

Marilena Aquino de Muro
Engenheiro de Alimentos

12/88

Orientador: Prof.Dr.Fumio Yokoya

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de "Mestre" em Ciência de Alimentos.

Campinas, 1988

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Fumio Yokoya, pelo estímulo e orientação.

Ao Dr. Luiz Sebastião Prigenzi, Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, por facilitar a realização do trabalho.

Ao Dr. Leon Rabinovitch, do Instituto Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro, pelo fornecimento dos antisoros utilizados neste trabalho, e principalmente pela atenção e amizade, que muito contribuíram na realização do mesmo.

Ao Dr. J.M. Kramer, do Central Public Health Laboratory- London, pelo envio de importantes referências bibliográficas.

Ao Dr. Merlin S. Bergdoll, do Food Research Institute - Madison, pelos comentários e envio de importante material bibliográfico.

Ao Fernando José Meira de Vasconcellos, do Instituto Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro, pelas análises sorológicas.

Às amigas Raquel dos Anjos Fazioli, Elizabeth Natal de Gaspari e Denise Vilarinho Tambourgi, da seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, que foram imprescindíveis na realização deste trabalho, pelo apoio e estímulo, pela amizade sincera, e pelas valiosas discussões e ajuda na presente pesquisa.

À Dra. Hatune Tanaka, Jonas José Kisielius e Paulo P. Joazeiro, da seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, pelas micrografias das cepas.

À Evelyn Oliver Sarmento, Regina Pratas dos Santos, Neusa Maria de Freitas Ferreira, da seção de Biotérios do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, pela ajuda, e à Tama Cláudia Dias de Miranda, da mesma seção, pelas fotografias.

À Ângela Cristina Rodrigues Ghilardi, Carmen Saraiva Giampaglia, César Mendes de Assis, Áquila Maria Lourenço Gomes, Letícia Farah Nagato e Cristiane Bonaldi Cano, do Instituto Adolfo Lutz. - ' São Paulo, pela ajuda e amizade.

Aos bibliotecários Maria Édna Barbosa de Jesus e José Marcelino de Oliveira, do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, e Creusa Kasumi Nomura da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelos serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e ao Fundo de Apoio à Pesquisa-FAP da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio financeiro.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos-ABIA, pelo fornecimento das cópias xerox desta tese.

Aos meus pais
e irmãs

ÍNDICE

	Página
-RESUMO -----	1
-SUMMARY -----	2
-INTRODUÇÃO -----	3
-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. Isolamento -----	11
2. Caracterização do microrganismo	
2.1. caracterização morfológica -----	15
2.2. caracterização bioquímica -----	16
2.3. caracterização sorológica -----	19
3. Amilases e Proteases de <u>Bacillus cereus</u> -----	20
4. Toxinas de <u>Bacillus cereus</u>	
4.1. toxina emética -----	23
4.2. toxina diarreica -----	24
4.3. fosfolipase C -----	26
4.4. hemolisinas -----	28
5. Avaliação da toxicidade de cepas de <u>B.cereus</u> -----	29
-MATERIAL E MÉTODOS	
1. Material	
1.1. Procedência de substâncias e reagentes -----	35
1.2. Meios de cultura -----	36
1.3. Amostras de alimentos -----	37
1.4. Microrganismos -----	37
1.5. Equipamentos especiais -----	38
1.6. Animais de laboratório -----	39
2. Métodos	
2.1. Isolamento -----	39
2.2. Caracterização do microrganismo	
2.2.1. caracterização morfológica -----	39
2.2.2. caracterização bioquímica -----	40
2.2.3. caracterização sorológica -----	43
2.3. Produção de enzimas	
2.3.1. produção de amilases*	
2.3.1.1. condições de crescimento -----	44
2.3.1.2. condições de ensaio para determinação de atividade amilásica -----	44

2.3.1.3. condições de ensaio para determinação da atividade de beta-amilase -----	45
2.3.2. produção de proteases neutra e alcalina	
2.3.2.1. condições de crescimento -----	45
2.3.2.2. condições de ensaio para determinação da atividade proteolítica -----	46
2.4. Avaliação da toxicidade das cepas de <u>B.cereus</u>	
2.4.1. inoculação intraperitonal em camundongos -----	46
2.4.2. teste de aumento da permeabilidade vascular (APV)	
2.4.2.1. produção de toxina -----	47
2.4.2.2. inoculação intradérmica em coelho -----	48
2.4.2.3. inoculação intradérmica em camundongos -----	48
2.5. Microscopia Eletrônica	
2.5.1. técnica de contrastação negativa -----	48
-RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1. Isolamento -----	49
2. Características do microrganismo -----	57
3. Atividades amilolítica e proteolítica das cepas de <u>B.cereus</u> -----	61
4. Avaliação da toxicidade das cepas de <u>B.cereus</u> -----	64
5. Microscopia Eletrônica -----	80
-CONCLUSÕES -----	84
-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	85

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 01 - Contagens e tipo de alimento de onde foram isoladas as cepas de <u>B.cereus</u> -----	55
TABELA 02 - Dados clínicos e epidemiológicos dos casos de intoxicação alimentar -----	56
TABELA 03 - Características morfológicas e bioquímicas das cepas de <u>B.cereus</u> -----	59
TABELA 04 - Sorotipos das cepas de <u>B.cereus</u> -----	60
TABELA 05 - Atividades amilolíticas das cepas de <u>B.cereus</u> -----	62
TABELA 06 - Atividades proteolíticas das cepas de <u>B.cereus</u> -----	63
TABELA 07 - Mortalidade de camundongos após inoculação intraperitonal de sobrenadantes de cultivos de <u>B.cereus</u> -----	66
TABELA 08 - Teor de proteína dos sobrenadantes de cultivos de <u>B.cereus</u> usados para inoculação intraperitonal em camundongos -----	67
TABELA 09 - Cinética do aumento da permeabilidade vascular (APV) por inoculação intradérmica de filtrados de cultivo de <u>B.cereus</u> em coelho -----	72
TABELA 10 - Intensidade da coloração azulada das manchas na reação de APV por inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de <u>B.cereus</u> em coelho -----	73
TABELA 11 - Reação de APV no tecido celular subcutâneo de camundongos por inoculação intradérmica de filtrados de cultivo de <u>B.cereus</u> -----	77
TABELA 12 - Resultados dos testes bioquímicos que apresentaram variação mais significativa e dos ensaios biológicos das cepas de <u>B.cereus</u> -----	78
TABELA 13 - Porcentagem de correlação entre os resultados dos testes bioquímicos e dos ensaios biológicos das cepas de <u>B.cereus</u> -----	79

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 01 - Esgotamento em estrias de <u>B.cereus</u> em meio seletivo MYP-ágar (24 h/35°C) -----	50
FIGURA 02 - Confirmação da atividade de lecitinase em MYP-ágar -----	51
FIGURA 03 - Crescimento rizóide de <u>B.mycoides</u> em ágar-nutriente (24 h/35°C) -----	52
FIGURA 04 - Atividade hemolítica de <u>B.cereus</u> , <u>B.thuringiensis</u> , <u>B.mycoides</u> e <u>B.anthraxis</u> em ágar-sangue de carneiro (24 h/35°C) -----	53
FIGURA 05 - Dorso de coelho depilado e quadriculado, 40 min após a inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de <u>B.cereus</u> , mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por manchas de coloração azulada -----	69
FIGURA 06 - Dorso de coelho depilado e quadriculado após inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de <u>B.cereus</u> , mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por manchas de coloração azulada -----	70
FIGURA 07 - Exposição do tecido celular subcutâneo dorsal de coelho 24 h após inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de <u>B.cereus</u> , mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por manchas de coloração azulada -----	71
FIGURA 08 - Dorso de camundongo depilado e quadriculado, 1h e 30 min após a inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de <u>B.cereus</u> , mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por manchas de coloração azulada -----	75
FIGURA 09 - Exposição do tecido celular subcutâneo dorsal de camundongos 2h e 30 min após inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de <u>B.cereus</u> , mostrando áreas de hemorragia -----	76

- FIGURA 10 - Micrografia de B.cereus (cepa= 4/1) contrastado
com silicotungstato de sódio 1% a pH 7,0
(foto 1= x4200; foto 2= x9050) ----- 81
- FIGURA 11 - Micrografia de B.cereus (cepa 79/2) contrastado
com silicotungstato de sódio 1% a pH 7,0
(foto 1= x4200; foto 2= x9050) ----- 82
- FIGURA 12 - Micrografia de B.cereus contrastado com
silicotungstato de sódio 1% a pH 7,0 x4200
(foto 1= cepa 79/2; foto 2= cepa 280/1) ----- 83

LISTA DE ESQUEMAS

Página

ESQUEMA 01 - Localização das cepas de <u>B. bereus</u> na inoculação intradérmica em coelho -----	68
ESQUEMA 02 - Localização das cepas de <u>B. cereus</u> na inoculação intradérmica em camundongo -----	74

-RESUMO

Bacillus cereus foram isolados em MYP-ágar, a partir de alimentos envolvidos ou não em casos de intoxicação alimentar, sendo as colônias presuntivas identificadas pela determinação das seguintes propriedades: características morfológicas da célula vegetativa e esporângio; não formação de cristal de toxina para-esporal; motilidade; crescimento não-rizóide, e atividade hemolítica, importantes na diferenciação entre os membros do grupo I dos Bacillus.

Os testes bioquímicos, que apresentaram maior porcentagem de variação: fermentação de salicina (70,6%), hidrólise de amido (76,5%), e outras propriedades (como produção de amilases e proteases), não mostraram correlação direta com os resultados dos ensaios de toxicidade, como inoculação intraperitonal em camundongos e inoculação intradérmica em coelhos e camundongos.

Na superfície das células da cepa 4/1 foram encontradas estruturas finas filamentosas, presentes em grande quantidade, como uma rede, que pareceram desempenhar algum papel na atividade biológica dessa cepa.

-SUMMARY

Bacillus cereus were isolated in MYP-agar medium, from food products, some of them suspected to be implicated in food borne intoxication cases, and the presumptive colonies identified by the following properties: morphological characteristics of vegetative and sporulating cells; absence of intracellular protein crystal; motility; absence of rhizoid growth, and hemolytic activity, important in the differentiation between members of Group I Bacillus.

Biochemical tests such as salicin fermentation and starch hidrolisis, with percentagem variation of 70.6% and 76.5% respective, as well as another properties like amilase and protease activities, did not show a direct correlation with the results of the toxicity tests: intraperitoneal injection of mice and intradermic injection in rabbits and mices.

Filamentous structures were found on the cell surface of strain 4/1, that may contribute to the biological activity of this strain.

-INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é um bastonete Gram-positivo, aeróbico, formador de esporo, capaz de crescer sob condições de anaerobiose. As células vegetativas têm geralmente 1,0-1,2 μm de largura, e 3,0-5,0 μm de comprimento, e os esporos são elipsoidais, centrais ou para-centrais (GORDON et alii, 1973; GORDON, 1977; SNEATH, 1986). O organismo cresce numa faixa de temperatura de 10° a 48°C, com crescimento ótimo ocorrendo entre 28° e 35°C.

B.cereus é comum no solo e vegetais, e muitos levantamentos da incidência deste organismo, numa grande variedade de alimentos, têm sido feitos. A bactéria tem sido encontrada, numa faixa de 10^2 a 10^6 ufc/g de alimento, em sementes e brotos de vegetais (HARMON et alii, 1987), tomates e feijões-verdes enlatados (FIELDS et alii, 1977), feijões (NESTER & WOODBURN, 1982), pratos-prontos chineses (SCHIEMANN, 1978), arroz e preparados de arroz (VIJAYALAKSHMI et alii, 1981; BRYAN et alii, 1981), e alimentos industrializados em geral, como por exemplo, sorvetes, chocolates, massas folhadas, cremes, produtos cárneos, legumes, etc. (NIKODÉMUSZ, 1979; VICENTE et alii, 1983).

Existem na literatura inúmeros levantamentos sobre a contaminação de leite cru e pasteurizado, bem como de outros produtos lácteos, tais como, leite em pó, queijos, flans, sorvetes, e produtos acidificados (MARTIN, 1974; OVERCAST & ATMARAN, 1974; STEWART, 1975; WAES, 1976; WALTHER & LUCK, 1978; AHMED et alii, 1983; AGGARWAL & SRINIVASAN, 1986); a presença de um número elevado de B.cereus compromete a conservação desses alimentos, pois pode causar fenômenos como o "coalho-doce", pela ação de reninas, ou ainda o chamado "creme-azêdo". Esses fenômenos podem ocorrer mesmo em leite pasteurizado a temperatura de refrigeração, devido a resistência térmica dos esporos e à sua facilidade de germinação e multiplicação a essas temperaturas (GOEPFERT et alii, 1972; HOLMES et alii, 1981). A contaminação do leite e laticínios é cruzada, devido ao ambiente, ração de animais, equipamentos de processamento, e condições inadequadas de manipulação.

Outra classe de alimentos que tem merecido destaque quanto a incidência de B.cereus, são os chamados produtos desidratados, que incluem desde farinhas, amidos, vegetais desidratados, macarrão, cereais, condimentos, até misturas em pó para sopas, misturas vitaminadas para bebidas, chocolate em pó, café solúvel, leite em pó, extrato de carne (KIM & GOEPFERT, 1970; KIM & GOEPFERT, 1971; LEITÃO et alii, 1973/4; ROGERS, 1978; DELAZARI et alii, 1978; BLAKEY & PRIEST, 1980; SEENAPPA & KEMPTON, 1981; ROBERTS et alii, 1982; ROBBS et alii, 1983). Os vários autores determinaram diferentes médias de incidência de B.cereus nesses tipos de alimento, numa porcentagem de amostras compreendida entre 20-56%.

A larga distribuição de B.cereus na natureza e em vários alimentos, inevitavelmente contribui para a flora intestinal transitória de indivíduos saudáveis, estando presente em fezes de 14 a 15% dos indivíduos das populações estudadas (GHOSH, 1977; TRUNBULL & KRAMER, 1985; GRAVANI, 1987).

O B.cereus é conhecido como um agente etiológico de intoxicação alimentar, mas também causa infecções não relacionadas com alimentos, desde infecção branda, tal como de feridas infectadas, até doenças graves com alto índice de fatalidade onde há disseminação do microrganismo, tais como: septicemia, bacteriemia, broncopneumonia, meningite, endocardites, osteomielites e panoftalmias. O organismo pode também ser patogênico em animais domésticos, tendo sido o agente causal de abortos e mastites bovinas (PEARSON, 1969; TURNBULL et alii, 1977; SIEGMAN-IGRA et alii, 1983; DAVEY & TAUBER, 1987).

O B.cereus causa duas formas distintas de gastroenterites que diferem em vários fatores tais como: períodos de incubação e sintomatologia. Um quadro relacionando estas características com alguns microrganismos causadores de toxinfecções alimentares apresenta-se na próxima página. Os dois tipos de síndromes são causadas por toxinas que podem provocar diarreia (tipo - diarreica) ou vômito (tipo-emética), depois do consumo de alimentos contaminados (GILBERT, 1979; JOHNSON, 1984). A síndrome emética está associada a uma toxina emética pré-formada no ali

Características de intoxicações alimentares causadas por Clostridium perfringens,
Staphylococcus aureus e Bacillus cereus (GILBERT, 1979)

Variáveis	<u>Cl.perfringens</u>	<u>B.cereus</u> ^a	<u>B.cereus</u> ^b	<u>S.aureus</u>
período-incubação	8-22 hr	8-16 hr	1-5 hr	2-6 hr
duração-doença	12-24 hr	12-24 hr	6-24 hr	6-24 hr
diarréia	extremamente comum	extremamente comum	raramente comum	comum
vômito	raro	ocasional	extremamente comum	extremamente comum
alimentos mais frequentemente implicados	carne cozida e aves	produtos cárneos, sopas, pudins, vegetais e molhos	arroz frito de restaurantes chineses	carne cozida, aves, e produ- tos lácteos

(a) surtos registrados desde 1950 na: Noruega, Dinamarca, Itália, Hungria, Suécia, Polônia, Romênia, URSS, EUA, Alemanha e Canadá.

(b) surtos registrados desde 1971 na: Grã-Bretanha, Canadá, Austrália, Finlândia, EUA e Japão.

mento, sendo o arroz cozido o veículo mais comum; esta toxina apresenta sintomas similares aos da toxina produzida por Staphylococcus aureus. A síndrome diarreica está associada a uma enterotoxina e apresenta sintomas paralelos àqueles da intoxicação por Clostridium perfringens (SHINAGAWA, 1987).

Desde de 1950, surtos de intoxicação por B.cereus têm sido registrados em vários países, incluindo Dinamarca, Itália, Hungria, Suécia, Polônia, Romênia, URSS, Alemanha e Canadá, a maioria países do norte e leste da Europa (GILBERT, 1979).

HAUGE em 1955 investigou e descreveu quatro surtos de intoxicação alimentar na Noruega, envolvendo aproximadamente 600 pessoas, incriminando B.cereus como o organismo causador. Nos Estados Unidos, o primeiro surto registrado de intoxicação alimentar causado por B.cereus, ocorreu em 1969, e foi descrito por MIDURA et alii (1970).

Exemplos de surtos de intoxicação alimentar atribuídos a B.cereus, bem como a contagem do organismo nos alimentos envolvidos e os principais sintomas, estão relacionados na tabela que se segue.

Os alimentos envolvidos nos surtos do tipo-diarreico são de uma grande variedade e incluem vegetais, saladas, carnes, pudins, sopas e molhos; os surtos do tipo-emético incluem arroz (quase exclusivamente) e outros alimentos amiláceos, tais como macarrão e queijo, e cremes.

Entre 1966 e 1979, aproximadamente 5.300 surtos de intoxicação alimentar foram registrados pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos, destes somente 19 surtos foram atribuídos ao B.cereus, incluindo 10 surtos de síndrome diarreica e 9 surtos de síndrome emética (U.S.DEPARTMENT OF HEALTH, 1973; TERRANOVA & BLAKE, 1978; MORRIS, 1981). Entre 1971 e 1973 foram registrados pelo Laboratório Central de Saúde Pública da Inglaterra, 18 incidentes da síndrome emética por B.cereus no Reino Unido, envolvendo arroz frito e cozido (PERRY, 1974). Inúmeros surtos de intoxicação alimentar durante a década de 1951-60 (DAUER, 1961) e 1966-79 (MORRIS, 1981), com agente etiológico desconhecido, poderiam ser atribuídos ao B.cereus ou ao

Exemplos de surtos de intoxicação alimentar atribuídos a Bacillus cereus

Sintomas principais da gastroenterite D=diarréia/V=vômito	País	Alimento envolvido	Contagem no alimento (ufc/g ou /mL)	Referência
D	Noruega	flan de baunilha	$2,5 \times 10^7 - 1,1 \times 10^8$	HAUGE (1955)
	EUA	pão-de-carne	$7,0 \times 10^6$	MIDURA et alii (1970)
	Canadá	frango grelhado	$2,7 \times 10^8$	TODD et alii (1974)
	Canadá	salada de feijões-verdes	----	SCHMITT et alii (1976)
	EUA	pão-de-peru	$1,2 \times 10^3$	GIANNELLA & BRASILE (1979)
	Japão	arroz cozido	$3,0 \times 10^7$	SHINAGAWA et alii (1979)
	Japão	pudim	$2,0 \times 10^6$	SHINAGAWA et alii (1985)
		marmitta-refeição	$3,0 \times 10^7$	
		marmitta-refeição	$5,7 \times 10^7$	
D/V *	Canadá	arroz frito e frango	$2,4 \times 10^7 - 1,5 \times 10^8$	LEFEBVRE et alii (1973)
	Canadá	frango cozido	$6,0 \times 10^4$	TODD et alii (1974)
	EUA	purê de batatas	$1,8 \times 10^7$	YRIOS et alii (1975)
	Itália	condimentos	----	D'AUBERT et alii (1980)

D/V *	Brasil	carne cozida	$6,0 \times 10^3$	RABINOVITCH et alii (1985)
		carne crua	$5,0 \times 10^2$	
		empadão de galinha	$6,0 \times 10^3$	
		chocolate branco em barra	$4,0 \times 10^2$	
V/D *	Reino Unido	arroz frito (5 surtos)	$10^6 - 10^8$	MORTIMER & McCANN (1974)
	EUA	brotos de vegetais	$8,0 \times 10^4 - 7,6 \times 10^7$	PORTNOY et alii (1976)
V	Reino Unido	arroz frito	$2,5 \times 10^5 - 3,5 \times 10^8$	PHLS** (1972)
	Reino Unido	arroz cozido (2 surtos)	$2,9 \times 10^9$	PHLS** (1973)
	Reino Unido	arroz cozido (17 surtos)	$3,0 \times 10^5 - 2,0 \times 10^9$	GILBERT et alii (1974)
	Finlândia	arroz fervido	$1,7 \times 10^8$	RAEVUORI et alii (1976)
		carne	$1,0 \times 10^6$	
	Japão	arroz cozido (6 surtos)	$1,2 \times 10^6 - 1,6 \times 10^7$	SHINAGAWA et alii (1979)
	EUA	macarrão e queijo	$10^8 - 10^9$	HOLMES et alii (1981)
	Japão	arroz frito e pratos com arroz (15 surtos)	$1,9 \times 10^4 - 8,0 \times 10^8$	SHINAGAWA et alii (1985)
		marmitta-refeição (2 surtos)	$1,2 \times 10^6 - 10^7$	

V	Japão	feijão-soja cru	$4,5 \times 10^9$	SHINAGAWA et alii (1985)
		frango grelhado	$1,3 \times 10^6$	
		"tempura"	$4,8 \times 10^5$	
		"yakisoba"	$1,6 \times 10^8$	

(*) D/V= sintoma predominante-diarreia

(**) V/D= sintoma predominante-vômito

(**) PHLS= Public Health Laboratory Service, Inglaterra.

Cl.perfringens, considerando os sintomas e períodos de incubação registrados, como no caso de SALZBERG et alii (1982).

Em qualquer dos dois tipos de gastroenterite por B.cereus, não ocorre febre, o que sugere que em ambos os casos os distúrbios são devidos à ação de exotoxinas. A síndrome tipo-diarréica é ocasionada por uma toxina termo-lábil, produzida durante o crescimento do microrganismo no trato digestivo depois da ingestão do alimento contaminado, isso explica o longo período de incubação; a síndrome tipo-emética é ocasionada por uma toxina termo-estável, pré-formada no alimento ingerido (HOLMES et alii, 1981; BERGDOLL, 1981).

Para associar uma intoxicação alimentar com o B.cereus, é necessário isolar 10^5 ou mais organismos por grama do alimento incriminado (especialmente se os sintomas são da síndrome tipo-diarréica), bem como das fezes dos indivíduos afetados; verificando-se se a contagem é mais alta do que nas fezes de indivíduos saudáveis (BERGDOLL, 1981; MORRIS, 1981).

Apesar de alguns casos de intoxicação alimentar estarem relacionados com complicações crônicas (HILL & YU, 1987), de uma maneira geral, não se trata de uma doença grave, sendo de rápida recuperação. É facilmente evitada e prevenida por boas práticas de higiene pelos manipuladores de alimentos, assim como através do controle da temperatura de processamento, estocagem e distribuição (BERGDOLL, 1981; DAVEY, 1985).

Quando se verificam episódios de intoxicação alimentar, sobretudo quando está presente mais de um tipo de microrganismo potencialmente patogênico, é importante estudar algumas propriedades do organismo, tais como o potencial toxigênico, e o(s) mecanismo(s) de patogenicidade, e não simplesmente determinar sua incidência e presença em alimentos e indivíduos contaminados (KIM & GOEPFERT, 1971; D'AUBERT et alii, 1980).

Em vista disso, o presente trabalho pretende, através de um esquema adequado de isolamento e identificação de B.cereus em alimentos susceptíveis envolvidos ou não em casos de intoxicação alimentar, estudar algumas características e propriedades do organismo como produção de enzimas, assim como avaliar a toxicidade das cepas isoladas através de ensaios com animais.

-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Isolamento

No trabalho inicial de intoxicação alimentar por B.cereus, HAUGE (1955) usou ágar-sangue incubado a 37°C por 18 h, anaeróbicamente, e então aeróbicamente por mais 18-24 h. As colônias circundadas por uma zona transparente de hemólise eram isoladas e testadas para atividade de lecitinase.

Desde então, vários meios seletivos têm sido desenvolvidos para detecção e especialmente, o isolamento direto de B.cereus de alimentos. Todos eles contam com a supressão dos organismos Gram-negativos por um antibiótico peptídico, a polimixina B (HIRSCH, 1960), e identificação presuntiva de B.cereus pela reação na gema-de-ovo, específica de um número limitado de espécies do gênero Bacillus (McGAUGHEY & CHU, 1948; BILLING & LUCKHURST, 1957).

COLMER (1948) encontrou que as culturas de B.cereus, B.cereus var. mycoides, B.cereus var. anthracis, possuem lecitinase. Ele sugeriu que a ação da lecitinase sobre a fração lecitina da gema-de-ovo é de destruir sua ação emulsionante, e a perda desta propriedade causa a marcada modificação no estado coloidal dos constituintes do ovo.

POLKHOVSKII (1970) estudou os tipos de lecitinase de linhagens de B.cereus de acordo com os sítios de ação na molécula de lecitina, e encontrou que a maioria das linhagens de B.cereus (75,8%) induzem a quebra da lecitina da gema-de-ovo como as lecitinases C e D, e 24% de acordo com lecitinase D. Das linhagens estudadas, 0,2% não produziram nenhuma das duas lecitinases. O autor determinou, também, que a presença de um determinado tipo de lecitinase não depende da fonte de onde foi isolado o B.cereus.

