

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

BACTÉRIAS do GRUPO do *Bacillus cereus* em LEITE e
ESTUDO ENTEROTOXIGÊNICO das CEPAS ISOLADAS

Naiá Carla Marchi de Rezende Lago

Médica Veterinária

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

BACTÉRIAS do GRUPO do *Bacillus cereus* em LEITE e
ESTUDO ENTEROTOXIGÊNICO das CEPAS ISOLADAS

Naiá Carla Marchi de Rezende Lago

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária - Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Dezembro de 2002

L177b Lago, Naiá Carla Marchi de Rezende
Bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite e estudo
enterotoxigênico das cepas isoladas / Naiá Carla Marchi de Rezende
Lago. – – Jaboticabal, 2002
xii, 70 f. :il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002

Orientador: Oswaldo Durival Rossi Júnior

Banca examinadora: Antônio Nader Filho, Dirceu Rodrigues
Meira, José Paes de Almeida Nogueira Pinto, Ruben Pablo Schocken
Iturrino

Bibliografia

1. *Bacillus cereus*. 2. Leite. 3. enterotoxinas. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 614.31:576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NAIÁ CARLA MARCHI de REZENDE LAGO – São Paulo, 29 de novembro de 1972. Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP, em 1995, concluiu sua pós-graduação em nível de Mestrado pela mesma instituição, na área de Medicina Veterinária Preventiva, no ano de 1998. Iniciou sua vida acadêmico-profissional pelo Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, onde permaneceu de 1998 a 2001 como responsável pelas disciplinas “Epidemiologia e Saneamento” e “Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados” do curso de Medicina Veterinária. No ano de 2000 ingressou como professora responsável pela disciplina “Fisiologia dos Animais Domésticos” do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Barão de Mauá. Neste mesmo ano, por um período de seis meses (setembro de 2000 a março de 2001), foi professora substituta na Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), responsável pela disciplina “Epidemiologia” do curso de Enfermagem. No ano seguinte (2001), tornou-se responsável pelas disciplinas “Microbiologia e Imunologia” e “Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública I”, do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Moura Lacerda, na cidade de Ribeirão Preto, SP. A partir de 2002, tornou-se também responsável pela disciplina “Tecnologia e Inspeção de Alimentos e Produtos de Origem Animal” e pelas análises microbiológicas oriundas do núcleo hospitalar do Centro Universitário Moura Lacerda. Durante sua vida acadêmica, publicou alguns trabalhos relacionados com sua área de pesquisa – microbiologia de alimentos de origem animal – especialmente microbiologia de leite.

Aos meus pais, Waldete e
Leila, exemplos de luta e
dedicação,

Ao meu companheiro,
Paulinho, pelo amor
incondicional,

A Carolina, já tão amada e
ansiosamente esperada...

DEDICO

"Nem o sol, nem o mar, nem o brilho das estrelas,
Tudo isso não tem valor, sem ter vocês..."

Ao Duri, eterno mestre e
constante exemplo de
orientação,

A mais nova e grande amiga
Ana Maria, a quem eu não
saberei como retribuir pela
valiosa ajuda durante todo o
trabalho,

Meu eterno agradecimento

"Amigo é coisa prá se guardar debaixo de sete chaves
Dentro do coração..."

AGRADECIMENTOS

- A Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal,
- Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, onde ficaram muitos amigos, em especial ao Diba,
- A Lila, pelo constante apoio técnico e moral,
- Ao laticínio que permitiu a colheita de parte das amostras, em especial à Fabiana,
- A grande amiga Neide, pelas mais diferentes formas de apoio durante todo o curso,
- Aos professores que proporcionaram maiores conhecimentos, em especial aos professores Amaral, Nader, Raul, Ângela, Pablo, Paes e Dirceu, que muito contribuíram para essa versão final,
- A todos que não foram aqui citados, mas sabem que jamais serão esquecidos,

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Caracterização do gênero <i>Bacillus</i>	3
3.2 Caracterização do <i>Bacillus cereus</i>	6
3.3 Ocorrência em leite e derivados.....	7
3.4 <i>Bacillus cereus</i> como agente causador de infecções secundárias.....	10
3.5 Fatores de virulência	11
3.6 Surtos e casos de toxinfecção envolvendo o <i>Bacillus cereus</i>	17
3.7 Isolamento e identificação do <i>Bacillus cereus</i>	20
3.8 Detecção de enterotoxinas.....	22
3.9 Controle e destruição dos esporos.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Preparo das amostras	26
4.1.1 Preparo do leite em pó instantâneo	26
4.1.2 Preparo das amostras líquidas	26
4.2 Isolamento do <i>Bacillus cereus</i>	26
4.3 Identificação do <i>Bacillus cereus</i>	27
4.4 Caracterização das cepas enterotoxigênicas.....	30
4.5 Análise estatística.....	33
4.6 Estimativa da validade das técnicas utilizadas para a detecção de enterotoxinas	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Principais características utilizadas na diferenciação das espécies do grupo do <i>Bacillus cereus</i> , segundo Harmon et al., 1992.....	5
2. Número de amostras de leite analisadas e de positivas para a presença de microrganismos do grupo do <i>Bacillus cereus</i> e número de cepas produtoras de enterotoxinas pela técnica de aglutinação passiva em látex. Ribeirão Preto e Jaboticabal, 2002.	36
3. Número de cepas de microrganismos do grupo do <i>Bacillus cereus</i> testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.....	42
4. Número de cepas de microrganismos do grupo do <i>Bacillus cereus</i> testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo aumento de permeabilidade vascular em pele de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.....	43
5. Número de cepas de <i>Bacillus cereus</i> testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelas diferentes técnicas usadas (alça intestinal ligada de coelho, aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho e aglutinação passiva em látex).	44
6. Número de cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas detectadas pela prova de aglutinação passiva em látex (“in vitro”) submetidas à prova de detecção de enterotoxinas pela técnica de acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho (“in vivo”)	46

Tabela	Página
7. Número de cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas detectadas pela prova de aglutinação passiva em látex (“in vitro”) submetidas à prova de detecção de enterotoxinas pela técnica de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho (“in vivo”).....	47
8. Número de cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas detectadas pela prova de acúmulo de fluido em alça ligada de coelho submetidas à prova de detecção de enterotoxinas pela técnica de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Colônia de bactérias sugestivas de pertencerem ao grupo do <i>Bacillus cereus</i> isoladas de amostras de leite em ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP).....	28
2. Número de amostras analisadas e de positivas para a presença de bactérias do grupo do <i>Bacillus cereus</i> , em relação a cada um dos tipos de leite analisados. Ribeirão Preto e Jaboticabal, 2002.....	36
3. Número de cepas de microrganismos do grupo do <i>Bacillus cereus</i> testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pela técnica de aglutinação passiva em látex, isoladas em diferentes tipos de leite.....	37
4. Número de cepas de microrganismos do grupo do <i>Bacillus cereus</i> testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.....	42
5. Número de cepas de microrganismos do grupo do <i>Bacillus cereus</i> testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo aumento de permeabilidade vascular em pele de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.....	43
6. Número de cepas de <i>Bacillus cereus</i> testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelas diferentes técnicas usadas (alça intestinal ligada de coelho, aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho e aglutinação passiva em látex).	45

BACTÉRIAS do GRUPO do *Bacillus cereus* em LEITE e ESTUDO ENTEROTOXIGÊNICO das CEPAS ISOLADAS

RESUMO – O *Bacillus cereus* é um microrganismo ubíquo encontrado freqüentemente em produtos lácteos. As perdas econômicas e o risco que traz à saúde pública são alarmantes. Os objetivos deste trabalho foram pesquisar o *Bacillus cereus* em leite, verificar a sua capacidade enterotoxigênica e o risco que provoca à saúde pública e comparar diferentes técnicas utilizadas para detecção de toxinas. Para tal, foram analisadas 120 amostras de leite (30 de leite cru, 30 de leite pasteurizado, 30 de leite em pó e 30 de UAT). Para a pesquisa de enterotoxinas, foram utilizadas três técnicas. Encontraram-se contaminadas 15 (50,0%), 29 (96,7%), 22 (73,3%) e 4 (13,3%) amostras de leite cru, pasteurizado, em pó e UAT, respectivamente. Para a detecção de enterotoxinas pela técnica da alça ligada em coelhos, foram positivas, respectivamente, 1 (7,1%), 10 (35,7%) e 3 (13,6%) cepas das amostras de leite cru, pasteurizado e em pó. Para o teste de aumento de permeabilidade vascular dérmica, apresentaram-se enterotoxigênicas, respectivamente, 1 (7,1%), 1 (3,6%), 2 (9,1%) e 1 (4,0%) cepas isoladas de leite cru, pasteurizado, em pó e UAT. Para a detecção de enterotoxinas pela prova de aglutinação passiva em látex, apresentaram-se positivas 7 (63,6%), 4 (30,8%), 3 (33,3%) e 8 (80,0%) cepas isoladas, respectivamente, de leite cru, pasteurizado, em pó e UAT. Conclui-se que as amostras de leite analisadas, principalmente as amostras já processadas termicamente, deixam a desejar quanto a sua qualidade, colocando em risco a saúde dos consumidores. Conclui-se também que a técnica de aglutinação é a mais indicada para a detecção da enterotoxina produzida pelo *Bacillus cereus*.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, enterotoxinas, leite

***Bacillus cereus* and RELATED SPECIES in MILK and ENTEROTOXIGENIC
STUDY from ISOLATED STRAINS**

ABSTRACT – *Bacillus cereus* is a ubiquitous microorganism frequently found in milk products. The economic losses and the damage to public health they cause are enormous. The objectives of this work were to search for *Bacillus cereus* in milk, their enterotoxigenic activity to estimate the risks the use of this product may produce and to compare different techniques used to detection of enterotoxins. For that, 120 samples of milk were examined (30 of raw milk, 30 of pasteurized milk, 30 of milk powder and 30 of UHT milk). To test the enterotoxigenicity, three techniques were used. *Bacillus cereus* was present in 15 (50,0%), 29 (96,7%), 22 (73,0%) and 4 (13,3%) samples of raw milk, pasteurized milk, milk powder and UHT milk, respectively. For the enterotoxigenicity detection using the assay in the rabbit ileal loop, 1 (7,1%), 10 (35,7%) and 3 (13,6%) strains from raw milk, pasteurized milk and milk powder were positive. For the enterotoxigenicity detection using the assay for vascular permeability activity, 1 (7,1%), 1 (3,6%), 2 (9,1%) and 1 (4,0%) strains from raw milk, pasteurized milk, milk powder and UHT milk were positive, respectively. Using the reversed passive latex agglutination, diarrheal toxin production was shown to be 7 (63,6%), 4 (30,8%), 3 (33,3%) and 8 (80,0%) strains respectively isolated from raw milk, pasteurized milk, milk powder, and UHT milk. It was concluded that the milk samples analyzed didn't present good quality and may put in risk the health of consumers of such products. We also concluded that the reversed passive latex agglutination is the best technique to determine the enterotoxins produced from *Bacillus cereus*.

