

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DETECÇÃO DO GRAU DE CONTAMINAÇÃO EM ARROZ
COMERCIALIZADO EM RESTAURANTES DO TIPO "SELF-SERVICE" DA
UNICAMP, COM ÊNFASE NA INCIDÊNCIA DE BACILLUS CEREUS

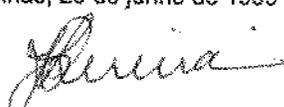
Débora de Barros Vallim

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Débora de Barros Vallim aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de junho de 1999.

Campinas, 23 de junho de 1999

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Pereira


Prof. Dr. José Luiz Pereira
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas, SP

1999



9915159

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

V244d

Vallim, Débora de Barros

Detecção do grau de contaminação em arroz comercializado em restaurantes do tipo "self-service" da UNICAMP, com ênfase na incidência de *Bacillus cereus*. / Débora de Barros Vallim. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: José Luíz Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Arroz. 2. *Bacillus cereus*. I. Pereira, José Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

UNICAMP	BC
NUM. DE REGISTRO:	
V. DE REGISTRO:	
T. DE REGISTRO:	38320
P. DE REGISTRO:	229/99
C. DE REGISTRO:	
P. DE REGISTRO:	R\$ 11,00
D. DE REGISTRO:	11/08/99
N.º COPIAS:	

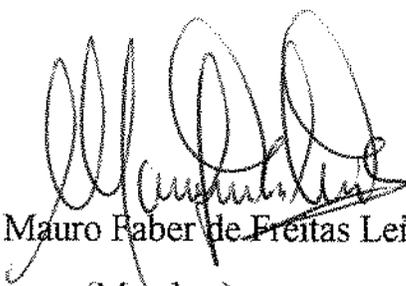
CM-00125546-9

BANCA EXAMINADORA



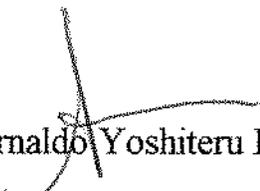
Prof. Dr. José Luiz Pereira

(Orientador)



Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão

(Membro)



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

(Membro)

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

(Membro)

*Se não houver frutos
Valeu a beleza das flores
Se não houver flores
Valeu a sombra das folhas
Se não houver folhas
Valeu a intenção da semente*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de treinamento que me concedeu

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos

Ao professor José Luíz Pereira pelo apoio, ensinamento, compreensão e paciência

A todos membros da banca examinadora pelos conselhos para o desenvolvimento do trabalho

À Norma pelos anos de apoio, ensinamentos e amizade

À Rosinha por estar sempre pronta a ajudar

Aos amigos, professores e funcionários da UNICAMP, cuja atenção e apoio foram essenciais durante a caminhada

Ao professor Francisco Borba Ribeiro Neto pelo apoio e lucidez com que me conduziu por longos anos

Eternamente a papai e mamãe pela força, amor e oportunidades que sempre

me deram

Ao meu grande amigo e marido João Carlos pela força, paciência, disponibilidade, amor e compreensão dedicados durante todos esses anos

Aos membros da minha família, em especial minha tia e prima

À minha estimada amiga Maria del Rosário que sempre soube solucionar problemas, carinhosamente

Aos meus queridos amigos: Giuliana, Andréia, Gláucio, Álvaro, Maurício, André, Cláudia, Patricia, Ricardo, entre outros - impossível nomeá-los todos - pelos momentos de felicidade e força que me deram em várias horas de conversa e descontração

L'Aurora

*Io non so se mai avvererà
Uno di quei sogni che uno fa
Come questo che
Non riesco a togliere dal cuore
Da quando c'è...
Forse anche questo resterà
Uno di quei sogni che uno fa
Anche questo che
Sto mettendo dentro a una canzone
Ma già che c'è intanto che c'è
Continuerò a sognare ancora un pó...
Sarà, sarà l'aurora
Per me sarà così come uscire fuori
Come respirare un'aria nuova
Sempre di più
E tu, e tu amore
Vedrai che presto tornerai
Dove adesso non ci sei
Forse un giorno tutto cambierà
Più sereno intorno si vedrà
Voglio dire che
Forse andranno a posto tante cose
Ecco perché continuerò
A sognare ancora un pó
Uno dei sogni miei...
Quello che c'è in fondo al
Cuore non muore mai
Se ci hai creduto davvero
Come ci ho creduto io...
Sarà sarà l'aurora
Per me sarà così
Sarà sarà di più ancora
Tutto il chiaro che farà...*

Índice

Quadros	9
Tabelas	9
Figuras	10
Resumo	11
Summary	12
1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica	16
2.1. Caracterização de <i>Bacillus cereus</i>	16
2.1.a. Posição Taxonômica de <i>Bacillus cereus</i>	19
2.2. Aspectos Epidemiológicos	22
2.2.1. Incidência de <i>Bacillus cereus</i> em alimentos	25
2.2.1. Síndrome Diarréica	27
2.2.1.a. Enterotoxina Diarréica	30
2.2.2. Síndrome Emética	34
2.2.2.a. Toxina Emética	38

2.2.3. Outras toxinas	40
2.3. Métodos biológicos usados na determinação da patogenicidade dos microrganismos e de suas toxinas, incluindo <i>Bacillus cereus</i>	43
2.4. Métodos Analíticos para <i>Bacillus cereus</i>	47
2.5. Controle da incidência de <i>Bacillus cereus</i>	52
3. Material e Método.....	57
4. Resultados e Discussão	65
5. Conclusão	72
6. Referências Bibliográficas	73

QUADROS

Quadro 01: Subgrupos de espécies de <i>Bacillus</i> mesófilos.....	19
Quadro 02: Critério para diferenciação entre quatro espécies de <i>Bacillus</i> , do grupo IA	21

TABELAS

Tabela 01: Características dos dois tipos de doenças causadas por <i>Bacillus cereus</i>	24
Tabela 02: Dados epidemiológicos comparativos entre <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Clostridium perfringens</i>	37
Tabela 03: Propriedades da toxina emética.....	40
Tabela 04: Características gerais das principais toxinas produzidas por <i>Bacillus cereus</i>	42
Tabela 05: Contagens do número de mesófilos totais e <i>Bacillus cereus</i> em amostras de arroz cozido.....	65
Tabela 06: Contagens do número de mesófilos totais e <i>Bacillus cereus</i> em amostras de arroz cru.....	66

Tabela 07: Testes bioquímicos propostos por Harmom (1991), para caracterização de <i>Bacillus</i>	69
---	----

FIGURAS

Figura 01: Fluxograma padrão do processo de preparo de arroz cozido e frito em restaurantes.....	56
Figura 02: Modelo de ficha de anotação de resultados do multi ensaio.....	62

Summary

Bacillus cereus can give rise to two distinct forms of foodborne disease; the emetic and the diarrhoeal syndromes. The emetic syndrome is believed to be associated with an emetic toxin pre-formed in food. Cooked rice is the most common vehicle, and the symptoms are similar to those of *Staphylococcus aureus* intoxication. The diarrhoeal type is caused by enterotoxin and the symptoms generally parallel those of the *Clostridium perfringens* food poisoning.

Forty two cooked rice samples were analysed and three of raw rice were collected and examined. We observed a similar contamination in mesophilic count in Plate Count Agar method and were isolated seventeen *Bacillus cereus* strains in MYP agar. All *B. cereus* strains were tested according to literature biochemical tests, that confirmed the presence of microorganisms.

We did Gram and crystals endotoxin methods; all samples were classified in “positive Gram” and “no presence of crystals”.

All seventeen strains were tested in API 50 CH Kit that classified only seven strains in *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus polymyxa* and *Bacillus subtilis*. RPLA Kit has detected the production of diarrhoeal toxin in 11 isolated strains.

Resumo

Bacillus cereus causa dois tipos de toxinfecções alimentares, com ação emética e diarreica.

A síndrome emética está associada com toxina pré-formada no alimento. Arroz cozido é um veículo mais comum e os sintomas são similares com os causados pela intoxicação causada por *Staphylococcus aureus*. O tipo diarreico é causado por uma enterotoxina e os sintomas são semelhantes aos causados pela toxinfecção por *Clostridium perfringens*.

Foram analisadas 42 amostras de arroz cozido e 3 amostras de arroz cru, nas quais se observou uma contaminação semelhante na contagem de mesófilos totais em meio PCA e de onde se isolaram 17 cepas suspeitas de serem *Bacillus cereus* em meio MYP que foram submetidas as análises bioquímicas propostas pela literatura, confirmando a presença deste microrganismo.

Realizou-se também, coloração de Gram e de cristais de endotoxina, onde todos os isolados apresentaram-se Gram positivos nas primeiras 24 horas de crescimento e sem presença de cristais de endotoxina.

Essas mesmas 17 cepas isoladas foram testadas pelo sistema multi-ensaio API 50 CH que conseguiu identificar somente 7, classificando-as como *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus polymyxa* e *Bacillus subtilis*.

O teste RPLA permitiu verificar que 11 das cepas isoladas são produtoras de toxina diarreica.

1. Introdução

Bacillus cereus está amplamente distribuído na natureza e pode ser isolado facilmente de uma grande variedade de alimentos, cuja origem seja, preferencialmente, o solo.

A toxinfecção alimentar causada por este microrganismo não é uma doença grave, sendo de fácil recuperação, podendo ser facilmente prevenida por boas práticas de higiene, controle de temperatura de processamento, estocagem e distribuição. São conhecidas duas formas diferentes de doenças (gastroenterite provocada pela ingestão de alimentos contaminados) causadas por *Bacillus cereus*; a síndrome do tipo diarreica e a síndrome tipo emética, provocadas por duas toxinas, chamadas diarreica e emética, respectivamente. (Kramer & Gilbert, 1989; Shinagawa, 1990; Torres-Angel *et al*, 1979).

A síndrome diarreica, descoberta há mais tempo, está associada com alimentos ricos em proteínas, tais como carnes, legumes, cremes, entre outros. Este tipo de doença apresenta um período de incubação entre oito a dezesseis horas, sendo caracterizada pelo aparecimento de dores abdominais, diarreia líquida e profusa e raramente vômitos e febre. Os sintomas da doença são semelhantes aos causados pelo *Clostridium perfringens* (Johnson, 1984). A duração média dos sintomas é de 12 horas.

O primeiro relato de uma nova forma de gastroenterite provocada por *Bacillus*

cereus ocorreu na Inglaterra em 1971, com o surgimento de mais seis surtos associados ao consumo de arroz frito em restaurantes chineses. Esta nova forma, designada como síndrome emética, tem como sintomas ataques de náusea e vômitos desenvolvidos em uma a cinco horas após a ingestão de alimentos contaminados. Dores abdominais e diarreia podem ocorrer, mas não são sintomas típicos desta síndrome. As características gerais da síndrome emética quanto ao período de incubação e sintomas gerais são muito semelhantes às características das intoxicações alimentares provocadas por *Staphylococcus aureus*. Nos surtos de síndrome emética, os alimentos implicados são quase todos exclusivamente amiláceos e, de forma geral, preparados e acondicionados de forma incorreta, principalmente com relação a temperatura (Baiocco, 1993).

As informações disponíveis permitem afirmar que a virulência exibida por *Bacillus cereus* está associada com um ou mais produtos extracelulares incluindo fosfolipases, penicilinases, hemolisinas, enzimas proteolíticas e outras toxinas que, quando presentes em grandes quantidades nos alimentos, ou qualquer outro veículo de transmissão, ocasionam, além de intoxicações alimentares, vários outros tipos de infecções generalizadas como broncopneumonia, bacteremia, meningite, endocardite e osteomielite (Bonventre & Jonhson, 1970).

Este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos gerais:

- Estudar a contaminação de alimentos comercializados, especificamente, arroz cozido, em restaurantes do tipo “self-service”, da UNICAMP, na região de Barão Geraldo, em Campinas, verificando-se a ocorrência de variações no grau de

contaminação por mesófilos totais e *Bacillus cereus* deste tipo de alimento durante um período de quatro meses, em três estabelecimentos, com amostragens no início e final dos períodos de refeição; as análises foram realizadas em triplicata

Objetivos específicos:

1. Determinação quantitativa da microbiota de mesófilos totais em amostras de arroz cozido
2. Avaliar a presença de *Bacillus cereus* em arroz cozido
3. Isolar cepas de *Bacillus* e submetê-las aos ensaios bioquímicos sugeridos pela literatura com a finalidade de identificação
4. Testar a eficiência do sistema multi-ensaio API 50 CH (BioMérieux) disponível no mercado destinado a identificação do gênero *Bacillus*
5. Verificar, dentre os isolados, quais os *Bacillus cereus* são produtores de toxina diarréica detectado pela técnica imunológica de Aglutinação Passiva Reversa em Látex (RPLA - Oxoid)

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Caracterização de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus foi originariamente isolado e descrito por Frankland & Coel, em 1887 (D'Aubert, 1980), e está entre as trinta e quatro espécies conhecidas do gênero *Bacillus*, de acordo com a nona edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 1990).