OWENS (1973) estudou a reação em gema-de-ovo produzida por várias espécies bacterianas, e comentou que a reação de formação de zonas opacas no meio sólido e um anel de gordura denso flutuante no meio líquido, causados pelo B.cereus,

B.cereus var.mycoides e B.anthraxis, são devidos à fosfolipase C ou a combinação de outras enzimas, como fosfolipase D e fosfomonoesterase. A hidrólise da fosfatidilcolina da gema-de-ovo, faz perder sua propriedade emulsificante causando a precipitação do material lipídico.

NYGREN (1962) isolou pequenos números de B.cereus de uma grande variedade de alimentos usando a técnica do número mais provável (NMP); contudo, os níveis de B.cereus nos alimentos incriminados por surtos de intoxicação alimentar são usualmente altos para ser necessário o enriquecimento.

MOSSEL, KOOPMAN & JONGERIUS (1967) desenvolveram um meio para enumeração direta de células vegetativas e esporos de B.cereus em alimentos, baseado na incapacidade deste organismo de assimilar manitol, e na sua habilidade de produzir fosfolipase C; para um maior grau de seletividade se adicionou sulfato de polimixina B ao ágar-manitol, gema-de-ovo, vermelho de fenol, numa concentração de 10 ppm.

O ágar-manitol, gema-de-ovo, vermelho de fenol, polimixina (do inglês, MYP-agar) descrito por MOSSEL et alii (1967), tem sido usado por mais de uma década nos EUA e Europa.

KIM & GOEPFERT (1971) sugeriram um meio a base de polimixina e gema-de-ovo (KG-ágar) para rápida enumeração de B.cereus; o teste é presuntivo na diferenciação de B.cereus e organismos estreitamente relacionados, baseado na formação de zonas opacas ao redor das colônias. O meio é formulado para estimular a esporulação e dispor dos esporos livres para testes de confirmação sorológica dentro de um período de 24 h. Os resultados indicaram que KG-ágar é tão eficiente quanto o MYP-ágar no isolamento e identificação presuntiva de B.cereus de alimentos, contudo tem sido usado com menos frequência.

GILBERT & TAYLOR (1976) usaram com sucesso ágar-sangue de cavalo, incubado a 35°-37°C por 24 h, no isolamento e enumeração de B.cereus de espécimes clínicos de surtos de intoxicação por alimentos contaminados; as colônias suspeitas de B.cereus eram sub-cultivadas em meio BC de Kendall para posterior identificação.

GOEPFERT (1976) enumerou como vantagem do KG-ágar, o rápido desenvolvimento de esporos livres e endosporos com 20-24 h; no meio MYP-ágar (MOSSEL et alii, 1967), a presença de um grande número de fermentadores de manitol, pode mascarar a detecção de colônias não fermentadoras.

MOSSEL & SHENNAN (1976) e MORITA & WOODBURN (1977) usaram o MYP-ágar (MOSSEL et alii 1967) como meio de isolamento e enumeração de B.cereus.

SCHIEMANN (1978) comparou três meios para isolamento de B.cereus, a saber: MYP-ágar, KG-ágar e ágar-sangue. Concluíram que, apesar de não haver diferença quantitativa significativa entre os meios, o ágar-sangue foi o meio mais seletivo.

HUTCHINSON & KRAMER (1978) fizeram um levantamento dos vários meios seletivos e/ou diferenciais usados para o isolamento de B.cereus, a saber: ágar-sangue (HAUGE, 1955); ágar-LiCl-polimixina B, extrato de carne, gema-de-ovo (DONOVAN, 1958); ágar nutriente-etanol (NIKODÉMUSZ, 1958); ágar-manitol, gema-de-ovo, vermelho de fenol, polimixina (MOSSEL et alii, 1967); ágar-gema-de-ovo modificada, polimixina B (KIM & GOEPFERT, 1971); ágar-manitol, gema-de-ovo, púrpura de bromocresol (meio BC de Kendall) (GILBERT & TAYLOR, 1976); manitol, gema-de-ovo, vermelho de fenol com ou sem polimixina (Standards Association of Australia, 1976, citado por HUTCHISON & KRAMER, 1978); ágar-lecitina (CHRISOPE, FOX & MARSHALL, 1976, citado por HUTCHISON & KRAMER, 1978). Na maioria dos meios a identificação primária do organismo está baseada na reação de lecitinase, bem como na incapacidade de fermentação do manitol.

HOLBROOK & ANDERSON (1980) desenvolveram o meio ágar-polimixina, piruvato, gema-de-ovo, manitol, azul de bromotimol (do inglês PEMBA), o qual é similar em princípio ao MYP-ágar, mas é considerado por seus criadores, superior ao MYP-ágar e KG-ágar.

LANCETTE & HARMON (1980) avaliaram duas técnicas diferentes para isolamento e enumeração de B.cereus em alimentos; concluíram que a técnica do número mais provável em caldo tripton de soja e polimixina (do inglês, TSP-broth), é indicada para exame de alimentos contendo população baixa de B.cereus, mas que o plaqueamento direto em MYP-ágar, é preferível para alimentos que contenham população alta do organismo.

WYATT & GUY (1981) usaram o plaqueamento direto no meio de KG-ágar, sendo as placas examinadas em busca das colônias típicas, as quais são circundadas por uma zona opaca.

KRAMER et alii (1982) indicaram o emprego do ágar-base 'Columbia com 5% de sangue e superfície coberta com polimixina (do inglês, CBA+P) para o isolamento de um pequeno número de B.cereus a partir de uma população mista. As razões da recomendação foram: (1) o meio pode ser preparado na hora do uso, evitando os problemas de estoque; (2) a aparência característica da colônia do B.cereus no ágar-sangue é mantida a despeito de outras espécies presentes; (3) as colônias típicas são facilmente diferenciadas por testes sorológicos.

HARMON (1982) usou a técnica de plaqueamento direto em MYP-ágar, com emulsão de ovo a 50%; enquanto, JOHNSON, NELSON & BUSTA (1984) usaram o MYP-ágar de MOSSEL et alii (1967), no qual se utiliza emulsão de ovo a 20%.

SZABO, TODD & RAYMAN (1984) sugeriram um meio modificado a partir do ágar-polimixina, piruvato, gema-de-ovo, manitol, azul de bromotimol (do inglês, PEMBA) substituindo o azul de bromotimol por púrpura de bromocresol, designando o novo meio de PEMPA (do inglês). A vantagem desta modificação foi diminuir o tempo de incubação de 48 para 22 h, e aumentar a habilidade de isolar colônias presuntivas. O desempenho na enumeração de B.cereus em comparação ao PEMBA e o MYP-ágar foi favorável.

HARMON, KAUTTER & McCLURE (1984) compararam o desempenho de três meios no isolamento de B.cereus a partir de brotos de feijão e trigo, a saber: MYP-ágar, PEMBA, e ágar-sangue com polimixina. Concluíram que as diferenças não foram significativas, contudo no MYP-ágar, o B.cereus poderia ser diferenciado mais facilmente de outros organismos, requerendo um menor número de testes confirmatórios (HARMON, 1974; HARMON & GOEPFERT, 1974).

SNEATH (1984) indica o meio PEMBA (do inglês) como o meio de isolamento, observando que a detecção do B.cereus pode ser dificultada na presença de B.mycoides, o qual usualmente cresce sobre a superfície do ágar como uma colônia azul turquesa com aparência rizóide; o B.cereus é caracterizado por colônias azuis e circundadas por um precipitado de gema-de-ovo de cor similar.

WATTERSON (1985) usou o meio recomendado por DONOVAN(1958), que consiste de uma base de glicose-extrato de carne-ágar(15 h/ 30°C), contendo 2,5% de gema-de-ovo fresca e 0,5% de citrato trisódico, para isolar esporos de B.cereus do solo e cascalhos de rio, já que o organismo é um sensível indicador de muitos tipos de depósitos profundos de minérios, incluindo depósitos de ouro.

TURNBULL & KRAMER (1985) usaram para o isolamento de B.cereus, o plaqueamento da suspensão de amostra em água peptonada já incubada a 30°C por 20 h, em ágar-sangue contendo 100.000 unidades de polimixina.

CHUNG & SUN (1986) usaram o ágar-polimixina, piruvato, gema-de-ovo, manitol, azul de bromotimol(PEMBA) para isolamento.

RODRIGUEZ & BARRET (1986) usaram KG-ágar para enumerar B.cereus em amostras de leite em pó reconstituído.

Conforme comunicação pessoal, em 1987, do Prof.C.A.M.LOPES, da Universidade Estadual Paulista de Botucatu, pode-se usar como antibiótico alternativo para polimixina B, a canamicina, em concentrações de 50-100 µg/ml, nos meios de cultura de Clostridium welchii (CW)-ágar ou KG-ágar.

RABINOVITCH & VASCONCELLOS (1987) sugerem um novo meio para isolamento e enumeração de B.cereus em alimentos; o meio é seletivo para os Bacillus do Grupo I, e permite a contagem presuntiva de B.cereus, que apresenta reação positiva de lecitinase em 33-34 h.

2. Caracterização do microrganismo

2.1. caracterização morfológica

De acordo com GORDON et alii (1973), GORDON (1977) e SNEATH (1984), O B.cereus é um bacilo pertencente ao Grupo I; bastonete com largura de 1,0-1,2 µm e comprimento 3,0-5,0 µm, Gram-positivo, com glóbulos lipídicos na célula vegetativa, com flagelos abundantes e peritríquicos, formador de esporos elipsoidais, centrais ou para-centrais, com esporângio não entumescido, não possuindo cristais de toxina protéica (cristais para-esporais).

Até datas relativamente recentes, tem se usado as técnicas tradicionais de coloração de células por Gram e de esporos por verde de malaquita para o exame microscópico das células vegetativas e esporângio, a coloração com Sudan-black-B para determinar a presença de glóbulos lipídicos na célula vegetativa, e a coloração com fucsina básica 0,5% ou ZN-carbolfucsina-TB(Difco) após a lise do esporângio, para detectar-se a presença de cristais de toxina (SCHIEMANN, 1978; LANCETTE & HARMON, 1980; HOLBROOK & ANDERSON, 1980; WYATT & GUY, 1981; KRAMER et alii, 1982; HARMON, 1982; HARMON, 1984; HARMON & GOEPFERT, 1984; CHUNG & SUN, 1986; RAJKOWSKI & MIKOLAJCIK, 1987).

RABINOVITCH & VASCONCELLOS (1987) sugeriram microscopia óptica direta, de suspensão de células em salina (NaCl 0,85%), a partir de ágar-extrato de solo, para observação da morfologia da célula vegetativa, esporângio e esporo, bem como detecção de cristais para-esporais (inclusões para-esporais), que são característicos do B. thuringiensis.

2.2. caracterização bioquímica

GORDON et alii (1973) caracterizaram B. cereus pelas reações positivas, a saber: produção de catalase, crescimento anaeróbico, teste de Voges-Proskauer, produção de ácido em caldo VP, resistência a lisozima, crescimento a 7% de NaCl, crescimento a pH 5,7, produção de ácido de glicose, hidrólise de amido, uso de citrato como fonte de carbono, redução de nitrato a nitrito, decomposição de caseína e tirosina, alcalinização do Litmus-milk. Reações negativas: desaminação de fenilalanina em 7 dias, ácido de arabinose, xilose e manitol.

SCHIEMANN (1978) utilizou os seguintes testes bioquímicos para caracterização do B. cereus: produção de catalase, motilidade, liquefação de gelatina, reação no Litmus-milk, teste de Voges-Proskauer, hidrólise de amido e produção de ácido a partir de glicerol, glicose, sacarose, salicina e manitol.

KRAMER et alii (1982) incluíram outros testes na caracterização do B. cereus: produção de lecitinase, crescimento a 45°C, 55°C e 60°C, crescimento em glicose-azida, lise pelo bacteriófago lambda.

SNEATH (1984) incluiu ainda: a não utilização de propionat, não formação de indol e crescimento a 10°C, 30°C e 40°C.

MOSSEL et alii (1967) sugeriram o emprego dos seguintes testes bioquímicos, para identificação dos isolados presuntivos de B.cereus: assimilação anaeróbica de glicose, hidrólise de gelatina, redução de nitrato, crescimento em ágar-hidrato de cloral 0,25%, este último também usado por HOLBROOK & ANDERSON (1980).

Vários autores têm sugerido esquemas de identificação de B.cereus desde MOSSEL et alii (1967); usando, dentre as características da espécie, aquelas mais adequadas na diferenciação dos membros do Grupo I dos Bacillus. Diferem entre si em alguns testes, chamados de confirmatórios para as colônias presuntivas.

GILBERT (1979) sugeriu como testes confirmatórios: produção de ácido a partir de glicose, e os ensaios de manitol, arabinose e xilose num meio com sais de amônio, motilidade e presença de cristais para-esporais.

Os testes confirmatórios usados por LANCETTE & HARMON(1980) foram: produção de ácido de glicose anaerobicamente, produção de acetilmetilcarbinol, redução de nitrato, decomposição de tirosina e resistência a lisozima.

GILBERT et alii (1981) confirmaram as colônias presuntivas de B.cereus pela motilidade, lecitinase-positiva, produção de ácido a partir de glicose, e não produção a partir de arabinose, xilose e manitol, em meio com sais de amônio. Os autores comentaram que se os B.cereus presuntivos dessem reações duvidosas, deveriam ser submetidos aos demais testes bioquímicos de caracterização, incluindo-se atividade de urease, produção de ácido também a partir de trealose, lactose, dulcitol, inositol e sorbitol.

Os testes confirmatórios usados por WYATT & GUY (1981) foram: utilização de carboidratos, redução de nitrato, produção de acetilmetilcarbinol e liquefação de gelatina.

HARMON (1982) usou como testes confirmatórios, os seguintes testes: motilidade, crescimento rizóide e atividade hemolítica em ágar-sangue.

HARMON (1984) recomenda como testes confirmatórios: a produção de ácido a partir de glicose, redução de nitrato, teste de Voges-Proskauer, decomposição de tirosina e resistência a lisozima; e, como testes de diferenciação dos membros do Grupo I dos Bacillus: motilidade, crescimento rizóide, teste da atividade hemolítica e coloração de cristais de toxina, um esquema idêntico é adotado por HARMON & GOEPFERT (1984).

RABINOVITCH et alii (1985) submeteram as colônias presumptivas de B.cereus aos seguintes testes bioquímicos para confirmação da espécie: teste de catalase, hidrólise de amido, hidrólise de gelatina, série de açúcares (manitol, xilose, maltose, arabinose, salicina, glicose), produção de acetilmetilcarbinol, redução de nitrato, motilidade, crescimento anaeróbico, atividade hemolítica, utilização de sorbitol e crescimento em meio com 5%, 7% e 10% de NaCl.

RABINOVITCH & VASCONCELLOS (1987) sugeriram como confirmação e identificação de B.cereus presuntivos no meio RVC-ágar, a produção de lecitinase em RVC-líquido, atividade hemolítica, motilidade; além da morfologia da célula vegetativa, esporângio e esporos.

SHINAGAWA (1987) tentou relacionar algumas características bioquímicas do B.cereus com patogenicidade; de todas as propriedades testadas, nenhuma mostrou variação marcante, com exceção da hidrólise de amido e fermentação de salicina. Encontrou que as linhagens de B.cereus isoladas de intoxicação alimentar do tipo-diarreica, eram hidrólise de amido positivas, enquanto que, as isoladas de intoxicação do tipo-emética, eram hidrólise de amido negativas. O autor sugeriu ainda, que esta diferença entre as linhagens poderia ser associada a um dos dois tipos de gastroenterite causados por B.cereus. Por outro lado, ressaltou que a aplicação e interpretação de testes bioquímicos dependem de critérios individuais, e que devem ser padronizados o suficiente para o uso de rotina num esquema de identificação de linhagens patogênicas.

2.3. caracterização sorológica

Todas as linhagens de B.cereus apresentam antígenos flagelares, esporais e somáticos. LAMANNA & EISLER (1960) considerando que os endosporos bacterianos possuem antígenos distintos das células vegetativas parentais, e que sua estrutura antigênica pode ter valor taxonômico, fizeram um estudo comparativo das aglutininas contra esporos das linhagens de B.cereus e B.anthraxis, a fim de verificar se esses anticorpos poderiam ser úteis na diferenciação destes dois microrganismos; concluíram que a constituição antigênica dos endosporos de ambas as espécies eram complexas e incluíam aglutinogênios tanto intra como interespecíficos, não sendo possível fazer-se a distinção entre os dois organismos pelos testes de aglutinação.

Por outro lado, LAMANNA & JONES (1961) concluíram que pelos testes de aglutinação e absorção de aglutininas podia ser revelada a existência de relação antigênica entre os endosporos de Bacillus formadores de cristais de toxina patogênicas para insetos, B.cereus e B.anthraxis. Os autores não conseguiram diferenciar esses organismos por testes de aglutinação sorológica, empregando endosporos como aglutinogênios.

KIM & GOEPFERT (1972) usaram a técnica de anticorpos fluorescentes e a fração globulina do soro preparada contra esporos autoclavados de B.cereus linhagem T. A fluorescência na superfície do esporo foi obtida em 58 das 59 linhagens de B.cereus e com todas as linhagens de B.anthraxis, B.thuringiensis e B.mycoides testadas.

Já que o antígeno flagelar (H) pode prover um alto grau de especificidade entre linhagens da mesma espécie (NORRIS, 1962), TAYLOR & GILBERT (1975), GILBERT & PARRY (1977) descreveram 18 sorotipos (H) de B.cereus, dos quais cinco (tipos 1, 3, 4, 5 e 8) foram mais comumente associados com a síndrome tipo-emética; o tipo 1 foi o sorotipo mais comumente isolado dos surtos eméticos (69%). Os sorotipos 2, 6, 9, 10 e 12 foram isolados em separado, de surtos do tipo-diarréico, associados com uma grande variedade de alimentos. Contudo, os tipos 1 e 8, foram implicados também em surtos do tipo-diarréico e, então, a caracte

rização só por estes antíssoros não pode ser usada para distinguir culturas dos dois tipos de síndromes.

Segundo GILBERT (1979), pouco sucesso tem sido obtido na identificação sorológica de B.cereus com base nos antígenos de parede celular. GILBERT & KRAMER (1986) fizeram um levantamento da predominância dos sorotipos de B.cereus isolados de alimentos, fezes e ambiente, não associados à surtos ou casos de intoxicação. Resumidamente, apresentaram os seguintes resultados: de ambiente (H)20, 17; de fezes humanas (H)1,18,17; de arroz cru (H)17,15,20,12; de arroz cozido (H)1,5,8,19,20; de cereais (H)8,12,4; de leite pasteurizado e creme (H)1,22,21,8, e de carne e aves cozidas (H)1,11,19,3,20. Os autores registraram ainda, de 40% a 54% de linhagens não caracterizadas.

SHINAGAWA (1987) comenta que esquemas de identificação sorológica com antígenos flagelares, têm sido uma ferramenta útil na investigação epidemiológica de surtos de intoxicação alimentar. Embora ele tenha identificado 23 sorotipos, alguns deles estão mais frequentemente implicados em surtos, que outros. Por exemplo, o sorotipo 1, somente ou com outros sorotipos (8,12), tem sido associado com 70% dos surtos do tipo-emético. Os sorotipos mais frequentemente associados com surtos do tipo-diarréico são o 1,2,6,8,10 e 19. Os sorotipos 1,8,12 e 19 são comumente associados com ambos os tipos de surtos.

3. Amilases e Proteases de Bacillus cereus

Segundo SCHAEFFER (1969), os filtrados de culturas de bactérias formadoras de esporos, usualmente, têm forte atividade proteolítica no final da fase de crescimento; estudos cinéticos relacionados à produção de proteases e a formação de esporos, mostraram, no caso do B.cereus, que esta atividade aumenta rapidamente ao final do crescimento como resultado da chamada síntese "de novo".

Segundo HANSON et alii (1970), muitas enzimas aparecem ou aumentam significativamente durante a esporulação. O B.cereus e o B.megaterium produzem somente enzimas extracelulares, similares às proteases neutras de B.subtilis.

A produção de protease neutra e da proteína do invólucro do esporo, são reguladas metabólicamente por co-repressores catabólicos; estudos revelam que não existe correlação entre a habilidade para produzir proteases neutras extracelulares e a habilidade do organismo esporular (HANSON et alii, 1970).

KEAY et alii (1970) afirmaram que vários Bacillus produzem uma mistura de proteases neutras e amilase, detectáveis no extrato bruto de enzima.

SHINKE et alii (1974) isolaram do solo, uma linhagem fortemente produtora de beta-amilase, e que pelas características morfológicas e bioquímicas pode ser identificada como B.cereus.

TAKASAKI (1976) demonstrou que o B.cereus var. mycoides era capaz de produzir amilases similares à beta-amilase do malte e à enzima tipo pululanase. Ambas as enzimas foram produzidas concomitantemente como extracelulares quando as linhagens foram cultivadas num meio de cultura comum contendo uma fonte de nitrogênio orgânico; a produção de ambas as enzimas foi marcadamente afetada pela concentração do nitrogênio e do carbono; quando a concentração de nitrogênio e carbono do meio aumentava, a produção de beta-amilase diminuía; adicionando-se Mn^{2+} , a produção de beta-amilase era inibida.

De acordo com PRIEST (1977), as alfa-amilases são parcialmente indutíveis para algumas espécies de Bacillus. Como o amido não pode penetrar na célula bacteriana, ele não está diretamente envolvido no processo de indução. Estas bactérias sintetizam constitutivamente a alfa-amilase em níveis bem baixos, mas o suficiente para quebrar o substrato exógeno, resultando produtos de baixo peso molecular; estes compostos resultantes da hidrólise, entram na célula e estimulam a maior produção de alfa-amilase. A grande maioria das espécies de Bacillus degradam amido e caseína; com poucas exceções, as proteases extracelulares do gênero são serinas ou são metaloenzimas.

Ainda segundo PRIEST (1977), o B.cereus é citado como produtor de: beta-amilase (hidrolisa a ligação glicosídica alfa-1,4 em polissacarídeos, produzindo maltose); metaloprotease (enzimas que requerem Ca^{2+} para estabilidade e Zn^{2+} para atividade, pH ótimo próximo da neutralidade); beta-lactamase (hidrolisa a liga

ção amida do anel beta-lactâmico de penicilinas e cefalosporinas); fosfatase alcalina (enzima extracelular); ribonucleases e 5-nucleotidase; fosfolipase C. As proteases neutras de B.cereus não são funcionais no processo de esporulação neste bacilo.

SHINKE et alii (1977) obtiveram um mutante de B.cereus, por irradiação ao UV, que produziu cerca de vinte e cinco vezes mais beta-amilase que a linhagem materna, e não requereu nem amido nem compostos relacionados para produção da enzima.

GILBERT (1979) cita que B.cereus produz uma larga faixa de metabólitos extracelulares durante a fase exponencial de crescimento. Muitos têm sido isolados e caracterizados, incluindo proteases, beta-lactamases, antibióticos peptídicos, fosfolipases, hemolisinas, e toxina letal para camundongos.

NANMORI et alii (1983) purificaram e caracterizaram a beta-amilase de um mutante de B.cereus, com peso molecular estimado em $6,0 \times 10^4$ - $5,5 \times 10^4$; o valor de Km para amido solúvel foi 0,4%, e pela análise de aminoácidos, foi detectado somente um grupo sulfidril; o ponto isoelétrico da enzima purificada foi de 8,3.

YOSHIGI et alii (1985) obtiveram de uma linhagem de B.cereus uma amilase extracelular, com peso molecular estimado em $5,5 \times 10^4$ com o ponto isoelétrico de 6,13, pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 55°C. A ação desta enzima sobre polissacarídeos amiláceos foi única, e o produto final predominante, foi malto-pentose; a amilase purificada poderia também digerir grânulos de amido, tais como de arroz e de milho.

Tem sido relatada a ocorrência de beta-amilases em filtrados de cultura de B.cereus, porém as quantidades destas beta-amilases são muito pequenas.

NANMORI et alii (1987) isolaram por mutagênese de uma linhagem de B.cereus, uma linhagem 5,5 vezes maior em atividade de beta-amilase. A produção de amilase desta linhagem aumentou na presença de 0,5% de glicose, ou 1% de maltose, e mais marcadamente, na presença de 2% de amido solúvel no meio de cultura.

SHINAGAWA et alii (1985), associaram a patogenicidade das suas linhagens de B.cereus com a hidrólise de amido por amilases,

isto é, linhagens diarréicas hidrolisam o amido, enquanto as eméticas são negativas, como já mencionado anteriormente.

4. Toxinas de *Bacillus cereus*

4.1. toxina emética

MELLING et alii (1976) identificaram uma nova entidade enterotoxigênica associada ao *B.cereus*, e, posteriormente, produziram, identificaram e caracterizaram a toxina, denominada, toxina emética. Produziram-na em culturas contendo arroz, e nos meios caldo-triptona de soja e ágar-triptona de soja. Por diálise, a toxina mostrou ter peso molecular menor que 10.000 daltons. A toxina emética produzida em cultura contendo arroz, foi estável em seguida aos tratamentos do tipo: 126°C por 90 min, pH 2 por 2 h, pH 11 por 2 h, tripsina por 24 h e pepsina por 24 h. Estes resultados diferenciam claramente a toxina emética da diarréica, que é lábil sob as condições enumeradas acima. A toxina emética é um polipeptídeo não antigênico, porque os animais podiam ser usados repetidamente sem o desenvolvimento de resistência para a toxina (MELLING et alii, 1978; MELLING & CAPEL, 1978).

Ainda segundo MELLING et alii (1976), ocorreu produção de toxina diarréica em todos os meios de cultura, enquanto que a toxina emética foi produzida somente em cultura com arroz. Isto está de acordo com os dados epidemiológicos, que revelam que os surtos diarréicos envolvem uma grande variedade de alimentos; enquanto que os surtos eméticos, na sua maioria, têm sido restritos ao consumo de arroz.

Segundo TURNBULL et alii (1979), a toxina emética responsável pela síndrome emética de intoxicação alimentar por *B.cereus* é claramente distinguível, não só da toxina diarréica, como também dos outros fatores tóxicos do organismo.