Keywords: *Bacillus cereus*, diarrheal toxin, milk

1 Introdução

As toxinfecções de origem alimentar acometem com muita freqüência as mais diferentes populações, embora nem sempre sejam corretamente diagnosticadas e relatadas em literatura científica. Desta forma, a determinação da ocorrência deste tipo de enfermidade torna-se difícil e, muitas vezes, subestimada.

Mesmo não sendo precisamente divulgados, inúmeros estudos mostram que os principais fatores responsáveis pelos casos ou surtos de toxinfecção alimentar estão no manuseio incorreto dos alimentos desde a sua obtenção até a sua estocagem, incluindo a falta de higiene na sua obtenção ou no seu processamento e o tratamento térmico insuficiente ou incorreto, quando for o caso.

Alguns microrganismos destacam-se quando o assunto é toxinfecção alimentar, como é o caso da *Salmonella* spp, da *Escherichia coli*, do *Staphylococcus aureus*, do *Clostridium perfringens*, do *Clostridium botulinum* e do *Bacillus cereus*.

O *Bacillus cereus* pode produzir diferentes toxinas responsáveis por casos de toxinfecção alimentar. Além de causar riscos à saúde pública, é responsável por grandes prejuízos econômicos, uma vez que constitui-se em um ativo deteriorante do leite e de seus derivados.

Acredita-se que realização deste trabalho possa permitir o conhecimento da qualidade microbiológica de um dos alimentos mais importantes para humanos, além de apontar possíveis riscos à saúde pública pela presença de microrganismos potencialmente enterotoxigênicos.

2 Objetivos

Tendo em vista o apresentado, idealizou-se o presente trabalho, cujos objetivos foram:

- Verificar a presença de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* em leite apresentado sob diferentes formas, como leite cru, leite em pó, leite pasteurizado e leite UAT (longa vida);
- Verificar a capacidade de produção de enterotoxinas pelos microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* possivelmente encontrados nas amostras de leite analisadas e, conseqüentemente, o risco do alimento provocar casos de toxinfecção alimentar;
- Comparar as técnicas “in vivo” com a técnica “in vitro” quanto à capacidade de detectar as enterotoxinas produzidas pelas possíveis cepas isoladas;
- Verificar a concordância, o índice *kappa*, a sensibilidade e a especificidade entre cada uma das técnicas “in vivo” e a técnica “in vitro” e entre as duas técnicas “in vivo” utilizadas para a detecção da produção de enterotoxinas pelo *Bacillus cereus*.

3 Revisão de Literatura

3.1 Caracterização do gênero *Bacillus*

O *Bacillus cereus* pertence ao gênero *Bacillus* e à família *Bacillaceae*, que compreende, na sua maioria, microrganismos na forma de bacilos. De acordo com Buchanan e Gibbons (1974), os microrganismos que se apresentam na forma de bacilos Gram positivos e que possuem a característica de formar esporos podem pertencer a quatro diferentes gêneros: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*. Os membros do gênero *Bacillus* são aeróbios ou facultativos, característica que permite diferenciá-los dos membros dos gêneros *Clostridium* e *Desulfotomaculum*, obrigatoriamente anaeróbios. Além desta característica, os microrganismos do gênero *Bacillus* são, geralmente, produtores de catalase, diferentemente dos microrganismos do gênero *Sporolactobacillus*.

O gênero *Bacillus* é formado por espécies Gram positivas ou negativas, que medem aproximadamente 1,2 a 7,0 μm . São móveis na sua maioria, com flagelação peritríquia (BROCK et al., 1984). O seu metabolismo pode ser respiratório, fermentativo, ou ambos, com a maioria das espécies produzindo catalase (DROMIGNY et al., 1994). Os membros termofílicos e psicofílicos do gênero podem se desenvolver, respectivamente, a temperaturas elevadas, como 75°C, ou baixas, como -5°C; também podem desenvolver-se em acidez e alcalinidade extremas, variando de pH 2 a 10. Portanto, as espécies de *Bacillus* podem ser isoladas a partir de diversos ambientes, sendo que algumas formam parte da microbiota intestinal de humanos e de outros animais (KONEMAM et al., 2001).

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* são divididas em dois grupos morfológicos. O *Bacillus cereus* pertence ao grupo I, que engloba, entre outras, as espécies *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. magaterium*, *B. pumilis*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. brevis* e *B. sphaericus*. O *Bacillus cereus*, juntamente com o *B. anthracis*, *B.*

mycoides e *B. thuringiensis*, formam o "grupo do *Bacillus cereus*" ou "*Bacillus cereus* e espécies correlatas" (VARNAM e EVANS, 1991).

O grupo II apresenta vinte e seis espécies, assim agrupadas pela necessidade de mais estudos para uma melhor classificação. Essas espécies são: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus medusa*, *Bacillus maroccanus*, *Bacillus pacificus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus epiphytus*, *Bacillus apiarius*, *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus macquariensis*, *Bacillus laevolacticus*, *Bacillus racemilacticus*, *Bacillus filicolonicus*, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Bacillus pulvifaciens*, *Bacillus cirroflagellosus*, *Bacillus freudenreichii*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus badius*, *Bacillus aneurinolyticus*, *Bacillus macroides*, *Bacillus aminovorans*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus psychrophilus*, e *Bacillus acidocaldarius* (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

Algumas características fisiológicas das espécies do grupo do *Bacillus cereus* podem ser usadas para diferenciá-las das demais espécies pertencentes ao grupo I. Dentre estas diferenças, podem ser citadas a prova da lecitinase, geralmente positiva para as espécies do grupo do *Bacillus cereus* e negativa para as demais, e a formação de ácido a partir do D-manitol, negativa para as espécies do grupo do *Bacillus cereus* e geralmente positiva para as demais. O desenvolvimento na presença de lisozima e a produção de ácido a partir da glicose em anaerobiose são características do grupo do *Bacillus cereus* e normalmente não ocorrem nas outras espécies do grupo I (STADHOUDERS, 1992a).

A partir de estudos de hibridização do DNA, observou-se que há uma grande similaridade cromossomal entre as espécies do grupo do *Bacillus cereus*. Depois de realizarem seu trabalho, Ash et al. (1991) concluíram que as espécies do grupo do *Bacillus cereus*, embora genotipicamente diferentes, formam um grupo com características fenotípicas muito semelhantes e de difícil diferenciação. Os autores sugerem que *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* poderiam ser considerados subespécies do *Bacillus cereus*. Ahmed et al. (1995) relatam a alta semelhança entre *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*.

De acordo com Stadhouders (1992a), devido à alta homologia do DNA, as diferentes espécies do grupo do *Bacillus cereus* poderiam ser classificadas como uma única espécie. Fenotipicamente é bastante difícil distinguir as espécies do grupo do *Bacillus cereus* entre si (DROBNIEWSKI, 1993). Harmon et al. (1992) citam as principais características que poderiam ser utilizadas na diferenciação das espécies. Essas características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Principais características utilizadas na diferenciação das espécies do grupo do *Bacillus cereus*, segundo Harmon et al. (1992).

Característica	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>
Coloração Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Lecitinase	±	±	±	(+)
Motilidade	±	-	±	-
Ácido a partir do manitol	-	-	-	-
Hemólise (carneiro)	+	+	+	-
Crescimento rizóide	-	+	-	-
Produção de cristais tóxicos	-	-	+	-
Utilização anaeróbia da glicose	+	+	+	+
Redução do nitrato	±	+	+	+
Reação do VP	+	+	+	+
Decomposição da tirosina	+	+	+	(+)
Resistência à lisozima	+	+	+	+

Legenda: + positivo; ± geralmente positivo; (+) fracamente positivo; - negativo.

Stadhouders (1992a) acrescenta que o *Bacillus thuringiensis* difere do *Bacillus cereus* pela sua patogenicidade para larvas de *Lepidoptera* e pela produção de cristais tóxicos dentro da célula durante a formação do esporo. No entanto, quando ele não produz cristais, não poderá ser diferenciado do *Bacillus cereus*. Estudos baseados na região variável V1 do RNA (porção 16S) também podem ser utilizados para diferenciar as duas espécies em questão (te GIFFEL et al., 1997).

Helgason et al. (2000) relatam que *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis* demonstram diferenças quanto a sua patogenicidade. O

Bacillus anthracis causa uma doença aguda fatal e é considerado uma arma biológica devido a sua alta toxicidade. O *Bacillus thuringiensis* produz, na sua maioria, cristais intracelulares em várias larvas de insetos e é comumente utilizado no controle biológico contra tais espécies. Por sua vez, o *Bacillus cereus* é ubíquo, causador de toxinfecções de origem alimentar e infecções secundárias em indivíduos debilitados. Em contraste a essas diferenças, estudos cromossômicos, através de eletroforese, demonstram que tais espécies deveriam ser consideradas apenas uma, já que apresentam material genético praticamente idêntico.

O *Bacillus cereus* é geralmente móvel e fortemente hemolítico, mas não produz crescimento rizóide, característica que pode ser usada para diferenciá-lo do *Bacillus mycoides*. O *Bacillus anthracis* não é nem móvel e nem hemolítico na sua maioria, mas algumas cepas de *Bacillus cereus* não móveis, assim como de *Bacillus anthracis* hemolíticas, podem dificultar a diferenciação entre estas duas espécies (DROBNIEWSKI, 1993). Granum (1997) cita que as espécies do gênero *Bacillus* esporulam facilmente após dois ou três dias na maioria dos meios de desenvolvimento, mas o *Bacillus cereus* e o *Bacillus thuringiensis* perdem sua motilidade durante os estágios iniciais da esporulação.

Assim, a diferenciação entre as espécies do grupo do *Bacillus cereus* por provas bioquímicas laboratoriais pode levar a erros; por isso, as quatro espécies em questão são agrupadas e formam o grupo do *Bacillus cereus*.