O nome “cereus” que significa, em latim, ceroso, descreve a aparência das colônias deste microrganismo em meios contendo ágar.

Morfologicamente, *Bacillus cereus* são bactérias em forma de bastonetes, Gram positivas na fase exponencial de crescimento, primeiras vinte e quatro horas, e Gram negativos na fase estacionária - após quarenta e oito horas. São aeróbios ou anaeróbios facultativos e apresentam único esporo na posição central ou p-central, que aparece na parte final da fase exponencial e durante a fase estacionária, sem que haja distensão do esporângio. Este esporo tem a facilidade de aderir a vários tipos de superfície, com a ajuda do pilli (Doyle, 1997). Têm motilidade, que é conferida pela presença de flagelos peritríqueos, que não são usados para taxonomia.

As dimensões da célula vegetativa são de diâmetro 1,0 a 1,2 μm e de comprimento 3,0 a 5,0 μm .

O crescimento e multiplicação desta bactéria pode ocorrer entre temperaturas extremas como 10 e 50 °C, porém a temperatura ótima fica entre 30 e 35 °C, portanto é um microrganismo mesófilo. Crescem em alimentos com atividade de água maior ou igual a 0,95 e na faixa de pH de 4,35 a 9,3 (Azeredo, 1998).

São capazes de metabolizar glicose, frutose, trealose, glicerol, sacarose, maltose, entre outros carboidratos, com produção de ácido. Possuem enzimas específicas para hidrólise de amido, caseína, esculina e gelatina. Não produzem indol e são catalase positiva. Ainda, o *Bacillus cereus* tem poly-β-hidroxybutirato como material de reserva e produz ácido sem gás a partir de glicose. Não fermenta manitol e tem um sistema ativo de fosfolipase (lecitinase).

Quanto à distribuição dessas bactérias na natureza, elas podem ser encontradas numa grande variedade de ambientes como o solo, poeira, água, incluindo vários tipos de alimentos consumidos amplamente pelos homens e animais. Entre esses alimentos, encontram-se principalmente cereais, leite e seus derivados, condimentos, carnes, água e legumes (Baiocco, 1993). A presença nestes alimentos, deve-se aos esporos resistentes ao calor, a desidratação e outros fatores destrutivos.

Bacillus cereus é um dos maiores problemas da indústria de laticínios, onde provoca, por ação de lecitinases, agregação da camada lipídica de leite pasteurizado, fenômeno conhecido como 'bitty cream'. Atribuí-se, também, a formação de "sweet curdling" ou coalho doce (Christiansson, 1989). Isto ocorre porque os esporos sobrevivem a pasteurização e após a germinação as células estão livres para

competir com outras células vegetativas (Doyle, 1997).

Dada a grande distribuição de *Bacillus cereus* na natureza, tais microrganismos são inevitavelmente ingeridos diariamente. Contudo, quando ingeridos em pequenas quantidades não representam riscos para a saúde; somente quando a ingesta é maior ou igual que 10^5 UFC/ g de alimento é que representam risco à população (Netten, 1992). Os esporos que conseguem sobreviver às condições adversas presentes ao longo do trato digestivo, podem vir a fazer parte da microflora intestinal transitória, e segundo Sisson (1992) estes podem ser isolados de fezes humanas, com relativa facilidade.

Os membros do gênero *Bacillus* tem variada distribuição ubíqua, em função de suas células secretarem enzimas capazes de degradar grande variedade de materiais orgânicos, são, basicamente, saprófitas. O *Bacillus cereus* tem, também, um papel ecológico bem definido e de interesse biotecnológico, como no tratamento de polpa de árvores (Blanchette, 1997).

Bacillus cereus é um dos responsáveis por um dos tipos de toxinfecção alimentar através de duas toxinas distintas: a diarréica e a emética, além de poder causar outros tipos de enfermidades não relacionadas a toxinfecções alimentares, porém de interesse clínico, como: bacteremia, bronquite, pneumonia, septicemia, oftalmite, osteomielite e endocardite (Bonventre & Jonhson, 1970).

2.1.a. Posição taxonômica de *Bacillus cereus*

Até meados deste século, a taxonomia para o gênero *Bacillus* era caótica. Após a proposta da divisão do gênero de acordo com a localização intracelular e de estrutura do endoesporo, foi possível classificá-lo em três grupos (Stanier, 1986).

Quadro 01:

Subgrupos de espécies de *Bacillus* mesófilos

Grupo	Tipo de Endoesporo	Posição do Endoesporo na Célula Vegetativa	Célula Vegetativa Distendida pelo Esporo	Representantes
I	Oval	Central	-	<i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>
II	Oval	Central	+	<i>B. fastidiosus</i> <i>B. polymyxa</i>
III	Esférico	Terminal	+	<i>B. pasteurii</i>

fonte: Stanier, 1986

O grupo I deste quadro, baseia-se na distinção entre *B.cereus* e *B. subtilis* em relação ao tamanho da célula e na presença ou ausência de poly- β -hydroxibutirato como material de reserva; mais espécies do grupo I podem crescer anaerobicamente na presença de açúcares, pois fazem uma fermentação distinta, na qual forma-se,

como produtos finais 2,3 butanediol, glicérol e CO₂, acompanhados de uma pequena quantidade de lactato e etanol. Os membros do grupo II formam esporos característicos e são microrganismos fermentativos, quimicamente distinto do primeiro grupo. Já os *Bacillus* do grupo III são caracterizados por formarem esporos esféricos localizados terminalmente na esporulação da célula (Stanier, 1986).

Posteriormente, o esquema inicialmente proposto foi endossado por Gordon (1973), e o grupo I foi subdividido de acordo com as dimensões de suas células vegetativas, de forma que o *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* passaram a compor o grupo IA, com células de comprimento maior que 0,9 µm e produtores de glóbulos lipídicos. Hoje, considera-se *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* variedades de *B. cereus*, em vez de espécies distintas, devido às semelhanças fenotípicas e genéticas (Doyle, 1997).

A característica diferencial de *B. thuringiensis* é a produção de cristais protéicos, tóxicos para os insetos e é usado no controle biológico; já o *B. mycoides* apresenta crescimento característico em forma de rizóide de acordo com o pH do meio (Sneath, 1990). O *B. anthracis* tem patogenicidade peculiar para animais.

Quadro 02: Critério para diferenciação entre as quatro espécies de *Bacillus*, do grupo IA

Espécies	Morfologia da colônia	Hemólise	Motilidade	Sensibilidade a penicilina	Inclusão de cristal parasporal
<i>B. cereus</i>	branca	+	+	-	-
<i>B. anthracis</i>	branca	-	-	+	-
<i>B. thuringiensis</i>	branca/cinza	+	+	-	+
<i>B. mycoides</i>	rizóide	(+)	-	-	-

(+) variável

Fonte: Doyle, 1997

2.2. Aspectos Epidemiológicos

De acordo com Baiocco (1993), os baixos números de surtos relatados que são comprovadamente provocados por *Bacillus cereus*, demonstram a falta de conhecimento e informação a respeito das características gerais deste microrganismo, bem como das doenças provocadas por ele.

Além disto, as eventuais investigações microbiológicas são dificultadas pelo uso de meios de cultura seletivos que não detectam *B. cereus*, mesmo quando estes microrganismos estão presentes nos alimentos responsáveis pelos surtos ou em amostras de fezes e vômito de pessoas acometidas pela enfermidade. Atualmente tem ocorrido um aumento expressivo no número de surtos de causa bacteriana conhecida, e principalmente nos ocasionados por *B. cereus*. Este novo índice pode tanto representar um aumento real no número de casos, como também pode refletir, mais provavelmente, um aumento de relatos dos mesmos (Kramer e Gilbert, 1989).

Sabe-se que *B. cereus* está implicado em dois tipos de formas clínicas de gastroenterite provocada pela ingestão de alimentos contaminados por toxinas distintas. Um primeiro tipo, descoberto há mais tempo, é denominado síndrome diarréica e está associado com alimentos ricos em proteínas, tais como carnes, legumes, cremes, entre outros. Este tipo de doença apresenta um período de incubação entre 8 e 16 horas, sendo caracterizada pelo aparecimento de dores abdominais, diarréia líquida profusa e raramente vômito. Outro tipo de doença causada por este agente infeccioso é conhecido como síndrome emética, e está

associada quase que exclusivamente ao consumo de alimentos amiláceos, especialmente, arroz cozido. Esta síndrome é marcada por ataques de náusea e vômitos, às vezes seguidos por diarreia; o período de incubação pode variar de alguns minutos a algumas horas. Ainda pode-se observar um pequeno número de pacientes que exibiu sintomas de ambos tipos de doenças, provavelmente como resultado da produção de ambos tipos de toxinas (Doyle, 1997).

O tipo dominante de doença causada por *Bacillus cereus* difere de país para país. No Japão, o tipo emético é relatado dez vezes mais freqüentemente que o diarreico, enquanto na Europa e América do Norte, o tipo diarreico é mais freqüentemente reportado. Esta variação ocorre devido aos diferentes hábitos alimentares das populações (Doyle, 1997).

Tabela 01: Características dos dois tipos de doenças causadas por *Bacillus cereus*

Características	Síndrome diarreica	Síndrome Emética
Dose infectante	$10^5 - 10^7$ (UFC/g)	$10^5 - 10^8$ (UFC/g)
Produção de toxina	No intestino do hospedeiro	Pré-formado no alimento
Tipo de toxina	Protéico	Peptídeo cíclico
Período de incubação (h)	8 - 16 (ocasionalmente > 24)	0,5 - 5
Duração da doença (h)	12 - 24 (ocasionalmente vários dias)	6 - 24
Sintomas	Dor abdominal, diarreia líquida e ocasionalmente náusea	Náusea, vômito e mal-estar
Alimentos frequentemente implicados	Produtos cárneos, sopas, vegetais, pudins e molhos, leite e produtos lácteos	Arroz frito e cozido, macarrão, massas

Fonte: Doyle, 1997

2.2.1. Incidência de *Bacillus cereus* em Alimentos

Tanto esporos como células vegetativas de *Bacillus cereus* são habitantes freqüentes de uma grande variedade de ambientes, incluindo solo, sedimentos, poeira, água, plantas e muitos tipos de alimentos, notoriamente cereais e derivados, leite e laticínios, condimentos, carnes e vegetais. Como consequência dessa distribuição e devido à sua rápida capacidade de esporulação, *B. cereus* sobrevive bem em ambientes externos e no intestino de animais (Azeredo,1998).

1. Carnes e produtos cárneos:

Bacillus cereus pode ser isolado a partir de carne fresca, o que reflete o grau de contaminação da carcaça pelo solo e pelo manuseio inadequado das mesmas. Em um estudo feito no Reino Unido, encontrou-se que em 6,9% de frango cru continha detectável número de *B. cereus*. Neste mesmo trabalho observou-se que os endoesporos de *Bacillus* sobreviveram ao processos usuais de cozimento, mas números significantes foram encontrados onde não houve um controle rígido e eficiente após o mesmo (Varnam, 1991).

Em uma pesquisa feita no Japão, carne bovina do tipo “hamburgers” foram os que apresentaram maior freqüência de contaminação (45,5% das amostras). No Brasil, Almeida & Schneider, em 1983, pesquisaram a presença do microrganismo em produtos elaborados com carne moída, adquiridos em estabelecidos comerciais na cidade de Campinas, constatando contaminação em 40% das amostras de

croquetes e 90% das amostras de almôndegas, com contagem superiores a 10^3 UFC/g.

2. Leite e derivados:

Bacillus cereus é um contaminante comum de leite desidratado, além de yogurt e queijos. Devido a fatores como a baixa atividade de água, característica de produtos desidratados, a produção de toxina pelo microrganismo é inibida (Varnam, 1991).

3. Cereais:

A incidência de *Bacillus cereus* em arroz é alta e há uma relação direta com a síndrome emética. A contaminação dos grãos ocorre durante a colheita, transporte, beneficiamento e armazenagem. Devido a atividade de água baixa, essa contaminação se faz, basicamente, por esporos do microrganismo (Azeredo, 1998).

4. Outros produtos desidratados:

Pode-se isolar *Bacillus cereus* de vários tipos de produtos desidratados como ovos, batatas, legumes, fórmulas infantis, sopas e condimentos como pimenta do reino, páprica e manjericão, além de outros aditivos (Varnam, 1991).

2.2.2. Síndrome Diarréica

O primeiro estudo completo envolvendo a relação entre síndrome diarréica e *Bacillus cereus* foi feito por Hauge em 1950 (Baiocco,1996) a partir de investigações de quatro surtos de natureza bastante similar, ocorridos na Noruega, e que segundo o próprio autor, afetaram aproximadamente 600 pessoas. Um desses surtos foi amplamente pesquisado e envolveu pacientes e funcionários de um hospital.