GILBERT et alii (1981) descreveram as propriedades da toxina emética, a saber: enterotoxina de baixo peso molecular (menor que 5.000 daltons), não sendo formada acima de 35°C, estável à altas temperaturas, pH extremos e enzimas.

As linhagens de *B.cereus* que sintetizam esta toxina, não são excepcionais com respeito a sua habilidade de produzir ou-

tros metabólitos, incluindo toxina diarréica; mas até que um modelo mais simples do que alimentar macacos esteja disponível, não será possível predizer a proporção de linhagens que são capazes de elaborar a toxina. Evidências epidemiológicas, contudo, mostram que 75% das linhagens incriminadas nos surtos de síndrome emética, são sorotipos 1, sugerindo que somente certas linhagens podem ser capazes de produzir esta toxina; os esporos dessas linhagens, também exibem uma resistência térmica, marcadamente maior que os esporos dos outros sorotipos (PARRY & GILBERT, 1980; GILBERT & KRAMER, 1984).

4.2. toxina diarréica

Durante a fase de crescimento logarítmico, o B.cereus elabora muitas exotoxinas não dialisáveis, incluindo uma enterotoxina produzida em vários graus pela maioria das linhagens de B.cereus, responsável pela síndrome diarréica, e cujas propriedades dermonecroticas e intestinoecroticas, são relevantes na patogênese de várias infecções não gastrointestinais por B.cereus (TURNBULL et alii, 1979; TURNBULL & KRAMER, 1983; FUMAROLA, 1984; GILBERT & KRAMER, 1984). Como um metabólito, a enterotoxina diarréica, é distinta da fosfolipase C e das duas hemolisinas de B.cereus, e constitui um dos dois fatores letais para camundongos, produzidos pelo organismo (o outro fator uma hemolisina tiol-ativada, a cereolisina). A instabilidade da enterotoxina, sua sensibilidade a enzimas proteolíticas, a parcial perda da toxigenicidade nas linhagens repetidamente sub-cultivadas, e os problemas encontrados na sua separação dos outros metabólitos de B.cereus, têm contribuído no pouco progresso da sua purificação (GILBERT & KRAMER, 1984).

SPIRA & GOEPFERT (1975) determinaram que a enterotoxina, uma verdadeira exotoxina, é instável sob uma grande variedade de condições, a força iônica é especialmente crítica; é mais estável numa faixa de pH de 5,0-10,0, mas perde atividade rapidamente fora desta faixa.

TURNBULL (1976) comenta que a atividade da toxina diarréica pode envolver a estimulação do sistema adenilato-ciclase-cAMP.

KRAMER et alii (1978) identificaram a enterotoxina como uma proteína, antigênica, de pI 4,9, e peso molecular de 50.000 daltons; a molécula é termo-lábil, sensível a pHs extremos, e suscetível à digestão por pronase e tripsina.

Segundo GILBERT et alii (1981), a toxina diarreica também é chamada de fator de acumulação de fluido, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrótica, toxina intestínonecrótica e fator letal para camundongos I.

SHARMA & DOGRA (1983) determinaram que a atividade máxima da enterotoxina se dá no final da fase exponencial de crescimento, sendo que o filtrado de cultura da fase estacionária não revela presença de enterotoxina. O pH ótimo para produção da enterotoxina é entre 8,0-8,5. Sugeriram que o crescimento do B.cereus não tem correlação com a produção da toxina. Alimentos nos quais não há produção de enterotoxina, podem ser desprovidos de algum fator específico de crescimento, desconhecido, o qual é essencial para iniciar a síntese da mesma.

GILBERT & KRAMER (1984) comentam que, durante os estágios iniciais de crescimento há uma queda caracterpística no pH, como decorrência da glicólise, alcançando um valor mínimo coincidentemente com o pico de atividade da enterotoxina, ao redor de 5 h. Com o consumo da glicose disponível, a deaminação causa um progressivo aumento do pH do meio, enquanto que a atividade da enterotoxina decresce rapidamente, possivelmente como resultado da degradação proteolítica; coincidentemente, com o surgimento da enterotoxina, as atividades hemolíticas e fosfolípídicas também podem ser detectadas. Os autores determinaram as condições ótimas de crescimento e da produção da enterotoxina, a saber: (a) uso do caldo-BHI + 0,1% glicose (BHIG), (b) 0,5% v/v de inóculo crescido e ativo, (c) cultura agitada a 200 rpm em porções de 10 ml de BHIG em frascos de 250 ml por 6 h a 36°C.

GILBERT & KRAMER (1986) resumiram as propriedades das toxinas diarreica e emética conforme a tabela mostrada a seguir.

Segundo GORINA et alii (1975), a técnica de hemaglutinação-agregada, fornece resultados reproduzíveis e não requer muito tempo para a reação; eritrócitos sensibilizados persistem por um mês sem perda de atividade, e, portanto, esta reação

é conveniente para detecção prática da enterotoxina de B.cereus nos alimentos e meio de cultura, numa quantidade de 4 ng/ml.

PARKER & GOEPFERT (1978) estudaram o aumento da síntese da enterotoxina de B.cereus usando a técnica de cultura em saco de celofane.

BEECHER & MACMILLAN (1987) sugerem o uso de anticorpos monoclonais, em método de "imunoblot" para detecção de toxina diarreica de B.cereus.

Finalmente, a toxina de Ezepchuk e Fluer, citada por GILBERT et alii (1981) e TURNBULL et alii (1979), uma proteína antigênica, termolábil, inativada à 60°C por 20 min, de peso molecular de 57.000 daltons, letal para coelhos e camundongos, e causadora de vômitos em gatos quando injetada intravenosamente, está possivelmente relacionada com a toxina diarreica.

4.3. fosfolipase C

NYGREN (1962) concluiu que a fosforilcolina, um produto final da hidrólise de lecitina pela fosfolipase C, é provavelmente um fator tóxico nos incidentes de intoxicação alimentar causados por Cl.perfringens e B.cereus.

JOHNSON & BONVENTRE (1967) comentaram que a alfa-toxina de Cl.perfringens é caracterizada como sendo letal, hemolítica e fosfolítica, todas as três atividades sendo expressadas por uma única proteína. Por outro lado, os filtrados de culturas de B.cereus, demonstraram atividades biológicas idênticas às das da alfa-toxina, porém cada atividade é produzida por uma proteína distinta.

Estudos sobre a fosforilase C de B.cereus, mostram ser uma proteína com peso molecular de 20.000 daltons, e um ponto isoeletrico de 8,0-8,1 (GOEPFERT et alii, 1972).

Segundo GILBERT et alii (1981), é também chamada de lecitinase e fator de turvação em gema-de-ovo, e se trata de uma metaloenzima, citotóxica, requerente de dois íons de Zn^{2+} (LITTLE & OTNASS, 1975). É relativamente estável, resistente à tripsina, e com peso molecular de 23-29.000 daltons, e ponto isoeletrico de 6,5-8,1; não é hemolítica nem letal, e nem der-

Propriedades comparativas das toxinas diarreica e emética de Bacillus cereus

(GILBERT & KRAMER, 1986)

Propriedade	Toxina diarreica	Toxina emética
natureza	proteína	peptídeo (?)
peso molecular (daltons)	50.000 (G-100) 38-46.000(SDS-PAGE)	menor que 10.000 (porosidade)
ponto isoeletrico(pI)	4,9-5,3	----
estabilidade: temperatura proteinasas	destruída a 55°C por 20 min. sensível a pronase e tripsina	estável a 126°C por 90 min. resistente a pepsina e tripsina
produção: fase do crescimento	final da fase exponencial	estacionária (associado à esporulação ?)
temperatura ótima em meio de laboratório e em alimentos	32°-37°C nutrientes complexos ocasionalmente pré-formada	25°-30°C sobrenadante de cultura com pré-formada arroz
atividades biológicas: reação em macacos alça ileal de coelho permeabilidade capilar em coelho	diarreia(0,5-3,5 horas) positivo(150 µg) aumento(0,05 µg)	vômito(1-5 horas) negativo negativo
necrose(pele/mucosa intestinal)	positiva	negativa
letalidade para camundongos e culturas de células: HFS, MRC-5 e CHO	positiva(12 µg via intravenosa) citotóxica(0,1-0,5 µg)	não determinado não determinado
antigenicidade	positiva(componentes-múltiplos)	negativa
deteção	vários imunoenaios	somente reação em primatas

monocrótica em coelhos.

GERASIMENE et alii (1983) estudaram as fosfolipases de B.cereus, e, concordando com SLEIN & LOGAN (1965), concluíram que se trata de três fosfolipases que diferem na especificidade ao substrato: a fosfatidilcolina-específica, a esfingomielina-específica e a fosfatidilinositol-específica.

4.4. hemolisinas

IVERS & POTTER (1977) comentam que a hemolisina e fosfolipase de B.cereus não estão envolvidas em respostas patológicas para a maioria das espécies animais, mas que possivelmente desempenham um papel de fatores virulentos auxiliares.

COOLBAUGH & WILLIAMS (1978) produziram e caracterizaram duas hemolisinas de B.cereus; os pesos moleculares de 52.000 daltons para H-I, e 31.000 daltons para H-II. As duas hemolisinas são precipitadas diferentemente pelo sulfato de amônio, e ambas exibem o efeito Arrhenius quando aquecidas. Ambas as hemolisinas atacam rapidamente eritrócitos; contudo, a lise pela H-I é imediata, enquanto a lise pela H-II, se dá depois de uma adaptação. Hemólise pela H-I e H-II aumenta com o aumento da temperatura, não atuando a 0°C; somente H-I é inibida pelo colesterol. As hemolisinas de B.cereus pareceram similares às hemolisinas de B.thuringiensis; este último também produz duas hemolisinas, a thuringiolisina de peso molecular de 47.000 daltons, e a hemolisina secundária, com peso molecular de 29.000 daltons. Os autores concluíram ainda, que H-I provavelmente é idêntica à cereolisina; e comentam que, a função das hemolisinas de B.cereus permanece desconhecida, como de todas as toxinas líticas, no processo de vida das bactérias que as produzem. A ubiquidade das hemolisinas nas populações microbianas e o metabolismo envolvido na sua produção, indicam que devem ter uma função importante.

A hemolisina I (H-I), também chamada de cereolisina, é uma toxina citolítica de atividade-tiol, relacionada com a estreptolisina O e a toxina clostridial O. É uma proteína antigênica termolábil, de peso molecular 49-59.000 daltons, ponto isoelétrico 6,3-6,7, inativada pelo colesterol, com atividade sobre a

permeabilidade vascular. A dose letal para camundongos por via intravenosa é de aproximadamente 5.000 unidades de hemolisina correspondentes a 1-2 µg de proteína tóxica; os camundongos parecem morrer por dificuldade respiratória, e sua resposta à cereolisina, se parece com a que ocorre em camundongos injetados com estreptolisina O (BERNHEIMER & GRUSHOFF, 1967; GILBERT et alii, 1981; DAVEY & TAUBER, 1987).

A hemolisina II (H-II), também chamada de hemolisina secundária, é uma proteína antigênica termolábil, de peso molecular de 29-34.000 daltons, ponto isoelétrico 4,92, suscetível à pronase, pepsina e tripsina. In vitro, a atividade não é afetada por tióis, colesterol e anti-estreptolisina O; in vivo, a toxicidade ainda não foi estabelecida (GILBERT et alii, 1981).

5. Avaliação da toxicidade de cepas de B.cereus

Muitas tentativas têm sido feitas para identificar os mecanismos das síndromes diarreica e emética, causadas por toxinas produzidas por B.cereus, mas os dados não têm sido definitivos no isolamento das toxinas ou na identificação com anticorpos específicos. O maior problema com os estudos de purificação, é a falta de uma metodologia adequada para substâncias tóxicas; a capacidade para detectar estas toxinas nos alimentos incriminados, fezes e vômitos dos indivíduos afetados, poderia ser um importante critério na diagnose laboratorial dos surtos; mas, desafortunadamente, estas técnicas não estão disponíveis no presente (BERGDOLL, 1981; SHINAGAWA, 1987).

Até o momento, um grande número de modelos experimentais, para detectar as toxinas diarreica e emética de B.cereus, com base nas suas propriedades e atividades biológicas, têm sido usados, e incluem: método de alimentação de macacos rhesus, teste na pele de cobaias, reação de permeabilidade vascular em coelhos, e método da alça ileal ligada de coelho e rato, bem como atividade citotóxica, tendo sido sugeridos e adotados com forme revisão a seguir.

MOLNAR (1962) usou como testes de toxicidade de filtrados de cultura de B.cereus, a inoculação intradérmica em cobaias, detectando-se a reação inflamatória ou formação de edema em

24 h, e a injeção intravenosa ou intraperitonal em camundongos, detectando-se o efeito letal.

BURDON et alii (1967) avaliaram a toxicidade de filtrados de cultura de B.cereus, usando a injeção intraperitonal em camundongos jovens, e produção de edema e fatores necrozantes pela injeção intradérmica em cobaias. Determinaram a presença de numerosas trombo-fibrilas nas artérias e capilares pulmonares dos camundongos mortos por injeção intravenosa de filtrados de cultura de B.cereus; e as mudanças patológicas consistiram, principalmente, em necrose coagulativa (leve edema e inflamação no músculo da parede abdominal anterior) nas áreas inoculadas. Nenhuma destas mudanças morfológicas foram vistas em camundongos, que morreram de infecção-antrax (LAMANNA & JONES, 1963; BONVENTRE & ECKERT, 1963).

STAMATIN & ANGHELESCO (1969) demonstraram que toxinas de B.cereus produzidas em meio aerado, são patogênicas (letais) para camundongos, tanto pela via intravenosa como pela respiratória; pela via respiratória, a ação tóxica se torna cinco vezes mais severa que pela intravenosa. Animais (camundongos, ratos e hamsters) inoculados por via intranasal com toxina, mostraram dispnéia e às vezes hemorragia nasal, e o exame pós-morte, mostrou edemas, às vezes hemorrágicos, dos pulmões e várias lesões no fígado e nas células epiteliais dos rins. Concluíram, que a toxina de B.cereus inoculada pela via respiratória, revela ser mais "forte" do que qualquer outra toxina bacteriana conhecida.

SPIRA & GOEPFERT (1972) pesquisaram a utilidade do teste da alça ileal ligada de coelho, como um modelo experimental de investigação de intoxicação alimentar por B.cereus, adaptando o teste já usado para o estudo da enteropatogenicidade de E.coli, Salmonella sp., Shigella sp., Pseudomona aeruginosa, Cl.perfringens, Vibrio parahaemolyticus e V.alcaligenes. Encontraram que 19 das 22 linhagens testadas forneciam resposta positiva, isto é, causavam acúmulo de fluido no intestino; porém esta resposta não diferencia as linhagens de B.cereus isoladas de surtos de intoxicação alimentar daquelas de outras fontes.

GLATZ & GOEPFERT (1973) desenvolveram um método usando a reação dérmica em cobaias, como medida do fator que induz acúmulo de fluido na alça ileal ligada de coelho; uma reação necrótica ou uma reação esverdeada, desenvolvia-se em 6 h após a inoculação intradérmica, e persistia por 7 dias (observação externa). A atividade no teste dérmico é demonstrada após 3 h da inoculação intradérmica dos filtrados de cultura, aumentando até um máximo em 5 a 6 h, permanecendo constante por 12 h após a inoculação. Esta é uma reação não específica, em que pelo menos duas espécies antigênicas distintas estão envolvidas.

GLATZ et alii (1974) encontraram que o fator que provoca aumento de permeabilidade vascular em coelhos e cobaias, e produz acúmulo de líquido na alça ileal ligada de coelho, não tem relação com a fosfolipase C, nem com as hemolisinas. Este fator é sintetizado quando a cultura é submetida a vigorosa aeração na fase logarítmica de crescimento. Pode ser precipitado com sulfato de amônio, e inativado por aquecimento à 56°C; não é dialisável e tem características antigênicas. A atividade desta toxina, que por um lado aumenta a permeabilidade vascular e por outro o acúmulo de líquido na alça ileal de coelhos, pôde facilmente ser quantificada por ambos os métodos biológicos, porém, a maior simplicidade, confiabilidade, e economia do teste de permeabilidade vascular, o faz o método de eleição para a seleção de culturas toxigênicas ou para o controle do processo de purificação da toxina.

SPIRA & GOEPFERT (1975) descreveram que a enterotoxina diarréica de B.cereus, produz acúmulo de fluido na alça ileal ligada de coelhos jovens (1-1,5 Kg); altera a permeabilidade vascular na pele de coelhos e é letal para camundongos, quando injetada por via intravenosa.

Para estudar as enterotoxinas de B.cereus, TURNBULL (1976) usou o ensaio biológico com macacos, onde a toxina é administrada por via oral, e o acúmulo de líquido na alça ileal ligada de coelho, que se deve ao estímulo do sistema adenilato-ciclase-cAMP pela toxina a nível das células epiteliais do intestino. Este autor encontrou que os efeitos citopatológicos, em culturas de tecido, ensaios com camundongos desmamados, e produção

de glicerol por células lipoprodutoras, não são de valor na detecção de qualquer enterotoxina.

MELLING et alii (1976) e MELLING & CAPEL (1978), demonstraram que linhagens diarréicas não causam vômitos em macacos rhesus, mas causam acúmulo de fluido na alça ileal de coelho. a toxina emética tem comportamento inverso.

TURNBULL et alii (1977) confirmaram o efeito necrótico na mucosa e submucosa intestinal, pela ação da enterotoxina diarréica de B.cereus.

TORRES-ANJEL et alii (1979) empregaram a inoculação intra venosa e intraperitonal em camundongos, alça ileal ligada de coelhos, inoculação cutânea em coelhos , e o modelo de coelhos lactentes, para demonstrar a toxicidade de cepas de B.cereus.

TURNBULL & KRAMER (1983) usaram o ensaio dérmico em coelhos, e métodos para determinar a atividade de hemolisinas e fosfolipase, para comprovar a atividade toxigênica das cepas isoladas de infecções não gastrointestinais. Os resultados sugerem que existe uma correlação significativa entre a virulência dos isolados e sua toxigenicidade no teste de pele. Isto foi atribuído à habilidade das cepas de B.cereus de sintetizarem, em vários graus, uma enterotoxina necrótica, possivelmente em conjunto com a hemolisina primária, a cereolisina.

THOMPSON et alii (1985) usaram o teste de aumento de permeabilidade vascular, letalidade para camundongos e atividade citotóxica, para estudar a enterotoxina produzida por B.thuringiensis em comparação com a enterotoxina de B.cereus.

TING & BANWART (1985) estudaram o desempenho do ensaio da alça intestinal ligada de rato, na detecção da toxina diarréica de B.cereus e concluíram que este sistema poderia ser usado para tal proposta, mas não é tão sensível como o ensaio da alça ileal ligada de coelho. Devido a que, o intestino do rato é menor que o do coelho, uma parte do intestino delgado foi usado no experimento, ao invés de somente o íleo. Os autores, enumeraram as seguintes vantagens do uso de ratos ao invés de coelhos: (1) são menos caros, (2) mais fáceis de manter e manejar, (3) há menos restrições quanto ao peso e idade dos animais.

SHINAGAWA et alii (1985) usaram como ensaios biológicos, para avaliação da toxicidade de cepas de B.cereus, o ensaio da atividade da permeabilidade vascular em coelhos (1,5-2,0 Kg), injeção intravenosa em camundongos e ensaio da alça ileal ligada de coelho e camundongo. Pelos resultados obtidos, correlacionaram as linhagens diarréicas com o acúmulo de líquido na alça ileal de coelhos e camundongos, alteração da permeabilidade vascular de coelhos com hemorragia e edema, letalidade para camundongos como ensaios biológicos, e hidrólise de amido como ensaio bioquímico. Por outro lado, as linhagens eméticas não provocam acúmulo de líquido, nem alteração da permeabilidade vascular e não hidrolisam o amido, porém, são letais para camundongos. Estes autores sugerem que algumas linhagens envolvidas em surtos do tipo-emético, produzem também toxina diarréica, corroborando com os dados de RABINOVITCH et alii (1985).

Concluindo, o ensaio da alça ileal ligada de coelho, parece ser o método mais utilizado, porém os resultados podem ser variáveis devido a idade do coelho (somente coelhos jovens pesando menos de 1,2 Kg, dão uma resposta positiva consistente). Também a resposta é variável para diferentes animais e portanto precisam ser usados em grande número. Dificuldades adicionais a este ensaio são por um lado, o custo relativamente elevado destes animais, e por outro, a limitação da idade e peso dos mesmos intrínsecos a este ensaio (SPIRA & GOEPFERT, 1972; BERGDOLL, 1981; TING & BANWART, 1985).

O ensaio de permeabilidade vascular em pele de coelho, muito usado pelos pesquisadores, não é específico já que mais de um agente é responsável pela reação positiva. De qualquer modo este ensaio pode ser útil na sequência de purificação do agente tóxico, porém como não é específico, outros testes precisam ser usados conjuntamente (BERGDOLL, 1981; TING & BANWART, 1985).

Segundo KRAMER et alii (1982), testes in vivo, como teste de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho, o teste da alça ileal ligada de coelho, e o teste de alimentação de macacos rhesus, são ainda procedimentos muito experimentais; sua aplicação fica restrita aos isolados de interesse particu-

lar e para monitorar o progresso na purificação da toxina. Usando esse tipo de ensaio, o critério para a confirmação de um episódio de intoxicação por B. cereus, não leva em consideração a presença da(s) toxina(s) produzidas pelo microrganismo no alimento incriminado; enquanto que, métodos sorológicos in vitro mais adequados para a detecção da enterotoxina diarreica estão sendo desenvolvidos.

Estudos em macacos têm sido feitos na tentativa de identificar frações que contenham a toxina diarreica, mas este método é limitado, porque os custos são elevados (BERGDOLL, 1981; CAPEL & MELLING, 1978; TING & BANWART, 1985).

O único ensaio disponível para a toxina emética, é aquele que emprega a alimentação de macacos rhesus com nutrientes contaminados, é usado para confirmar a patogenicidade da linhagem emética e também para acompanhar a purificação da toxina. O teste é incômodo e caro, por causa da interferência dos reagentes empregados na purificação da toxina e pela perda dos macacos (BERGDOLL, 1981; SHINAGAWA, 1987).

-MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1. Procedência de substâncias e reagentes

Foram utilizadas substâncias dos seguintes laboratórios: Sigma Chemical Company, E.Merck Ag.Darmstad, Carlo Erba do Brasil S.A., Equipamentos científicos do Brasil S.A. (Ecibra), Bioquímica do Brasil S.A.(Biobrás), Difco Laboratories, Vetec Química e representações Ltda, conforme relacionadas abaixo.

Maltose: Difco

Arabinose: Difco

Salicina: Difco

Glicose: Ecibra

Lactose: Ecibra

Amido solúvel: Difco

Caseína isoelétrica: Difco

Gelatina: Difco

Tirosina: Sigma

Peptona: Biobrás

Triptona: Biobrás

Extrato de levedura: Biobrás

Extrato de carne: Biobrás

Ágar: Difco

Leite desnatado: Companhia Nestlé

Cloreto de sódio: Vetec

D-manitol: Merck

Polimixina B: Pfizer

Alpha-naftol: Merck

Vermelho de fenol: Difco

Azul de Evans: Merck (art.3169)

Púrpura de bromocresol: George T. Gurr

Reagente para fenol Folin-Ciocalteu: Keel Ind.Química S.A.

Albumina de ovo: Herzog

1.2. Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura preparados no mínimo 24 h antes das inoculações, a saber:

- Ágar-manitol, gema-de-ovo, vermelho de fenol, polimixina (do inglês, MYP-agar), formulado de acordo com LANCETTE & HARMON (1980).
- Ágar-Extrato de Solo (AES), formulado de acordo com GORDON et alii (1973).
- Extrato de Solo, preparado de acordo com GORDON et alii (1973).
- Ágar-sangue, formulado de acordo com HARMON (1982).
- Caldo Voges-Proskauer (VP) modificado, formulado de acordo com LANCETTE & HARMON (1980) e SNEATH (1986).
- Caldo Nitrato, formulado de acordo com LANCETTE & HARMON (1980); GORDON et alii (1973) e HARMON (1984).
- Meio Glicose O/F modificado, baseado na formulação de SMIBERT & KRIEG (1981).
- Ágar-base vermelho de fenol modificado, baseado na formulação de MAC FADDIN (1980) e CHUNG & SUN (1986).
- Meio de açúcar e sais de amônio modificado, baseado na formulação de KRAMER et alii (1982), GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986).
- Meio RVC-líquido, formulado de acordo com RABINOVITCH & VASCONCELLOS (1987).
- Ágar-Sabouraud e Caldo-Sabouraud, formulados de acordo com GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986).
- Meio de Litmus-milk (Difco), recomendado por GORDON et alii (1973) e SCHIEMANN (1978).
- Meio de Citrato de Simmon (Difco), recomendado por KRAMER et alii (1982) e SMIBERT & KRIEG (1981).
- Meio de Christensen (Difco), recomendado por SHINAGAWA et alii (1985).
- Ágar-Amido, formulado de acordo com SHINAGAWA et alii (1985).
- Ágar-Gelatina, formulado de acordo com SMIBERT & KRIEG (1981).
- Ágar-Leite, formulado de acordo com GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986).