3.2 Caracterização do *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* apresenta-se sob a forma de bastonete Gram-positivo, medindo entre 1,0 e 1,2 μm de largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento. Seu esporo é elipsoidal ou cilíndrico e centro-terminal (VARNAM e EVANS, 1991). Sua temperatura ótima de desenvolvimento está entre 30 e 37°C, sendo o tempo de geração, nesta faixa, de 18 a 27 minutos (DROMIGNY et al., 1994). Drobniowski (1993) relata que cepas psicrófilas e termófilas podem se desenvolver em temperaturas tão baixas quanto 3°C ou tão altas quanto 75°C, respectivamente. A

7°C o tempo de geração de algumas cepas de *Bacillus cereus* chega a ser de até oito a 10 horas (DUFRENNE et al., 1994; LANGEVELD e CUPERUS, 1993),

Por ser ubíquo na natureza, tendo o solo como habitat natural, o *Bacillus cereus* é freqüentemente encontrado em produtos como grãos, legumes, temperos e alimentos ricos em amido, podendo determinar toxinfecções de origem alimentar se esses produtos forem usados como ingredientes de outros alimentos, principalmente se o alimento for submetido a um tratamento térmico brando (RUSUL e YAACOB, 1995) ou recontaminado após o seu processamento.

Além de ser ubíquo, o *Bacillus cereus* é um microrganismo que tem a capacidade de formar esporos. Esses esporos sobrevivem a altas temperaturas e por longos períodos em alimentos desidratados (SALLAM et al., 1991), sendo, por isso, freqüentemente encontrados em leite e derivados, carne e derivados, produtos em pó, arroz, óleos, condimentos, macarrão, farináceos e alimentos infantis (ARISPE e WESTHOFF, 1984; ASHENAFI, 1990; CHOPRA et al., 1980; CRIELLY et al., 1994; DOYLE, 1988; GILL et al., 1994; GRIFFITHS, 1993; LAICINI et al., 1993; LEE et al., 1995; LITTLE e KNOCHEL, 1994; McKNIGHT et al., 1990; PETERZ et al., 1985; SALJI et al., 1983; SALLAM et al., 1991; WONG et al., 1988).

A contaminação de leite e derivados pelo *Bacillus cereus* é proveniente principalmente das cepas originárias do solo, que se aderem à superfícies dos tetos das vacas leiteiras e chegam até o leite cru. Devido à esporulação, o *Bacillus cereus* sobrevive à pasteurização e, após germinação, as células estão livres da competição com outras células vegetativas (ANDERSSON et al., 1995).

3.3 Ocorrência em leite e derivados

Os produtos lácteos estão entre os alimentos mais freqüentemente contaminados com o *Bacillus cereus*. Mijacevic e Samardzija (1996) relatam que o tratamento térmico do leite destrói de 99,78% a 99,99% dos microrganismos ali presentes. No entanto, o estudo demonstrou que alguns esporos mesofílicos do

Bacillus cereus não são destruídos pelo tratamento UAT (temperatura ultra-alta – 135 a 150°C por dois a quatro segundos).

Em amostras de leite e derivados produzidos na Índia, Kamat et al. (1989) encontraram altos índices de contaminação por *Bacillus cereus*. Cerca de 94% das amostras estavam contaminadas, sendo que os níveis de contaminação estavam em torno de $2,0 \times 10^5$ UFC/g ou mL.

Te Giffel et al. (1996) analisaram 334 amostras de leite pasteurizado estocadas em refrigeradores domésticos para verificar a presença de *Bacillus cereus*. Os autores encontraram o referido microrganismo em 133 (40%) amostras.

Abdel e El-Sherbini (1996) analisaram 150 amostras colhidas em indústrias lácteas (leite cru) e em supermercados (leite pasteurizado) do Egito e encontraram o *Bacillus cereus* em 60 (40%) e 45 (30%) amostras de leite cru e pasteurizado, respectivamente.

Rangasamy et al. (1993) analisaram amostras de leite e derivados, incluindo amostras de leite UAT. Do total, 26,4% foram positivas para a presença de *Bacillus cereus*, embora apresentassem pequena população microbiana (<10 a $9,6 \times 10^2$ UFC por mililitro ou grama). No entanto, os autores salientaram a característica do microrganismo de se multiplicar em baixas temperaturas, e, dessa forma, uma pequena população microbiana poderia gerar uma população suficientemente elevada para desencadear surtos e casos de toxinfecção alimentar. Dos produtos analisados, 25% das amostras de leite cru (<10 UFC/mililitro), 33% das amostras de leite pasteurizado (<10 -28UFC/mililitro), 20% das amostras de iogurte ($6,0 \times 10^1$ - $4,3 \times 10^2$ UFC/mililitro), 40% das amostras de queijo Cheddar ($3,0 \times 10^1$ - $1,0 \times 10^2$ UFC/grama), 30% das amostras de leite em pó ($3,0 \times 10^1$ - $9,6 \times 10^2$ UFC/grama) e 40% das amostras de sorvete ($3,0 \times 10^1$ - $1,6 \times 10^2$ UFC/grama) apresentaram-se contaminadas com o *Bacillus cereus*.

Schocken-Iturrino et al. (1996) analisaram amostras de leite UAT e encontraram aproximadamente 25% delas contaminadas com *Bacillus* spp. Os autores não classificaram as espécies das cepas encontradas.

Ao analisarem 120 amostras de leite UAT, Rezende et al. (2000) encontraram 41 (34,17%) amostras positivas para a presença de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus*.

Existem controvérsias sobre o momento da contaminação do leite por *Bacillus cereus*. Alguns autores acreditam que a contaminação ocorra após o processamento térmico, enquanto outros acreditam na sobrevivência do microrganismo durante o processamento, principalmente em leite cru altamente contaminado. Ahmed et al. (1983) analisaram amostras de leite cru e pasteurizado e verificaram que a taxa de contaminação foi, respectivamente, de 9% e 35%. Com o aumento da taxa de contaminação de 9% nas amostras de leite cru para 35% nas de leite pasteurizado, os autores acreditam em contaminação pós tratamento térmico. Por outro lado, Crielly et al. (1994) analisaram inúmeras amostras de leite durante os vários estágios de processamento. Os autores verificaram que o leite cru apresentava altas contagens de *Bacillus cereus* e atribuíram a presença deste microrganismo no leite pasteurizado como consequência da sua sobrevivência durante o processamento térmico.

Um estudo realizado por Christiansson et al. (1999) reforça a teoria da sobrevivência do microrganismo ao tratamento térmico. Os autores, após estudarem o DNA de *Bacillus cereus* isolados do úbere de vacas leiteiras e do leite originário dessas vacas após o tratamento térmico, verificaram a alta semelhança dos microrganismos encontrados no úbere e no leite. Os autores salientam que, sendo assim, a concentração de esporos presente no leite está diretamente relacionada com a contaminação dos úberes das vacas leiteiras.

Rusul e Yaakob (1995) estudaram as cepas toxigênicas do *Bacillus cereus* isoladas de diferentes tipos de alimentos e verificaram que a maioria delas se desenvolveu numa faixa de temperatura entre 5°C e 7°C. Griffiths (1989) analisou amostras de leite cru e encontrou cepas psicrófilas de *Bacillus cereus* em cerca de 60% das amostras analisadas. O autor testou também a capacidade de sobrevivência destas cepas à pasteurização e verificou que 70% das amostras de leite pasteurizado analisadas, após permanecerem estocadas a 6°C,

apresentaram-se contaminadas com *Bacillus cereus*. Ao testar a enterotoxigenicidade dessas cepas, o autor verificou que 85% delas puderam produzir enterotoxinas.

Inúmeros estudos determinaram a enterotoxigenicidade de cepas de *Bacillus cereus* quando isoladas de leite e derivados. Das 85 cepas de *Bacillus cereus* isoladas de produtos lácteos na Noruega, 59% foram produtoras de enterotoxinas (GRANUM et al., 1993a). Duffrene et al. (1994) testaram várias cepas de *Bacillus cereus* que apresentavam a característica de desenvolver a 7°C e que foram isoladas de diversos tipos de alimentos, inclusive de leite. Os autores verificaram que todas eram produtoras de enterotoxinas. Sutherland (1993) também verificou a virulência de cepas de *Bacillus cereus* cultivadas em cremes e outros produtos lácteos, encontrando aproximadamente 67% das cepas testadas produtoras de enterotoxinas quando cultivadas a 21°C. A técnica utilizadas para a verificação da produção de enterotoxinas foi a aglutinação passiva em látex. Diferentemente dos trabalhos descritos, Rezende et al. (2000) testaram 44 cepas de *Bacillus cereus* isoladas de leite UAT para a produção de enterotoxinas pelo método em alça ligada de coelho, não encontrando nenhuma cepa enterotoxigênica.

Foegeding e Berry (1997) estudaram 27 cepas de *Bacillus cereus* isoladas de alimentos e de casos clínicos de toxinfecção e verificaram que os microrganismos apresentaram uma adaptação ao frio, podendo se desenvolver à temperatura de 7°C. A presença de alta população de cepas psicrófilas enterotoxigênicas implica num sério risco de segurança dos alimentos estocados em temperatura de refrigeração. Além disso, Griffiths (1993) estima que 25% dos problemas de vida útil do leite estejam associados com a proliferação de *Bacillus* spp.

3.4 *Bacillus cereus* como agente causador de infecções secundárias

Os membros do gênero *Bacillus* podem atuar ainda como microrganismos oportunistas, principalmente em indivíduos que apresentam-se imunologicamente

debilitados. São descritos casos de mastite (JONES e TURNBULL, 1981), infecções oculares, infecções respiratórias, infecções do sistema nervoso central, bacteremia, septicemia, endocardite, osteomielite e salpingite (LOGAN, 1988), todos provocados por *Bacillus cereus*. Jevon et al. (1993) citam que este microrganismo está associado a vários tipos de infecções em ambientes hospitalares.

De acordo com Beecher et al. (1995b), o *Bacillus cereus* é uma das mais comuns causas de endoftalmites bacterianas pós-traumáticas e metastáticas em humanos. Tal patologia é produzida por uma exotoxina, mas a hemolisina BL também pode provocar a lesão, principalmente se associada à exotoxina.

Musa et al. (1999) relatam três casos de septicemia fulminante devido à infecção por *Bacillus cereus*. Os três pacientes apresentavam leucemia aguda, com neutropenia devido à quimioterapia. Inicialmente, os indivíduos apresentaram uma ligeira febre, de curta duração, acompanhada por hiperatividade do sistema nervoso simpático. Logo após, apresentaram febre alta (40-41°C) com distúrbios do sistema nervoso, fato que culminou em coma e morte.