Neste surto, das 80 pessoas que ingeriram a refeição servida no jantar, 61 ficaram doentes; das 19 pessoas que não apresentaram nenhum sintoma, 11 não haviam comido a sobremesa e 8 comeram pequena quantidade deste alimento. Portanto, o alimento mais provável de ser o veículo da intoxicação no surto relatado foi a sobremesa, preparada na véspera e armazenada em recipientes à temperatura ambiente. Foi observado um período de incubação em torno de dez horas. Os sintomas apresentados incluíam dores abdominais, diarréia líquida e náusea moderada; vômito e febre não foram comuns e a duração média desses sintomas não ultrapassou doze horas. Análise microbiológica de restos de sobremesa servida revelaram alta contaminação por *Bacillus cereus*. (Baiocco, 1993)

Hauge, para confirmar este surto, isolou a bactéria, promoveu o crescimento em 4×10^6 células por mL e ele próprio se autoinoculou, ingerindo 200 mL da cultura. Após 13 horas, o mesmo desenvolveu dores abdominais e diarréia profusa por 8 horas. (Doyle, 1997)

Desde 1950 tem-se observado um aumento considerável do número de casos de toxinfecções alimentares semelhantes ao quadro descrito para síndrome diarreica. Segundo Kramer e Gilbert (1989), entre os anos de 1960 e 1968, *Bacillus cereus* foi considerado a terceira causa mais comum de surtos de intoxicação alimentar na Hungria, sendo que o primeiro surto ocorreu em 1958, provavelmente pela ingestão de uma sopa de legumes contendo um alto número deste microrganismo por grama de alimento, afetando 65 pessoas. Um pouco mais tarde, foram publicados relatos sobre 35 surtos ocorridos também na Hungria, envolvendo cerca de 800 indivíduos, sendo que todos apresentaram sintomas da síndrome diarreica. As carnes condimentadas, de grande aceitação entre os húngaros, foram os principais alimentos suspeitos de veiculação de *B. cereus* nestes casos (Baiocco, 1993).

Somente em 1970 foi relatado o primeiro caso de síndrome diarreica nos EUA por Midura (1970). De acordo com este autor, 15 estudantes apresentaram diarreia, dores abdominais e náuseas após ingerirem pão de carne contendo cerca de 70×10^6 microrganismos por grama de alimento. O período de incubação foi de 10 horas e o tempo de duração dos sintomas foi de aproximadamente 24 horas. Jephcott *et al* (1977), acompanharam um surto, também ocorrido nos EUA, envolvendo 49 idosos que recebiam refeições preparadas pelo serviço social local. Os sintomas foram dores abdominais e diarreia entre cinco e catorze horas após a ingestão do alimento. Considerando a idade das pessoas envolvidas, os sintomas foram mais severos e o período de incubação foi menor que os demais já relatados em surtos similares. *Bacillus cereus* foi o agente infeccioso incriminado depois de realizadas provas microbiológicas em restos de alimentos suspeitos e fezes das vítimas. Entretanto, o período de incubação, os sintomas apresentados e as análises bacteriológicas são

típicas também de intoxicações alimentares causadas por *Clostridium perfringens*. Neste estudo foram isolados *B. cereus* de fezes dos pacientes e dos restos de alimentos suspeitos, enquanto que *C. perfringens* foram isolados das fezes, porém não dos alimentos. Os alimentos preparados com muita antecedência e deixados à temperatura ambiente constituem um meio ideal para a multiplicação de bactérias, uma vez que tanto *C. perfringens* como *B. cereus* podem se multiplicar à 43°C. (Baiocco, 1993)

Segundo Shinagawa (1990), entre 1950 e 1976, na Finlândia, ocorreram 50 surtos, no Canadá cerca de 9 surtos, e na Holanda 11 surtos causados por *Bacillus cereus*. Existe uma grande variedade de alimentos que podem ser incriminados nestes surtos, tais como: sopa de carne e legumes, massa, leite, sorvete, carnes cozidas, legumes cozidos e crus. Salzberg (1982) realizou o estudo de um surto ocorrido em dois restaurantes, onde os sintomas apresentados pelas pessoas afetadas foram: diarreia, dores abdominais, náusea e vômitos em alguns casos. Nesta ocorrência também pode-se incriminar tanto *B. cereus* como *C. perfringens*, uma vez que não foram feitas análises microbiológicas dos alimentos envolvidos (carne e maionese preparados na véspera). Em geral, no Brasil, existem poucos relatos sobre surtos de toxinfecções alimentares causados por *Bacillus cereus*.

O acúmulo quantitativo de *Bacillus cereus* no alimento depende do número de organismos inicialmente presentes, o alimento adequado para o crescimento e o tempo de duração do mesmo e das condições em que permanece.

Há semelhanças, deste tipo de doença, com os sintomas causados pela

toxinfecção causada pelo *Clostridium perfringens*, que também requer milhões de bactérias (um número maior que 10^6 UFC/g - Harmon, 1991) por grama de alimento para causar os sintomas da doença.

2.2.2.a. Enterotoxina Diarreica

De acordo com Johnson (1984), existem vários termos que podem ser usados para designar a toxina diarreica, tais como: agente diarreico, fator de acumulação de fluidos, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrotica, entre outros. Todos estes termos, entretanto, referem-se a uma proteína com peso molecular de 50.000 Daltons e ponto isoelétrico de 4,9. Segundo Granum (1993), a enterotoxina diarreica é secretada durante a fase de crescimento vegetativo dos microrganismos, principalmente durante o final da fase logarítmica. Quando a fase exponencial é finalizada, a toxicidade é perdida. Além disso, as linhagens podem perder a capacidade de síntese de toxinas quando subcultivadas, significando que este processo é, provavelmente, intermediado por fagos ou epissomas (Kramer e Gilbert, 1989).

As enterotoxinas, de um modo geral, podem ser produzidas numa faixa de pH entre 6,0 e 8,5, sendo que o pH ótimo de produção situa-se em torno de 7,0 ou 7,5 e requerem glicose como nutriente essencial para produção, porém em altas concentrações, há redução ou eliminação da produção da toxina. Outros carboidratos não foram testados.

Os limites de temperatura nos quais ocorre a síntese destas substâncias situam-se entre 18 e 43°C. As enterotoxinas diarréicas tornam-se instáveis quando armazenadas a 4°C e inativadas quando submetidas a temperaturas superiores a 56°C por cinco minutos (Varnan, 1991) e também tem sua produção inibida por 1,5% de NaCl ou 1000 ppm de NaNO₃ (Azeredo, 1998).

As toxinas diarréicas quando ingeridas atuam nas células da mucosa intestinal e estimulam o sistema AMP cíclico - adenilato ciclase, acarretando acúmulo de fluidos no intestino, o que pode ser detectado, principalmente, através de ensaio de íleo ligado de coelho, porém, em linhas gerais, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação da toxina.

D'Aubert, em 1980, demonstrou a existência de quatro enterotoxinas distintas:

- a primeira estimula o sistema adenil-ciclase-AMP cíclico, causando acúmulo de líquido na alça ileal de coelho. Esta toxina deve ser a responsável pelo episódio diarréico que se manifesta depois de um longo período de incubação
- a segunda toxina é um fator que causa acúmulo de líquido, sem influir no sistema adenil-ciclase-AMP cíclico
- a terceira é definida como toxina piogênica, que causa dano severo à mucosa ileal
- a quarta causa vômito, mas não está bem identificada e possivelmente está relacionada com episódios de gastroenterite com breve período de incubação

De acordo com Gilbert (1979) e Thomas *et al* (1992) diferentes linhagens submetidas a condições distintas de crescimento, apresentam respostas diferenciadas na produção de toxina, as quais, quando injetadas no íleo ligado de coelho, causaram

graus distintos de acúmulo de líquido. Através deste teste, foi constatado o efeito transitório das toxinas diarreicas na permeabilidade intestinal, e que estas substâncias se unem fracamente aos sítios receptores presentes no íleo. Ao contrário das enterotoxinas elaboradas por *V. cholerae* e *C. perfringens*, a atividade das enterotoxinas produzidas por *Bacillus cereus* é totalmente inibida pela injeção do antisoro específico no íleo ligado de coelho. Estes pesquisadores também observaram as propriedades das enterotoxinas diarreicas em preparações brutas ou parcialmente purificadas através de filtração em gel de Sephadex G75.

Embora as condições necessárias para produção de enterotoxina diarreica já estejam razoavelmente bem definidas, as tentativas de isolamento e purificação desta substância não tem encontrado muito êxito, dada a natureza lábil da molécula, sua susceptibilidade a enzimas proteolíticas e a perda da toxigenicidade das linhagens subcultivadas.

De acordo com Kramer e Gilbert (1989), técnicas como eletroforese em gel de poliacrilamida, cromatografia em Amberlite CG400, QAE-Sephadex, entre outras, têm sido usadas para separação de toxinas e outros produtos extracelulares elaborados por *Bacillus cereus*.

Um método que vem sendo amplamente usado para detecção de enterotoxina diarreica é o da Aglutinação Passiva Reversa em Látex (RPLA) - Oxoid, cujo limite de sensibilidade situa-se ao redor de 1 ng/mL (Buchanan, R. L., 1994).

Além dos métodos como RPLA, várias outras técnicas podem ser usadas para

se detectar a atividade da toxina diarreica, como caracterizações biológicas ou sorológicas, tais como (Johnson, 1984):

- filtrado de células de macaco com ingesta via sonda nasogástrica
- teste da alça ileal de coelho ligada, com monitoração do fluido acumulado
- permeabilidade vascular, visualizada pela injeção subcutânea de filtrado de células, seguida da injeção de solução de corante Evans Blue, que dará cor azul na região vascularizada da pele de porquinhos da Índia ou coelhos
- teste de Ensaio Imuno Enzimático (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

2.2.3. Síndrome Emética

O primeiro relato de uma nova forma de gastroenterite provocada por *Bacillus cereus* foi feito na Inglaterra em 1971 com o acompanhamento de seis surtos associados ao consumo de arroz frito em restaurantes chineses. Esta nova forma designada como síndrome emética, inclui como principais sintomas: ataques de náusea e vômito desenvolvidos dentro de 1 a 5 horas após a ingestão de alimentos contaminados pela toxina e a duração dos sintomas é de, no máximo, 24 horas. Dores abdominais podem ocorrer, mas não são sintomas típicos desta síndrome. Esta doença está relacionada ao consumo de arroz e macarrão (Kramer, 1989).

Ainda, segundo o mesmo autor, entre os anos de 1971 e 1984 foram relatados, também na Inglaterra, cerca de 192 surtos envolvendo mais de mil casos, sendo que a maioria deles ocorreram durante o verão.

A grande maioria dos casos da síndrome emética também têm sido freqüentemente associada ao consumo de arroz servido em restaurantes chineses. Isto pode ser explicado pela técnica chinesa de preparo do arroz, onde o mesmo é cozido em grandes volumes e armazenado à temperatura ambiente, sendo utilizadas apenas pequenas porções de cada vez. Os esporos resistentes ao processo térmico, germinam rapidamente quando o arroz é deixado à temperatura ambiente (García, 1993).

As características gerais da síndrome emética quanto ao período de incubação

e sintomas gerais são muito semelhantes com as características das intoxicações alimentares provocadas por *Staphylococcus aureus*. Para uma confirmação definitiva, torna-se necessário a realização de testes microbiológicos específicos para cada um dos microrganismos possivelmente envolvidos e /ou a toxina presente (Baiocco, 1993).

Nos surtos de síndrome emética, os alimentos implicados são quase todos exclusivamente amiláceos e, de forma geral, foram preparados e acondicionados de forma incorreta, não respeitando as regras básicas de higiene.

De acordo com Gilbert, Stringer e Peace (1974) entre 1971 e 1973, mais de 30 surtos de intoxicações alimentares foram descritos na Inglaterra. Exames bacteriológicos de restos de alimentos ou de amostras de fezes ou vômitos das pessoas envolvidas não apontaram os organismos freqüentemente envolvidos nos casos de intoxicações alimentares. Na grande maioria dos surtos avaliados durante esses anos, grande número de bastonetes, identificados como *Bacillus cereus* tem sido isolados de vários tipos de amostras coletadas. Os sintomas em cada um dos surtos foram muito parecidos, sendo descritos como um ataque de náusea e vômito entre 1 a 5 horas depois de ingeridos os alimentos (Kramer, 1989).

De acordo com Raevuori (1976) um surto semelhante de intoxicação alimentar ocorreu numa indústria na Finlândia, onde 18 das 36 pessoas que comeram uma refeição no almoço, incluindo arroz cozido, carne e vegetais, tornaram-se doentes. O período de incubação foi de duas horas, em média, e os principais sintomas observados foram vômito, náusea e dores abdominais, características estas,

típicas de intoxicações provocadas por *B. cereus*. O alimento envolvido foi o arroz cozido.