- Ágar-Tirosina 0,5%, formulado de acordo com HARMON(1984).
- Caldo Nutriente (Difco).
- Caldo Comum, com formulação em g/l: peptona-10,0; cloreto de sódio-5,0; extrato de carne-4,0; água destilada-1 l; pH $7,4 \pm 0,2$.
- Ágar-Comum, mesma formulação do Caldo Comum mais a adição de 1,5% de ágar.
- Caldo Nutriente, com formulação em g/l: peptona-5,0; extrato de carne-1,0; extrato de levedura-2,0; cloreto de sódio-5,0; água destilada-1 l; pH $7,0 \pm 0,2$.
- Ágar-Nutriente, mesma formulação do Caldo Nutriente mais a adição de 1,5% de ágar.
- Meio indutor de amilases, formulado de acordo com TAKASAKI (1976).
- Meio indutor de proteases neutra e alcalina, formulado de acordo com OISHI et alii (1963).
- Infusão de Cérebro e Coração (do inglês, BHI-broth) (Merck), suplementado com 0,1% (p/v) de glicose (BHIG), recomendado por TURNBULL (1976), KRAMER et alii (1982) e GILBERT & KRAMER (1984).

1.3. Amostras de alimentos

As amostras utilizadas neste trabalho foram de alimentos industrializados e refeições, incluindo, carnes, aves, peixes, leite pasteurizado, leite em pó, queijos, sopas de cereais, farinha de mandioca, extrudados ("snacks"), sorvetes, doces com creme e geléias, bolos, chocolates, condimentos, misturas em pó para pudins e pratos prontos, totalizando 280 amostras de alimentos analisados, no período de abril a dezembro de 1987.

Os alimentos envolvidos em casos de intoxicação alimentar são respectivamente: bomba-creme (amostra nº 90) e bolo-aniversário (amostra nº 280).

1.4. Microrganismos

Foram usadas como culturas-referência as cepas: B.anthraxis IAL-116 (Instituto Adolfo Lutz-SP) como controle negativo de he-

mólise em ágar-sangue; B.thuringiensis var.sotto LFB-FIOCRUZ 471 (Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-RJ) como controle positivo de formação de cristais de toxina para-esporais, e B.mycoides(isolada de uma amostra de carne moída) como controle positivo de crescimento rizóide.

Foi usada como cultura-padrão da espécie a cepa de B.cereus ATCC 14579-8, obtida na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz (IAL)-SP, com características bioquímicas descritas por SNEATH (1986).

As demais cepas de B.cereus foram isoladas das amostras de alimentos e caracterizadas bioquimicamente, sendo escolhidas 49 cepas para as análises sorológicas, das quais 16 cepas foram caracterizadas.

As culturas-estoque foram mantidas em Ágar-Extrato de Solo conforme procedimento do Instituto Oswaldo Cruz(IOC)-RJ, técnica preconizada por GORDON et alii (1973).

1.5. Equipamentos especiais

- Microscópio óptico - CARL-ZEISS
 - objetiva PLAN 100/1,25 óleo(160/-)
 - ocular- C8x (canhão 1,25x)
- Microscópio binocular-modelo AMPLIVAL da CARL-ZEISS-JENA
 - objetiva- APOCHROMAT-HI.100/1,32
 - condensador- APE 1,4
 - ocular PK 12,5x e ocular PK 12,5 com escala micrométrica 10/100 partes.
- Balança Analítica -E.METTLER -Zurich
 - tipo H-5- capac.160g (1div-10 mg)
- Agitador recíproco -Ética (SP)
- Centrífuga refrigerada- SORVALL, Ivan Sorvall, Inc.
 - modelo RC-2
- Centrífuga - Excelsa 2 - FANEN Ltda., modelo 205N.
- Espectrofotômetros PERKIN-ELMER- Coleman 295 e 139.
- Membranas filtrantes -(0,2 μ m e 0,45 μ m) Millipore.
- Microscópio Eletrônico - marca PHILIPS
 - modelo 400T
 - operando a 80 KV

1.6. Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos machos albinos, da raça "swiss", de cerca de 30 dias, pesando 20-22 g, e coelho albino adulto (fêmea), pesando 3,4 Kg, obtidos da Seção de Biotérios do Instituto Adolfo Lutz (IAL)- São Paulo.

2. Métodos

2.1. Isolamento

As cepas de B.cereus foram isoladas a partir de uma diluição 1:10 do alimento em água peptonada 0,1% (10^{-1} a 10^{-6} quando alimento envolvido em intoxicação). Uma alíquota de 0,1 ml foi espalhada em placa de MYP-ágar e incubada a 30°C por 20-24h (SCHIEHMANN, 1978; LANCETTE & HARMON, 1980; WYATT & GUY, 1981; HARMON, 1982; PETERZ et alii, 1985).

Seguindo à incubação, as placas foram examinadas em busca das colônias típicas, as quais, quando existentes, são circundadas por uma zona de precipitação opaca em virtude da atividade da lecitinase. As colônias são róseas devido à reação alcalina e a não fermentação do manitol.

Considerou-se para contagem as placas contendo de 5-50 colônias típicas. As colônias presuntivas de B.cereus, um mínimo de cinco, foram transferidas para tubos com ágar comum inclinado e incubadas a 30°C por 20-24 h. A fim de se comprovar a pureza dos isolados, preparou-se esfregaços que foram corados pelo método de Gram; quando necessário, eram purificados por esgotamento em placas de ágar nutriente, e daí novamente para o MYP-ágar.

Durante os testes de caracterização morfológica e bioquímica e demais testes, as culturas foram repicadas e mantidos em tubos com ágar comum inclinado.

2.2. Caracterização do microrganismo

2.2.1. caracterização morfológica

-dimensionamento de células vegetativas- observação por microscopia óptica de montagem úmida da cultura "jovem", isto é, cultura de 16-18 h de incubação a 35°C em ágar comum.

Foram tomadas medidas de dez células vegetativas, incluindo tanto comprimento como largura, usando-se a faixa de variação de cada dimensão.

-observação de esporo e cristal para-esporal-
observação por microscopia óptica de montagem úmida das culturas presuntivas de B.cereus, cultivadas em Ágar-Extrato de Solo (GORDON et alii, 1973) a 35°C por 20-24 h. Verificação do tipo de esporo (elipsoidal/cilíndrico), da posição do esporo (central/paracentral) e do não entumescimento do esporângio; bem como, verificação da ausência de cristal para-esporal, caracterizando o isolado como de morfologia compatível com a de B.cereus.

-teste de motilidade- consistiu na observação por microscopia óptica de montagem úmida, entre lâmina e lamínula, de cultura com 16 h de incubação a 35°C em caldo comum.

2.2.2. caracterização bioquímica

-teste para atividade hemolítica- feito de acordo com HARMON (1982,1984), placas de ágar-sangue de carneiro foram divididas em cinco partes iguais. Cada parte foi inoculada por estria (tocando-se gentilmente a superfície do ágar com alça de 2mm) com cultura de 24 h em ágar comum. As placas foram então incubadas a 35°C por 20-24 h, sendo verificada a existência de atividade hemolítica, indicada por uma zona de hemólise completa de 2-4mm (beta-hemólise) ao redor do crescimento.

-teste de Voges-Proskauer-feito de acordo com GORDON et alii (1973), LANCETTE & HARMON (1980) e HARMON (1984). Tubos com meio VP modificado foram inoculados com cultura de 24 h em ágar comum, e incubados a 35°C por 48 h. A presença de acetilmetilcarbinol (acetoína) foi determinada pela adição de 0,2 ml de hidróxido de potássio a 40% e 0,6 ml de solução alcoólica de alpha-naftol a 1 ml de cultura. Reação positiva=cor vermelha em 30-60 min a temperatura ambiente.

-pH no caldo Voges-Proskauer (VP)-feito de acordo com GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986), as culturas foram incubadas no caldo VP modificado à 35°C por 7 dias, e sem adicionar os reagentes de VP, media-se o pH do meio com fita indicadora de pH.

-redução de nitrato- feito de acordo com GORDON et alii (1973), LANCETTE & HARMON (1980) e HARMON (1984). Tubos com caldo nitrato foram inoculados com cultura de 24 h em ágar comum e incubados a 35°C por 48 h. A presença de nitrito foi determinada pela adição dos reagentes SMIBERT & KRIEG (1981).

-metabolismo oxidativo/fermentativo de glicose- feito de acordo com SMIBERT & KRIEG (1981). Tubos com meio semi-sólido de carboidrato (glicose) foram inoculados com culturas de 24 h em ágar comum, por picada com agulha reta, e incubados a 35°C por 24-48 h.

-utilização de carboidratos-verificou-se a produção de ácido e gás, a partir dos seguintes açúcares: glicose, xilose, arabinose, lactose e salicina. A concentração final dos açúcares foi de 1,0% (p/v), exceto para a salicina, a qual foi de 0,5% (p/v). A série de açúcares de acordo com CHUNG & SUN (1986) e MAC FADDIN (1981), foi inoculada com culturas crescidas por 24 h em ágar comum, e incubadas a 35°C por 48 h; a série de açúcares de acordo com KRAMER et alii (1982), foi incubada a 35°C por 5 dias.

-confirmação da atividade de lecitinase- feito de acordo com RABINOVITCH & VASCONCELLOS (1987), tubos com o meio RVC-líquido foram inoculados com cultura de 24 h em ágar nutriente, e incubados a 35°C por 20-24 h.

-crescimento a 45°C e 55°C- feito de acordo com KRAMER et alii (1982) e GORDON et alii (1973), placas de ágar nutriente foram divididas em cinco partes. Cada parte foi inoculada com estria de 1-2 cm (tocando-se gentilmente a superfície do ágar com alça de 2mm) com cultura de 24 h em ágar comum. As placas foram-então incubadas a 45°C e 55°C por 24-48 h, após o que pesquisava-se a existência de crescimento.

-crescimento a 7% de NaCl- feito de acordo com KRAMER et alii (1982), GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986). Tubos com caldo nutriente a 7% de NaCl, foram inoculados com cultura de 24 h em ágar comum, e incubados a 35°C por um período de 7 a 14 dias. Durante o período de incubação verificou-se se houve crescimento, pela turvação ou formação de película.

-crescimento em caldo nutriente-feito de acordo com GORDON et alii (1973). Tubos de ensaio com caldo nutriente foram inoculados com cultura de 24 h em ágar comum, e incubados a 35°C por um período de até 14 dias. Durante o período de incubação verificou-se a existência de crescimento.

-crescimento em pH 5,7- placas de ágar-Sabouraud divididas em cinco partes foram inoculadas em estria, e tubos com caldo-Sabouraud foram inoculados com cultura de 24 h, e incubados a 35°C por 48 h (GORDON et alii, 1973; SNEATH, 1986). Após o período de incubação pesquisava-se a existência de crescimento no ágar, no caldo, ou em ambos.

-reação no Litmus-milk- feito de acordo com GORDON et alii (1973) e SCHIEMANN (1978). Tubos com o meio de Litmus-milk ; foram inoculados com culturas de 24 h, e incubados a 35°C por um período de 7 a 14 dias. Durante o período de incubação observou-se as reações de mudança ocorridas no meio.

-utilização de citrato-feito de acordo com KRAMER et alii (1982) e SMIBERT & KRIEG (1981), placas com o meio de citrato de Simmon, foram divididas em cinco partes, e inoculadas em estrias (tocando-se gentilmente a superfície do ágar) com culturas de 24 h, incubadas a 35°C por 5 dias. Após o período de incubação observou-se existência de crescimento.

-atividade de urease-de acordo com SHINAGAWA et alii (1985), tubos com o meio de urease de Christensen inclinado, foram inoculados com cultura de 24 h, e verificou-se a modificação do meio após período de incubação de 5 dias a 35°C.

-teste de hidrólise de amido- feito de acordo com SHINAGAWA et alii (1985), placas de ágar-amido, foram divididas em cinco partes e inoculadas em estrias de 1-2 cm (tocando-se gentilmente a superfície do ágar) com alça de 2mm com culturas de 24 h em ágar comum, e incubadas a 35°C por 24 e 48 h. Após a incubação, solução de lugol foi espalhada sobre a superfície da placa. A leitura do teste foi feita de acordo com GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986), ou seja, pesquisando-se a existência de zona de transparência ao redor e sob o crescimento.

-hidrólise de gelatina-feito de acordo com SMIBERT & KRIEG (1981), placas com ágar-gelatina foram divididas

em cinco partes, e inoculadas em estrias com culturas de 24 h, e incubadas a 35°C por 24 h. Após incubação, inundou-se as placas com reagente precipitador da gelatina. Considerou-se teste positivo quando zonas transparentes ao redor do crescimento.

-hidrólise de caseína- feito de acordo com GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986), placas com ágar-leite foram divididas em cinco partes e inoculadas em estria com alça de 2mm (tocando-se gentilmente a superfície do ágar) com cultura de 24 h, e foram incubadas a 35°C por 24 h. Após a incubação verificou-se o aparecimento de zonas transparentes ao redor do crescimento.

-hidrólise de tirosina- feito de acordo com HARMON (1984), tubos inclinados de ágar-tirosina 0,5% foram inoculados na superfície com alça de 2mm com cultura de 24 h, e foram incubados a 35°C por 5 dias. O aparecimento de zonas transparentes abaixo do crescimento era indicativo da dissolução dos cristais de tirosina. Os resultados foram expressos conforme a profundidade da transparência, variando de (+f), (+) e (++). Observou-se também o possível aparecimento de um pigmento negro solúvel, conforme GORDON et alii (1973).

2.2.3. caracterização sorológica

-sorotipagem por teste de aglutinação rápida em lâmina- as cepas com a biquímica sugestiva de B.cereus foram confirmadas através de reações sorológicas de aglutinação. As cepas foram cultivadas em caldo nutriente por 20 h a 33-35°C. À cada 10 ml de meio de cultivo líquido adicionou-se 0,1 ml de formalina; depois da inativação por cerca de 1 h, foram centrifugadas a 12000xg por 15 min. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se os precipitados com 2 ml de solução salina a 0,85% estéril. Após a homogeneização foram filtrados com pipeta Pasteur com a ponta recoberta por algodão. Para o teste de aglutinação foram colocados na lâmina 1 gota do antissoro flagelar mais 1 gota do antígeno flagelar (cepa teste de B.cereus preparada como descrito acima) misturando-se com bastão capilar. Os antissoros (H) foram produzidos no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo

Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro, e conforme comunicação pessoal do Dr. Leon Rabinovitch, foram preparados com base na técnica descrita por GILBERT & PARRY (1977) e TAYLOR & GILBERT (1975), com modificações, e foram absorvidos contra aglutinogênios flagelares de B.thuringiensis das seguintes variedades sorológicas: var.tolworthi, var.sotto, var.pakistani e var.morrisoni, retirando-se então as aglutininas homólogas. Foram usados 11 antissoros diferentes para os ensaios de aglutinação, considerando-se aglutinações positivas a formação intensa de "grumos" em até um máximo de dois min de reação. Uma gota de antígeno flagelar sem adição de soro, foi usada como controle de auto-aglutinação.

2.3. Produção de enzimas

2.3.1. produção de amilases

2.3.1.1. condições de crescimento- foram distribuídos 100 ml de meio de produção conforme TAKASAKI(1976) em frascos Erlenmeyer de 500 ml e esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C por 15 min. Os frascos eram inoculados com 1 ml de pré-inóculo do microrganismo no mesmo meio, e incubados em agitador recíproco, com velocidade regulada para 150 rpm, à temperatura de 28°C, durante 65 h e 90 h, respectivamente.

Após o período de incubação, o cultivo foi submetido à centrifugação de 12000xg por 10 min. O sobrenadante foi analisado quanto à produção de beta-amilase (TAKASAKI, 1976), e alfa-amilase (SMITH & ROE, 1949; LINARDI, 1985).

2.3.1.2. condições de ensaio para determinação da atividade alfa-amilásica- a cada 0,5 ml de amido solúvel a 1% acrescentava-se 0,1 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0; 0,3 ml de água destilada e 0,1 ml do sobrenadante.

Após incubação de 5 min em banho de água à temperatura de 50°C, a reação era paralisada pela adição de 0,5 ml de HCl 1,0N. Para o desenvolvimento de cor, adicionava-se 0,1ml de solução de lugol (0,3% de I em 30% de solução de KI), sendo o volume completado para 15 ml. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 620nm.

Usou-se como branco o tampão fosfato 0,1M, pH6,0.

A atividade amilásica foi determinada conforme SMITH & ROE (1949), MEDDA & CHANDRA (1980) e LINARDI (1985), sendo expressa como atividade dextrinizante.

Usou-se amido solúvel nas concentrações de 500; 250; 125; e 62,5 µg/ml na construção da curva padrão.

Uma unidade dextrinizante (UD) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 mg de amido por min, nas condições específicas de ensaio.

2.3.1.3. condições de ensaio para determinação da atividade de beta-amilase-conforme TAKASAKI (1976), a atividade de beta-amilase foi medida numa mistura de reação de 4ml, contendo 2 ml de amido solúvel 2% em tampão fosfato pH 7,0 e solução de enzima. O tempo de reação foi de 10 min a 40°C, e a maltose formada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945). Usou-se como branco água destilada ao invés de solução de enzima, na mistura de reação.

Usou-se glicose nas concentrações de 500; 250; 125; e 62,5 µg/ml na construção da curva padrão.

Uma unidade de beta-amilase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 mg de maltose a partir de amido solúvel, nas condições específicas do ensaio.

2.3.2. produção de proteases neutra e alcalina

2.3.2.1. condições de crescimento-foram distribuídos 100 ml de meio de produção conforme OISHI et alii (1963) em frascos Erlenmeyer de 500 ml e esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C por 15 min. Os frascos eram inoculados com 1 ml de pré-inóculo do microrganismo no mesmo meio, e incubados em agitador recíproco, com velocidade regulada para 150 rpm, à temperatura de 28°C, durante 48 h. Após o período de incubação, o volume cultivado foi submetido à centrifugação de 12000xg por 10 min. O sobrenadante foi analisado quanto a produção de proteases neutra e alcalina, segundo técnica descrita por ANSON (1937) e modificada de acordo com LINARDI (1985).

2.3.2.2. condições de ensaio para determinação da atividade proteolítica- para cada 0,2 ml de caseína purificada a 0,6% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 ou 0,1M de tampão TRIS-HCl, pH 9,0 (atividade determinada como protease neutra ou alcalina respectivamente) adicionavam-se 0,4 ml do sobrenadante a ser testado. Após 5 min de incubação a 40°C em banho de água, a reação era paralisada pela adição de 2,0 ml de ácido tricloroacético a 0,11M, contendo ácido acético 0,33M e acetato de sódio 0,22M. A mistura era deixada à temperatura ambiente por 30 min, e após era centrifugada a 3000xg por 10 min. O sobrenadante era filtrado em papel de filtro. Para cada 1,0 ml do filtrado acrescentavam-se 2,0 ml de NaOH 0,5N e 0,6 ml de reagente de fenol 1,0N. As leituras eram feitas em espectrofotômetro a 550nm.

Como branco usou-se 1,0 ml de caseína a 0,6% diluída em tampão fosfato ou TRIS, acrescido de 0,2 ml do sobrenadante, com adição imediata de 1,0 ml de ácido tricloroacético a 0,11M. Ao filtrado, como descrito acima, acrescentavam-se 2,0 ml de NaOH 0,5N e 0,6 ml de reagente de fenol. Usou-se a tirosina nas concentrações de 0,05; 0,075; 0,10; 0,15; e 0,20 mg/ml na construção da curva padrão. Uma unidade proteolítica (UP) foi definida como a quantidade de enzima que, atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/ml de tirosina por min, nas condições específicas do ensaio.

2.4. Avaliação da toxicidade das cepas de B.cereus

2.4.1. inoculação intraperitonal em camundongos

-produção de toxina- foram distribuídos 100 ml do meio de infusão de cérebro e coração, suplementado com 0,1% de glicose (p/v) (do inglês, BHIG) conforme TURNBULL (1976), em frascos Erlenmeyer de 500 ml e esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C por 15 min. Os frascos eram inoculados com 1 ml de pré-inóculo do microrganismo no mesmo meio (18 h a 35°C) (SHARMA & DOGRA, 1983), e incubados em agitador recíproco, com ve

locidade regulada para 150 rpm, à temperatura de 36°C, durante 16-18 h. Após o período de incubação, os volumes cultivados foram submetidos à centrifugação de 1200xg por 30 min a 4°C, e os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até serem utilizados nas inoculações.

-inoculação intraperitoneal- conforme MOLNAR(1962), SRIVASTAVA et alii (1981) e RABINOVITCH et alii (1985), porções de 0,5 ml de sobrenadante foram injetadas em grupos de cinco camundongos, por via intraperitoneal. Foram utilizados grupos de nove camundongos para injeção de meio de cultura estéril e solução salina 0,85%, como controles negativos.

O efeito tóxico foi medido pelo número de mortes durante o período de 24 h após a inoculação, confirmando-se o resultado até 48 h.

-dosagem de proteínas- de acordo com MOLNAR (1962), foi determinado o teor de proteínas dos sobrenadantes injetados, usando o método de LOWRY et alii (1951). Usou-se albumina de ovo nas concentrações de 2,5; 1,0; 0,5; 0,1; e 0,05 mg/ml na construção da curva padrão.

2.4.2. teste de Aumento da Permeabilidade Vascular (APV)

2.4.2.1. produção de toxina- foram distribuídos 20 ml de meio de infusão de cérebro e coração, suplementado com 0,1% (p/v) de glicose (BHIG), esterilizado à 121°C por 15 min, em frascos Erlenmeyer de 500 ml. Os frascos foram inoculados com 1 ml de pré-inóculo do microrganismo em caldo nutriente (15 h a 35°C), e incubados em agitador recíproco, com velocidade regulada para 150 rpm, à temperatura de 36°C, durante um período de 6 h (KRAMER et alii, 1982; GILBERT & KRAMER, 1984). Conforme KRAMER et alii (1982), durante o período de incubação, volumes de 0,2 ml de NaOH 0,1N, foram adicionados a 3,5 h e 4,5 h, em cada frasco para corrigir o pH do meio. Após 6 h de incubação, as culturas foram filtradas através de membranas Millipore 0,2 µm e os filtrados mantidos a -20°C até serem utilizados.

2.4.2.2. inoculação intradérmica em coelho-volumes de 200 μ l (0,2 ml) dos filtrados de culturas foram injetados intradérmicamente no dorso previamente depilado e quadriculado (3x3 cm) de um coelho albino adulto. Após três horas da inoculação, injetou-se intravenosamente, pela veia marginal da orelha, 4,0 ml de uma solução 2% (p/v) de azul de Evans em salina 0,85%. As zonas azuladas no dorso do animal foram medidas em diferentes tempos, e após 24 h da inoculação, o animal foi sacrificado, e as lesões foram medidas pelo lado do tecido celular subcutâneo.

2.4.2.3. inoculação intradérmica em camundongos-volumes de 100 μ l (0,1 ml) dos filtrados de culturas foram injetados intradérmicamente no dorso previamente depilado e quadriculado (1,5x1,5 cm) de camundongos. Após três horas da inoculação, injetou-se intravenosamente, 0,2 ml de uma solução 0,25% (p/v) de azul de Evans em salina 0,85%. Observou-se o aparecimento de zonas azuladas no dorso dos animais, durante um período de 3 h (GLATZ & GOEPFERT, 1973). Após esse período, os animais foram sacrificados, e verificou-se a presença de zonas com hemorragia pelo lado do tecido celular subcutâneo. Foram escolhidas quatro cepas, e repetiu-se o teste de APV, conforme descrito acima, modificando-se apenas o volume injetado para 50 μ l (0,05 ml).

2.5. Microscopia Eletrônica

2.5.1. técnica de contrastação negativa- adotou-se como procedimento, a deposição sobre a grade (tela) de 1 gota de cultura-teste (cultivada em ágar nutriente inclinado por 18-20 h à 35°C) lavada suavemente com gotas de solução de bacitracina a 10% (agente umectante), e após sedimentação, o excesso de líquido foi absorvido com papel de filtro.

Logo após, 1 gota do agente contrastante (substância eletrodensa) silicotungstato de sódio a 1% (pH 7,0) foi colocada sobre a grade + cultura, e o excesso retirado imediatamente. As grades assim preparadas foram observadas por microscopia eletrônica (HASCHEMEYER & MYERS, 1972; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 1982).

-RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Isolamento

O meio utilizado no isolamento e enumeração de B.cereus de alimentos neste trabalho, foi o MYP-ágar, que segundo dados da literatura, exibe boa performance no isolamento direto, fornecendo logo de início, duas importantes propriedades na identificação dos isolados.

Conforme FIGURA 01, a aparência das colônias ditas presuntivas de B.cereus, consiste na coloração rósea e presença de zona opaca de precipitação ao redor. Desde que, o que nos interessa é a identificação do organismo isolado, o importante então é utilizar um esquema que permita a sua diferenciação das outras espécies do Grupo I dos Bacillus, a saber:

B.megaterium, B.mycoides, B.thuringiensis e B.anthraxis.

A primeira espécie, isto é, B.megaterium, já está fora da diferenciação, pois apresenta reações opostas no meio de isolamento; lecitinase negativa e fermentação de manitol positiva.

Observando a FIGURA 02, percebemos que os demais microrganismos são lecitinase positiva e não fermentadores de manitol; apesar da cepa de B.anthraxis usada, não ter apresentado forte atividade de fosfolipase.

A partir daqui, é possível descartar-se o B.mycoides, se verificarmos a característica de crescimento rizóide em ágar nutriente, como mostra a FIGURA 03.

Outra característica importante e definitiva na diferenciação do B.cereus, neste ponto, do B.anthraxis, é a atividade hemolítica em ágar-sangue (FIGURA 04); fica claro que B.cereus causa hemólise, pela zona de transparência ao redor do crescimento, enquanto que o B.anthraxis não apresenta atividade beta-hemolítica, como é denominada.