Um outro caso de morte devido a uma infecção por *Bacillus cereus* em paciente com câncer é relatado por Carreto et al. (2000). O paciente sofria de câncer pulmonar e foi internado com bacteremia persistente e falência múltipla de órgãos provocada pelo *Bacillus cereus*. Os autores citam que, mesmo tratando o paciente com um antibiótico efetivo “in vitro” (vancomicina), não houve melhora clínica, o que culminou com a morte do paciente. Estudos posteriores demonstraram que a mesma cepa havia provocado uma bacteremia em um outro paciente internado na mesma sala de UTI (unidade de terapia intensiva), enfatizando a capacidade do *Bacillus cereus* em provocar infecções hospitalares.

3.5 Fatores de virulência

O *Bacillus cereus* pode produzir diferentes tipos de toxinas, divididas em quatro grupos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e toxina

emética (GRANUM, 1994). Dromigny et al. (1994) afirmam que as perturbações digestivas são causadas pelas toxinas diarréica e emética.

Embora a maioria dos autores relatem que para ocorrer toxinfecção alimentar seja necessária a ingestão de um grande número de células viáveis de *Bacillus cereus* (no mínimo 10^5 UFC por mililitro ou grama, segundo CHIRSTIANSSON, 1992), Becker et al. (1994) descrevem casos de toxinfecção alimentar ocorridos na Irlanda do Norte causados pela ingestão de alimentos contendo baixas quantidades do referido microrganismo. Os autores ainda descrevem que cerca de 18% de todas as toxinfecções alimentares causadas por microrganismos devidamente identificados, no período de 1985 a 1989, foram causadas por *Bacillus cereus*.

Um estudo realizado por Beecher e Macmillan (1990), com uso de técnicas imunológicas, detectou que a hemolisina produzida pelo *Bacillus cereus* possui pelo menos dois componentes (“binding” e “lysis”, B e L, respectivamente). Os autores classificaram esses componentes quanto a sua capacidade de causar hemólise e verificaram que o componente B era necessário para ligar a toxina à hemácia, enquanto o componente L era imprescindível para causar a lise dessa hemácia. Tais componentes não foram hemolíticos quando testados individualmente, apresentando tal característica apenas quando em conjunto. Este estudo sugeriu ainda que a enterotoxina e a hemolisina são a mesma toxina, já que anticorpos monoclonais reativos contra a hemolisina BL foram produzidos pelo uso de preparações parcialmente purificadas de enterotoxinas. O mesmo estudo levou à conclusão que a hemolisina e a cereolisina são toxinas diferentes.

Posteriormente, Beecher e Macmillan (1991) concluíram que tal hemolisina era composta por três unidades (provavelmente três diferentes proteínas) que podiam ser separadas em três diferentes frações (B, L₁ e L₂) e que a combinação desses três elementos era necessária para a produção de edema com manchas azuladas no teste de permeabilidade vascular em pele de coelho. Os autores não afirmam com certeza se as frações L₁ e L₂ são duas proteínas diferentes ou se a fração L₁ é um produto de degradação da fração L₂, embora os estudos de ação

sinérgica em diferentes ensaios biológicos os tenha levado a acreditar que as três frações sejam, realmente, três diferentes proteínas.

Para testar tais frações, os autores inicialmente separaram-nas, recombinando-as ou não (B, L₁, L₂, B+L₁, B+L₂, L₁+L₂, B+L₁+L₂) antes de submetê-las ao teste de aumento de permeabilidade vascular. Não houve reações positivas, ou seja, manchas azuladas com edemaciação, para as frações separadas (B, L₁, L₂) e para as combinações B+L₂ e L₁+L₂. A combinação B+L₁ produziu um pequeno edema, mas sem a formação da área azulada ao seu redor. Somente a combinação das três frações (B+L₁+L₂) produziu uma reação tipicamente positiva, evidenciada por edemaciação associada a halo azulado ao redor do ponto de inoculação da substância testada. No entanto, não houve necrose no centro das lesões. Os autores ainda ressaltam que é necessário demonstrar se a hemolisina BL provoca acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho, demonstrando, assim, se tratar de uma enterotoxina. De acordo com Beecher e Wong (1994) e Tsen et al. (2000), a hemolisina BL é o maior fator de virulência do *Bacillus cereus*.

Pruss et al. (1999) afirmam que a hemolisina BL (HBL) é produzida por todas as espécies do grupo do *Bacillus cereus*, com exceção do *Bacillus anthracis*. Os autores investigaram a presença do gene relacionado à produção da HBL em várias cepas e, posteriormente, testaram tais cepas para a produção da HBL, através do uso de anticorpos monoclonais contra os componentes L₁, L₂ e B. O gene produtor de tal hemolisina foi detectado pelo uso do PCR e foi encontrado nas oito cepas de *Bacillus thuringiensis* testadas. Destas, sete produziram a HBL. Onze das 16 cepas de *Bacillus mycoides* e 10 das 23 cepas de *Bacillus cereus* testadas também apresentavam o gene produtor da HBL, sendo que a maioria se mostrou produtora da enterotoxina quando testada pelas técnicas imunológicas.

Hsieh et al. (1999) realizaram um trabalho semelhante, pesquisando o gene produtor da hemolisina BL nos microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* e a capacidade dessas cepas em produzir enterotoxina, através das técnicas de

hemólise e citotoxicidade. Os autores também afirmam que *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* e *Bacillus thuringiensis* são potencialmente enterotoxigênicos.

O trabalho realizado por Fermanian e Wong (2000) reforça os achados por Pruss et al. (1999) e Hsieh et al. (1999). Os autores testaram 114 cepas de *Bacillus cereus*, duas de *Bacillus thuringiensis* e nove de *Bacillus mycoides* para a produção da HBL por duas diferentes técnicas: difusão em gel de ágar sangue e exame direto após o crescimento da colônia em ágar nutriente sangue e em ágar BHI (infusão de cérebro com coração) sangue. Pela prova de difusão em gel de ágar, 74-78% das cepas se mostraram produtoras da HBL. Pelo resultado em conjunto das técnicas de crescimento em placas de ágar, 73-74% das cepas produziram a hemolisina. Os autores concluem que as três espécies não podem ser diferenciadas com base na produção da hemolisina BL.

Estudos mais recentes descrevem o isolamento de componentes homólogos às frações L₁, L₂ e B, designados L_{1a}, L_{2a} e B_a (Beecher e Wong, 2000). Na verdade, não houve diferenças notáveis entre as atividades produzidas pelos homólogos L. No entanto, os componentes B e B_a são significativamente diferentes. Quando o componente B_a foi substituído pelo B através de técnicas de difusão em gel de ágar, o padrão típico de hemólise produzido pelo complexo HBL não ocorreu. Os autores concluem que há a possibilidade de existência de outras toxinas correlacionadas à HBL no diversificado grupo do *Bacillus cereus*.

A hemolisina BL tem sido extensivamente caracterizada e exibe uma variedade de atividades biológicas, como reação dermonecrótica e acúmulo de fluido em intestino de coelhos, citotoxicidade em células de ovário de hamster e em células de retina. De acordo com Beecher et al. (1995a), o teste em alça ligada de coelho é difícil e apresenta resultados variáveis. Um curto período de incubação é necessário porque a toxina atua muito rapidamente, podendo levar o animal a óbito se a incubação for longa. Por outro lado, o curto período limita o máximo de fluido acumulado e ainda pode levar a resultados falso-positivos, pois limita a absorção do fluido teste inoculado. Seguindo a metodologia proposta por Bergdoll (1988), a razão entre volume de fluido acumulado (em mililitros) e comprimento de

alça intestinal (em centímetros), se $\geq 0,5$ em pelo menos 50% dos animais testados, caracteriza um teste positivo. Os autores citaram um índice de descarte de 25% devido a resultados falso-positivos (valor $\geq 0,5$ para controles-negativos).

O trabalho realizado por Buchanan e Schultz (1994) teve como objetivo avaliar a eficácia da prova de ELISA (ensaio imunossorbente ligado à enzima) e compará-la com a prova de aglutinação passiva em látex e com a cultura em células de ovário de hamster chinês (CHO) para a detecção de enterotoxinas produzidas por *Bacillus cereus*. Os autores testaram 12 cepas, sendo uma de *Bacillus thuringiensis* produtora de enterotoxina, uma de *Bacillus cereus* produtora de toxina emética e 10 de *Bacillus cereus* produtoras de enterotoxinas. Os três métodos detectaram igualmente oito cepas enterotoxigênicas. A cepa produtora de toxina emética foi negativa nas três técnicas. Uma cepa foi fracamente positiva pela técnica de ELISA, mas fortemente positiva nos demais. Os controles positivos das técnicas de ELISA e de aglutinação passiva em látex foram testados para a detecção de reação cruzada. Ficou demonstrado que as duas técnicas diferem no tipo de antígeno pesquisado, já que houve falta de reação cruzada entre os seus controles positivos. No entanto, mesmo havendo diferenças no antígeno pesquisado, existe uma alta correlação entre a prova de aglutinação passiva em látex e o cultivo em CHO (FERMANIAN et al. 1997).

Ombui et al. (1997) testaram a produção de enterotoxinas por *Bacillus cereus* por diferentes métodos (aglutinação passiva em látex e presença do gene enterotoxigênico do *Bacillus cereus* - BCET - por reação de polimerase em cadeia) e concluíram que duas ou mais enterotoxinas podem ser produzidas pelo *Bacillus cereus*. De acordo com Granum e Lund (1997), o *Bacillus cereus* produz três tipos de enterotoxinas. Duas delas estão envolvidas em casos de toxinfecção alimentar e são formadas por diferentes proteínas que atuam em conjunto. Uma dessas duas enterotoxinas é uma hemolisina. A terceira enterotoxina é uma única proteína e não parece estar envolvida em toxinfecção alimentar.

Em seu trabalho, Sutherland e Limond (1993) verificaram que os níveis de glicose e de amido influenciam a produção de toxinas por cepas de *Bacillus cereus*. Os autores concluíram também que o pH do meio influencia de maneira direta a produção de toxinas. Os achados ajudam a explicar a variação dos níveis de toxinas encontrados em diferentes produtos lácteos.

A toxina diarréica é considerada termolábil, principalmente quando comparada à toxina emética, que é termoestável (DROMIGNY et al., 1994). Mesmo assim, Baker e Griffiths (1995) citam que após a pasteurização a 72°C por 16 segundos, a enterotoxina ainda apresenta 90% de sua atividade. Quantidade significativas da enterotoxina foram obtidas mesmo após a pasteurização do leite a 85°C por 15 a 18 segundos.