Entre 1982 e 1986, no Japão, ocorreram 73 surtos causados por *Bacillus cereus* envolvendo 1323 casos, sendo que 93 a 95% dos casos apresentaram o tipo emético da doença. A maioria dos surtos ocorreram nos meses de verão e foram associados ao consumo de arroz cozido (Shinagawa, 1990).

Na Noruega, em fevereiro de 1995, houve um caso envolvendo 152 competidores juniores de ski (idade entre 16 e 19 anos) que consumiram carne cozida. Os atletas jovens tiveram sintomas severos, enquanto os treinadores nada sofreram; a duração dos sintomas foi de 2 a vários dias (Doyle, 1997).

Uma característica interessante que tem sido observada mundialmente é o número geralmente baixo de casos registrados dessas doenças em vários outros países, fazendo com que os surtos ocasionados por *Bacillus cereus* permanecessem quantitativamente quase desconhecidos até hoje. Isto deve ser explicado pelo fato das doenças se apresentarem, em alguns casos, de forma muito suave, ou ainda pelo fato dos sintomas desenvolvidos serem atribuídos a outros microrganismos que não *B. cereus* como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* (Baiocco, 1993).

Dados epidemiológicos comparativos entre estes três microrganismos podem ser vistos na tabela 02.

Tabela 02: Dados epidemiológicos comparativos entre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* (Baiocco, 1993)

Característica	<i>C. perfringens</i>	<i>B. cereus</i> Síndrome diarréica	<i>B. cereus</i> Síndrome Emética	<i>S. aureus</i>
Período de incubação (h)	8-22	8-16	1-5	2-6
Duração dos sintomas (h)	12-24	12-14	6-24	6-24
Diarréia e dores abdominais	predominante	predominante	muito comum	comum
Náusea e vômitos	raro	ocasional	Predominante	predominante
Patogenicidade	toxina ^a	toxina ^b	toxina ^c	toxina ^c
Alimentos envolvidos	carnes	carnes, sopas, legumes, etc.	Arroz cozido e massas	carnes cozidas frias e laticínios

a - toxina associada à esporulação liberada no intestino delgado

b - toxina pré-formada no alimento ou produzida no intestino delgado

c - toxina pré-formada no alimento

2.2.3.a. Toxina Emética

Estas toxinas apresentam características bem distintas das enterotoxinas envolvidas nos surtos de diarreia, e são produzidas principalmente em culturas contendo extrato de arroz ou meios de caldo triptona de soja ou ágar triptona de soja. Sua produção ocorre durante a esporulação, porém esta relação não está clara (Varnam, 1991).

São termoestáveis, suportando uma temperatura de 126°C por 90 minutos e de 4°C por dois meses, aproximadamente. As toxinas podem ser produzidas numa faixa de pH que vai de 2,0 a 11,0, não sendo sensíveis à ação das enzimas tripsina e pepsina. Este fato explica a resistência destas toxinas às condições presentes no estômago. Não são polares, pois são extraídas com clorofórmio (Johnson, 1984) e apresentam peso molecular igual a 1000 Daltons, aproximadamente.

Não estimulam o sistema AMPcíclico-adenil ciclase (Gilbert,1989; Vannetten, 1990; Grant, 1993) e pouco se sabe sobre a forma de atuação desta toxina; deduz-se que atuem em neurotransmissores, nesse caso, ocasionando a resposta emética. Quando fornecidas em rações para macacos Rhesus, provocam vômito entre 1 a 5 horas após a ingestão. O ensaio de íleo ligado de coelho é negativo, ou seja, não há acúmulo de fluidos na parte do intestino inoculada. Os testes de permeabilidade vascular e de necrose em coelho também são negativos. A detecção desta toxina é feita, principalmente, através de reações com primatas ou uma outra alternativa é um teste de cultura de tecidos baseada na produção de

vacúolo em células Hep-2, mas requer avaliação (Varnam, 1991).

São consideradas um peptídeo não antigênico, pois os animais testados não desenvolvem resistência imunológica a essa toxina. Evidências epidemiológicas mostram que 75% das linhagens envolvidas em surtos de síndrome emética são sorotipo 1. Isso significa que somente algumas linhagens de *Bacillus cereus* são capazes de sintetizar essa toxina (Gilbert e Perry, 1977).

A toxina emética é também chamada cereulide e consiste de uma estrutura circular de 3 ou 4 repetições de aminoácidos e/ou oxiácidos:

[D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃ (Doyle, 1997).

Há uma hipótese que a toxina emética seja um lipídeo, devido a natureza hidrofóbica (Doyle, 1997).

Tabela 03: Propriedades da toxina emética:

Determinação	Propriedade ou Atividade
Peso molecular	1,2 KDa
Estrutura	Peptídeo de forma circular
Ponto isoelétrico	Neutro
Antigenicidade	Não (?)
Atividade biológica em primatas	Vômito
Receptor	5-HT ₃ (estímulo do vago aferente)
Testes na alça ileal (coelho, rato)	Nenhum
Citotoxicidade	Não
Células HEp-2	Atividade Vacuolar
Estabilidade ao calor	90 minutos a 121°C
Estabilidade ao pH	Estável a pH 2-11
Efeito de proteólise (tripsina, pepsina)	Nenhuma
Produção de toxina	Em alimentos: arroz e leite a 25-32°C

Fonte: Doyle, 1997

2.2.4. Outras Toxinas

Outras proteínas com atividade enterotoxigênica têm sido reportadas, mas pouco se sabe sobre suas propriedades. Além das toxinas diarreica e emética outras

toxinas como hemolisinas (cereolisina, hemolisina I, hemolisina II), fosfolipase C, entre outras, também são produzidas por *Bacillus cereus* (Azevedo, 1998).

Outra toxina, enterotoxina T, que é composta de uma única proteína, tem peso molecular de 41kDa e foi recentemente identificada por Agata *et al* (Doyle, 1997).

Um resumo geral das características das toxinas é apresentada na tabela que segue:

Tabela 04: Características gerais das principais toxinas produzidas por *Bacillus cereus* (Baiocco, 1993)

Toxinas	Propriedades gerais
Enterotoxina Diarréica	Proteína termolábil; peso molecular de 38-46KDa; pI 5,1-5,6; inativadas por enzimas proteolíticas; atividade necrótica e letal; função patogênica em intoxicações alimentares e infecção extraintestinal; formada por várias subunidades
Toxina Emética	Termoestável; peso molecular < 10kDa; resistente a enzimas proteolíticas; produzida durante a esporulação
Hemolisina primária (cereolisina, hemolisina I)	Termolábil, peso molecular de 49 a 59 KDa; pI 6,3 a 6,7; neutralizadas pelo colesterol e antistreptolisina O; atividade necrótica e letal; função patogênica em infecção extraintestinal
Hemolisina secundária (hemolisina II)	Termolábil; peso molecular de 29 a 34 KDa; pI de 4,9 a 5,3; sensível a proteases; não sensível ao colesterol e antistreptolisina O; toxicidade não estabelecida
Fosfolipase C (lecitinase)	Complexo enzimático estável; peso molecular de 23 a 29 KDa; atividade hemolítica
Exoenterotoxina descrita por Ezepechuk <i>et al</i> (1979)	Termolábil; peso molecular de 57 KDa; inativada a 60°C por 20 minutos; possivelmente relacionada a enterotoxina diarréica
Toxina isolada por Ezepechuk <i>et al</i> (1979)	Proteína; peso molecular de 100KDa; resistente a tripsina; letal; relação com a enterotoxina não estabelecida

2.3. Métodos Biológicos usados na Determinação da Patogenicidade dos Microrganismos e de suas toxinas, incluindo *Bacillus cereus*

2.3.1. Alimentação de macacos Rhesus:

Neste ensaio, culturas isoladas de *Bacillus cereus* ou filtrados livres de células (para avaliação apenas das toxinas produzidas) são adicionadas às rações e fornecidas a esses animais, em laboratório. Através do acompanhamento dos sintomas apresentados é possível estabelecer os mecanismos de ação desses microrganismos ou de suas toxinas quando ingeridos pelos animais e conseqüentemente pelo homem. Não é uma técnica muito usada dado seu alto custo, desconforto causado aos macacos analisados e dificuldades operacionais (Jonhson, 1984)

2.3.2. Ensaio de íleo ligado de coelho:

A presença de enterotoxina, neste ensaio, é determinada pelo acúmulo de fluidos na porção do íleo onde foi injetado o sobrenadante da cultura toxigênica. Para a realização deste método, é necessário inicialmente que o coelho sofra uma cirurgia na qual parte do seu intestino é exposto para inoculação do filtrado livre de célula do microrganismo estudado. Após um curto período de tempo, o coelho é novamente aberto e, logo a seguir, sacrificado. Observa-se então se houve ou não dilatação da parte do intestino que foi inoculado com o sobrenadante. Se for constatada a dilatação, fica confirmada a presença de enterotoxinas, bem como a

patogenicidade da cultura. O ensaio do íleo ligado de coelho também pode ser usado na avaliação de microrganismos invasivos que agem a nível do epitélio intestinal. Neste caso, o ensaio é realizado através da inoculação de células microbianas viáveis diretamente no intestino dos animais que são posteriormente sacrificados, e a parte de seu intestino afetada é analisada. Com isso, determina-se o grau de patogenicidade do microrganismo enteroinvasivo em questão (Jonhson,1984).

2.3.3. Reação de aumento de permeabilidade vascular em cobaias:

Filtrados livres de células da cultura microbiana em estudo são injetados no epitélio da parte dorsal de coelhos ou de cobaias. Após um certo período de incubação, injeta-se o corante de Evans por via endovenosa. Após algumas horas é possível observar uma coloração azulada nas regiões dérmicas onde ocorreu aumento da permeabilidade vascular. A tonalidade azul torna-se mais ou menos clara de acordo com o grau de permeabilidade vascular naquela região, para cada uma das toxinas estudadas (Muro, 1988).

Além dos métodos biológicos anteriormente citados, estão disponíveis kits comerciais para detecção de *Bacillus cereus* e de suas toxinas; o RPLA, específico para toxina diarréica, que tem como princípio uma reação imunológica entre antígeno e anticorpo, tendo como fase sólida partículas de látex (Buchanan, 1994; Beecher, 1994; Day, 1994; Doyle, 1997) e o ensaio de ELISA, que é uma reação imunológica entre antígeno e anticorpo, mediado por enzimas (Day, 1994; Doyle, 1997). Pode-se citar ainda, ensaios como RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) que representam uma forte ferramenta para caracterização deste

microrganismo baseado em características genéticas (Stephan, 1996).

Para o auxílio na identificação bioquímica de *Bacillus cereus*, está disponível no mercado o kit multi ensaio API 50 CH e CHB (BIOLAB - bioMérieux) que permite realizar o estudo da fermentação de 49 açúcares. Este teste acrescenta um maior número de informações bioquímicas, além daquelas citadas na metodologia clássica (Sneath, 1990), utilizadas para identificação e caracterização deste microrganismo, pois no mesmo, durante a incubação, o catabolismo dos glúcides produz ácidos orgânicos que provocam a viragem do indicador de pH; os resultados obtidos constituem o perfil bioquímico da cepa e servem para sua identificação, baseada na capacidade fermentativa de carboidratos (Varnam, 1991).

Ensaio bioquímico para o mesmo, tais como, reação de Voges Proskauer, liquefação de gelatina, hidrólise de amido, produção de indol, entre outros (Shinagawa, 1990) são sugeridos pelo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 1990).

Para este trabalho, selecionou-se no Manual de Bergey's (1990), alguns testes bioquímicos que identificam *Bacillus cereus*, tais como:

- Teste de catalase: indica a presença da enzima catalase; o resultado positivo é caracterizado pelo aparecimento de bolhas (produção de H₂), indicando que o microrganismo pertence ao gênero *Bacillus*, dado se tratar do único bastonete Gram positivo esporulado capaz de degradar peróxidos

- Teste de Voges Proskauer: baseia-se na detecção de acetoína, precursora de butilenoglicol, a partir da fermentação da glicose. Em presença de O₂, álcali e α-naftol como catalisador, a acetoína converte-se a diacetil que é o reagente da reação de VP. O diacetil reage com o grupo guanina (arginina) presente no meio, dando um produto de condensação vermelho rosa
- Teste de hidrólise de tirosina: evidencia a capacidade de decomposição do aminoácido tirosina, o que diferencia *Bacillus cereus* de *Bacillus subtilis*
- Teste de redução de nitrato: teste realizado para caracterizar a capacidade de redução de nitrato, presente no meio de cultura, a nitrito ou nitrogênio
- Citrato: algumas bactérias podem obter energia em ausência de açúcares, usando o citrato como única fonte de carbono
- Litmus milk: detecta a ação na proteína do leite e produção de ácido a partir da lactose. O teste é considerado positivo quando ocorre a coagulação doce - há formação de coágulo no fundo do tubo de ensaio, sem gás, seguido de hidrólise de proteína
- Teste de coloração de cristais de toxinas intracelulares: caracteriza a espécie *Bacillus thuringiensis* por microscopia de contraste de fase, porém é mais recomendado a detecção pela coloração com fucsina e observação ao microscópio óptico comum (Harmon, 1991)

2.4. Métodos Analíticos para *Bacillus cereus*

2.4.1. Meios de isolamento e enumeração

As metodologias para detecção e identificação de *B. cereus* continuam sendo a base para o diagnóstico de intoxicação (Netten & Kramer, 1992).