Finalmente, a colônia presuntiva de B.cereus será definitivamente identificada, se pela observação microscópica da cultura em Ágar-Extrato de Solo, não forem encontrados cristais para-esporais no esporângio não entumescido, de bastonetes com largura maior que 1,0 μ m. Dessa forma, podemos diferenciar o B.cereus do B.thuringiensis, já que dentre os dois, é o segun-

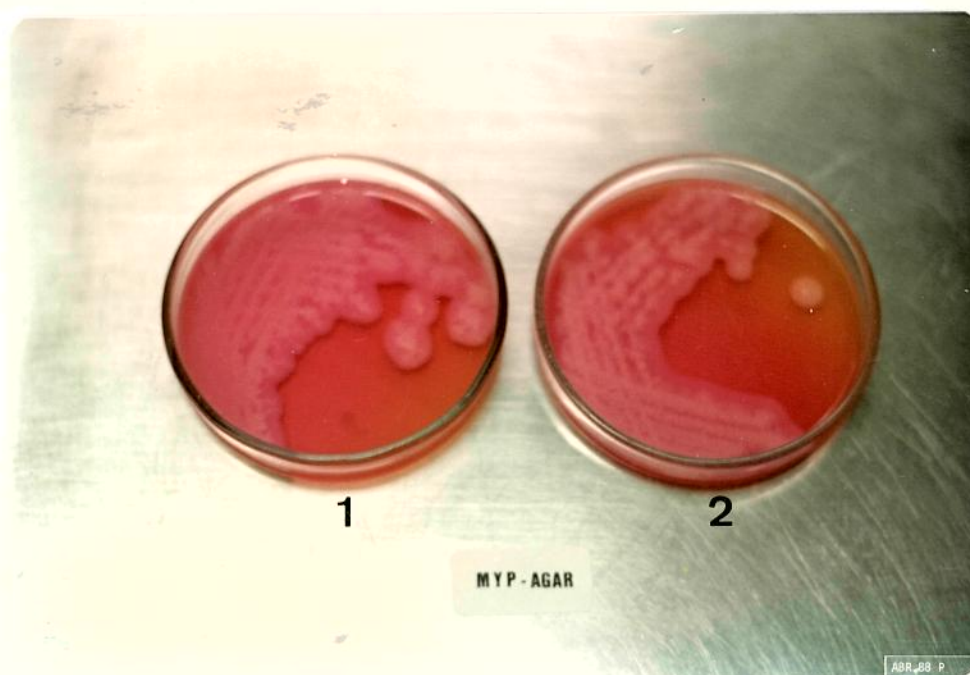


FIGURA 01 - Esgotamento em estrias de B.cereus no meio seletivo MYP-ágar (24 h/35°C). Notar as zonas de precipitação ao redor das colônias, em virtude da atividade da fosfolipase C sobre a lecitina da gema-de-ovo, e a coloração rósea típica da não fermentação de manitol. placa 1= B.cereus cepa 4/1

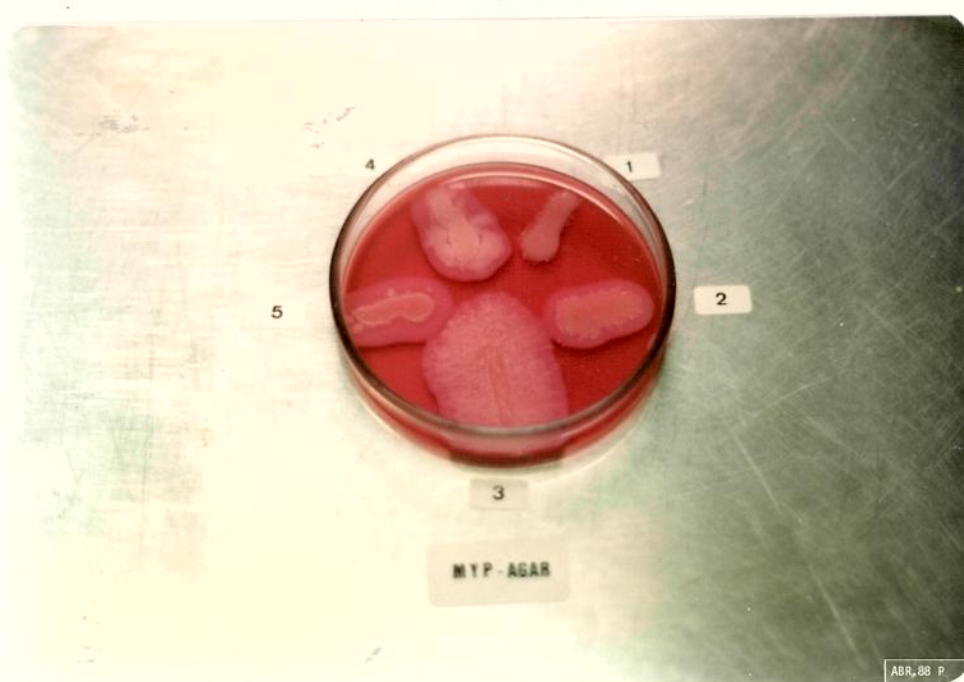


FIGURA 02 - Confirmação da atividade de lecitinase em MYP-ágar

1= B.anthraxis IAL 116

2= B.thuringiensis var.sotto LFB-FIOCRUZ 471

3= B.mycoides (isolado de carne moída cozida)

4= B.cereus (cepa 4/1)

5= B.cereus (cepa 280/1)

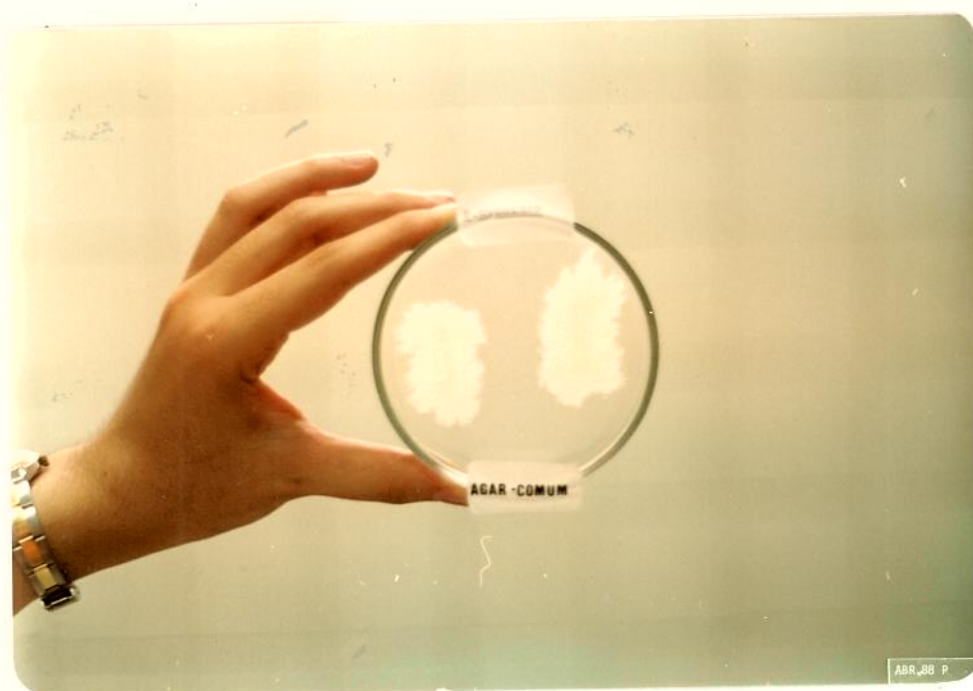


FIGURA 03 - Crescimento rizóide de B.mycoides em ágar nutriente (24 h/ 35°C), cepa isolada de carne moída cozida.



FIGURA 04 - Atividade hemolítica de B. cereus⁴⁻⁵, B. thuringiensis², B. mycoides³ e B. anthracis¹, em ágar-sangue de carneiro (24 h/35°C).

1= B. anthracis IAL 116

2= B. thuringiensis var. sotto LFB-FIOCRUZ 471

3= B. mycoides (isolado de carne moída cozida)

4= B. cereus (cepa 4/1).

do que apresenta cristais de toxina como corpos para-esporais, os quais podem ser perfeitamente observados por microscopia óptica, em montagem úmida, entre lâmina e lamínula, de cultura esporulada.

A TABELA 01 traz os dados de contagem e tipo de alimento de onde foram isolados os B.cereus, identificados conforme o esquema apresentado e justificado acima.

Cabe lembrar, que esquemas de identificação devem usar o menor número possível de testes, desde que estes permitam uma adequada diferenciação do organismo em questão, de outros estreitamente relacionados. Este esquema, se assemelha àqueles sugeridos por HARMON (1984) e RABINOVITCH & VASCONCELLOS (1987), diferindo, respectivamente, na técnica usada para determinação da presença dos cristais de toxina e motilidade; e no meio seletivo usado no isolamento.

É importante salientar, que as cepas de B.cereus designadas como 90/1 e 280/1, foram isoladas de alimentos envolvidos em casos de intoxicação alimentar, respectivamente, de bomba-creme e bolo-aniversário. Conforme TABELA 02, em ambos os casos, foi isolado também Staphylococcus aureus, e em contagens significativas, $3,1 \times 10^7$ ufc/g na bomba-creme e $5,6 \times 10^7$ ufc/g no bolo-aniversário.

GREAVES (1985) registrou um caso de intoxicação alimentar, cujos sintomas poderiam sugerir etiologias tanto do S.aureus como do B.cereus; ambos os organismos foram isolados do alimento incriminado, e ainda, os testes de enterotoxina revelaram a presença das enterotoxinas A e D produzidas por S.aureus. Entretanto, permaneceu a dúvida, se os pacientes sofreram uma intoxicação devido ao B.cereus ou ao S.aureus, ou então, se sofreram uma intoxicação mista envolvendo S.aureus ou B.cereus.

Da mesma forma, nos dois casos de intoxicação alimentar registrados neste trabalho, persiste a dúvida de qual é o agente causador da gastroenterite.

TABELA 01 - Contagens e tipo de alimento de onde foram isoladas as cepas de B.cereus

Cepas	Alimento-"origem"	Data-isolamento	Contagem
			ufc/g ou / ml
4/1	sorvete cremoso-sabor morango	24/04/87	200
43/2	doce de geléia e feijão	21/05/87	> 5000
71/2	sopa (refeição pronta)	04/06/87	> 5000
79/2	leite B- pasteurizado	12/06/87	> 5000
90/1	bomba-creme	11/06/87	18500
159/1 *	farinha de mandioca	26/12/84	-----
165/1	cenoura ao molho branco (refeição pronta)	07/07/87	2400
191/1 *	leite em pó	17/04/85	-----
218/5	polpa de fruta congelada	06/08/87	1100
236/5	omelete (refeição pronta)	10/09/87	1000
270/1	feijão cozido (refeição pronta)	30/10/87	> 5000
275/2	sopa com resíduo (refeição pronta)	29/10/87	220
277/1	asa de frango (crua)	30/10/87	1300
280/1	bolo de aniversário	07/12/87	$4,5 \times 10^7$
BN-1 *	leite achocolatado (embalagem Tetra-Pak)	17/12/87	-----
BPS-2 *	queijo tipo "petit-suisse"	17/12/87	-----

*Obs.: -cepas 159/1 e 191/1 - fornecidas pela coleção de culturas da seção de Microbiologia de Alimentos-IAL (SP) - sem dados de contagem.

-cepas BN-1 e BPS-2 - fornecidas pelo laboratório de controle de qualidade da Companhia Nestlé - sem dados de contagem.

-cepas isoladas de alimentos envolvidos em casos de intoxicação alimentar: 90/1 e 280/1.

(ufc/g ou /ml= unidades formadoras de colônias por g ou ml)

TABELA 02 - Dados clínicos e epidemiológicos dos casos de
intoxicação alimentar

Características	Alimento envolvido	
	bomba-creme	bolo-aniversário
Período de incubação	3 a 5 h	12 h
Sintomas:		
náusea	+	nr
vômitos	+++	nr
diarréia e cólicas abdominais	++	+
número de pessoas afetadas	80	nr
Microrganismos isolados:		
<u>S.aureus</u> (ufc/g)	$3,1 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$
<u>B.cereus</u> (ufc/g)	$1,85 \times 10^4$	$4,5 \times 10^7$

Obs.: - as cepas de B.cereus 90/1 e 280/1 usadas neste trabalho,
foram isoladas, respectivamente, da bomba-creme e
bolo-aniversário.

- as cepas de S.aureus isoladas do bolo de aniversário
são coagulase (+); termo-nuclease(+); lecitinase (+);
e produtoras de toxina do tipo A.

(nr)= dados não registrados.

2. Características do microrganismo

A TABELA 03 apresenta as características morfológicas e bioquímicas das cepas de B.cereus isoladas. As propriedades determinadas incluem, tanto aquelas importantes para a identificação do isolado como sendo B.cereus (morfologia, motilidade, não fermentação de manitol, produção de lecitinase e hemolisinas), como aquelas que não se restringem à espécie, mas se estendem a mais de 70,0% das espécies de Bacillus, por exemplo: fermentação de glicose (84,4%), hidrólise de caseína (78,1%), hidrólise de gelatina (75,0%), redução de nitrato a nitrito (68,8%), conforme GORDON et alii (1973) e SNEATH (1986).

É interessante lembrar: que o teste de Voges-Proskauer é positivo para 80,0% das espécies do grupo I dos Bacillus; que os testes de nitrato, Voges-Proskauer e utilização de citrato, apresentam grande heterogeneidade entre as cepas das espécies de Bacillus, inclusive B.cereus, não sendo portanto, adequados para a identificação ou confirmação dessa espécie (HUTCHISON & TAYLOR, 1978; SNEATH, 1986; RAJKOWSKI & MIKOLAJCIK, 1987).

O objetivo de se determinar as características de B.cereus, foi relacionar algum, ou alguns testes bioquímicos à patogenicidade das cepas isoladas.

SHINAGAWA (1987) notou variação entre as linhagens isoladas dos dois tipos de intoxicação alimentar, com respeito a capacidade de hidrolisar amido, e também fermentar a salicina. Correlacionou a hidrólise de amido positiva com as linhagens diarréicas, e a hidrólise de amido negativa com as linhagens eméticas, contrapondo as observações de LOGAN et alii (1979).

RAEVUORI et alii (1977) cita a correlação entre fermentação de salicina e linhagens eméticas.

Para as cepas isoladas neste trabalho, as características bioquímicas que apresentaram variação foram: fermentação de salicina e lactose, hidrólise de amido, produção de pigmento negro solúvel em ágar nutriente, reação em Litmus-milk.

As cepas 79/2, 191/1 e BPS-2, que fermentaram lactose, formaram coelho ácido em 48 h, em Litmus-milk, ficando o meio com pH 4-5, não havendo digestão da caseína pelas proteases, como ocorreu com as demais cepas.

As outras características bioquímicas, cujas respectivas porcentagens de resultados positivos estão a seguir: fermentação de salicina (70,6%), hidrólise de amido (76,5%), produção de pigmento negro solúvel (23,5%), podem talvez ser correlacionadas com a toxicidade das cepas, isso será discutido mais adiante, quando tivermos os resultados dos ensaios biológicos.

A TABELA 04 apresenta os sorotipos das cepas isoladas de B.cereus, porém ainda não são conhecidos quais os antissoros flagelares que estariam mais envolvidos com a síndrome do tipo-emética, e quais aqueles mais frequentes na síndrome do tipo-diarréica, para que uma associação antissoro-patogenicidade pudesse ser feita.

TABELA 03 - Características morfológicas e bioquímicas das cepas de B.cereus

	4/1	43/2	71/2	79/2	90/1	159/1	165/1	191/1	218/5	236/5	270/1	275/2	277/1	280/1	BN-1	BPS-2	ATCC
Reação de Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
célula vegetativa																	
largura, μm	1.2-1.4	1.2-1.4	1.2-1.5	1.2-1.5	1.4-1.6	1.2-1.4	1.2-1.4	1.2-1.4	1.2-1.4	1.2-1.4	1.2-1.6	1.2-1.6	1.2-1.4	1.2-1.4	0.9-1.2	1.2-1.5	1.1-1.2
comprimento, μm	3.1-4.4	3.1-4.5	3.1-4.6	3.1-4.4	3.4-4.4	3.1-4.4	3.1-3.8	3.1-4.4	3.8-4.4	3.8-5.0	3.1-3.8	3.1-3.8	3.1-4.4	3.1-4.5	3.1-4.4	3.1-3.8	3.1-4.8
motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
esporos																	
elipsoidal/cilíndrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
central/paracentral	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
esporângio entumescido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lecitinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
beta-hemólise	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
teste VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH no caldo VP																	
menor que 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
redução de nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glicose C/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
crescimento a:																	
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
crescimento em:																	
NaCl a 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
crescimento a pH:																	
6.8 caldo nutriente	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.7 caldo-sabouraud	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.6 agar-sabouraud	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ácido de: (1/2)*																	
glicose	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
xilose	±/-	±/-	±/-	±/-	-/-	-/-	±/-	-/-	±/-	-/-	±/-	±/-	±/-	-/-	-/-	-/-	-/-
arabinose	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	±/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
salicina	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+
lactose	±/-	±/-	-/-	+/+	-/-	-/-	±/-	+/+	±/-	-/-	-/-	±/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-
manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hidrólise de amido:																	
24 horas	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
48 horas	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
hidrólise de caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hidrólise de gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hidrólise de tirosina	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	++
pigmento negro solúvel	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
utilização de citrato	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
urease	-	-	±	-	±f	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
reação-litmus-milk*:																	
redução	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
coalho ácido (pH 4-5)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
digestão da caseína	++	++	+	-	++	++	+	-	++	++	++	++	++	++	++	-	++

*Obs.: - reação no Litmus-milk:-digestão da caseína-(+)líquido turvo;
(++)líquido transparente (proteólise total).

- ácido a partir de açúcares: (1/2) = (MAC FADDIN, 1981/KRAMER et alii, 1982).

TABELA 04 - Sorotipos das cepas de B.cereus

Cepas	Antissoros*
4/1	5; 6; 7; 8
43/2	4
71/2	4; 6
79/2	4; 5; 6; 7; 8
90/1	6
159/1	1; 10; 11
165/1	4
191/1	5; 6; 7
218/5	1; 9; 10; 11
236/5	6
270/1	6
275/2	4; 6
277/1	4
280/1	6
BN-1	6
BPS-2	6; 7

*Obs.: -soros antiflagelares (H) produzidos no Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB), do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz. (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

- sorotipadas 32,65% das cepas testadas em aglutinação rápida em lâminas, contra os 11 antissoros.

3. Atividades amilolítica e proteolítica das cepas de *B.cereus*

As TABELAS 05 e 06 apresentam os resultados das determinações de atividade amilolítica (alfa e beta-amilases) e de atividade proteolítica (proteases neutra e alcalina das cepas de *B.cereus* isolados).

As atividades amilolíticas, tanto alfa como beta-amilase, mostraram queda de atividade, quando o tempo de cultivo foi de 90 h ao invés de 65 h, provavelmente devido a desnaturação da enzima.

No entanto, nenhuma cepa revelou ter alta atividade amilolítica, comparando-se com os dados de SHINKE et alii (1977), NANMORI et alii (1983), YOSHIGI et alii (1985) e LINARDI (1985). Os resultados de atividade da alfa-amilase a 65 h (valor médio= 3,62; desvio padrão=1,97) e da beta-amilase a 65 h (valor médio= 0,95; desvio padrão=0,23), não são suficientes para associar essas propriedades à patogenicidade das cepas.

As cepas não se revelaram altamente proteolíticas, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho ($\overline{UP-N}=1,38^*$; desvio padrão=0,35; e $\overline{UP-A}=1,10^*$; desvio padrão=0,18), em comparação com os dados de literatura (SCHAEFFER, 1969; HANSON et alii, 1970; LINARDI, 1985); e a razão N/A* das várias cepas, revela que não são significativas as diferenças entre as atividades de protease neutra e protease alcalina (valor médio N/A=1,27 ; desvio padrão=0,35).

(*) obs.: $\overline{UP-N}$ = unidade proteolítica (protease neutra) média.

$\overline{UP-A}$ = unidade proteolítica (protease alcalina) média.

N/A= razão entre $\overline{UP-N}$ e $\overline{UP-A}$.

TABELA 05 - Atividades amilolíticas das cepas de B.cereus

Cepas	Alfa-amilase		Beta-amilase	
	UD/ml		mg/ml	
	65 h	90 h	65 h	90 h
4/1	5,6	2,0	0,7	0,4
43/2	5,6	1,6	1,1	0,4
71/2	2,0	1,5	1,1	0,4
79/2	2,6	1,3	1,4	0,8
90/1	3,0	2,0	0,8	0,4
159/1	3,0	2,0	0,8	0,4
165/1	5,6	1,2	0,9	0,2
191/1	2,0	0,8	1,2	0,5
218/5	1,5	2,2	0,8	0,2
236/5	7,7	2,2	0,8	0,4
270/1	1,8	2,7	1,0	0,3
275/2	3,0	1,8	1,1	0,4
277/1	3,0	1,3	0,7	0,5
280/1	2,2	1,1	0,8	0,4
BN-1	1,8	0,8	0,6	0,4
BPS-2	3,4	1,8	1,0	0,4
ATCC 14579-8	7,7	3,5	1,4	0,4

UD/ml = Unidade Dextrinizante, definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 mg de amido, nas condições específicas do ensaio.

mg/ml = uma unidade de beta-amilase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1,0 mg de maltose a partir de amido solúvel, nas condições específicas do ensaio.

TABELA 06 - Atividades proteolíticas das cepas de B.cereus

Cepas	Proteases		N/A
	UP-N	UP-A	
4/1	1,16	1,04	1,12
43/2	0,98	1,08	0,91
71/2	1,84	1,08	1,70
79/2	1,56	0,88	1,77
90/1	2,04	1,10	1,85
159/1	1,16	1,22	0,95
165/1	1,30	1,02	1,27
191/1	1,02	1,08	0,94
218/5	1,20	1,22	0,98
236/5	1,28	0,86	1,49
270/1	0,86	0,90	0,96
275/2	1,30	1,02	1,27
277/1	1,00	1,16	0,86
280/1	1,84	1,08	1,70
BN-1	1,28	1,28	1,00
BPS-2	1,82	1,00	1,82
ATCC 14579 -8	1,74	1,64	1,06

UP-N = Unidade Proteolítica, dosada como protease neutra;

UP-A = Unidade Proteolítica, dosada como protease alcalina.

Ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/ml de tirosina/min, nas condições específicas do ensaio.

N/A = Razão entre UP-N e UP-A.

4. Avaliação da toxicidade das cepas de B.cereus

A avaliação da toxicidade das cepas de B.cereus foi experimentada em modelos animais através da inoculação intraperitoneal em camundongos, inoculação intradérmica em coelho e camundongo. Os ensaios revelaram a atividade biológica dos sobrenadantes de cultivo de algumas cepas.

Considerando estes modelos, e as condições de temperatura, pH, tempo e meio de cultivo usados, podemos afirmar que, na realidade, foi avaliada a capacidade de produção de toxina diarréica pelas cepas isoladas, já que, de acordo com a literatura, atividades como efeito letal em camundongos, aumento da permeabilidade vascular com formação de edema e hemorragia, são atribuídas, principalmente, à essa exotoxina.

Pela TABELA 07, verificamos que dentre as cepas examinadas, somente as cepas 4/1, 79/2 e 90/1 foram letais para camundongos por inoculação intraperitoneal, demonstrando a presença de um fator responsável pela mortalidade, nos respectivos sobrenadantes de cultivo. Em nenhum dos experimentos desse tipo, foi observada a ocorrência de diarreia nos animais-teste.

Pela TABELA 08, verificamos que não houve diferença significativa entre os sobrenadantes de cultivo com respeito ao teor de proteína. Para se garantir a esterilidade dos sobrenadantes injetados, estes foram filtrados em membrana Millipore 0,45 µm.

A toxina diarréica é termo-lábil, sensível à pHs extremos e à ação de enzimas proteolíticas, e talvez por isso, pode ter havido perda de atividade nas condições prolongadas de cultivo para esses experimentos, fazendo com que as cepas com menor produção de toxina, não demonstrassem nenhum efeito letal, bem como, ocorresse variação nas taxas de mortalidade pelas cepas 79/2 e 90/1. Opostamente, a cepa 4/1, mantém a taxa de mortalidade ao redor de 60-70%; isto sugere a possível existência de um outro fator tóxico e letal, cuja produção e/ou atividade não dependam das condições de cultivo e inoculação.

As condições ótimas de produção e atividade máxima de toxina diarréica, foram seguidas para os ensaios de inoculação intradérmica em coelho e camundongo, realizados conforme

ESQUEMA 01, FIGURAS 05, 06, 07; e ESQUEMA 02, FIGURAS 08 e 09, respectivamente.

A variação nos resultados de aumento da permeabilidade vascular (cuja unidade foi definida segundo SHARMA & DOGRA, 1983) constantes da TABELA 09, e de intensidade da coloração azulada em pele de coelho (TABELA 10), conjuntamente com os resultados de intensidade de hemorragia em tecido celular subcutâneo de camundongos, demonstrou que várias cepas produziram toxina diarreica, só que em quantidades diferentes.

Na reação de aumento da permeabilidade vascular (APV) em pele de coelho, verificou-se aumento de volume (indicando formação de edema) e hipertermia (indicando reação inflamatória), especialmente nos pontos inoculados com os filtrados de cultivos das cepas 4/1, 90/1, 270/1 e ATCC 14579-8.

Novamente, a cepa 4/1 exibiu um comportamento particular, pois o seu filtrado causou, tanto a reação de APV de coloração azul mais intensa e mais circular (não espalhada) em coelho, como a maior área de hemorragia em tecido celular subcutâneo de camundongo.

Foi feita microscopia eletrônica, para procurar alguma diferença ultraestrutural entre as cepas, incluindo as cepas 4/1, 79/2, 90/1, 218/5, 280/1 e BPS-2, cujos resultados são apresentados adiante. Este grupo cobre 1/3 das cepas utilizadas neste trabalho, incluindo aquelas responsáveis pela mortalidade em camundongos, aquelas isoladas de alimentos envolvidos em intoxicação e outras cepas que apresentaram resultados positivos e negativos de APV em coelho e camundongo.