As enterotoxinas estimulam o sistema adenilciclase-AMPCíclico nas células intestinais e induzem ao acúmulo de líquido no intestino. De acordo com Christiansson (1992), são letais quando injetadas por via endovenosa em ratos de laboratório. O mesmo autor cita que as condições ótimas para a síntese de enterotoxinas incluem a adição de glicose ao meio de cultura (preferencialmente o caldo de infusão de cérebro e coração) na concentração de 0,1% e agitação moderada (400 rpm) para a contínua adição de pequenas quantidades de ar, já que a espuma pode inativar a toxina pré-formada (GLATZ e GOEPFERT, 1976). Além desses procedimentos, pH constante ao redor de 8,0 e temperatura em torno de 32°C são recomendados (SPIRA e SILVERMAN, 1979). Quanto ao teor de oxigênio, Granum et al. (1993b) concluíram, em seu estudo, que as cepas de *Bacillus cereus* podem produzir enterotoxinas tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose, sendo que a quantidade de enterotoxinas em anaerobiose foi ligeiramente menor do que aquela produzida em aerobiose.

Estudos em modelos experimentais revelaram que a enterotoxina é degradada no trato gastrintestinal antes de atingir o íleo (GRANUM, 1994; TAN et al., 1997). Assim, Fehlhaber e Janetesche (1995) citam que a ocorrência da síndrome diarréica é resultado da ingestão de cepas de *Bacillus cereus* que, no intestino, produzem enterotoxinas. Por outro lado, Beecher et al. (1995a)

descrevem que não existem evidências suficientes para se concluir se a síndrome diarreica é causada pela ingestão da toxina pré-formada no alimento ou se a toxina é produzida no intestino. O período de incubação desta síndrome geralmente varia de seis a 15 horas, sendo de 12 horas, em média. Granum (1997) reforça a teoria da infecção com posterior produção de enterotoxinas, já que considera um período de incubação relativamente longo para que a toxina já fosse pré-formada e ingerida com o alimento responsável pela toxinfecção.

3.6 Surtos e casos de toxinfecção envolvendo o *Bacillus cereus*

Os primeiros casos de toxinfecção causados pelo *Bacillus cereus* enterotoxigênico foram descritos por Hauge (1955) e ocorreram entre os anos de 1947 e 1949, em três hospitais e uma casa para idosos. Em todos eles, aproximadamente 600 pessoas foram intoxicadas. O que ocorreu num hospital em Oslo, em 1948, teve como origem um creme de vanila contaminado com *Bacillus cereus*.

Para provar a capacidade do *Bacillus cereus* em produzir toxinas, Hauge (1955) inoculou esta bactéria em creme de vanila estéril, deixou por 24 horas em temperatura ambiente e após o período consumiu 200 ml do creme. Os sintomas característicos iniciaram-se após 13 horas do consumo do creme contaminado.

Midura et al. (1970) descrevem um surto de toxinfecção alimentar que envolveu 15 pessoas de um mesmo grupo, formado por 31 indivíduos. O grupo se subdividiu em dois subgrupos para o jantar. O primeiro subgrupo, formado por 13 indivíduos, lanchou às 17:30 horas. Quatro pessoas deste primeiro subgrupo (30,8%) ficaram doentes algumas horas depois de terem lanchado. O segundo subgrupo, que lanchou às 19:30 horas, era formado pelos 18 indivíduos restantes. Deste grupo, 11 pessoas ficaram doentes (61,1%). O alimento considerado causador do surto era à base de carne vermelha, e provavelmente a má-conservação causou o aumento do número de casos para o segundo grupo de indivíduos.

O primeiro caso relatado de toxinfecção por uma cepa emética de *Bacillus cereus* ocorreu na Inglaterra, em 1971 (PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, 1972). Logo em seguida, outros dois surtos ocorreram. Nas três situações, os indivíduos acometidos tinham se alimentado em restaurantes. Durante a investigação epidemiológica do terceiro surto, foi verificado que o arroz utilizado nas refeições tinha um grande número de esporos de bacilos Gram positivos ($3,5 \times 10^8$ UFC/g), posteriormente confirmados como *Bacillus cereus*.

Um levantamento feito por Delazari et al. (1978) mostra vários surtos em diferentes países entre 1960 e 1980. Na Hungria, entre 1960 e 1968, do total de surtos envolvendo *Bacillus cereus*, 53,8% tiveram produtos cárneos como veículo, 10,6% vegetais, 9,6% leite e cacau e 17,7% outros alimentos (GOEPFERT et al., 1972). Dados cumulativos levantados por Todd (1978) revelaram que, em 1973, *Bacillus* spp. foi responsável por 4,0%, 2,7% e 1,6% dos surtos de toxinfecções de origem alimentar ocorridos no Canadá, Inglaterra/País de Gales e EUA, respectivamente. Correspondentemente, 99,4%, 52,7% e 68,8% dos surtos de toxinfecções tiveram origem microbiológica. Em outro estudo realizado, Todd (1976) encontrou que, de 3347 casos de toxinfecções alimentares ocorridos no Canadá, 1516 (45,29%) tiveram origem microbiológica. Os diferentes tipos de carnes e derivados foram a principal causa dos surtos, compreendendo 68,10% do total de casos.

Giannella e Brasile (1979) descrevem um surto ocorrido em um hospital em Lexington, Kentucky, que envolveu 28 pacientes. A investigação epidemiológica concluiu que houve uma intoxicação alimentar causada por um tipo de alimento a base de carne de peru, característico da região, contaminado com *Bacillus cereus*.

Holmes et al. (1981) relataram casos de toxinfecções de origem alimentar causados por leite em pó contaminado com *Bacillus cereus*. O leite foi utilizado na fabricação de queijo e macarrão. De 13 pessoas que se alimentaram com esses produtos, oito ficaram doentes (61,5%).

Salzberg et al. (1982) estudaram o possível agente causador de um surto envolvendo dois restaurantes de uma mesma instituição, em Campinas (SP), e verificaram que a carne cozida condimentada ou a maionese de batata eram os alimentos envolvidos com a toxinfecção alimentar. Não foi possível usar os alimentos para identificar o agente, mas eles concluíram, através de inquérito epidemiológico, que o causador era o *Clostridium perfringens* ou o *Bacillus cereus*. Segundo os autores, se a maionese foi a causa da toxinfecção, o provável agente seria o *Bacillus cereus*, pois este alimento não reúne boas condições de anaerobiose para o crescimento do *Clostridium perfringens*, nem a batata é um bom meio para a multiplicação deste microrganismo. Por outro lado, se o alimento causador foi a carne, o provável agente seria o *Clostridium perfringens*, dada as boas condições que existem neste produto para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios.

Na Noruega foi descrito um caso de toxinfecção alimentar envolvendo duas pessoas. A possível causa foi um frango grelhado adquirido pronto em loja de alimentos. Amostras deste frango foram analisadas e continham aproximadamente 10^4 UFC de *Bacillus cereus* por grama. Com base nos sintomas clínicos e características microbiológicas, concluiu-se que a toxinfecção foi determinada pelo consumo do frango grelhado contaminado com *Bacillus cereus* (BOLSTAD, 1991).

Christiansson (1992) relata um surto ocorrido em 1972, na Romênia, envolvendo 221 crianças. A origem da doença foi leite contaminado com *Bacillus cereus*.

Um surto envolvendo várias pessoas é relatado por Luby et al. (1993). Após ingerirem um churrasco de carne suína que permaneceu por aproximadamente 18h fora de refrigeração, 139 pessoas, das 643 entrevistadas, relataram ter sofrido as conseqüências da intoxicação, como diarréia e, em 23% dos casos, também a presença de febre. A carne foi analisada e detectou-se a presença do *Bacillus cereus*.

Becker et al. (1994) descrevem que, na Irlanda do Norte, cerca de 18% de todas as toxinfecções alimentares causadas por microrganismos devidamente identificados, no período de 1985 a 1989, foram causadas por *Bacillus cereus*. Os autores constataram que, ao contrário do que ocorre na maioria dos surtos, esses casos, em particular, foram proporcionados por alimentos contendo baixas concentrações de *Bacillus cereus*. Um surto nos EUA envolvendo carne de peru contaminada deixou 28 pessoas intoxicadas com uma concentração de apenas $1,2 \times 10^3$ UFC por grama de alimento.

O *B. thuringiensis* também tem sido descrito como agente produtor de enterotoxina (DROBNIEWSKI, 1993) e causador de intoxicação alimentar (JACKSON et al., 1995). Tal fato pode gerar uma série de problemas, já que o microrganismo tem sido espalhado pela natureza para se fazer controle biológico de insetos em vários países. No entanto, Granum (1997) afirma que os casos de toxinfecção atribuídos ao *Bacillus thuringiensis* podem ter sido provocados pelo próprio *Bacillus cereus*, já que existe uma grande dificuldade de diferenciação entre as quatro espécies do grupo.

3.7 Isolamento e identificação do *Bacillus cereus*

Comercialmente é possível encontrar inúmeros meios de cultivo utilizados para o isolamento de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus*. A maioria dos procedimentos para seu isolamento e contagem envolvem técnicas de plaqueamento direto em ágar adicionado de agentes de caráter seletivo e diferencial, objetivando diminuir a competição com outros microrganismos possivelmente presentes nas amostras analisadas e facilitar a identificação pela formação de colônias sugestivas.

Os meios de cultivo mais comumente usados são: ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP), ágar Kim e Goepfert (KG), ágar sangue, ágar azul de bromotimol manitol piruvato gema de ovo polimixina B (PEMBA) e uma fórmula similar que substitui o azul de bromotimol pela púrpura de bromocresol (PEMPA). Muitas dessas fórmulas usam a polimixina como um agente inibidor de organismos

competidores. Vasconcellos e Rabinovitch (1995) sugerem um meio denominado VRM, sem o uso de antibióticos, para o isolamento do *Bacillus cereus*. De acordo com os autores, o meio VRM, quando comparado ao meio MYP, oferece duas vantagens: não ser necessário o uso de antibióticos e uma reduzida complexidade durante o preparo do meio no laboratório.

São vários os trabalhos que comparam os diferentes meios de cultivo quanto à frequência de isolamento do *Bacillus cereus*. Alguns autores verificaram diferenças significativas entre os meios, outros não. Harmon et al. (1984) concluíram que o MYP foi melhor que o PEMBA e o ágar sangue, já que as colônias de *Bacillus cereus* naquele meio são melhor diferenciadas das de outras espécies. Por outro lado, Peterz et al. (1985) não encontraram diferenças significativas de isolamento entre esses três diferentes meios de cultura. Rusul e Yaakob (1995), por sua vez, submeteram as cepas características de *Bacillus cereus* isoladas do meio PEMBA à confirmação bioquímica, caracterizando cerca de 63% das cepas isoladas como realmente pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus*. Os autores classificam tal meio como deficiente para o isolamento do *Bacillus cereus*. Ao comparar os meios PEMBA e KG, Rangasamy et al. (1993) não encontraram diferenças significativas ($p > 0,05$). Schulten et al. (2000) compararam os meios MYP e PEMBA, mas não encontraram diferenças significativas entre eles.