Nos primeiros estudos relacionando *B. cereus* a intoxicações alimentares, Hauge (1950) adotou método de inoculação direta em superfície de ágar-sangue. Este ensaio apoia-se no reconhecimento de características morfológicas das colônias hemolíticas em meio de ágar, sem nenhum princípio seletivo, e foi aprimorado por Kramer *et al* (1982), utilizando polimixina-B como agente seletivo.

Pelo menos 11 tipos de meios de cultura foram propostos, desde 1946, com o objetivo de isolar e enumerar *B. cereus* (Netten & Kramer, 1992). Em todos estes meios, o inóculo deve ser espalhado em superfície, o que permite a formação de colônias características e de fácil visualização. A incubação feita a 30°C é reconhecida pela maioria dos autores como sendo a ótima para promover o crescimento desta bactéria. Os agentes seletivos usados nos meios de isolamento limitam-se as polimixinas, cloreto de lítio e actidiona. Os efeitos do cloreto de lítio, contudo, podem levar à inibição de *B. cereus*, daí a contra-indicação de seu uso. A polimixina-B tem efeito bactericida contra Gram-negativas (Azeredo, 1998).

Os sistemas de diagnóstico utilizados nos meios de isolamento de *B. cereus* exploram características morfológicas de suas colônias, bem como propriedades

fisiológicas relacionadas à produção de lecitinases e à incapacidade de fermentar manitol (Varadaraj, 1993). A reação de precipitação de lecitina envolve a hidrólise mediada por fosfolipases C, enzimas dependentes de íons Ca e Zn ou Mg, caracterizadas pelo sítio de clivagem, nos fosfolipídeos. É um sistema enzimático complexo, que ocasiona a precipitação do substrato e o aparecimento de zona opaca ao redor das colônias, em meio sólido, diferente da reação de formação de halo transparente, observada, por exemplo, em *Staphylococcus aureus* (Netten & Kramer, 1992).

Segundo Shinagawa (1990) e Netten & Kramer (1992), os meios mais usados, hoje, incluem o uso de polimixina-B, gema de ovo (fonte de lecitina) e um indicador de pH. Tais meios apresentam seletividade decorrente da resistência de *Bacillus* a polimixina e seu sistema de diagnóstico é baseada em precipitação de lecitina e coloração do meio (Azeredo, 1998).

Os meios mais comumente utilizados são:

a) Meio MYP (meio de Mossel, 1967):

Segundo Mossel (1967) MYP é a sigla para “mannitol egg yolk phenol red polymyxin”. Este meio evidencia a produção de lecitinase e a incapacidade de fermentar manitol. Usa-se o antibiótico polimixina-B com a finalidade de inibir espécies não pertencentes ao gênero *Bacillus*. As colônias do microrganismo são caracterizadas por aparecerem no meio como colônias planas, sem brilho, com bordas ligeiramente onduladas, com 3 a 6 mm de diâmetro, rodeadas de halo denso e

branco de precipitação de lecitina contra um fundo róseo arroxeadado intenso do meio. Segundo Netten & Kramer (1992) é o meio mais utilizado nos EUA e em outros países filiados a ISO (International Standards Organization).

b) Meio KG (Kim & Goepfert, 1971):

Este meio foi feito para identificação presuntiva de *Bacillus cereus* e espécies do grupo I do gênero *Bacillus*, com base na formação de zona de turbidez em volta das colônias, como resultado da precipitação da lecitina. O uso de vermelho de fenol serve para acentuar a reação de lecitinase e a polimixina-B é o agente seletivo. É, caracteristicamente, um meio pobre, sem carboidratos, o que estimula a formação de esporos livres dentro de poucas horas, o que permite a observação de cristais protéicos de *B. thuringiensis* e, assim, sua diferenciação. Segundo Azeredo (1998), os autores do meio KG consideram o meio MYP ineficiente em eliminar microrganismos manitol-positivos porque permite o crescimento de grandes números de espécies fermentadoras de manitol, o que torna o meio amarelo, dificultando, ou mesmo impedindo, a visualização de colônias manitol-negativas. Além do meio seletivo KG, seus autores propuseram uma técnica sorológica rápida para confirmação de *Bacillus cereus*, dependente da produção de endoesporos livres dentro de 24 horas.

c) Meio PEMBA (“polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue agar”):

Este meio foi formulado por Holbrook & Anderson em 1980 e é apresentado

como meio seletivo e de diagnóstico que permite detectar e identificar com rapidez pequenos números de *Bacillus cereus* em alimentos. A base para o reconhecimento das colônias, está na incapacidade de fermentar manitol pelo microrganismo. A alcalinidade do meio PEMBA é revelada pelo indicador azul de bromotimol e o uso de piruvato tem como objetivos intensificar a reação de lecitinase, facilitar a esporulação e reduzir o espalhamento das colônias de *B. cereus*. A seletividade do meio PEMBA pode ser acentuada pela adição de actidiona, recomendada para alimentos suspeitos de elevada contaminação por fungos.

Rabinovitch & Vasconcelos, em 1987, desenvolveram, no Brasil, um meio que permite o uso de menor concentração de polimixina-B, ou mesmo, sua substituição por colistina (polimixina-E), com eventual adição de actidiona. Este meio recebeu a adição de zinco para acentuar a reação de lecitinase e apresenta uma vida útil de até três semanas, bem superior ao MYP, KG e PEMBA, cuja estocagem média, à 4°C, é de quatro dias. Ainda segundo os mesmos autores, Vasconcelos & Rabinovitch, em 1995, desenvolveram uma fórmula seletiva mais econômica, que dispensa o uso de antibióticos. O meio, denominado VRM, inclui em sua formulação um indicador de oxi-redução (resazurina) e gema de ovo, além de componentes que estimulam a reação fosfolipídica e a esporulação. Com pH alto (8,2) o meio inibe ou retarda o crescimento de outros microrganismos, entre os quais *B. megaterium*. A eficiência do meio VRM foi testada em 86 amostras de alimentos contaminados por *B. cereus*, permitindo contagens ligeiramente superiores às obtidas em MYP.

Há vários trabalhos que comparam a eficiência de diferentes meios no isolamento seletivo de *Bacillus cereus*. Segundo Azeredo (1998), Harmon, em 1984

observou melhor a diferenciação das colônias em MYP que em PEMBA, já que, neste último, o espalhamento das colônias é maior e impede contagens superiores a 30 UFC; ainda de acordo com o autor, Rusul & Yaacob, em 1995, fizeram sérias restrições ao meio PEMBA, criticando-o pela baixa seletividade no isolamento de 459 colônias presuntivas de *B. cereus*, das quais apenas 42,3% foram confirmadas.



2.5. Controle da Incidência de *Bacillus cereus*

2.5.1. Análise de Perigos e Identificação de Pontos Críticos de Controle em Arroz Cozido

Segundo Costa (1982), qualidade é o grau com que se ajusta um produto à demanda que pretende satisfazer.

Assim, em restaurantes coletivos, pretende-se consumir um alimento de boa qualidade; para que isso seja conseguido, várias etapas de processamento devem ser seguidas, pois há necessidade de introduzir, a nível de cadeia alimentar, medidas preventivas adequadas, que constituem o sistema de análise de perigos e identificação de pontos críticos de controle.

Trata-se de analisar cada passo e situações, desde a chegada da matéria-prima ao estabelecimento até que o alimento preparado seja servido, buscando as possibilidades de contaminação por microrganismos, de sua multiplicação, da sobrevivência aos tratamentos térmicos culinários e da multiplicação durante a conservação, reaquecimento (regeneração) e conservação a quente do alimento preparado (García, 1993).

De acordo com Yokoya (1982), o controle de qualidade é freqüentemente restrito a três aspectos fundamentais:

- controle da matéria prima

- controle do processamento
- inspeção do produto acabado

As matérias primas são de natureza bastante variadas, por isso, deve-se uma atenção especial às características das mesmas a fim de se obter um produto final com qualidade. Se o controle da matéria prima e do processamento for perfeito, a inspeção do produto acabado seria dispensável. Entretanto, na prática, dificilmente pode-se obter a garantia total no controle da matéria prima e do processamento, tornando-se necessária a inspeção do produto acabado.

Todos os ingredientes usados no processamento devem ser considerados; além do produto vegetal ou animal utilizado como ingrediente principal, produtos como água, sal, açúcar, ácidos, condimentos e outros aditivos, bem como o tipo da embalagem devem ser considerados para o controle de qualidade final do produto.

No controle do processamento, deve-se identificar, inicialmente, os pontos críticos da linha.

Já a inspeção do produto final desempenha um papel de relevância relativa no controle de qualidade. Ele serve para confirmar que o sistema de controle de qualidade está funcionando adequadamente, e indicar a existência de pontos frágeis nesse sistema. Segundo Yokoya (1982) os fatores que devem ser observados no produto final são:

- se a qualidade sensorial do produto acabado é similar àquela prevista pelo teste de controle da matéria prima

- se o produto é saudável do ponto de vista microbiológico
- se a amostra apresenta falhas imprevistas, como corpos estranhos
- se o produto é atrativo ao consumidor

O arroz cru contém esporos de *Bacillus cereus*, parte dos quais resiste ao efeito da cocção, mas esta operação não é um ponto crítico de controle (García, 1993).

Depois de cozido, o arroz é conservado a temperaturas que permitem a multiplicação de *B. cereus*; os esporos sobreviventes germinam e elaboram as toxinas. As toxinas eméticas são termoestáveis e não são inativadas durante o posterior aquecimento. Na prática, o arroz é fervido, mantido quente para servi-lo ou refrigerado. No caso do produto cozido e refrigerado, o arroz é retirado da refrigeração e frito conforme for pedido, no caso de pratos orientais. Os pontos críticos são a conservação a quente do arroz cozido e a conservação fria antes da fritura.

Algumas etapas merecem destaque no preparo do arroz, como segue (Silliker J.H. *et al*, 1997):

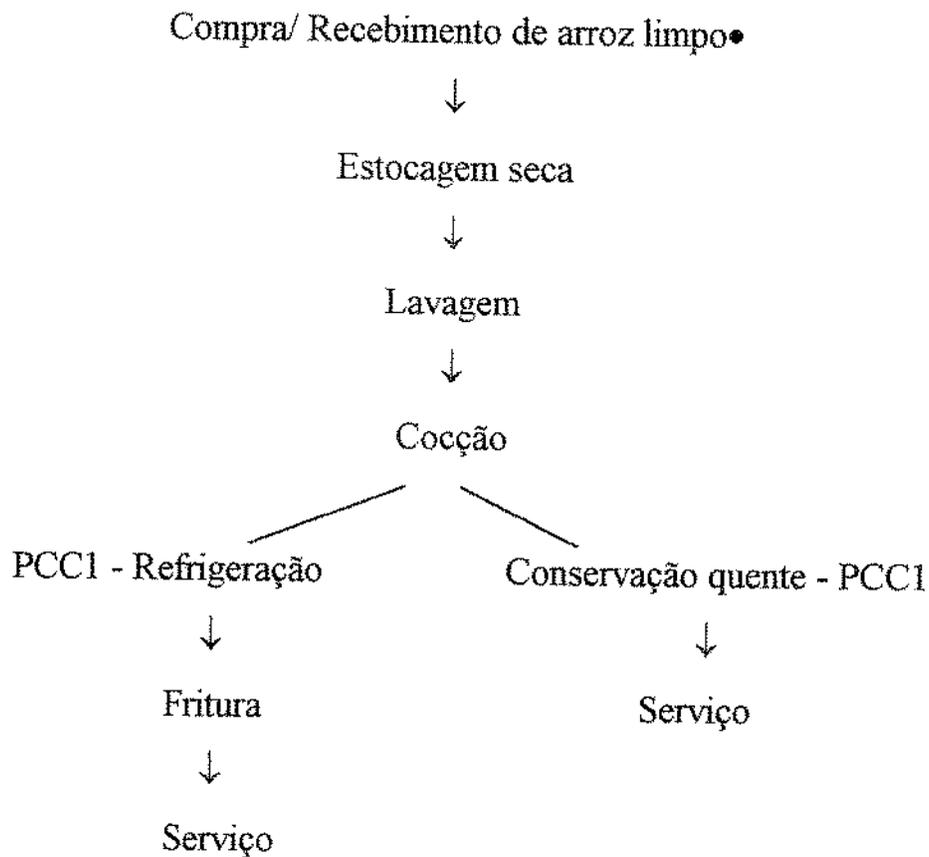
1. Compra e recebimento: nesta etapa não há necessidade de controle microbiano direto. O arroz deve ser inspecionado para infestações de insetos e danos de roedores. Arroz mofado deveria ser descartado
2. Lavagem: a lavagem retira pouca sujidade, alguns fragmentos de insetos e outros contaminantes indesejáveis, mas tem pouco impacto microbiológico