As TABELAS 12 e 13 trazem os resultados e a correlação entre os testes bioquímicos que apresentaram variação mais significativa e os ensaios biológicos utilizados neste trabalho.

Concluimos que, a variabilidade dos testes bioquímicos, e a não especificidade dos ensaios de APV e letalidade, os quais envolvem mais de uma entidade tóxica, não permitem o uso deste tipo de correlação na indicação de cepas toxigênicas, isoladas de alimentos envolvidos ou não em casos de intoxicação.

TABELA 07 - Mortalidade de camundongos após inoculação intra-peritonal de sobrenadantes de cultivos de B.cereus

Cepas	Mortalidade			
	teste (A) (*)	%	teste (B) (*)	%
4/1	3/5	60,0	4/6	67,0
43/2	0/5	0	0/6	0
71/2	0/5	0	0/6	0
79/2	6/6	100,0	2/6	34,0
90/1	4/5	80,0	2/6	34,0
159/1	0/5	0	0/5	0
165/1	0/5	0	0/5	0
191/1	0/5	0	0/5	0
218/5	0/5	0	0/5	0
236/5	0/5	0	0/6	0
270/1	0/5	0	nr	nr
275/2	0/5	0	nr	nr
277/1	0/5	0	nr	nr
280/1	0/5	0	nr	nr
BN-1	0/5	0	nr	nr
BPS-2	0/5	0	nr	nr
ATCC 14579-8	0/5	0	nr	nr

(*) = número de animais mortos sobre animais inoculados, num período de até 24 h.

teste (A) = sobrenadante de cultivo centrifugado.

teste (B) = sobrenadante de cultivo centrifugado e filtrado em membrana Millipore 0,45 µm.

nr = teste não realizado.

TABELA 08 - Teor de proteína dos sobrenadantes de cultivos de B.cereus usados para inoculação intraperitonal em camundongos

Cepas	Proteínas (mg/ 0,5 ml injetado)	
	teste (A)	teste (B)
4/1	8,2	8,8
43/2	9,6	8,8
71/2	7,6	8,0
79/2	7,4	7,2
90/1	8,0	10,1
159/1	8,8	9,6
165/1	8,8	8,2
191/1	7,4	11,0
218/5	6,9	9,0
236/5	8,8	8,8
270/1	7,9	nr
275/2	9,6	nr
277/1	6,0	nr
280/1	10,4	nr
BN-1	8,8	nr
BPS-2	8,0	nr
ATCC 14579-8	8,0	nr
meio de cultura	11,9	nr

teste (A) = sobrenadante de cultivo centrifugado.

teste (B) = sobrenadante de cultivo centrifugado e filtrado em membrana Millipore 0,45 µm.

nr = não realizado

esquema 1

		270/1	236/5		236/5	270/1
71/2	4/1	79/2	191/1	277/1	280/1	
<u>C</u>	43/2	165/1	90/1	BPS-2	BN-1	275/2
			159/1		BN-1	218/5
				<u>ATCC</u>		

esquema 2

				<u>ATCC</u>		
			159/1		BN-1	218/5
<u>C</u>	43/2	165/1	90/1	BPS-2	BN-1	275/2
71/2	4/1	79/2	191/1	277/1	280/1	
		270/1	236/5		236/5	270/1

ESQUEMA 01 - Localização das cepas de B.cereus na
inoculação intradérmica em coelho

esquema 1= dorso do animal= foto 1 da FIGURA 01

esquema 2= lado do tecido subcutâneo= FIGURA 07

C= controle= meio BHIG estéril

ATCC= cepa B.cereus ATCC 14579-8



FIGURA 05 - Dorso de coelho depilado e quadriculado, 40 min após a inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de B.cereus, mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por manchas de coloração azulada.



1



2

FIGURA 06 - Dorso de coelho depilado e quadriculado após inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de B.cereus, mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por manchas de coloração azulada.
(foto 1= 1 h e 10 min após inoculação,
foto 2= 2 h e 30 min após inoculação)

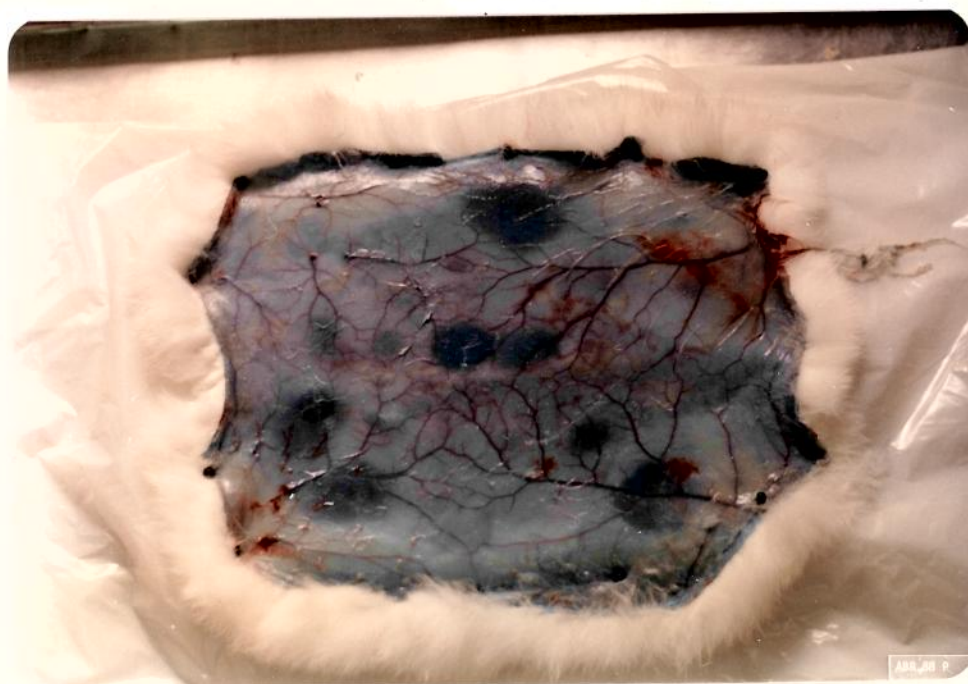


FIGURA 07 - Exposição do tecido celular subcutâneo dorsal de coelho 24 h após inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de B.cereus, mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por manchas de coloração azulada.

TABELA 09 - Cinética do aumento da permeabilidade vascular (APV) por inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de B.cereus em coelho (volume injetado = 200 µl)

Cepas	Diâmetro (cm) = APVU/ml					
	10'	20'	40'	1h10'	2h30'	24h
4/1	2,00	2,25	2,25	2,25	3,00	3,00
43/2	-	-	-	-	-	1,15
79/2	-	0,50	0,55	0,65	0,60	-
90/1	1,40	1,40	1,40	1,40	1,35	2,50
159/1	-	-	-	0,60	0,50	-
165/1	-	-	0,60	0,55	0,85	1,15
218/5	-	-	0,50	0,55	0,55	-
236/5	-	-	-	-	0,55	-
270/1	2,00	2,00	-	1,90	2,50	3,20
275/2	0,65	-	0,50	0,50	0,55	-
280/1	-	-	-	-	-	1,50
BPS-2	-	0,60	0,75	0,55	0,60	2,25
ATCC 14579-8	2,50	2,50	2,50	2,50	2,25	4,25*

-as cepas 71/2, 191/1, 277/1 e BN-1 não causaram APV com o aparecimento de manchas de coloração azulada.

* mancha correspondente à cepa de B.cereus ATCC 14579-8 do tipo espalhada, não circunscrita.

Diâmetro (cm) = média de diâmetros perpendiculares das manchas de coloração azulada no dorso depilado do animal; no tempo de 24 h, a medida foi feita no tecido celular subcutâneo.

APVU/ml = unidade de aumento da permeabilidade vascular, definida como a quantidade de toxina que aumenta 5 mm no diâmetro da mancha azulada; nas condições do experimento, equivale às medidas dos diâmetros (cm).

TABELA 10 - Intensidade da coloração azulada das manchas na reação de APV por inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de B.cereus em coelho

Cepas	Intensidade					
	10'	20'	40'	1h10'	2h30'	24h
4/1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
43/2						+
79/2		+	+	+	+	
90/1	+	+	+	++	++	+++
159/1				+	+	
165/1			+	+	+	
218/5			+	+	+	
236/5					+	
270/1	++	++	+	++	++	++++
275/2	+	+	+	+	+	
280/1						++
BPS-2		++++	++++	++++	+++	++
ATCC 14579-8	+++	+++	+++	++	++	++++

-as cepas 71/2, 191/1, 277/1 e BN-1 não causaram APV com o aparecimento de manchas de coloração azulada.

-as intensidades são correspondentes às manchas da TABELA 09.

Intensidade = variando numa faixa de (+) fracamente azul até (++++) fortemente azul; a intensidade (++++) é bem característica na mancha correspondente à cepa de B.cereus 4/1.

<u>grupo 1</u>		<u>grupo 2</u>	
159/1	<u>C</u>	191/1	90/1
71/2	4/1	BPS-2	218/5
79/2	43/2	236/5	270/1

C

<u>grupo 3</u>	
275/2	BN-1
277/1	280/1
<u>ATCC</u>	165/1

C

ESQUEMA 02 - Localização das cepas de B.cereus na
 inoculação intradérmica em camundongo
 (lado do tecido subcutâneo= foto 2 da FIGURA 09)
grupo 1= preto; grupo 2= verde; grupo 3= vermelho
C= meio BHIG estéril; ATCC= B.cereus ATCC 14579-8



FIGURA 08 - Dorso de camundongo depilado e quadriculado, 1h e 30 min após a inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de B.cereus, mostrando aumento de permeabilidade vascular representada por mancha de coloração azulada; na foto, correspondente à cepa 4/1.

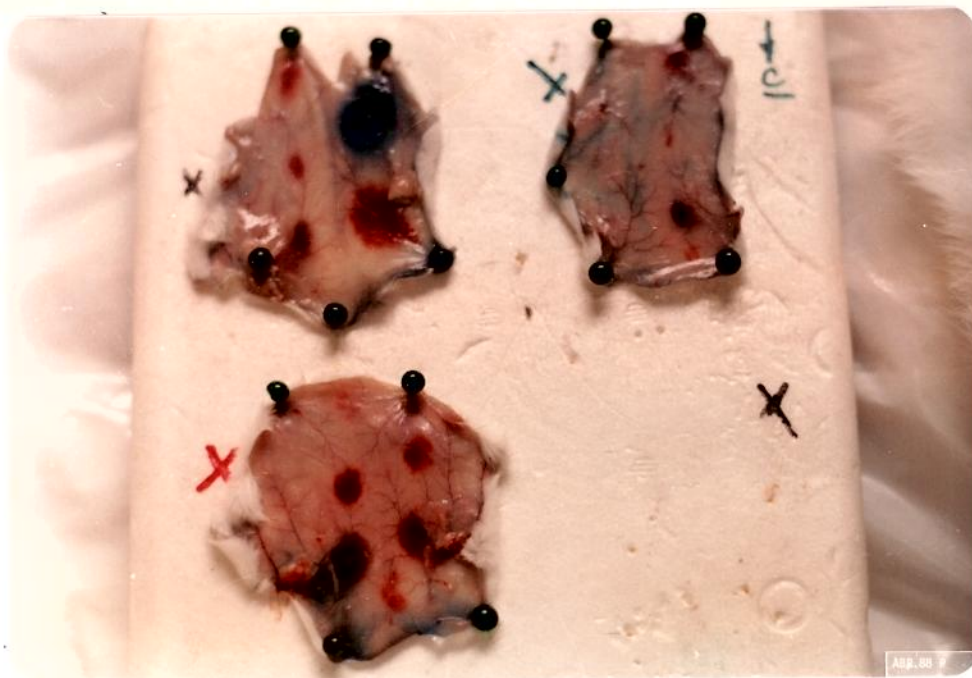
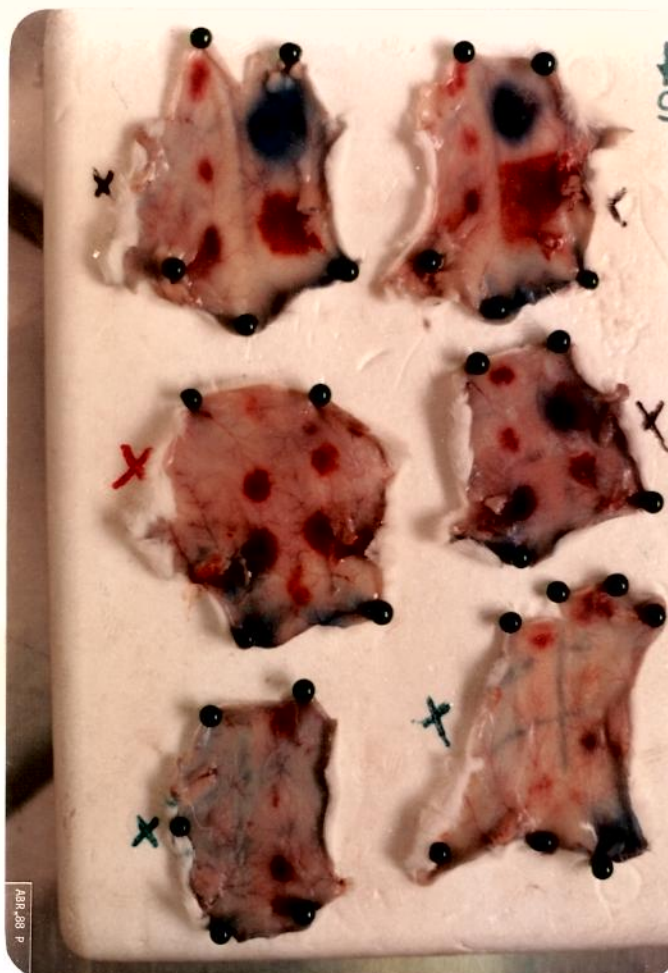


FIGURA 09 - Exposição do tecido celular subcutâneo dorsal de camundongos 2h e 30 min após inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de cepas de B.cereus, mostrando áreas de hemorragia.
(mancha azul=correspondente ao meio BHIG estéril)

TABELA 11 - Reação de APV no tecido celular subcutâneo de camundongos por inoculação intradérmica de filtrados de cultivos de B.cereus

Cepas	Intensidade de APV = hemorragia (volume injetado = 100 µl)
4/1	++++
71/2	+
79/2	++
90/1	+
159/1	+
165/1	+++
270/1	+
277/1	++
280/1	++
ATCC 14579-8	+++

-as cepas 43/2, 191/1, 218/5, 236/5, 275/2, BN-1 e BPS-2 não causaram APV com o aparecimento de áreas de hemorragia.

Obs.: repetição do ensaio usando as cepas 4/1, 79/2, 90/1 e 218/5, injetando um volume de 50 µl das diluições 1:1, 1:4, 1:8, 1:16 do filtrado de cultivo, causou APV apresentando mancha de coloração azulada no tecido celular subcutâneo sem hemorragia somente para a cepa 4/1 nas diluições 1:1 e 1:4.

TABELA 12 - Resultados dos testes bioquímicos que apresentaram variação mais significativa e dos ensaios biológicos das cepas de B.cereus

Cepas	Testes bioquímicos		Ensaio biológico		
	ácido/ salicina	hidrólise/ amido	APV*	APV**	mortalidade camundongos
4/1	+	+	+	+	+
43/2	+	+	+	-	-
71/2	+	+	-	+	-
79/2	-	-	-	+	+
90/1	-	-	+	+	+
159/1	-	+	-	+	-
165/1	+	+	-	+	-
191/1	-	-	-	-	-
218/5	-	+	-	-	-
236/5	+	+	-	-	-
270/1	+	+	+	+	-
275/2	+	+	-	-	-
277/1	+	+	-	+	-
280/1	+	+	+	+	-
BN-1	-	+	-	-	-
BPS-2	+	-	+	-	-
ATCC 14579-8	+	+	+	+	-

APV* = aumento de permeabilidade vascular no tecido celular subcutâneo de coelho após 24 h da inoculação intra - dérmica.

APV**= aumento de permeabilidade vascular no tecido celular subcutâneo de camundongo após 2h 30 min da inoculação intradérmica.

TABELA 13 - Porcentagem de correlação entre os resultados dos testes bioquímicos e dos ensaios biológicos das cepas de B.cereus*

Salicina	APV-coelho (24 h)	Correlação (%)
+	+	35,3
+	-	29,4
-	-	29,4
-	+	5,9

Salicina	APV-camundongo (2h 30')	Correlação (%)
+	+	41,2
+	-	23,5
-	-	17,6
-	+	17,6

Hidrólise de amido	APV-coelho (24 h)	Correlação (%)
+	+	29,4
+	-	47,0
-	-	11,8
-	+	11,8

Hidrólise de amido	APV-camundongo (2h 30')	Correlação (%)
+	+	47,0
+	-	29,4
-	-	11,8
-	+	11,8

(*) dados relativos às cepas de B.cereus, constantes na TABELA 12.

5. Microscopia Eletrônica

As cepas de B.cereus escolhidas, foram examinadas por microscopia eletrônica, usando a técnica de contrastação negativa, conforme mostram as FIGURAS 10, 11 e 12.

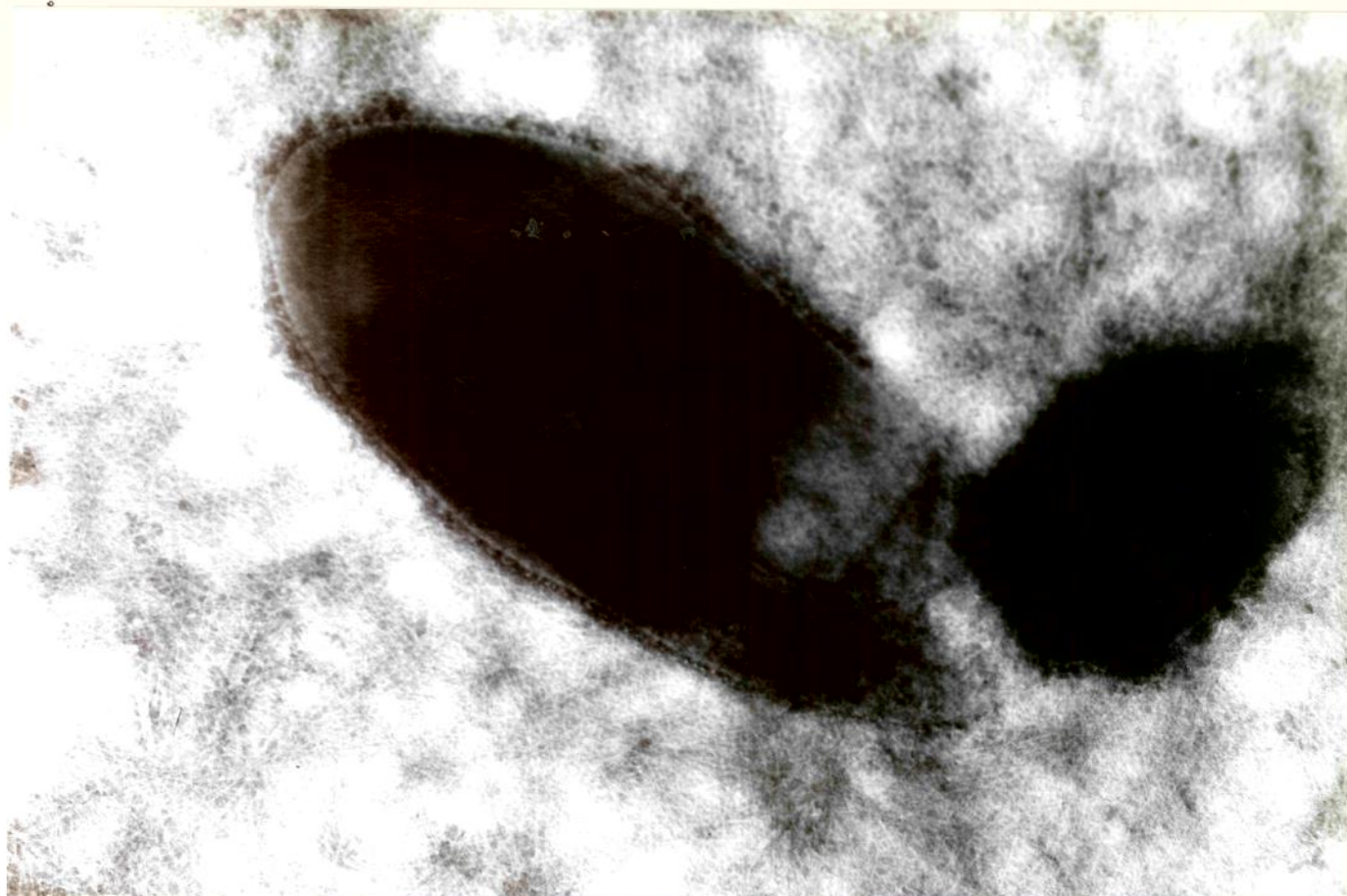
Pode-se observar a morfologia do esporângio (não entumescido) e célula vegetativa (em divisão), respectivamente nas fotos 1 e 2 da FIGURA 12.

Os flagelos podem ser claramente identificados nas FIGURAS 11 e 12, sendo comuns à todas as cepas examinadas; porém, a FIGURA 10 revela que da célula vegetativa (ou melhor, esporângio em rompimento) da cepa 4/1, emanam inúmeros filamentos, longos e finos, que, num emaranhado, formam uma espécie de rede ao redor das células, bem diferente do descrito na literatura. De acordo com DesROSIER & LARA (1981), por exemplo, algumas cepas de B.cereus possuem pili, aleatoriamente distribuídos na superfície dos esporos, mas não nas células vegetativas e esporângio, associando inclusive, esta estrutura à um gene que se expressaria somente durante a esporulação do microrganismo.

A atividade biológica ou natureza dessa estrutura filamentosa identificada, são questões que merecem investigação, pois, o comportamento singular da cepa 4/1, em relação às outras cepas isoladas, igualmente testadas em animais, sugere que esta estrutura pode desempenhar algum papel no(s) mecanismo(s) de toxicidade de B.cereus.

Considerando-se os respectivos aumentos das FIGURAS 10 e 11, foi medida a largura dos flagelos e "pili" com escala milimétrica diretamente nas microfotografias; a largura média dos flagelos é de 0,11 μm , e dos filamentos finos semelhantes a pili ou fimbrias, de 0,05 μm .