De acordo com Van Netten e Kramer (1992), a divergência entre os resultados encontrados nos diferentes meios pode ser atribuída ao método de preparo dos meios, à composição e à microbiota testada, ou à subjetividade na observação e interpretação dos resultados.

Tendo em vista a grande diversificação de resultados, a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) recomenda o MYP como meio de cultivo para o isolamento das espécies do grupo do *Bacillus cereus* (HARMON et al., 1984).

O uso do MYP seguido das provas bioquímicas para a identificação do *Bacillus cereus* tem a desvantagem de levar vários dias até que se confirme a espécie, devido a necessidade de realização de provas bioquímicas. No entanto,

CHEN et al. (2001) descrevem uma rápida maneira de se conseguir a identificação do *Bacillus cereus* através de detecção de um antígeno de superfície celular pela técnica de ELISA. Após se desenvolverem no MYP, as cepas oriundas de colônias características de *Bacillus cereus* são testadas por esta técnica. Das 38 cepas de *Bacillus cereus* e 127 cepas de outros *Bacillus* testadas, a sensibilidade e a especificidade do ELISA foram de 100 e 88,2%, respectivamente. As cepas que produziram resultados falso-positivos eram bactérias do grupo do *Bacillus cereus*, isto é, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus mycoides*. Quando os autores consideraram os quatro microrganismos do grupo como uma única espécie, a sensibilidade e a especificidade foram, respectivamente, de 100 e 99,1%. Os autores concluíram que o ELISA pode ser usado como um método rápido para a identificação presuntiva do *Bacillus cereus* desenvolvido no ágar MYP.

3.8 Detecção de enterotoxinas

No mercado existem inúmeros kits para a determinação da enterotoxigenicidade de cepas de *Bacillus cereus*. No entanto, o teste de acúmulo de líquidos em alça intestinal de coelho é uma prova laboratorial bastante utilizada para estudar a sua virulência. Outra técnica utilizada para a detecção da produção de enterotoxinas por *Bacillus cereus* é o teste de alteração de permeabilidade vascular. Esta baseia-se no fato de que a toxina, quando injetada intradermicamente em coelhos, altera a permeabilidade vascular local, auxiliando na determinação da virulência da cepa testada. De acordo com Christiansson (1992), a resposta obtida pelas duas técnicas tem alta correlação entre si.

3.9 Controle e destruição dos esporos

Os esporos do *Bacillus cereus* são resistentes a altas temperaturas. Para Setlow (1994), uma das razões para a sobrevivência dos esporos de *Bacillus cereus* por longos períodos é, sem dúvida, a sua dormência metabólica.

É difícil estipular um valor de binômio tempo e temperatura para a destruição dos esporos. O valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ (tempo necessário para reduzir a população em 90% ou um ciclo log) variou de 4,6 minutos (DUFRENNE et al., 1994) a 15 minutos (KAMAT et al., 1989) para os esporos testados. Fernandez et al. (1999) submeteram os esporos de duas diferentes cepas de *Bacillus cereus* a diferentes temperaturas e encontraram diferenças significativas quanto à termotolerância desses esporos. O valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ variou de 4,04 a 39 minutos para as duas diferentes cepas testadas. Os autores relatam ainda que as duas cepas puderam se desenvolver em temperatura de refrigeração. Uma das cepas foi capaz de se multiplicar a 5°C e a outra, a 10°C. A cepa que se desenvolveu a 5°C era mais termolábil do que a outra.

Dufrenne et al. (1994) também verificaram diferenças no valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ para os esporos de cepas psicotróficas de *Bacillus cereus*. Os autores encontraram, para esporos de cepas que se desenvolveram em temperatura menor ou igual a 7°C, valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ variando de 4,6 a 7,4 minutos, enquanto que para aquelas cuja temperatura de desenvolvimento estava ao redor de 9°C, tal valor variou de 4,6 a 14 minutos. Os autores sugerem que cepas psicotróficas sejam mais sensíveis ao calor.

A 95°C, os valores encontrados por Johnson et al. (1982) variaram de 1,2 a 20,2 minutos, enquanto Mazas et al. (1995) encontraram um intervalo bastante curto, de 3,58 a 5,76 minutos para diferentes cepas de *Bacillus cereus* testadas.

Com o aumento da temperatura empregada para 100°C, os valores encontrados variaram de 1,18 a 4,87 minutos para as diferentes cepas testadas (GONZALEZ et al., 1995; MAZAS et al., 1995). Quando Penna e Moraes (2002) submeteram esporos de *Bacillus cereus* inoculados em diferentes meios a temperaturas variando de 80 a 100°C, os valores D encontrados foram, respectivamente, 3,62, 1,99 e 1,34 minutos, para os esporos inoculados em arroz branco cozido, tampão fosfato e água de arroz.

A 121,1°C, Bradshaw et al. (1975) encontraram um intervalo de 0,03 a 2,35 minutos, dependendo da cepa testada. Todas as cepas estudadas pelos autores eram enterotoxigênicas.

Vários trabalhos mostram alterações que o meio de esporulação provoca no valor D. Gonzalez et al. (1995) verificaram que o valor $D_{100^{\circ}\text{C}}$ para uma mesma cepa variou de 2,86 (em ágar leite) a 4,87 minutos (em PCA). No entanto, para outra cepa, não houve diferença no valor D para os quatro diferentes meios de recuperação testados (ágar nutriente, ágar soja tripton, ágar padrão para contagem e ágar leite). O valor $D_{95^{\circ}\text{C}}$ para os esporos psicrótróficos isolados do leite aumentou de 25 segundos no leite desnatado para 36 segundos no creme (MEER et al., 1991). Em particular, os lipídeos mostram um efeito protetor sobre os esporos, já que são pobres condutores de calor.

A nisina tem sido relatada como potencial agente controlador do desenvolvimento de esporos de *Bacillus cereus* (BEARD et al., 1999; BEUCHAT et al., 1997; PENNA e MORAES, 2002). O valor $D_{97^{\circ}\text{C}}$ para leite sem nisina e leite complementado com 4000 UI de nisina por mililitro foi, respectivamente, de 7,0 e 4,7 minutos, demonstrando uma redução de 32% neste valor D. Quando o tempo de redução decimal foi testado a 103°C, os valores encontrados foram de 0,88 e 1,5 minutos para amostras de leite com e sem nisina, respectivamente. Neste caso, a nisina provocou uma redução de 42% no tempo de redução decimal

A taxa de destruição do *Bacillus cereus* pelo tratamento térmico inicial depende da temperatura aplicada. Os esporos de germinação rápida são mais termolábeis do que os de germinação lenta e podem ser parcialmente destruídos em altas temperaturas, enquanto os de germinação lenta serão ativados (BECKER et al., 1994). Assim, o método de preparo dos alimentos nem sempre assegura a inativação dos esporos do *Bacillus cereus* e o seu subsequente crescimento durante a armazenagem do produto (RUSUL e YAACOB, 1995), mesmo em temperatura de refrigeração.

4 Material e Métodos

Foram analisadas 120 amostras de leite, sendo 30 de leite cru, 30 de leite pasteurizado, 30 de leite em pó instantâneo e 30 de leite UAT integrais para a pesquisa da presença de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus*.

As amostras de leite cru foram adquiridas em um laticínio na cidade de Ribeirão Preto/SP, a partir do tanque de estocagem de leite cru, sendo colhidas assepticamente em frascos previamente esterilizados. Imediatamente antes da colheita, a torneira do tanque, de aço inox, era limpa com algodão embebido em etanol 70% e flambada em seguida. Logo após, deixava-se o leite fluir por alguns segundos e, com o frasco inclinado, próximo a uma chama, a amostra era então colhida. Em cada visita ao laticínio eram colhidas aproximadamente cinco amostras, num intervalo médio de 30 minutos entre cada colheita.

As amostras de leite pasteurizado foram adquiridas no mesmo laticínio, procurando-se estabelecer uma relação entre as amostras de leite cru e de leite pasteurizado. Para isso, aproximadamente a cada 30 minutos uma amostra de leite pasteurizado recém-embalado era colhida. Essa amostra era oriunda do mesmo tanque de onde foram obtidas as amostras de leite cru.

As amostras de leite em pó e UAT foram obtidas no comércio das cidades de Ribeirão Preto/SP e Jaboticabal/SP e eram de diferentes marcas comerciais. Em caso de se repetir a marca, tomava-se o cuidado de se obter lotes diferentes.

As amostras de leites cru e pasteurizado foram mantidas em caixas isotérmicas com cubos de gelo desde a sua obtenção até o momento da análise, que foi realizada em no máximo seis horas após a sua obtenção. As análises foram feitas no laboratório de microbiologia de alimentos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP.

4.1 Preparo das amostras (APHA, 1992)

4.1.1 Preparo do leite em pó instantâneo

Antes da abertura, as latas foram lavadas com água e detergente, secas com papel descartável e, em seguida, descontaminadas com etanol a 70%. A abertura das latas foi feita nas proximidades da chama do bico de Bunsen ou em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de instrumental esterilizado.

Após a abertura, o conteúdo foi revolvido com uma espátula esterilizada para uma completa mistura e homogeneização. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 25 gramas, que foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado para prosseguir-se com a reconstituição. Para tal, foram adicionados às 25 gramas de amostra 225 mililitros de água destilada estéril. Seguiu-se, então, à homogeneização por simples agitação.

4.1.2 Preparo das amostras líquidas

Antes da retirada da unidade analítica, as embalagens foram devidamente descontaminadas, ou seja, inicialmente lavadas com água e detergente, secas com papel descartável e limpas com etanol a 70%. Após a descontaminação das embalagens e homogeneização do conteúdo (invertendo-se 25 vezes), as mesmas foram abertas com instrumental esterilizado e então retirou-se a unidade analítica para análise.

4.2 Isolamento do *Bacillus cereus*

Para a tentativa de isolamento de cepas de *Bacillus cereus* foi necessário, inicialmente, submeter as amostras a um enriquecimento seletivo. Para tal, 10 mililitros de cada amostra foram transferidos para um frasco estéril tipo Erlenmeyer contendo 90 mililitros de caldo soja triptona (TSB) adicionado de polimixina B na proporção de 20 µg por mililitro (STADHOUDERS, 1992b). O conjunto foi incubado a 30°C por 24-30 horas e, após o período, foi feito o plaqueamento seletivo.