3. Cocção: devido ao fato dos esporos de *Bacillus cereus* serem a preocupação principal e muitos deles sobreviverem às temperaturas de cocção, a mesma não pode ser considerada um ponto crítico de controle (PCC)
4. Conservação a quente - PCC 1: a temperatura recomendada para conservação quente é de pelo menos 55°C, a fim de impedir a multiplicação de microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos. Nas panelas, nas tábuas de vapor e em banho-maria, o arroz mantido acima do nível da água pode apresentar temperaturas mais baixas que o submerso. O produto deve ser mexido freqüentemente. Durante a conservação quente, a temperatura do arroz cozido deveria ser medida a cada 2-3 horas. Se a temperatura descer abaixo de 55°C, o arroz deverá ser servido, reaquecido ou rapidamente resfriado e posteriormente totalmente reaquecido. O resfriamento rápido é conseguido somente se o arroz for colocado no refrigerador em camadas com 8 cm ou menos de espessura
 - * controle: a multiplicação microbiana é controlada conservando a temperatura do arroz cozido acima de 55°C
 - * monitoramento: mede-se a temperatura do arroz ao menos a cada 2-3 horas
5. Conservação fria - PCC 2: o arroz cozido é colocado em assadeiras rasas com 8 cm ou menos de profundidade, em um refrigerador ou local frio
 - * controle: a temperatura é abaixada rapidamente até onde não mais ocorrerá o crescimento de *Bacillus cereus*
 - * monitoramento: é medida a temperatura do arroz e do local refrigerado
6. Fritura: nos restaurantes chineses, freqüentemente, o arroz é misturado a outros ingredientes (p. ex. ovos, camarões, carne, molho de soja) e a seguir frito. Durante a fritura, o arroz e os demais ingredientes, muitas vezes, alcançam temperaturas de 90°C ou mais. Consequentemente, as células vegetativas de

microorganismos contaminantes introduzidos com os ingredientes devem ser, se não destruídos, ao menos sensivelmente diminuídos, porém a toxina emética de *Bacillus cereus*, caso esteja presente, não será inativada, dada sua resistência térmica, como anteriormente citado. Portanto, o frimento (reaquecimento) não pode ser considerado um ponto crítico de controle.

Um resumo destas etapas de preparo de arroz seguem na figura 01.

Figura 01: Fluxograma padrão do processo de preparo de arroz cozido e frito em restaurantes (García, 1993):



• indica uma situação de maior contaminação

3. Material e Método

3.1. Amostras

Foram analisadas amostras de arroz cozido coletadas em três restaurantes tipo “self-service”, localizados no campus da UNICAMP, denominados restaurantes 1,2 e 3 respectivamente. Porções de aproximadamente 30g de arroz foram coletadas em dois períodos distintos, pela manhã, por volta de 11:00 horas e à tarde, por volta das 14:00 horas, acondicionadas em recipientes de alumínio e imediatamente transferidas ao laboratório de microbiologia. A coleta ocorreu durante um período de quatro meses, completando um total de 42 amostras. Fizeram-se também coletas de arroz cru fornecidas pelos próprios restaurantes.

Todas as amostras de arroz cozido foram coletadas diretamente de recipientes do tipo “banho-maria”, e anotando-se a temperatura do referido banho.

3.2. Determinação de Contagens Bacterianas

Nas amostras coletadas, procedeu-se a contagem de mesófilos totais pelo método de profundidade (Gonzalez, 1995) e para contagem de *Bacillus* sp utilizou-se o método proposto por Harmon (1991).

3.2.1. Contagem Total de Mesófilos

Das amostras, foram tomadas 10g de cada e homogeneizadas em 90mL de solução salina peptonada, de acordo com os procedimentos preconizados pelo Food and Drug Administration (FDA) - (Harmon, 1991) e a partir deste homogeneizado, preparou-se uma série de diluições decimais, até a ordem de 10^{-3} g/mL, utilizando-se o mesmo diluente.

As amostras correspondentes às diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} g/mL foram plaqueadas em profundidade, em triplicata, em meio Plate Count Agar (PCA-Difco) e incubadas à 30°C por 24 horas, para contagem de mesófilas.

3.2.2. Contagem e Isolamento de colônias de *Bacillus*

Utilizando-se as mesmas diluições, procedeu-se o plaqueamento em superfície, espalhando-se 0,1mL em uma placa e 0,3mL em três outras placas da diluição correspondente a 0,1g/mL em meio Mannitol Yolk Polymyxin (MYP-Difco); nas diluições subsequentes inoculou-se o volume de 0,1mL, conforme a metodologia proposta por Harmon (1991). As placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas para contagem presuntiva de *Bacillus cereus*.

As contagens foram feitas considerando-se todas colônias típicas de *Bacillus cereus*, conforme o observado com relação às características da linhagem padrão de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Assim enumeraram-se as colônias rosadas e circundadas por halo de precipitação de lecitina. Todas as colônias com estas características foram isoladas em meio Ágar nutriente e após crescimento à 30°C por 24 horas e mantidas sob refrigeração para posterior identificação.

3.2.3. Caracterização dos isolados de colônias típicas de *Bacillus cereus*

A confirmação dos isolados como membros do grupo de *Bacillus cereus* e a sua diferenciação em espécies foi feita de acordo com a metodologia recomendada pelo FDA e descrita por Harmon (1991).

3.2.3.a. Coloração de Gram e Coloração para detecção de cristais tóxicos

Todos os microrganismos isolados foram submetidos a coloração de Gram e a coloração de cristais. Para tanto, foram utilizadas culturas em ágar nutriente com 24 horas de incubação a 30°C.

No caso da técnica para visualização da formação de cristais, utilizou-se o procedimento descrito por Harmon (1991); as culturas permaneceram por 3 dias à temperatura ambiente e realizaram-se esfregaços em lâminas de vidro limpas e secas, os quais foram fixados por leve aquecimento e a seguir com tratamento de metanol durante 30 segundos, secas em chama e o esfregaço foi corado com solução aquosa de fucsina básica a 0,5%. As lâminas foram aquecidas sob chama até emissão de vapores e após 1 a 2 minutos novo aquecimento. O esfregaço foi lavado com água, seco e examinado em microscópio óptico sob imersão, para visualização de cristais tetragonais de toxina.

3.2.3.b. Caracterização bioquímica dos isolados

Os isolados, após a caracterização morfológica como descrito no item 3.2.3.a

foram submetidos a uma série de testes bioquímicos para determinação de seu perfil metabólico. Foram utilizados o sistema multi-ensaio API 50 CH (BioMérieux)- (Varnam,1991) para o estudo do comportamento e capacidade de utilização de carboidratos e também uma série de outros ensaios bioquímicos complementares (Sneath, 1990).

3.2.3.b.1. Série bioquímica complementar

As culturas em estudo, após crescimento em ágar nutriente por 24 horas à 30°C, foram submetidas aos ensaios de:

- Produção de catalase (H_2O_2 - 3%)
- Voges Proskauer (Vokes Proskauer)
- Hidrólise de tirosina (L-Tyrosin - Merck)
- Utilização de citrato (Simmons Citrate Agar - Difco)
- Hidrólise de litmus milk - proteólise (Difco)
- Redução de nitrato

3.2.3.b.2. Capacidade de utilização de carboidratos pelo uso do sistema multi ensaio API 50 CH (BioMérieux) - (Varnam, 1991)

Após o cultivo de *Bacillus cereus* em ágar nutriente à 30°C por 24 horas, fez-se uma suspensão densa com a bactéria em tubos contendo soro fisiológico (0,9% NaCl) - (S1). Uma outra suspensão em tubo com 5mL de soro fisiológico foi realizada com o fim de compará-la ao ponto 2 da escala de McFarland (anotando-se o número de gotas utilizado para se conseguir este ponto - n). Inoculou-se no meio

de cultura API CHB duas vezes o número de gotas usadas na suspensão que foi comparada a escala, ou seja, 2n, procedendo-se uma homogeneização.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, inoculou-se o meio API CHB nas 49 galerias (correspondente a 49 açúcares). Incubando-se em câmara úmida, em estufa, à 30°C, por 24/48 horas.

Após a incubação, fez-se a leitura em cada tubo da galeria (estudo da acidificação produzida pela viragem de vermelho fenol para amarelo; especificamente para esculina, observa-se a viragem de vermelho para preto). Desta forma, foram considerados positivos os tubos de coloração amarela.

Ocasionalmente pode ocorrer que um teste inicialmente positivo volte a negativo, isto é devido a produção de amoníaco a partir de peptona que mascara a formação de ácidos, uma vez que alcaliniza os meios; estes testes devem ser, então, considerados positivos.

Os testes considerados positivos são marcados em uma tabela, que pode ser vista na página 62, e enviadas ao laboratório da BioMérieux para identificação, através de seu perfil bioquímico, por meio de programas de computador.

Figura 02: Modelo de ficha de anotação de resultados do multi ensaio

api 50 CH

REF.: _____

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelievo : _____

bioMérieux

Imprimé en France / Printed in France

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49		
CODE	Control	Glycerol	Erythritol	D-Arabinose	L-Arabinose	Ribose	D-Xylose	L-Xylose	Adonitol	D-Methyl-xyloside	D-Galactose	D-Glucose	D-Fructose	D-Mannose	L-Sorbose	Phenolose	Dulcitol	Inositol	Mannitol	Sorbitol	α Methyl-D-mannoside	α Methyl-D-glucoside	N Acetyl glucosamine	Arylgalactine	Arbutine	Esculine	Salicine	Carbocose	Maltose	Maltotriose	Lactose	Melibiose	Saccharose	Trehalose	Inuline	Melibiose	D-Raffinose	Amandon	Glycogène	Xyritol	m Galactose	D-Turanose	D-Lyxose	D-Tagatose	D-Fucose	L-Fucose	D-Arabinol	L-Arabinol	Glycomate	α ceto-glycomate	β ceto-glycomate

Milieu d'inoculation / Inoculation medium / Inoculatioms-medium / Terreno d'inoculo / Medio de inoculacion :

Température d'incubation / incubation temperature / Inkubationstemperatur / Temperatura di incubazione / Temperatura de incubación :

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests :

Ident. :

3.2.3.c. Análise de Enterotoxina Diarréica pelo ensaio de Aglutinação Passiva Reversa em Látex (RPLA) - (Buchanan, 1994)

Após o isolamento e subsequente caracterização bioquímica das linhagens isoladas, as mesmas foram submetidas ao teste sorológico para análise da capacidade de produção de enterotoxina em meio de cultura.

3.2.3.c.1. Produção de Enterotoxina Diarréica por linhagens de *Bacillus cereus* (Varnam, 1991)

Cada linhagem isolada e mantida em nutriente ágar foi inoculada em 0,5mL de caldo nutriente e incubado por 18 horas à 36°C. Uma alçada deste inóculo foi adicionada em 10mL de meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI - Difco) acrescido de 0,01% de glicose e incubado por 6 horas a 200rpm, em temperatura de 36°C, sendo que após 3,5 e 4,5 horas de incubação foi adicionado sucessivamente ao meio 0,1mL de NaOH 0,1N.

Após este período, a cultura foi centrifugada a 10000rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro milipore de 0,45µm de diâmetro de poro. O filtrado obtido foi conservado à -20°C.

3.2.3.c.2. Utilização do teste de RPLA

O teste de multi ensaio RPLA é composto de dois reagentes de látex, codificados pelo fabricante como TD951 e TD952, um diluente (TD954) e uma

enterotoxina controle (TD953).

O ensaio foi realizado em uma placa de poliestireno para microtitulação com 12 colunas e 8 linhas; cada amostra foi adicionada a duas colunas, sendo que as linhas correspondiam às diluições do extrato que foram realizadas como descrito.

Com o auxílio de uma pipeta foi dispensado 25 μ L de diluente (TD954) em cada uma das cavidades das duas colunas, exceto na primeira linha. A seguir, adicionou-se 25 μ L da amostra na primeira e segunda linha e fez-se diluições consecutivas, da mesma forma, até a sétima linha, portanto a última linha deveria conter somente o diluente.