1



2

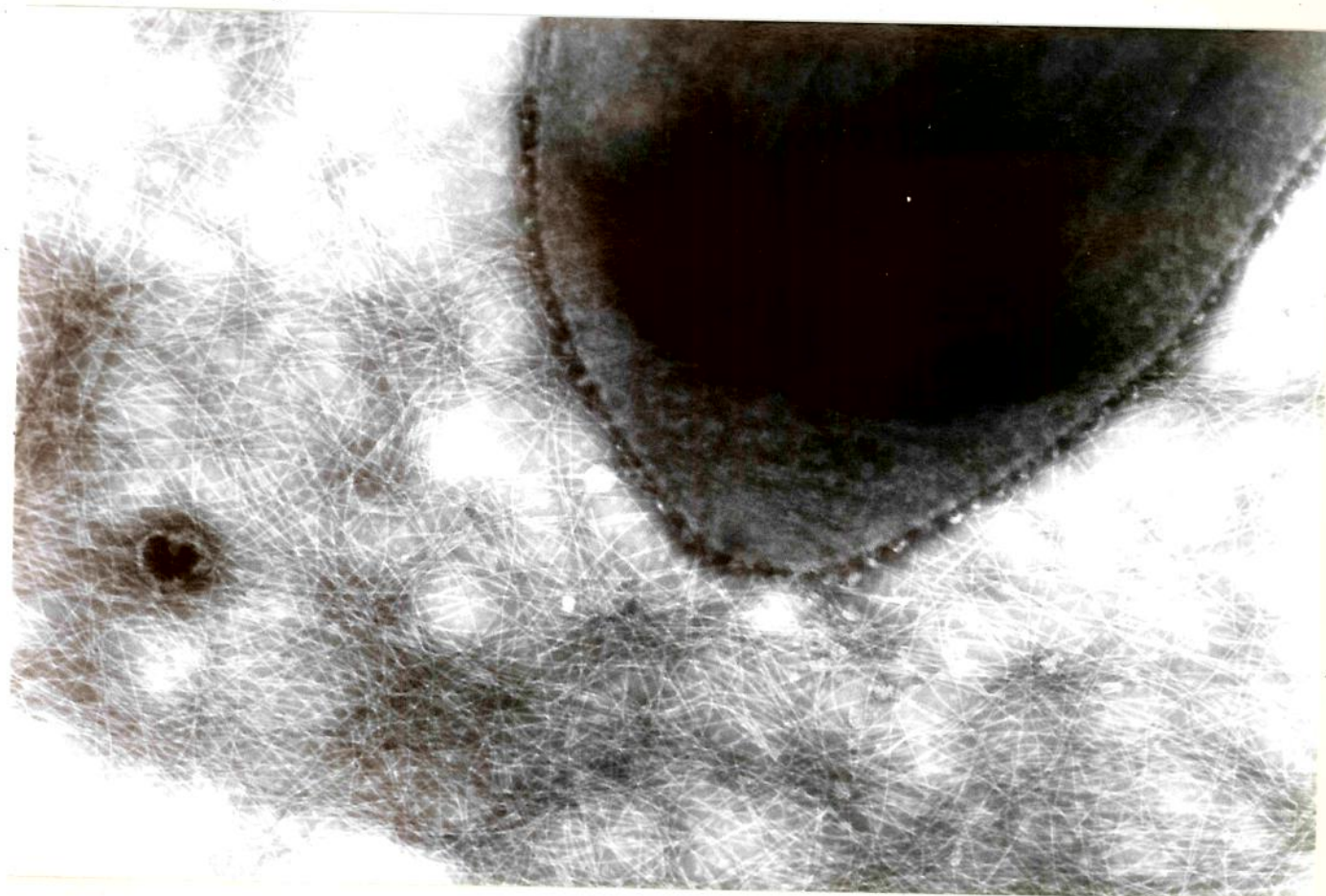
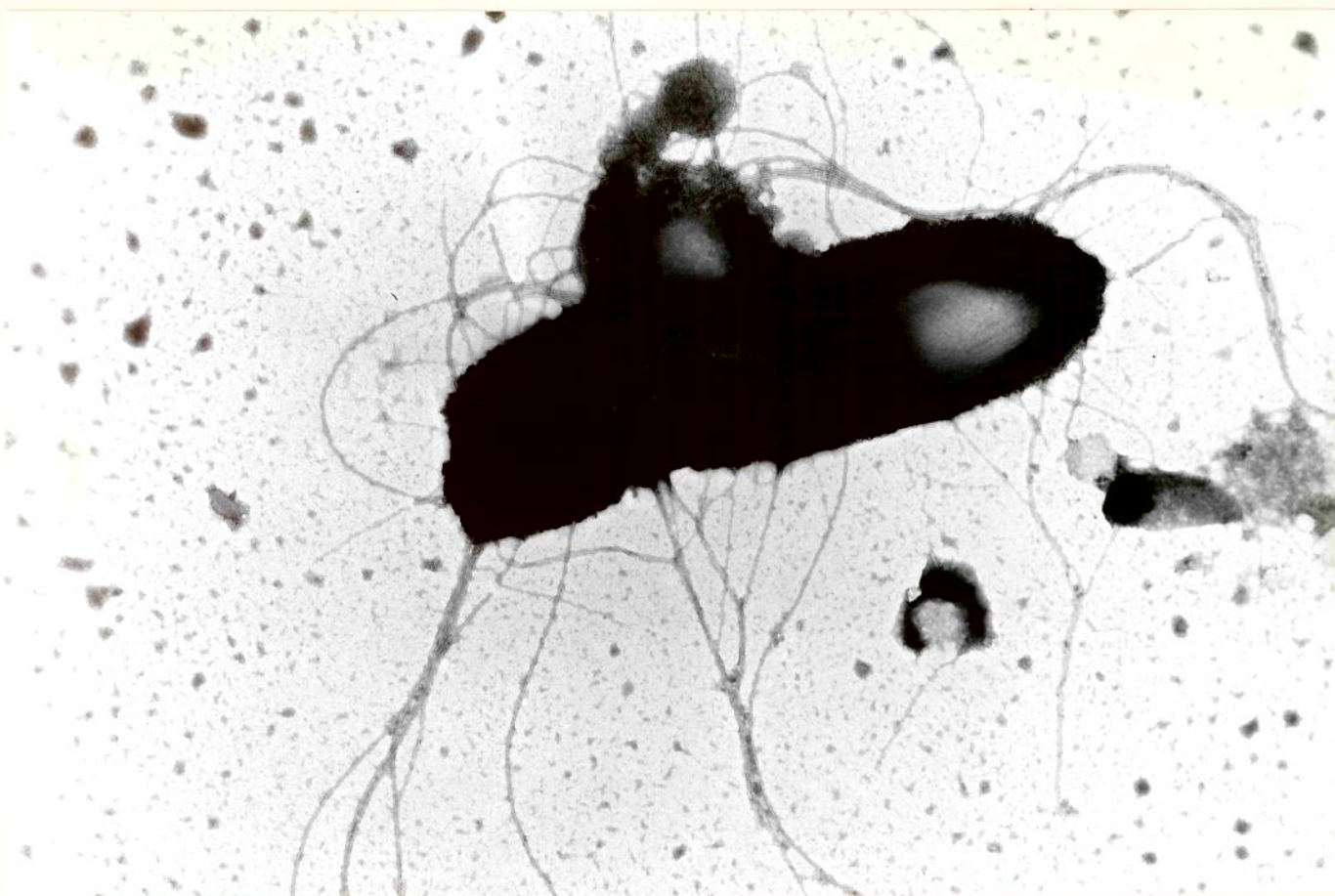


FIGURA 10 - Micrografia de B.cereus (cepa= 4/1) contrastado com silicotungstato de sódio 1% a pH 7,0 (foto 1= x4200; foto 2= x9050)

1



2

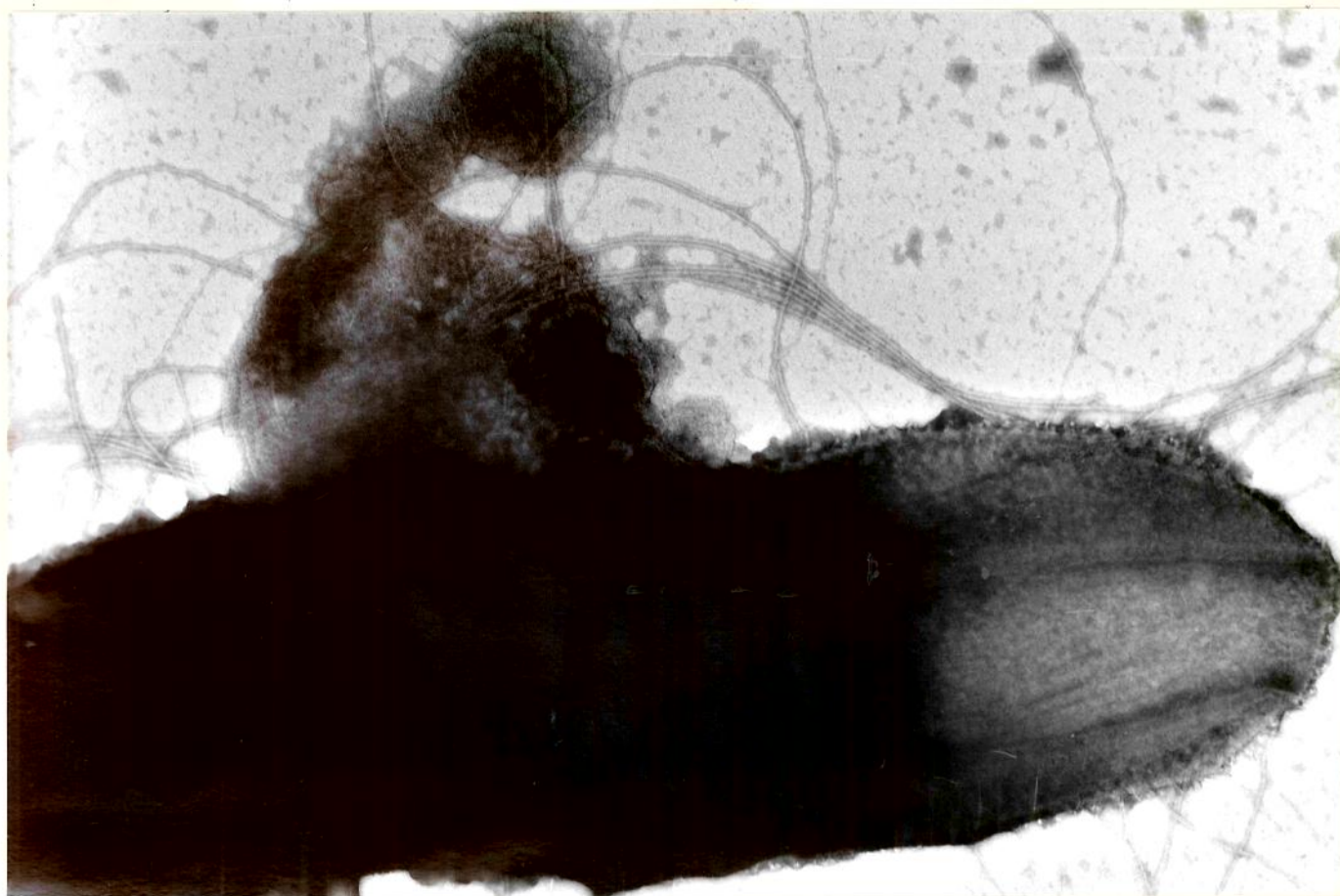
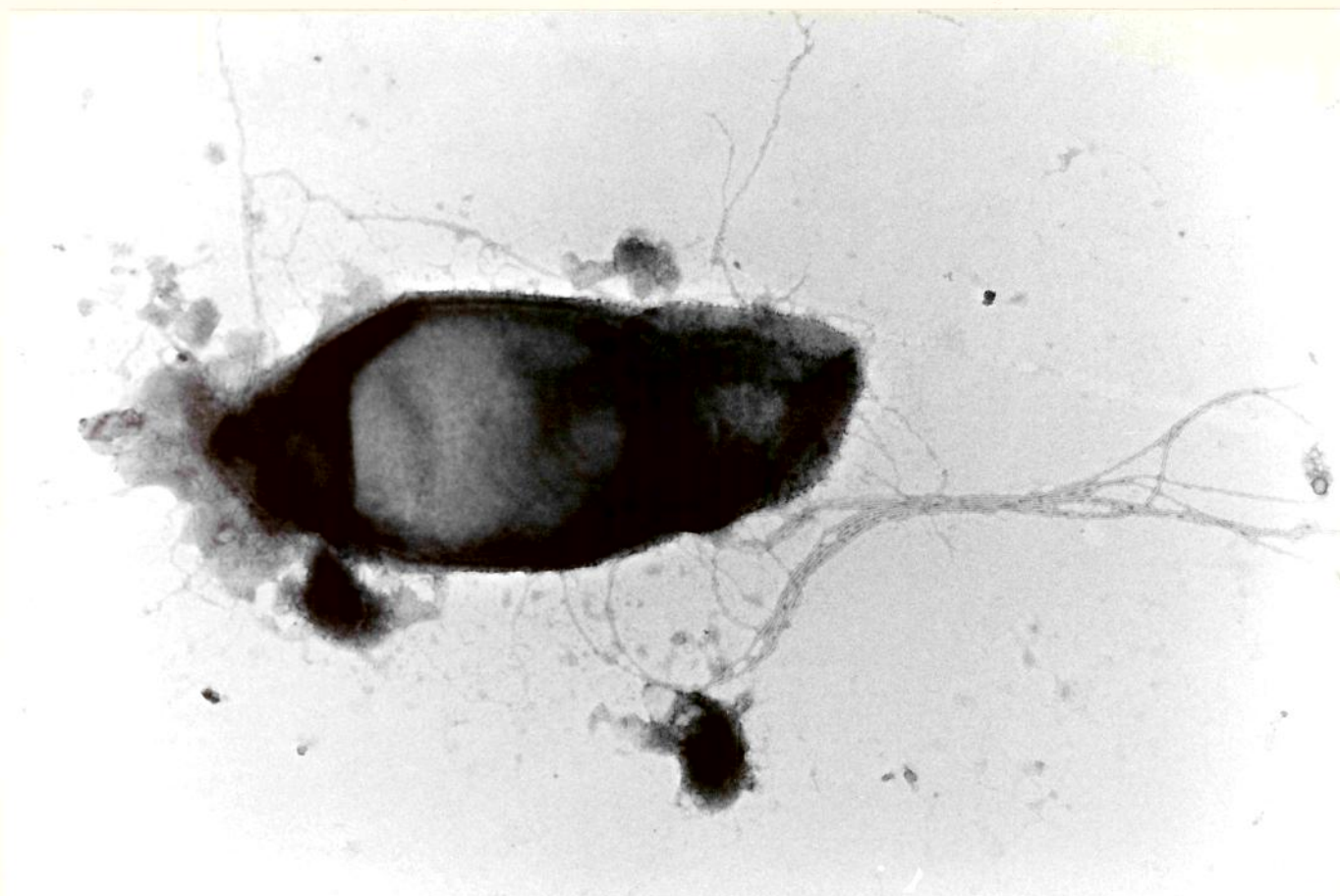


FIGURA 11 - Micrografia de B.cereus (cepa= 79/2) contrastado com silicotungstato de sódio 1% a pH 7,0 (foto 1= x4200; foto 2= x9050)

1



2

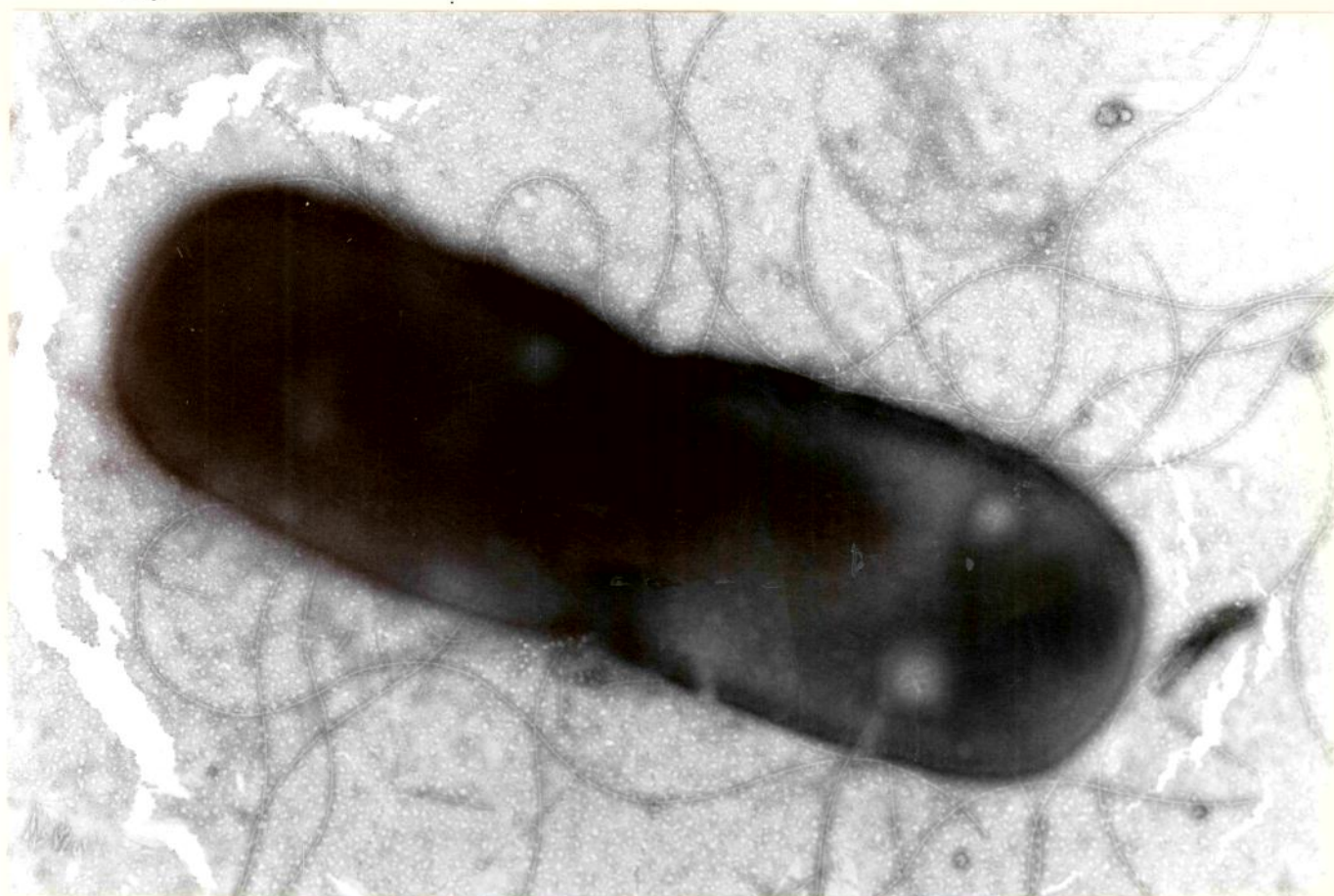


FIGURA 12 - Micrografia de B.cereus contrastado com
silicotungstato de sódio 1% a pH 7,0 x4200
(foto 1= cepa 79/2 ; foto 2= cepa 280/1)

-CONCLUSÕES

1. Para o isolamento inicial de B.cereus foi utilizado o meio MYP-ágar, que permite a detecção de duas propriedades importantes: produção de lecitinase e não fermentação de manitol. Quando a placa original estiver muito carregada, é conveniente a confirmação da atividade de lecitinase no mesmo meio ou no meio RVC-líquido.
2. Na identificação das colônias presuntivas de B.cereus, são importantes as seguintes propriedades: características morfológicas da célula vegetativa e esporângio, não formação de cristal de toxina para-esporal, motilidade, crescimento não rizóide e atividade beta-hemolítica.
3. Os testes bioquímicos e outras propriedades (como produção de amilases e proteases), não apresentaram resultados marcantes que pudessem ser associados à toxicidade das cepas.
4. A variabilidade dos testes bioquímicos e a não especificidade dos ensaios de APV em coelhos e camundongos e letalidade para camundongos, os quais envolvem mais de uma entidade tóxica, não permitem o uso de uma correlação para a indicação da toxicidade e patogenicidade de cepas isoladas de alimentos envolvidos ou não em casos de intoxicação alimentar.
5. Num esquema de investigação epidemiológica, mais importante do que isolar e enumerar um microrganismo, é isolar e quantificar a toxina presente no alimento incriminado.
6. Os modelos experimentais usando animais, como inoculação intraperitoneal em camundongos, inoculação intradérmica em coelho e camundongo, são ensaios úteis para se acompanhar a purificação da toxina, no caso a toxina diarréica de B.cereus, já que os resultados de efeito letal, aumento da permeabilidade vascular e necroses, são causados por mais de uma entidade tóxica; a utilização de camundongos ao invés de coelhos, é preferível devido à facilidade de obtenção, manutenção e manipulação dos animais.
7. As estruturas filamentosas finas e abundantes encontradas na superfície das células da cepa 4/1 de B.cereus, parecem desempenhar algum papel na atividade biológica do filtrado de cultivo dessa cepa.

- AGGARWAL, P.K. & SRINIVASAN, R.A. - Influence of Bacillus cereus on the keeping quality of pasteurised milk.
The Indian J.Dairy Scien., 39(1):95-97, 1986.
- AHMED, A. A-H.; MOUSTAFA, M.K. & MARTH, E.H. - Incidence of Bacillus cereus in milk and some milk products.
J.Food Protect., 46(2):126-128, 1983.
- ANSON, M.L. - The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin.
J.Gen.Physiol., 20:565-574, 1937.
- BEECHER, D.J. & MACMILLAN, J.D. - Use of monoclonal antibody in immunoblot assay for detection of diarrheagenic toxin from Bacillus cereus.
Abst.Ann.Meet.-ASM, P-6:275, 1987.
- BERGDOLL, M.S. - Bacillus cereus foodborne disease.
Clin.Microbiol.Newsletter, 13(3):1-2, 1981.
- BERNHEIMER, A.W. & GRUSHOFF, P. - Cereolysin: production, purification and partial characterization.
J.Gen.Microbiol., 46:143-150, 1967.
- BILLING, E. & LUCKHURST, E.R. - A simplified method for the preparation of egg yolk media.
J.Appl.Bact., 20(1):90, 1957.
- BLAKEY, L.J. & PRIEST, F.G. - The occurrence of Bacillus cereus in some dried foods including pulses and cereals.
J.Appl.Bact., 48:297-302, 1980.
- BONVENTRE, P.F. & ECKERT, N.J. - The biological activities of Bacillus anthracis and Bacillus cereus culture filtrates.
Am.J.Pathol., 43:201-212, 1963.
- BONVENTRE, P.F. - Differential cytotoxicity of Bacillus anthracis and Bacillus cereus culture filtrates.
J.Bacteriol., 90(1):284-285, 1965.
- BONVENTRE, P.F.; LINCOLN, R.E. & LAMANNA, C. - Status of bacterial toxins and their nomenclature: need for discipline and clarity of expression.
Bacteriol.Rev., 31(2):95-109, 1967.

- BRYAN, F.L.; BARTLESON, C.A. & CHRISTOPHERSON, N. - Hazard analyses, in reference to Bacillus cereus, of boiled and fried rice in cantonese-style restaurants.
J.Food Protect., 44(7):500-512, 1981.
- BRYAN, F.L. - Epidemiology of milk-borne diseases.
J.Food Protect., 46(7):637-649, 1983.
- BURDON, K.L. & WENDE, R.D. - On the differentiation of anthrax bacilli from Bacillus cereus.
J.Infect.Dis., 107:224-234, 1960.
- BURDON, K.L.; DAVIS, J.S. & WENDE, R.D. - Experimental infection of mice with Bacillus cereus: studies of pathogenesis and pathologic changes.
J.Infect.Dis., 117:307-316, 1967.
- CAPEL, B.J. & MELLING, J. - Semi-automated detection of emesis in the rhesus monkey.
Br.J.Exp.Path., 59:459-460, 1978.
- CHUNG, K.-T. & SUN, H.-L. - Distribution and characteristics of Bacillus cereus isolated from rice in Taiwan.
J.Food Scien., 51(5):1208-1212, 1986.
- COLMER, A.R. - The action of Bacillus cereus and related species on the lecithin complex of egg yolk.
J.Bacteriol., 55:777-785, 1948.
- COOLBAUGH, J.C.; WENDE, R.D. & WILLIAMS, R.P. - Microtitration of Bacillus cereus hemolysin.
Appl.Microbiol., 24(6):997-998, 1972.
- COOLBAUGH, J.C. & WILLIAMS, R.P. - Production and characterization of two hemolysins of Bacillus cereus.
Canad.J.Microbiol., 24(11):1289-1295, 1978.
- D'AUBERT, S.; ABBATI, P. & CANTONI, C. - Sull'intossicazione alimentare da Bacillus cereus.
Industrie Alimentari, 19(12):913-921, 1980.
- DAUER, C.C. - 1960 Summary of disease outbreaks and a 10-year resumé.
Public Health Rep., 76(10):915-922, 1961.
- DAVEY, G.R. - Food poisoning in New South Wales:1977-84.
Food Technol.Australia, 37(10):453-456, 1985.

- DAVEY, R.T. & TAUBER, W.B. - Posttraumatic endophthalmitis: the emerging role of Bacillus cereus infection. Rev.Infect.Dis., 9(1):110-123, 1987.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M. & EIROA, M.N.U. - Bacillus cereus em alimentos desidratados. Bol.Inst.Tecnol.Alim., 60:31-41, 1978.
- DesROSIER, J.P. & LARA, J.C. - Isolation and properties of pili from spores of Bacillus cereus. J.Bacteriol., 145(1):613-619, 1981.
- FIELDS, M.L.; ZAMORA, A.F. & BRADSHAW, M. - Microbiological analysis of home-canned tomatoes and green beans. J.Food Scien., 42(4):931-934, 1977.
- FUMAROLA, D. & MIRAGLIOTTA, G. - Bacillus cereus enterotoxins: what pathogenic mechanisms? Infection, 12(2):65/105, 1984.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - Técnica de contrastação negativa. In: Técnicas de microscopia eletrônica: apostila. Rio de Janeiro, Centro de Microscopia Eletrônica, 1982. p.98.
- GERASIMENE, G.B.; MAKARYNAITE, YU.P.; KULENE, V.V.; GLEMZHA, A.A. & YANULAITENE, K.K. - Some properties of phospholipases C from Bacillus cereus. Appl.Biochem.Microbiol., 21(2):184-189, 1985.
- GHOSH, A.C. - Prevalence of Bacillus cereus in the faeces of healthy adults. J.Hyg.Camb., 80:233-236, 1978.
- GIANNELLA, R.A. & BRASILE, L. - A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by Bacillus cereus: clinical, epidemiologic, and microbiologic studies. J.Infect.Dis., 139(3):366-370, 1979.
- GILBERT, R.J.; STRINGER, M.F. & PEACE, T.C. - The survival and growth of Bacillus cereus in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. J.Hyg.Camb., 73:433-444, 1974.
- GILBERT, R.J. & PARRY, J.M. - Serotypes of Bacillus cereus from outbreaks of food poisoning and from routine foods. J.Hyg.Camb., 78:69-74, 1977.

- GILBERT, R.J. - "Bacillus cereus gastroenteritis". In:
RIEMANN, H. & BRYAN, F.L. eds. Food-borne infections
and intoxications, 2nd ed., Academic Press, 1979.
chap.X, pp.495-518.
- GILBERT, R.J.; TURNBULL, P.C.B.; PARRY, J.M. & KRAMER, J.M. -
"Bacillus cereus and other Bacillus species: their part
in food poisoning and other clinical infections". In:
BERKELEY, R.C.W. & GOOD-FELLOW, M. eds. The aerobic
endospore forming bacteria: classification and identi-
fication. London, Academic Press, 1981. pp.297-314.
- GILBERT, R.J. & KRAMER, J.M. - Bacillus cereus enteroto-
xins: present status.
Biochem.Society Transact., 604th meeting, 12:198-200, 1984.
- GILBERT, R.J. & KRAMER, J.M. - "Bacillus cereus food poi-
soning." In: CLIVER, D.O. & COCHRANE, B.A. eds.
Progress in food safety. Madison-Wisconsin, Food Research
Institute, 1986, pp.85-93.
- GLATZ, B.A. & GOEPFERT, J.M. - Extracellular factor synthe-
sized by Bacillus cereus which evokes a dermal reaction
in guinea pigs.
Infect.Immun., 8(1):25-29, 1973.
- GLATZ, B.A.; SPIRA, W.M. & GOEPFERT, J.M. - Alteration of
vascular permeability in rabbits by culture filtrates
of Bacillus cereus and related species.
Infect.Immun., 10(2):229-303, 1974.
- GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M. & KIM, H.U. - Bacillus cereus:
food poisoning organism. A review.
J.Milk Food Technol., 35(4):213-227, 1972.
- GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. & HOR-NAY PANG, C. - The genus
Bacillus. Agriculture handbook n°427. Washington D.C.,
U.S.Department of Agriculture, Government Printing Office, 1973.
- GORDON, R.E. - The genus Bacillus. In: LASKIN, A.I. &
LECHEVALIER, H.A. eds. CRC Handbook of Microbiology.
2nd ed., volume I-Bacteria, pp.319-336, 1977.