Para o plaqueamento seletivo, uma alíquota de 0,1 mililitro da cultura de enriquecimento seletivo foi semeada em placas de Petri contendo ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP), segundo recomenda Mossel et al. (1967). As placas foram incubadas a 30°C por 18-40 horas e, ao final do período, foram observados os tipos de colônias presentes. Quando houve desenvolvimento microbiano, foram consideradas como sugestivas das espécies do grupo do *Bacillus cereus* as colônias esbranquiçadas, de aspecto rugoso e seco, medindo entre três e seis milímetros de diâmetro, rodeadas por um halo esbranquiçado formado pela ação da lecitinase e que não fermentaram o manitol (coloração rósea ao redor da colônia), como descreveram MOSSEL et al. (1967), RAIMUNDO E ROBBS (1988), STADHOUDERS, (1992b), te GIFFEL et al. (1995) Van NETTEN e KRAMER (1992) e WONG et al. (1988).

4.3 Identificação do *Bacillus cereus*

As colônias que apresentaram-se como características de pertencerem ao grupo do *Bacillus cereus* (Figura 1) foram repicadas em ágar soja tripton (TSA) inclinado e em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). Os respectivos meios de cultura foram incubados a 30°C por 24 horas e, posteriormente, cada cultura foi submetida às provas para a confirmação da espécie como pertencente ao referido grupo.

Inicialmente foram realizados dois esfregaços. Um deles foi corado pelo método de Gram para a caracterização da morfologia e da coloração e o outro corado pelo método de Wirtz-Concklin (BIER, 1975), para a visualização de esporos. Confirmada a presença de bastonetes Gram positivos e formadores de esporos, as provas bioquímicas descritas a seguir foram então realizadas segundo metodologia estabelecida por MacFadin (1976), para a caracterização do grupo do *Bacillus cereus*:

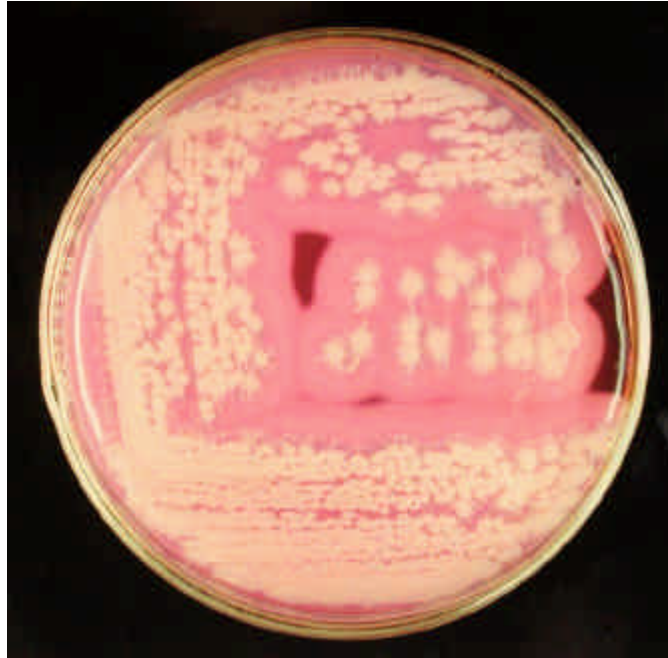


Figura 1. Colônia de bactérias sugestivas de pertencerem ao grupo do *Bacillus cereus* isoladas de amostras de leite em ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP).

- Prova da catalase: uma alíquota da cultura pura foi colocada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. Havendo desprendimento de bolhas de gás, considerou-se a cultura como sendo positiva para a prova da catalase.

- Provas da motilidade e redução do nitrato a nitrito: as cepas isoladas foram semeadas com a ajuda de uma agulha, através de uma única picada profunda, no centro de tubos de ensaio contendo ágar motilidade-nitrato esterilizado em autoclave. Os tubos foram incubados a 30°C por 24 horas. Para a prova da motilidade, foi considerado resultado positivo quando houve desenvolvimento microbiano em toda a extensão do ágar e negativo quando este ocorreu somente na linha de semeadura.

Para a prova da redução de nitrato a nitrito, após a leitura da prova de motilidade foram adicionados os reativos de alfa-naftilamina a 0,5% (Reativo A) e ácido sulfanílico a 0,8% (Reativo B). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de um halo vermelho-tijolo em 30 segundos. Nos tubos com

resultado negativo foi adicionado zinco em pó, que promove a redução do nitrato a nitrito e conseqüente mudança de cor, confirmando a eficácia da prova.

- Reação de Voges-Proskauer (VP): em tubos de ensaio contendo dois mililitros de caldo MR-VP esterilizado, foi semeada a cultura pura (a partir do TSA). Após a incubação a 30°C por 48-72 horas e utilizando como controle negativo somente o meio de cultura, foi acrescentado 0,5 mililitros de solução de α -naftol (Reagente 1) com auxílio de pipeta e pêra de borracha e 0,3 mililitros de solução de hidróxido de potássio a 40% (Reagente 2). A mistura foi homogeneizada, considerando-se positiva a cultura que tornou-se com uma coloração avermelhada em até 15 minutos e negativa quando não houve alteração da cor original.

- Hemólise em sangue de carneiro: foram usadas placas de ágar nutriente enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As culturas, a partir do BHI, foram semeadas em forma de estrias com ajuda de uma alça de níquel-cromo e depois incubadas a 30°C por 24 horas. Formando um halo de hemólise, a prova foi considerada positiva.

- Fermentação anaeróbia da glicose: usando caldo vermelho de fenol com 1% de glicose (pH ajustado a 7,4-7,6) distribuído em tubos de ensaio (cerca de três mililitros) vedados com 0,5 mililitros de vaselina líquida, foi inoculada a cultura pura. Após incubação a 30°C por até 72 horas, foi considerada positiva a amostra que apresentou mudança de coloração para amarela e negativa quando a coloração do meio permaneceu na sua cor inicial (vermelho).

- Crescimento rizóide: para a realização desta prova, cada cultura, a partir do BHI, foi semeada em placas de Petri contendo ágar nutriente, com a ajuda de uma agulha, em estria única. Após a incubação das placas a 30°C por 24 horas, considerou-se como positiva para a prova aquela cultura que apresentou crescimento em formato semelhante ao de raízes.

Foram considerados microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* os bacilos Gram positivos, esporulados e positivos para as provas de catalase, utilização anaeróbia da glicose e VP (HARMON et al., 1992). Embora as outras provas bioquímicas pudessem ter resultado tanto positivo quanto negativo, sem excluir a possibilidade de ser um microrganismo do grupo do *Bacillus cereus*, elas foram realizadas para se verificar a possibilidade de uma possível diferenciação laboratorial entre os quatro microrganismos do grupo.

4.4 Caracterização das cepas enterotoxigênicas

As colônias características de pertencerem ao grupo do *Bacillus cereus* foram submetidas a testes para a determinação da produção de enterotoxinas. Foram utilizados o teste em alça intestinal ligada e o teste da reação de permeabilidade vascular, ambos em coelhos, e o teste de aglutinação passiva em látex.

Para o teste em alça intestinal ligada de coelho, seguiu-se a metodologia descrita por Spira e Goepfert (1972). Para tal, as cepas foram repicadas em caldo nutriente esterilizado e, após a incubação a 30°C por 12 horas, uma alíquota deste caldo foi repicado em caldo de infusão de cérebro e coração adicionado de 0,1% de glicose (BHIG), que permaneceu por mais 12 horas incubado a 30°C sob moderada agitação (200 rpm). Ao término deste período, a cultura foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado em membranas de éster de celulose de 25 milímetros de diâmetro e poros de 0,45 micrômetros. O produto final, chamado de filtrado, foi utilizado no mesmo dia do seu preparo.

Os filtrados foram testados em coelhos albinos jovens da raça Norfolk 2000, com idade não superior a oito semanas e peso inferior a 1000 gramas. Os animais permaneceram em jejum alimentar por 48 horas e jejum hídrico por 24 horas. Após anestesiados, suas alças intestinais foram expostas através de laparotomia e o conteúdo do íleo foi removido para porções anteriores ou posteriores do local de inoculação do filtrado a ser testado. As alças eram

umedecidas com solução fisiológica estéril. Segmentos do íleo foram amarrados com fio de algodão em porções de 10 centímetros intercaladas com porções de cinco centímetros. Volumes de dois mililitros do filtrado foram injetados nos segmentos de 10 centímetros, sendo que os segmentos de cinco centímetros permaneceram vazios. Terminada a inoculação, o abdome foi fechado. Cada filtrado da cepa em estudo foi inoculado em, no mínimo, dois coelhos diferentes. Em cada coelho foi inoculada, ainda, uma cepa sabidamente enterotoxigênica em uma das extremidades, que funcionou como controle positivo, e somente o BHIG na outra extremidade, funcionando como controle negativo.

Ao término da cirurgia, os animais permaneceram em jejum alimentar, mas receberam água a vontade. Após sete horas, os coelhos foram sacrificados e as alças intestinais examinadas quanto à presença de acúmulo de líquido. O teste foi considerado positivo quando a razão entre o volume de fluido acumulado no interior do segmento testado e o comprimento do respectivo segmento da alça intestinal era maior que 0,5 nas porções que foram inoculadas com as culturas-teste. Quando houve acúmulo de líquido no segmento correspondente ao controle negativo, ou nos segmentos de cinco centímetros que não foram inoculados, todo o teste foi desconsiderado. Foram consideradas positivas para a produção de enterotoxinas as cepas que apresentaram resultados positivos em pelo menos 50% dos animais testados (BURROWS e MUSTEIKIS, 1966). Quando houve resultados antagônicos, o teste foi refeito em pelo menos mais um animal.

Para a realização do teste de aumento da permeabilidade vascular em pele de coelho, depilou-se o dorso do animal, que foi marcado em quadrados. Em cada quadrado injetou-se 0,05 mililitros do filtrado intradermicamente. Após três horas, uma solução de azul de Evans a 2% foi injetada pela veia auricular do coelho, na dose de 2mL/Kg. O corante espalha-se por todo o corpo pela circulação. Se a permeabilidade da pele é alterada pela toxina, o corante acumula-se na pele ao redor do local de aplicação do filtrado, gerando uma mancha azul facilmente visualizada. Pode haver não só a formação de mancha azulada, mas também de edema e de necrose cutânea (GLATZ et al., 1974).