Na primeira coluna de cada amostra, adicionou-se 25 μ L de látex sensibilizado (TD951) com Imunoglobulina G anti-enterotoxina diarreica de *Bacillus cereus* e na segunda 25 μ L de látex controle (TD952). A placa foi agitada lentamente, recoberta com um papel filme para evitar evaporação e mantida a temperatura ambiente por 24 horas.

Após o período de incubação, fez-se a leitura das cavidades, observando-se a intensidade de aglutinação nas diferentes diluições.

4. Resultados e Discussão

Foram coletadas 42 amostras de arroz cozido; destas isolou-se 14 colônias típicas de *Bacillus cereus* em meio MYP (denominadas de 1 a 14). No que se refere a arroz cru, das 3 amostras, isolou-se 3 colônias típicas deste microrganismo (denominadas 15, 16 e 17).

Os testes obtidos em meio PCA e MYP podem ser observados na tabela 05, que indicam as contagens para mesófilos totais e *Bacillus cereus* nos períodos da manhã e da tarde, respectivamente. Constatou-se que a temperatura média dos banhos permanecia ao redor de 55°C.

Tabela 5: Contagens do número de mesófilos totais e *Bacillus cereus* em amostras de arroz cozido (- = não se detectou crescimento)

◆ Período da manhã - Dados fornecidos em UFC/g de arroz

Contagem	Restaurante 1		Restaurante 2		Restaurante 3	
	PCA	MYP	PCA	MYP	PCA	MYP
1	4,0x10 ⁴	1,4x10 ²	8,5x10 ¹	-	1,5x10 ¹	-
2	3,0x10 ¹	-	1,5x10 ¹	-	-	-
3	2,5x10 ¹	-	2,7x10 ³	2,0x10 ¹	5,5x10 ¹	-
4	2,2x10 ³	2,0x10 ²	-	-	9,4x10 ³	-
5	2,6x10 ³	1,0x10 ¹	1,5x10 ⁵	-	1,4x10 ⁴	3,0x10 ¹
6	9,0x10 ³	-	5,5x10 ¹	-	7,0x10 ¹	-
7	1,5x10 ³	-	1,3x10 ³	-	4,5x10 ¹	-

◆ Período da tarde - Dados fornecidos em UFC/g de arroz

Contagem	Restaurante 1		Restaurante 2		Restaurante 3	
	PCA	MYP	PCA	MYP	PCA	MYP
1	$6,5 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	-	$5,0 \times 10^1$	-
2	$2,5 \times 10^2$	-	$2,4 \times 10^3$	$7,0 \times 10^1$	-	-
3	$1,0 \times 10^1$	-	$2,8 \times 10^2$	-	$1,1 \times 10^2$	-
4	$2,3 \times 10^3$	-	-	-	-	-
5	$1,0 \times 10^1$	-	$3,7 \times 10^2$	-	$2,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$
6	-	-	$3,6 \times 10^4$	-	$2,0 \times 10^3$	-
7	$7,6 \times 10^3$	-	>300	-	$2,2 \times 10^3$	-

(-) não se detectou crescimento

Tabela 6: Contagens do número de mesófilos totais e de *Bacillus cereus* em amostras de arroz cru

Dados fornecidos em UFC/g de arroz

Coleta	Restaurante 1		Restaurante 2		Restaurante 3	
	PCA	MYP	PCA	MYP	PCA	MYP
1	$1,0 \times 10^1$	-	-	$1,0 \times 10^1$	$2,6 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$

(-) não se detectou crescimento

De acordo com os dados da tabela 05, percebe-se que a variação ao longo do tempo, considerando as contagens em UFC/ g de arroz, entre a 1º e a 7º coleta, mantém-se semelhante, pois há picos de baixa e alta contaminação em um mesmo restaurante e repetindo-se entre os demais.

No que se refere a variação ao longo do dia, quando se compara o 1º e o 2º período (manhã e tarde), percebe-se que em alguns dias, ora ocorre uma queda significativa de contaminação e ora ocorre um aumento da mesma. A presença de altos índices de contaminação na contagem em meio PCA, ocorrem, provavelmente, (1) devido ao aproveitamento de arroz cozido do dia anterior ou (2) a ocorrência de uma proliferação dos microrganismos inicialmente presentes, devido à temperatura constante do banho-maria, ou a oscilação da mesma, ou ainda, (3) devido a uma contaminação externa, devido à exposição ao ambiente.

Em linhas gerais, a contaminação para mesófilos totais, pelo método de “Plate Count Agar”, apresentar-se com altos índices, caracteriza higiene deficiente do estabelecimento, da matéria-prima ou uma contaminação ocorrida durante o processamento por equipamentos, pessoal e ambiente.

Em meio MYP, não se conseguiu detectar variação ao longo do tempo (durante os períodos de coleta) ou do dia (manhã e tarde), isto pode estar relacionado com a baixa incidência de *Bacillus cereus* em alimentos.

Os microrganismos caracterizados como *Bacillus cereus*, em meio MYP, após coloração de Gram, apresentaram-se Gram positivos, nas primeiras 24 horas de

incubação e como bastonetes longos dispostos em cadeia com dimensões próximas ao padrão, com esporos na posição central e sem distender o esporângio.

Na coloração de cristais de toxinas intracelulares, observou-se, em todas as cepas isoladas, a ausência dos mesmos.

Os microrganismos quando submetidos aos testes bioquímicos citados no item 3.2.3.b.1, apresentaram o perfil da tabela 7.

De acordo com os testes todos microrganismos foram caracterizados como *Bacillus cereus*. Para as amostras de arroz cru, a análise bioquímica pelo teste de citrato, mostrou-se com resultado negativo nas 3 colônias isoladas.

As análises bioquímicas tradicionais, citadas pela literatura, representam uma fonte segura para identificação destas bactérias, porém a presença de alguns resultados negativos podem levar a conclusão de se tratarem de microrganismos mutantes. Como por exemplo a interpretação no teste de citrato realizado nas colônias isoladas de arroz cru; um resultado negativo pode significar a presença de uma outra espécie do gênero *Bacillus*, como também um *Bacillus cereus* geneticamente modificado. O teste de citrato, segundo Sneath (1990), diz que o mesmo é positivo em 90 a 100% dos casos; se considerarmos 90%, restam 10% que podem ser citrato negativo e classificados como espécies de *Bacillus cereus*. Desta forma, análises complementares devem ser feitas, para a verdadeira confirmação, tais como RPLA, ELISA e RAPD.

Tabela 07: Testes bioquímicos propostos por Harmon (1991), para caracterização de *Bacillus*

Cepas	Proteólise	Tirosina	Citrato	VP	Catalase	Nitrato
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+
4	+	+	-	(+)?	+	+
5	-	+	+	+	+	+
6	-	+	-	+	+	+
7	-	+	+	+	+	+
8	-	+	+	-	+	+
9	-	+	-	-	+	+
10	-	-	+	-	+	+
11	-	+	+	-	+	+
12	-	+	+	-	+	+
13	-	+	+	-	+	+
14	-	+	+	+	+	+
15	-	+	-	+	+	+
16	+	+	-	+	+	+
17	+	+	-	+	+	-

As 14 colônias de *Bacillus cereus* isoladas de arroz cozido, as 3 de arroz cru, caracterizadas bioquimicamente como positivas, além do padrão ATCC 14579, foram submetidas ao teste multi ensaio API 50 CH e conseguiu-se resultados em apenas 7, de acordo com o laboratório da BioMérieux. Destas 7 colônias, 5 foram consideradas *Bacillus thuringiensis*, inclusive o padrão ATCC 14579; 1 como *Bacillus subtilis* ou *Bacillus licheniformis* e outra com perfil duvidoso, variando entre *Bacillus polymyxa*, *Bacillus circulans* e *Bacillus licheniformis*.

O kit API 50 CH mostrou-se ineficiente para caracterização de *Bacillus cereus*, pois os resultados obtidos não foram coerentes com os da série bioquímica proposto por Sneath (1990). A presença, de acordo com a interpretação dos resultados realizados pelo fabricante, de *Bacillus thuringiensis* não pode estar correta, já que na coloração de Gram, onde se verificou o tamanho das células e na coloração de cristais de toxina, em momento algum houve a suspeita da presença deste microrganismo. Ainda, pode-se duvidar da eficiência deste kit, devido ao uso do método de RPLA, onde foi detectado a presença de toxina diarréica, exclusivamente produzida por *Bacillus cereus*.

Entre as 17 amostras submetidas ao teste multi ensaio RPLA, 11 foram consideradas produtoras de toxina diarréica, classificadas com a numeração 3,4,6,7,8,9,10,12,14 (obedecendo a mesma ordem da tabela dos resultados dos testes bioquímicos) e 2 amostras de arroz cru (numeração 16 e 17). As amostras de números 3, 4 e 6 referem-se ao restaurante 2; a 7, 8, 12 e 14 ao restaurante 1 e as amostras 9 e 10 ao restaurante 3, sendo o restaurante número 1 com maior incidência de *Bacillus cereus*. As amostras de arroz cru referem-se ao 3º restaurante.

O ensaio RPLA é uma ferramenta eficiente, pois consegue demonstrar com clareza a reação imunológica ocorrida, caracterizando a presença de toxina diarréica. Por outro lado, embora a literatura cite o *Bacillus cereus* como sendo o único responsável pela produção da toxina é possível que outras espécies também o façam como se pode evidenciar atualmente com *Staphylococcus* da espécie não aureus produtores de enterotoxina (Breckinridge, L.C. and Berdoll, M.S.,1971).

Práticas realizadas em restaurantes como a adição de produtos proteicos, condimentos e especiarias, aliados ao preparo antecipado do alimento e reaproveitamento do mesmo, assim como cozinhas despreparadas e equipamentos usados com falta de higiene representam uma fonte de contaminação por *Bacillus cereus*. Isto pode significar um aumento de contaminação e supor uma eventual intoxicação alimentar, ainda que muitos episódios ocorridos, de pequeno porte, tenham sido subestimados em nosso meio.

O crescimento do setor comercial de refeições pelo atendimento “self-service” pode significar um perigo na ocorrência de doenças de origem alimentar, devido à longa exposição à temperatura do banho-maria, ao meio ambiente e aos consumidores.

5. CONCLUSÃO:

Com base nos resultados apresentados e discutidos anteriormente, podemos concluir que:

1. As contagens de microrganismos mesófilos ocorreu ao longo do dia de modo semelhante, em todas as amostras
2. Com base nos resultados, pode-se afirmar que a maior probabilidade de contaminação ocorra pelo reaproveitamento de arroz do dia anterior, por contaminação externa devido a exposição ao ambiente e oscilações na temperatura dos banhos
3. A incidência de *Bacillus cereus* foi baixa ao longo do período
4. O método tradicional de descrição do perfil bioquímico mostrou-se mais eficiente do que a utilização do kit API 50 CH, pelo menos nos casos estudados
5. Não se detectou a presença de *Bacillus thuringensis*, através da pesquisa de cristais de endotoxinas, como sugerido pelo laboratório BioMérieux, que analisou os dados do kit API 50 CH, donde se conclui que estes resultados não são suficientemente seguros
6. O ensaio de RPLA é ainda o mais seguro na identificação de linhagens produtoras de enterotoxina diarréica produzida por *Bacillus cereus*, apesar das limitações do método. Desta forma outros ensaios, como ELISA e/ou RAPD poderiam ser utilizados
7. Práticas inadequadas no preparo e distribuição de arroz em restaurantes tipo “self-service”, aumentam as chances da ocorrência de toxinfecções alimentares

6. Referências Bibliográficas*:

- ALMEIDA, R.C.C.; SCHNEIDER, I.S. Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidos ao varejo no município de Campinas. Higiene Alimentar. S.P.: vol. 2, No.1/2, p. 37-41, 1983
- ANDERSEN, G.J.; GOLDRING, M.A.. Quality Control in the Australian Rice Industry. Food Technology in Australia. USA.: Vol. 28, No. 10, p. 306, 1976
- ASANO, S. *et al.* Cloning of Novel Enterotoxin Genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. USA.: Vol. 63, No. 3, p. 1054-1057, 1997
- ASPLUND, K. *et al.* The inhibition of the growth of *Bacillus cereus* in liver sausage. International Journal of Food Microbiology. USA.: Vol. 7, p. 353-355, 1988
- AZEREDO, R.M.C. Estimativa de Riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus* . Tese: UNICAMP, 1998
- BAIOCCO, L.M.. Aspectos Epidemiológicos das Toxinfecções causadas por *Bacillus cereus* e caracterização das toxinas produzidas por estes microrganismos. Monografia. Campinas: UNICAMP, 1993