- GORINA, L.G.; FLUER, F.S.; OLOVNIKOV, A.M. & EZEPCUK, YU.V.-
Use of the aggregate-hemagglutination technique for determining exo-enterotoxin of Bacillus cereus.
Appl.Microbiol., 29(2):201-204, 1975.
- GRAVANI, R.B. - Bacterial foodborne disease.
Dairy and Food Sanitation, (2):77-82, 1987.
- GREAVES, M.J. - Staphylococcal food poisoning.
Environm.Health, 93(2):41, 1985.
- HANSON, R.S.; PETERSON, J.A. & YOUSTEN, A.A. - Unique biochemical events in bacterial sporulation.
Ann.Rev.Microbiol., 24:53-90, 1970.
- HARMON, S.M. - New method for differentiating members of the Bacillus cereus group: collaborative study.
J.Assoc.Off.Anal.Chem., 65(5):1134-1139, 1982.
- HARMON, S.M. & GOEPFERT, J.M. - "Bacillus cereus." In: SPECK, M.L. ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2nd ed. American Public Health Association, 1984. chap.35, pp.458-467.
- HARMON, S.M. - "Bacillus cereus." In: U.S.Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual of the Division of Microbiology Center for Food Safety and Applied Nutrition, 6th ed., Arlington, Association of Official Analytical Chemists, 1984. chap.16.
- HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. & McCLURE, F.D. - Comparison of selective plating media for enumeration of Bacillus cereus in foods.
J.Food Protect., 47(1):65-67, 1984.
- HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. & SOLOMON, H.M. - Bacillus cereus contamination of seeds and vegetable sprouts grown in a home sprouting kit.
J.Food Protect., 50(1):62-65, 1987.
- HASCHEMEYER, R.H. & MYERS, R.J. - "Negative Staining." In: HAYAT, M.A. ed. Principles and techniques of electron microscopy - biological applications.vol.2. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1972.

HAUGE, S. - Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli.

J.Appl.Bacteriol., 18:591-595, 1955.

HILL, J.L. & YU, D.T.Y. - Development of an experimental animal model for reactive arthritis induced by Yersinia enterocolitica infection.

Infect.Immun., 55(3):721-726, 1987.

HIRSCH, H.A.; MCCARTHY, C.G. & FINLAND, M. - Polymyxin B and colistin: activity, resistance and crossresistance in vitro.

Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 103:338-342, 1960.

HOLBROOK, R. & ANDERSON, J.M. - An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of Bacillus cereus in foods.

Can.J.Microbiol., 26:753-759, 1980.

HOLMES, J.R.; PLUNKETT, T.; PATE, P.; ROPER, W. & ALEXANDER, W.J. - Emetic food poisoning caused by Bacillus cereus.

Arch.Intern.Med., 141(6):766-767, 1981.

HUTCHINSON, E.M.S. & TAPLIN, J. - Bacillus cereus in food.

Food Technol.Aust., 30:329-333, 1978.

IVERS, J.T. & POTTER, N.N. - Production and stability of hemolysin, phospholipase C, and lethal toxin of Bacillus cereus in foods.

J.Food Protect., 40(1):17-22, 1977.

JOHNSON, C.E. & BONVENTRE, P.F. - Lethal toxin of Bacillus cereus. I. Relationship and nature of toxin, hemolysin, and phospholipase.

J.Bacteriol., 94(2):306-316, 1967.

JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L. & BUSTA, F.F. - Germination and heat resistance of Bacillus cereus spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses.

J.Food Scien., 47:1268-1271, 1982.

JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L. & BUSTA, F.F. - Influence of heating and cooling rates on Bacillus cereus spore survival and growth in a broth medium and in rice.

J.Food Scien., 49:34-39, 1984.

- JOHNSON, K.M. - Bacillus cereus foodborne illness-an update.
J.Food Protect., 47(2):145-153, 1984.
- KEAY, L.; MOSER, P.W. & WILDI, B.S. - Proteases of the
genus Bacillus. II. Alkaline proteases.
Biotechnol.Bioengin., 12:213-249, 1970.
- KIM, U. & GOEPFERT, J.M. - Incidence of Bacillus cereus in
dried-food products.
Bacteriol.Proceedings, A-80:12, 1970.
- KIM, H.U. & GOEPFERT, J.M. - Occurrence of Bacillus cereus
in selected dry food products.
J.Milk Food Technol., 34:12-15, 1971.
- KIM, H.U. & GOEPFERT, J.M. - Enumeration and identification
of Bacillus cereus in foods. I. 24-hour presumptive test
medium.
Appl.Microbiol., 22(4):581-587, 1971.
- KIM, H.U. & GOEPFERT, J.M. - Efficacy of a fluorescent-anti-
body procedure for identifying Bacillus cereus in foods.
Appl.Microbiol., 24(5):708-713, 1972.
- KRAMER, J.M.; TURNBULL, P.C.B.; JØRGENSEN, K.; PARRY, J. &
GILBERT, R.J. - Separation of exponential growth exotoxins
of Bacillus cereus and their preliminary characterization.
J.Appl.Bact., 45(3): xix, 1978.
- KRAMER, J.M.; TURNBULL, P.C.B.; MUNSHI, G. & GILBERT, R.J.-
"Identification and characterization of Bacillus cereus
and other Bacillus species associated with foods and
food poisoning." In: CORRY, J.E.L.; ROBERTS, D. & SKINNER, F.A.,
eds. Isolation and identification methods for food poisoning
organisms. technical series n°17, London, Academic Press,
pp.261-286, 1982.
- KRAMER, J.M. - "Bacillus cereus exotoxins: production,
isolation, detection and properties." In: ALOUF, J.E.;
FREER, J.H.; FEHRENBACH, F.J. & JELJASZEWICZ, eds.
Bacterial protein toxins. London, Academic Press, 1984.
- LAMANNA, C. & EISLER, D. - Comparative study of the agglu-
tinogens of the endospores of Bacillus anthracis and
Bacillus cereus.
J.Bacteriol., 79:435-441, 1960.

LAMANNA, C. & JONES, L. - Antigenic relationship of the endospores of Bacillus cereus-like insect pathogens to Bacillus cereus and Bacillus anthracis.

J.Bacteriol., 81:622-625, 1961.

LAMANNA, C. & JONES, L. - Lethality for mice of vegetative and spore forms of Bacillus cereus and Bacillus cereus-like insect pathogens injected intraperitoneally and subcutaneously.

J.Bacteriol., 85:532-535, 1963.

LANCETTE, G.A. & HARMON, S.M. - "Enumeration and confirmation of Bacillus cereus in foods: collaborative study.

J.Assoc.Off.Anal.Chem., 63(3):581-586, 1980.

LEFEBVRE, A.; GREGOIRE, C.A.; BRABANT, N. & TODD, E. - Suspected Bacillus cereus food poisoning.

Epidemiol.Bulletin, 17(9):108-111, 1973.

LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I. & MAZZONI, H. - Microbiologia de Alimentos desidratados.

Coletânea do ITAL, 5:223-241, 1973/74.

LEMILLE, F.; BARJAC, H. & BONNEFOI, A. - Étude sérologique de Bacillus cereus. Mise en évidence de divers sérotypes basés sur les antigènes flagellaires.

Annls.Inst.Pasteur, Paris, 117:31-38, 1969.

LINARDI, V.R. - Melhoramento de Bacillus amyloliquefaciens por transformação e fusão, para produção de alfa-amilase e proteases. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1985, 101f. (mimeo.)

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J.- Protein measurement with the Folin Phenol reagent.

J.Biol.Chem., 193:265-275, 1951.

MACDONALD, K.L. & GRIFFIN, P.M. - Foodborne disease outbreaks-Annual summary, 1982.

J.Food Protect., 49:933-939, 1986.

MAC FADDIN, J.F. - Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p.354, 1980.

- McGAUGHEY, C.A. & CHU, H.P. - The egg-yolk reaction of aerobic sporing bacilli.
J.Gen.Microbiol., 2:334-341, 1948.
- MARTIN, J.H. - Significance of bacterial spores in milk.
J.Milk Food Technol., 37(2):94-98, 1974.
- MEDDA, S. & CHANDRA, A.K. - New strains of Bacillus licheniformis and Bacillus coagulans producing thermo-stable alfa-amylase active at alkaline pH.
J.Appl.Bacteriol., 48:47-58, 1980.
- MELLING, J.; CAPEL, B.J.; TURNBULL, P.C.B. & GILBERT, R.J.- Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with Bacillus cereus.
J.Clin.Pathol., 29:938-940, 1976.
- MELLING, J. & CAPEL, B.J. - Characteristics of Bacillus cereus emetic toxin.
FEMS Microbiol.Letters, 4:133-135, 1978.
- MELLING, J.; CAPEL, B.J.; WITHAM, M.D. & GILBERT, R.J. - Identification and characterization of Bacillus cereus emetic toxin.
J.Appl.Bacteriol., 45(3): xxv, 1978.
- MIDURA, T.; GERBER, M.; WOOD, R. & LEONARD, A.R. - Outbreak of food poisoning caused by Bacillus cereus.
Public Health Reports, 85(1):45-48, 1970.
- MOLNAR, D.M. - Separation of the toxin of Bacillus cereus into two components and nonidentity of the toxin with phospholipase.
J.Bacteriol., 84:147-153, 1962.
- MORITA, T.N. & WOODBURN, M.J. - Stimulation of Bacillus cereus growth by protein in cooked rice combinations.
J.Food Scien., 42(5):1232-1235, 1977.
- MORRIS, J.G., Jr. - Bacillus cereus food poisoning.
Arch.Intern.Med., 141(6):711, 1981.
- MORTIMER, P.R. & McCANN, G. - Food-poisoning episodes associated with Bacillus cereus in fried rice.
Lancet, 1:1043-1045, 1974.

- MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J. & JONGERIUS, E. - Enumeration of Bacillus cereus in foods.
Appl.Microbiol., 15(3):650-653, 1967.
- MOSSEL, D.A.A. & SHENNAN, J.L. - Micro-organisms in dried foods: their significance, limitation and enumeration.
J.Food Technol., 11:205-220, 1976.
- MOSSEL, D.A.A. & GARCIA, B.M. - Microbiologia de los alimentos. Editorial Acribia, S.A., 1985. pp.249-250.
- NANMORI, T.; SHINKE, R.; AOKI, K. & NISHIRA, H. - Purification and characterization of beta-amylase from Bacillus cereus BQ10-S1 Spo II.
Agr.Biol.Chem., 47(5):941-947, 1983.
- NANMORI, T.; NUMATA, Y. & SHINKE, R. - Isolation and characterization of a Bacillus cereus mutant strain hyperproductive of exo-beta-amylase.
Appl.Environm.Microbiol., 53(4):768-771, 1987.
- NESTER, S. & WOODBURN, M. - Contamination and growth of Bacillus cereus and Clostridium perfringens in mexican-style beans.
J.Food Protect., 45(7):638-642, 1982.
- NIKODÉMUSZ, I. - Occurrence of Bacillus cereus in foods.
Acta Aliment., 8(2):111-116, 1979.
- NORRIS, J.R. - Bacterial spore antigens: a review.
J.Gen.Microbiol., 28:393-408, 1962.
- NYGREN, B. - Phospholipase C -producing bacteria and food poisoning.
Acta Path.Microb.Scandinavica, supplementum 160:1-85, 1962.
- OISHI, M; TAKAHASHI, H. & MARUO, B. - Intracellular alfa-amylase in Bacillus subtilis.
J.Bacteriol., 85:246-247, 1963.
- OVERCAST, W.W. & ATMARAM, K. - The role of Bacillus cereus in sweet curdling of fluid milk.
J.Milk Food Technol., 37(5):233-236, 1974.
- OWENS, J.J. - The egg yolk reaction produced by several species of bacteria.
J.Appl.Bacteriol., 37:137-148, 1974.

PARKER, D.A. & GOEPFERT, J.M. - A research note- Enhancement of synthesis of Bacillus cereus enterotoxin using a sac-culture technique.

J.Food Protect., 41(2):116-117, 1978.

PARRY, J.M. & GILBERT, R.J. - Studies on the heat resistance of Bacillus cereus spores and growth of the organism in boiled rice.

J.Hyg.Camb., 84:77-82, 1980.

PATEL, G.S. - Bacteriological quality of pedha and burfi with special reference to certain bacteria of public health significance.

J.Food Scien.Technol., 22:133-136, 1985.

PEARSON, H.E. - Human infections caused by organisms of the Bacillus species.

Am.J.Clin.Path., 53:506-515, 1970.

PERRY, J. - Food poisoning from fried rice.

Environm.Health, 3:50-51, 1974.

PETERZ, M.; WIBERG, C. & NORBERG, P. - Comparison of media for isolation of Bacillus cereus from foods.

J.Food Protect., 48(11):969-970, 1985.

POLKHOVSKII, V.A. - Lecithinase activity of Bacillus cereus-strains isolated from various natural sources.

Mikrobiologiya, 39(4):567-573, 1970.

PORTNOY, B.L.; GOEPFERT, J.M. & HARMON, S.M. - An outbreak of Bacillus cereus food poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts.

Am.J.Epidem., 103(6):589-594, 1976.

PRIEST, F.G. - Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus.

Bacteriol.Rev., 41(3):711-753, 1977.

PUBLIC HEATH LABORATORY SERVICE - Food poisoning associated with Bacillus cereus.

British Med.J., 1:189-190, 1972.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE - Bacillus cereus food poisoning.

British Med.J., 22:647, 1973.

- RABINOVITCH, L.; VICENTE, M.M.A.; GUAYCURÚS, T.V.; FREITAS, J.P.G.V. & MESQUITA, R.P. - Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de Bacillus cereus em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro.
Mem.Inst.Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 80(1):1-9, 1985.
- RABINOVITCH, L. & VASCONCELLOS, F.J.M. - A new medium for the detection and enumeration of Bacillus cereus in food.
Rev.Microbiol., São Paulo, 18(4):330-334, 1987.
- RAEVUORI, M.; KIUTAMO, T.; NISKANEN, A. & SALMINEN, K. - An outbreak of Bacillus cereus food-poisoning in Finland associated with boiled rice.
J.Hyg.Camb., 76:319-327, 1976.
- RAJKOWSKI, K.T. & MIKOLAJCIK, E.M. - Characteristics of selected strains of Bacillus cereus.
J.Food Protect., 50(3):199-205, 1987.
- RIVAS, M. & RODRICKS, J.V. - Food hazards of microbial origin. II. Bacterial toxins.
Rev.Lat.-amer.Microbiol., 21:159-165, 1979.
- ROBBS, N.K.; ROBBS, P.G. & FAVARIN, V. - Microbiologia de alimentos formulados para o Programa Nacional de Merenda Escolar.
Arq.Univ.Fed.Rur.Rio de J., Itaguaí, 6(2):193-203, 1983.
- ROBERTS, D.; WATSON, G.N. & GILBERT, R.J. - "Contamination of food plants and plant products with bacteria of public health significance. In: RHODES-ROBERTS, M. & SKINNER, F.A., eds. Bacteria and plants. series nº10, London, Academic Press, 1982. pp.169-195.
- RODRIGUES, M.H. & BARRET, E.L.- Changes in microbial population and growth of Bacillus cereus during storage of reconstituted dry milk.
J.Food Protect., 49(9):680-686, 1986.
- ROGERS, R.F. - Bacillus isolates from refrigerated doughs, wheat flour, and wheat.
Cereal Chem., 55(5)-671-674, 1978.

- SALZBERG, S.P.; MASSAGUER, P.R. & SERRANO, A.M. - Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar.
Rev.Microbiol., São Paulo, 13(1):26-30, 1982.
- SCHAEFFER, P. - Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and exotoxins.
Bacteriol.Rev., 33(1):48-71, 1969.
- SCHIEMANN, D.A. - Occurrence of Bacillus cereus and the bacteriological quality of chinese "take-out" foods.
J.Food Protect., 41(6):450-454, 1978.
- SCHMITT, N.; BOWMER, E.J. & WILLOUGHBY, B.A. - Food poisoning outbreak attributed to Bacillus cereus.
Can.J.Publ.Health, 67:418-422, 1976.
- SEENAPPA, M. & KEMPTON, A.G. - A note on the occurrence of Bacillus cereus and other species of Bacillus in Indian spices of export quality.
J.Appl.Bacteriol., 50:225-228, 1981.
- SEENAPPA, M. & KEMPTON, A.G. - A simple key for the identification of Bacillus species common in foods.
J.Food Scien.Technol., 18:131-133, 1981.
- SHARMA, P.L. & DOGRA, R.C. - Bacillus cereus enterotoxin and its production in different foods.
J.Food Scien.Technol., 20:223-227, 1983.
- SHATTOCK, P.M.F. - The use of serology in the classification of micro-organisms.
J.Gen.Microbiol., 12:367-374, 1955.
- SHINAGAWA, K.; KUNITA, N.; SASAKI, Y. & OKAMOTO, A. - Biochemical characteristics and heat tolerance of strains of Bacillus cereus isolated from uncooked and cooked rice after food poisoning outbreaks.
J.Food Hyg.Soc.Japan, 20(6):430-437, 1979.
- SHINAGAWA, K.; KUNITA, N.; ONAKA, T. & TAKEMASA, N. - Serotypes of Bacillus cereus isolated from cooked and raw rice responsible for food poisoning and from healthy people.
J.Food Hyg.Soc.Japan, 21(4):266-273, 1980.

SHINAGAWA, K.; MATSUSAKA, N.; KONUMA, H. & KURATA, H. -

The relation between the diarrheal and other biological activities of Bacillus cereus involved in food poisoning outbreaks.

Jpn.J.Vet.Sci., 47(4):557-565, 1985.

SHINAGAWA, K. - Analytical methods for Bacillus cereus and other Bacillus species.

Communications at the Food Microbiology Meetings, october-1987, Grécia.

SHINKE, R.; NISHIRA, H. & MUGIBAYASHI, N. - Isolation of beta-amylase producing microorganisms.

Agr.Biol.Chem., 38(3):665-666, 1974.

SIEGMAN-IGRA, Y.; LAVOCHKIN, J.; SCHWARTZ, D. & KONFORTI, N. - Meningitis and Bacteremia due to Bacillus cereus.

Israel J.Med.Sciences, 19:546-551, 1983.

SINGH, R.S.; BATISH, V.K.; PARKASH, O. & RANGANATHAN, B. -

Toxigenic Bacillus cereus var. fluorescens in human milk.

J.Dairy Scien., 67:513-517, 1984.

SLEIN, M.W. & LOGAN, G.F. - Partial purification and properties of two phospholipases of Bacillus cereus.

J.Bacteriol., 85:369-381, 1963.

SLEIN, M.W. & LOGAN, G.F. - Characterization of the phospholipases of Bacillus cereus and their effects on erythrocytes, bone, and kidney cells.

J.Bacteriol., 90(1):69-81, 1965.

SMIBERT, R.M. & KRIEG, N.R. - "General characterization."

In: GERHARDT, P., ed. Manual of methods for general bacteriology. Washington, American Society for Microbiology, 1981. section V, chap.20, pp.409-443.

SMITH, B.W. & ROE, J.H. - A photometric method for the determination of alfa-amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color.

J.Biol.Chem., 179:53-59, 1949.

SNEATH, P.H.A. - "Endospore-forming Gram-positive rods and cocci." In: BUCHANAN, R.E, & GIBBONS, N.E., eds.

Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.II. 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.

- SOMOGYI, M. - A new reagent for the determination of sugars.
J.Biol.Chem., 160:61-68, 1945.
- SPIRA, W.M. & GOEPFERT, J.M. - Bacillus cereus -induced
fluid accumulation in rabbit ileal loops.
Appl.Microbiol., 24(3):341-348, 1972.
- SPIRA, W.M. & GOEPFERT, J.M. - Biological characteristics
of an enterotoxin produced by Bacillus cereus.
Can.J.Microbiol., 21:1236-1246, 1975.
- SRIVASTAVA, K.C.; PAZ, A.A.; SARIDAKIS, H.O.; POPPER, O.P. &
CASTRO, S.R.P. - Microbiology of frozen goat meat and
toxin production by Bacillus cereus isolated there from.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.B 174:125-132, 1981.
- STAMATIN, N. & ANGHELESCO, S. - Pouvoir pathogène et toxici-
té de Bacillus cereus.
Annls.Inst.Pasteur, Paris, 116:210-217, 1969.
- STEWART, D.B. - Factors influencing the incidence of B.cereus
spores in milk.
J.Soc.Dairy Technol., 28(2):80-85, 1975.
- SZABO, R.A.; TODD, E.C.D. & RAYMAN, M.K. - Twenty-four hour
isolation and confirmation of Bacillus cereus in foods.
J.Food Protect., 47(11):856-860, 1984.
- TAKASAKI, Y. - Productions and utilizations of beta-amyla-
se and pullulanase from Bacillus cereus var.mycoides.
Agr.Biol.Chem., 40(8):1515-1522, 1976.
- TAYLOR, A.J. & GILBERT, R.J. - Bacillus cereus food poison-
ing: a provisional serotyping scheme.
J.Med.Microbiol., 8:543-550, 1975.
- TERRANOVA, W. & BLAKE, P.A. - Current concepts: Bacillus
cereus food poisoning.
The N.Engl.J.Med., 298(3):143-144, 1978.
- THOMPSON, N.E.; KETTERHAGEN, M.J.; BERGDOLL, M.S. &
SCHANTZ, E.J. - Isolation and some properties of an
enterotoxin produced by Bacillus cereus.
Infect.Immun., 43(3):887-894, 1984.

THOMPSON, N.E.; ASCHENBACH, J.M.; BERGDOLL, M.S. &

SCHANTZ, E.J. - Production of Bacillus cereus enterotoxin by insecticide strains of Bacillus thuringiensis.

Abst. Ann. Meet. - ASM, B 135:40, 1985.

TING, W.-T. & BANWART, G.J. - Detection of Bacillus cereus diarrheagenic toxin using a rat ligated intestinal loop assay.

J. Food Saf., 7:57-63, 1985.

TODD, E. & PIVNICK, H. - Public health problems associated with barbecued food. A review.

J. Milk Food Technol., 36(1):1-18, 1973.

TODD, E.; PARK, C.; CLENER, B.; FABRICIUS, A.; EDWARDS, D. &

EWAN, P. - Two outbreaks of Bacillus cereus food poisoning in Canada.

Can. J. Pub. Health, 65:109-113, 1974.

TODD, E.C.D. - Foodborne disease in six countries-a comparison.

J. Food Protect., 41(7):559-565, 1978.

TORRES-ANJEL, M.J. et alii - Enterotoxigenicidad de Bacillus cereus.

Rev. Lat. - amer. Microbiol., 21:5-10, 1979.

TURNBULL, P.C.B. - Studies on the production of enterotoxins by Bacillus cereus.

J. Clin. Path., 29:941-948, 1976.

TURNBULL, P.C.B.; FRENCH, T.A. & DOWSETT, E.G. - Severe systemic and pyogenic infections with Bacillus cereus.

Brit. Med. J., 1:1628-1629, 1977.

TURNBULL, P.C.B.; NOTTINGHAM, J.F. & GHOSH, A.C. - A severe necrotic enterotoxin produced by certain food, food poisoning and other clinical isolates of Bacillus cereus.

Brit. J. Exp. Path., 58:273, 1977.

TURNBULL, P.C.B.; KRAMER, J.M. & JØRGENSEN, K.; GILBERT, R.J. & MELLING, J. - Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of Bacillus cereus.

Am. J. Clin. Nutr., 32:219-228, 1979.

- TURNBULL, P.C.B.; JØRGENSEN, K.; KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J.
& PARRY, J. - Severe clinical conditions associated with
Bacillus cereus and the apparent involvement of exotoxins.
J.Clin.Path., 32:289-293, 1979.
- TURNBULL, P.C.B. & KRAMER, J.M. - Non-gastrointestinal
Bacillus cereus infections: an analysis of exotoxin
production by strains isolated a two-year period.
J.Clin.Path., 36:1091-1096, 1983.
- TURNBULL, P.C.B. & KRAMER, J.M. - Intestinal carriage of
Bacillus cereus: faecal isolation studies in three popu-
lation groups.
J.Hyg.Camb., 95:629-638, 1985.
- U.S.DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE.CDC-
Bacillus cereus food poisoning - United Kingdom.
Morbid.Mortal.Wk.Rept., 22:348, 1973.
- VICENTE, M.M.A.; RABINOVITCH, L; GUAYCURÚS, T.V. &
FREITAS, J.P.G.V. - Resultados preliminares sobre a in-
cidência de Bacillus cereus em alimentos industrializados.
Ciência e Cultura, (supl.) 35:605, 1983.
- VIJAYALAKSHMI, G.; DWARAKANATH, C.T. & MURTHY, V.S. - Stu-
dies on Bacillus cereus contamination of rice and rice
preparations.
J.Food Scien.Technol., 18:231-234, 1981.
- WAES, G. - Bacillus cereus et Clostridium perfringens dans
les produits laitiers.
Revue de l'Agriculture, 29(4):993-1005, 1976.
- WATHEW, J. & LUCK, H. - Incidence of Bacillus cereus in
milk powder.
S.Afr.J.Dairy Technol., 10(1):47-50, 1978.
- WATTERSON, J.R. - A procedure for estimating Bacillus cereus
spores in soil and stream-sediment samples- a potential
exploration technique.
J.Geochem.Explorat., 23:243-252, 1985.
- WYATT, C.J. & GUY, V.H. - Incidence and growth of Bacillus
cereus in retail pumpkin pies.
J.Food Protect., 44(6):422-424, 1981.

YOSHIGI, N; CHIKANO, T. & KAMIMURA, M.- Purification and
properties of an amylase from Bacillus cereus NY-14.

Agric.Biol.Chem., 49(12):3369-3376, 1985.

YRIOS, J.W.; GOEPFERT, J.M.; SKINNER, H.G. & BELINKY, S.-

Bacillus cereus food poisoning-Wisconsin.

Morbid.Mortal.Wk.Rept., 24:306, 1975.