- BEECHER, D. J.; LEE WONG, A. C. Identification and Analysis of the Antigens Detected by Two Commercial *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin Immunoassay Kits. Applied and Environmental Microbiology. USA.: Vol. 60, No. 12, p. 4614-4616, 1994
- BENEDICT, R.C. *et al.* *Bacillus cereus*: Aerobic Growth Kinetics. Journal of Food Protection. USA.: Vol. 56, no. 3, p. 211-214; 1993
- BENNETT, R. W. *et al.* Biological Characterization and Serological Identification of *Bacillus cereus* diarrhoeal factor. Netherlands Milk Dairy Journal. USA.: No. 47, 1993
- BONVENTRE, P.F. e JOHNSON, C.E.. *Bacillus cereus* toxin. In: Microbial Toxins, vol. III. Bacterial Protein toxins. Academic Press, p. 415-435. N.Y.: 1970
- BRECKINRIDGE, L.C. and BERGDOLL, M.S. Outbreak of foodborne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing *Staphylococcus*. Med. Intelligence. USA.: 284(10): 541-543, 1971
- BRYAN, F.L. & RIEMANN, H.. Foodborne Infections and Intoxication. 2ed. N.Y.: Academic Press, Inc. 1979
- BUCHANAN, R.L.; SCHULTZ, F.J. Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. Letters in Applied Microbiology. USA.: No. 19, p. 353-

356, 1994

CHRISTIANSSON, A. *et al.* Toxin Production by *Bacillus cereus* Dairy Isolates in Milk at Low Temperatures. Applied and Environmental Microbiology. USA.: Vol. 55, No. 10, p. 2595-2600, 1989

CHUNG, K., SUN, H. Distribution and Characteristics of *Bacillus cereus* Isolated From Rice in Taiwan. Journal of Food Science. USA.: Vol. 51, No. 5, p. 1208-1212, 1986

CLIVER, D.O.. Foodborne Disease. California: Academic Press Inc., 1990

COSTA, J.J.S. Controle de Qualidade- Aspectos Organizacionais e Modelo Estatístico. R.J.: Editora Rio, 1982

D' AUBERT, S.; ABBATI, P.; CANTONI, C.. Sull'intossicazione alimentare da *Bacillus cereus*. Industrie Alimentari. Itália: dicembre, p. 913-926, 1980

DAVIS, B.D.. Tratado de Microbiología. Barcelona: Salvat, 1971

DAY, T.L. *et al.* A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. Journal of Applied Bacteriology. USA.: No. 11, p. 9-13, 1994

- DOYLE, M.P. *et al.* Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. USA.: ASM Press- Washington, 1997
- DUFRENNE, J. *et al.* Characteristics of Some Psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. USA.: International Journal of Food Microbiology. USA.: No. 27. p. 175-183, 1995
- FOEGEDING, P. M. *et al.* Assessment of Foodborne Microbial Risks. Clinical Microbiology Newsletter. USA.: Vol. 13, No. 14, p. 105-108, 1991
- GARCÍA, B.M. Aplicacion del Sistema de Analisis de Riesgos e Identificacion y Control de Puntos Criticos (ARICPC) en la Restauracion Colectiva. Alimentaria. Madrid: marzo, p. 17-23, 1993
- GIFTEL, M.C. *et al.* Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. Food Microbiology. USA.: No. 13, p. 53-58, 1996
- GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Riemann, H e Bryan, F.L. (ed). Food-borne Infections and Intoxications. 2nd edition. Academic Press, Cap. X, p. 495-518, 1979
- GILBERT, R.J.; PARRY, J.M.. Serotypes of *Bacillus cereus* from outbreaks of food poisoning and from routine foods. Journal Hvg. Camb. London: No. 78, p. 69-74, 1977

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. Journal Hyg. Camb. London: Vol. 73, p. 433-443, 1974

GONZALEZ, M.L. *et al.* The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. Journal of Applied Bacteriology, USA.: No. 78, p. 548-554, 1995

GRANT, I. R. *et al.* Effect of low-dose irradiation on growth of and toxin production by *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in roast beef and gravy. International Journal of Food Microbiology. USA.: Vol. 18, p. 25-36, 1993

HARMON, S.M.; GOEPFERT, J.M.. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: American Public Health Association, 1991

HARMON, S. M.; KAUTTER, D. A.; McCLURE, F.D.. Comparison of Selective Plating Media for Enumeration of *Bacillus cereus* in Foods. Journal of Food Protection. USA.: Vol. 47, No. 1, p. 65-67, 1984

HENDERSON, I. *et al.* Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR. International Journal of Systematic Bacteriology. USA.: Vol. 44, No. 1, p. 99-105, 1994

JEPHCOTT, A. E. *et al.* An Unusual Outbreak of Food-Poisoning Associated with Meals-on-Wheels. The Lancet. France: July 16, p. 129-130, 1977

JESUS, F.F. Avaliação da Presença de *Bacillus cereus* em pimenta do reino em pó e cominho em pó, comercializados no Estado do Rio de Janeiro. Tese. R.J.: Fundação Oswaldo Cruz, 1993

JONHSON, K.M. *Bacillus cereus* Foodborne Illness- An Update. Journal of Food Protection. USA.: Vol. 47, No. 2, p. 145-153, 1984

JONHSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F.. Germination and Heat Resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic foodborne illnesses. Journal of Food Science. USA.: Vol. 47, p. 1268-1271, 1982

KIM, H.U.; GOEPFERT, J.M.. Enumeration and Identification of *Bacillus cereus* in Foods. Applied Microbiology. USA.: Vol. 22, No. 4, p. 581-587, 1971

KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J.. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Foodborne Bacterial Pathogens. London: Marcel Dekker Inc, 1989

LANGEVELD, L.P.M. *et al.* Consumption by Healthy Adults of Pasteurized Milk with a High Concentration of *Bacillus cereus*: A Double-Blind Study. Journal of Food Protection. USA.: Vol. 59, No. 7, p. 723-726, 1996

- LARSEN,H.D.; JORGENSEN,K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. International Journal of Food Microbiology. USA.: Vol. 34, p. 179-186, 1997
- MAZAS, M. *et al.* Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food Science and Technology. USA.: No.30, p. 71-78, 1995
- MARTIN, J.H. *et al.* Characteristics and Control of Potential Foodborne Pathogens in Cultured Dairy Foods. Cultured Dairy Products Journal. USA.: Vol. 30, No. 3, p. 9-12;15-16, 1995
- MIDURA, T. *et al.* Outbreak of Food Poisoning caused by *Bacillus cereus*. Public Health Reports. USA.: Vol. 85, No. 1, p. 45-48, 1970
- MIKAMI, T. *et al.* . Detection of Common Flagella Antigen in *Bacillus cereus* by Monoclonal Antibody. Microbiology Immunol. USA.: Vol. 34, No. 8, p. 709-714, 1990
- MORITA, T. N.; Woodburn, M. J.. Stimulation of *Bacillus cereus* Growth by Protein in Cooked Rice Combinations. Journal of Food Science. USA.: Vol. 42, No. 5, p. 1232-1235, 1977
- MORTIMER, P.R.; McCANN, G.. Food-Poisoning Episodes Associated with *Bacillus cereus* in Fried Rice. The Lancet. France: Vol.1, p.1043-1045, 1974

- MOSSEL, D.A.A. *et al.* Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Applied Microbiology. USA.: Vol. 15, No. 3, p. 650-653, 1967
- MOSSO, M. A. *et al.* Enumeration of *Bacillus* and *Bacillus cereus* Spores in Food from Spain. Journal of Food Protection. USA.: Vol. 52, No. 3, p. 184-188, 1989
- MURAKAMI, T. *et al.* Detection of *Bacillus cereus* Flagellar Antigen by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Microbiology Immunol. USA.: Vol. 35, No. 3, p. 223-234, 1991
- MURO, M.A.. *Bacillus cereus*: caracterização bioquímica e sorológica, e avaliação da toxicidade de cepas isoladas de alimentos envolvidos ou não em casos de intoxicação alimentar. Tese. Campinas: UNICAMP, 1988
- NETTEN, P.; KRAMER, J.M.. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. International Journal of Food Microbiology. USA.: No. 17, p. 85-99, 1992
- NETTEN, P.. *et al.* Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. Journal of Applied Bacteriology. USA.: Vol. 69, p. 73-79, 1989
- NISHIKAWA, Y. *et al.* Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and Hep-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. International Journal of Food Microbiology. USA.: No. 31, p. 149-159, 1996

PARKER, D. A.; GOEPFERT, J.M.. Enhancement of Synthesis of *Bacillus cereus* Enterotoxin Using a Sac-Culture Technique. Journal of Food Protection. USA.: Vol. 41, No. 2, p. 116-117, 1978

RAEVUORI, M. *et al.* An Outbreak of *Bacillus cereus* food-poisoning in Finland associated with boiled rice. Journal Hyg. Great Britain: Vol. 76, p. 319 326, 1976

RABINOVITCH, L.; VASCONCELOS, F.J.M.. A new medium for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in food. Revista de Microbiologia. S.P.: Vol. 18, No. 4, p. 330-334, 1987

RANGASAMY, P.N. *et al.* Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. The Australian Journal of Dairy Technology. USA.: Vol. 48, nov., p. 93-95, 1993

ROITMAM, I. *et al.* Tratado de Microbiologia. Vol. 1. S.P.: Editora Manole Ltda, 1988

ROMANCZYK, L.J. *et al.* Formation of 2-acetyl-1-pyrroline by several *Bacillus cereus* strains isolated from cocoa fermentation boxes. Journal Agric. Food Chemical. USA.: No. 43, p. 469-475, 1995

SBCTA. Manual de Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle - ARPCC. Campinas, 1993

- SCHRAFT, H. *et al.* Epidemiological Typing of *Bacillus* spp. Isolated from Food. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 11, p. 4229-4232, 1996
- SCHRAFT, H. & GRIFFITHS, M.W. Specific Oligonucleotide Primers for Detection of Lecithinase-Positive *Bacillus* spp. by PCR. Applied and Environmental Microbiology. USA.: Vol. 61, no. 1, p. 98-102, 1995
- SHINAGAWA, K. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. International Journal of Food Microbiology, vol. 10, p. 125-142, 1990
- SILLIKER, J.H. *et al.* APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos. S.P.: Livraria Varela, 1997
- SISSON, P.R. *et al.* Application of pyrolysis mass spectrometry to the investigation of outbreaks of food poisoning and non-gastrointestinal infection associated with *Bacillus* species and *Clostridium perfringens*. International Journal of Food Microbiology. USA.: No. 17, p. 57-66, 1992
- SNEATH, P.H.A.. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Vol. 2. London: Williams & Wilkins, 1990
- STAUFFER, J.E.. Quality Assurance of Food - Ingredients, Processing and Distribution. USA: Food & Nutrition Press, Inc, 1988
- STEPHAN, R.. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genomic

- fingerprinting of *Bacillus cereus* isolates. International Journal of Food Microbiology. USA.: No. 31, p. 311-316, 1996
- STANIER, B.D.. *et al.* The Microbial World. 4ed. N.J.: Prentice-Hall, 1986
- STECCHINI, M.L.. *et al.* Relazioni tra le Proprietà di Struttura del Mezzo e la Crescita Microbica. Itàlia: Industrie Alimentari. XXXIV, dez.,1995
- SUTHERLAND, A.D. Toxin production by *Bacillus cereus* in Dairy Products. Journal of Dairy Research. London: Vol. 60, p. 569-574, 1993
- TERRANOVA, W.; BLAKE, P. A. *Bacillus cereus* Food Poisoning. The New England Journal of Medicine. England: Jan. 19, p. 143-144, 1978
- TORRES-ANGEL, M.J. *et al* .Enterotoxigenicidad de *Bacillus cereus*. Rev. Latino-Americana Microbiología. vol. 21, p. 5-10, 1979
- TRABULSI, L.R. Microbiologia. 2ed. S.P.: Livraria Atheneu Editora, 1991
- VARADARAJ, M.C. Methods for detection and enumeration of foodborne bacterial pathogens: a critical evaluation. Journal of Food Science and Technology. V. 30, No.1, p. 1-13, 1993
- VARNAM, A.H. *et al.* Foodborne Pathogens: an Illustrated Text. USA.:Mosby Year Book, 1991

YOKOYA, F. Controle de Qualidade nas Fábricas de Alimentos. S.P.:FTPT,
1982

ERRATA

- Incluir na bibliografia
SALZBERG, S.P.; *et al.* Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. Revista de Microbiologia. S.P.: No. 13 (1), p.26-30, 1982
- Corrigir o autor NETTEN, P. para VAN NETTEN, P.
- Corrigir na página 31, último parágrafo:
“De acordo com Gilbert (1979) e Thomas *et al* em 1992 (Baiocco, 1993), diferentes linhagens...”

* As referências bibliográficas foram normatizadas segundo RUIZ, J.A..
Metodologia Científica. 2ed. S.P.: Editora Atlas, 1990