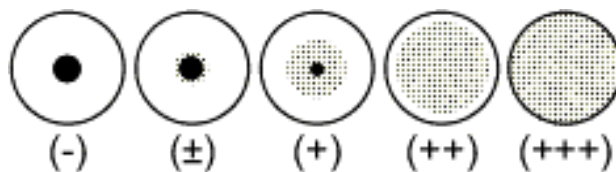
Para a realização da técnica “in vitro”, utilizou-se um kit comercial¹ composto por:

- a) látex sensibilizado: látex sensibilizado com anti-soro (IgG) obtido de coelhos imunizados com uma cepa de *Bacillus cereus* purificada e produtora de enterotoxinas.
- b) látex controle: suspensão de látex sensibilizada com globulinas não imunogênicas de coelho (controle negativo);
- c) enterotoxina de *Bacillus cereus* liofilizada (controle positivo);
- d) diluente: tampão fosfato salina contendo soroalbumina bovina.

O princípio da técnica baseia-se no fato de que as partículas de látex sensibilizadas com o anti-soro irão aglutinar na presença da enterotoxina produzida pelo *Bacillus cereus*. Tal reação foi demonstrada quando se misturou o látex sensibilizado com a enterotoxina fornecida como controle positivo. Por outro lado, quando se misturava o látex controle com o látex sensibilizado, esperava-se uma reação negativa.

Embora o anticorpo utilizado nesta técnica seja específico contra um componente “não tóxico” da enterotoxina (L₂), Granum et al. (1993a) relatam que a técnica de aglutinação passiva em látex é bastante simples e confiável na detecção da enterotoxina produzida pelo *Bacillus cereus*.

A interpretação dos resultados foi feita baseando-se na ilustração seguinte, fornecida pelo fabricante do kit:



¹ BCET-RPLA *Bacillus cereus* enterotoxin (diarrhoeal type) test kit, Oxoid®

Para a obtenção da enterotoxina, a cepa a ser testada foi inoculada em caldo de infusão de cérebro com coração e posteriormente incubada a 32°C por 6-18 horas. Após incubação, centrifugou-se a cultura a 900 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante, chamado de filtrado, era então testado para a presença da enterotoxina. De acordo com a ilustração, os resultados classificados como (+), (++) ou (+++) eram considerados positivos.

4.5 Análise Estatística

Os resultados relativos ao número de cepas positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelas diferentes técnicas usadas (“in vivo” e “in vitro”) foram analisados através do teste não paramétrico do qui quadrado ao nível de significância de 5% (BERQUÓ et al., 1980), com o objetivo de se verificar a existência de diferença estatística para a detecção de enterotoxinas entre as técnicas utilizadas.

4.6 Estimativa da validade das técnicas utilizadas para a detecção de enterotoxinas

As técnicas utilizadas para a detecção de enterotoxinas foram comparadas, duas a duas, quanto à concordância existente entre elas. Ainda foram calculadas a sensibilidade e a especificidade das técnicas “in vivo”, individualmente, quando comparadas com a técnica “in vitro” e também quando comparadas entre si. Tais parâmetros (sensibilidade, especificidade e concordância) expressam a validade de um método de diagnóstico. Para se obter a proporção de concordâncias além da esperada pela chance, utilizou-se o índice *kappa*. Tal índice pode variar de valores “menos 1” a “mais 1”. “Menos 1” significa completo desacordo e “mais 1”, exato acordo nos resultados fornecidos pelos testes. Zero indica o mesmo que resultados ao acaso, do tipo “cara e coroa”. A interpretação de *kappa* está resumida a seguir: (PEREIRA, 2000)

- $<0,00$: indica concordância ruim;
- $0,00-0,20$: indica concordância fraca;
- $0,21-0,40$: indica concordância sofrível;
- $0,41-0,60$: indica concordância regular;
- $0,61-0,80$: indica concordância boa;
- $0,81-0,99$: indica concordância ótima;
- $1,00$: indica concordância perfeita.

5 Resultados e Discussão

Nas Tabelas e Figuras 2 a 6 são apresentados os resultados referentes ao isolamento de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* das diferentes amostras de leite analisadas, bem como os resultados da produção de enterotoxinas pelas diferentes técnicas a partir das cepas isoladas.

Os resultados apresentados na Tabela 2 e Figura 2 mostram que, das 120 amostras de leite analisadas, a maioria (58,3%) foi positiva para a presença do referido microrganismo. Apresentaram-se positivas 22 (73,3%) amostras de leite em pó, 15 (50,0%) amostras de leite cru, 29 (96,7%) amostras de leite pasteurizado e quatro (13,3%) amostras de leite longa vida. Destacam-se as amostras de leite pasteurizado, que apresentaram 96,7% de amostras positivas para o isolamento do *Bacillus cereus*, número considerado extremamente alarmante quanto ao risco que tal produto pode trazer à saúde pública. Em um trabalho semelhante, te Giffel et al. (1996) encontraram 40% das amostras de leite pasteurizado contaminadas pelo referido microrganismo, enquanto Abdel e El-Sherbini (1996) encontraram 30% e 40% das amostras de leite pasteurizado e cru, respectivamente, contaminadas pelo *Bacillus cereus*. Raimundo e Robbs (1988) encontraram 66,6% das amostras de leite pasteurizado e 80,0% das amostras de leite cru contaminadas pelo microrganismo em questão. No presente trabalho, 50,0% das amostras de leite cru apresentaram-se contaminadas.

Tabela 2. Número de amostras de leite analisadas e de positivas para a presença de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* e número de cepas produtoras de enterotoxinas pela técnica de aglutinação passiva em látex. Ribeirão Preto e Jaboticabal (SP), 2002.

Tipo de leite	Nº de amostras		Nº de cepas ⁽¹⁾	
	Analisadas	Positivas (%)	Testadas	Positivas (%)
Pó	30	22 (73,3)	9	3 (33,3)
Cru	30	15 (50,0)	11	7 (63,6)
Pasteurizado	30	29 (96,7)	13	4 (30,8)
Longa Vida	30	4 (13,3)	10	8 (80,0)
Total	120	70 (58,3)	43	22 (51,2)

⁽¹⁾ Cepas testadas para a produção de enterotoxinas pela técnica de aglutinação passiva em látex.

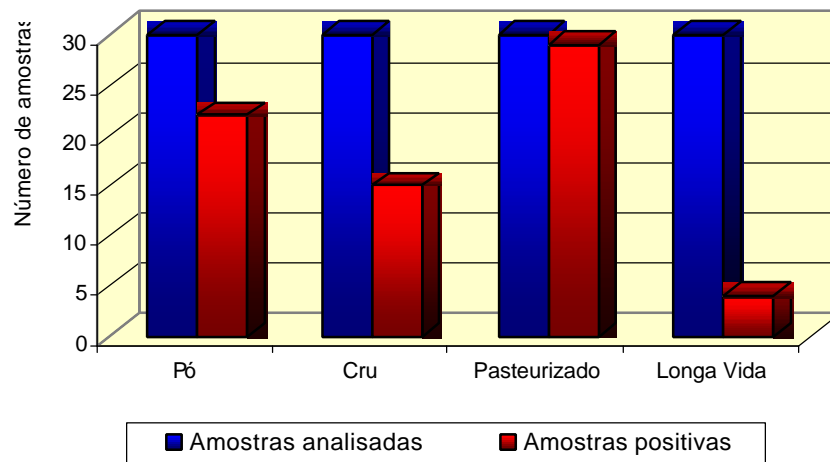


Figura 2. Número de amostras analisadas e de positivas para a presença de bactérias do grupo do *Bacillus cereus*, em relação a cada um dos tipos de leite analisados. Ribeirão Preto e Jaboticabal (SP), 2002.

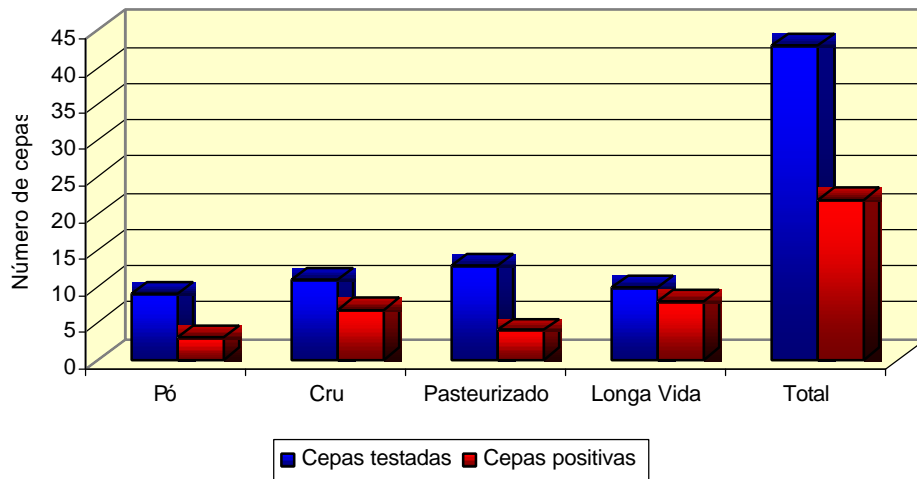


Figura 3. Número de cepas de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pela técnica de aglutinação passiva em látex, isoladas em diferentes tipos de leite.

Kamat et al. (1989) analisaram diferentes produtos prontos adquiridos na Índia e encontraram todas as amostras de leite pasteurizado contaminadas com o *Bacillus cereus*. Esses resultados assemelham-se aos encontrados neste trabalho, onde 96,7% das amostras de leite pasteurizado estavam contaminadas com o *Bacillus cereus*.

Barros et al. (2001) analisaram 72 amostras de leite em pó comercializadas na cidade de São Paulo/SP e encontraram apenas 20 (27,8%) contaminadas com o *Bacillus cereus*. Esses valores são inferiores aos encontrados neste trabalho. No entanto, os autores salientam que o número de amostras positivas poderia ser maior caso fosse utilizado um meio de enriquecimento antes da tentativa de isolamento.

Rangasamy et al. (1993) analisaram diferentes amostras de leite e derivados. Os autores encontraram o *Bacillus cereus* em seis (25%) amostras de leite cru, quatro (33%) amostras de leite pasteurizado e três (30%) amostras de leite em pó, mas nenhuma amostra de leite longa vida apresentou-se contaminada com o microrganismo. Esses valores são inferiores aos encontrados neste

trabalho. No entanto, pode-se observar que os autores também tiveram uma freqüência de isolamento menor no leite cru do que nos leites em pó e pasteurizados, o que está de acordo com os valores encontrados nesta pesquisa. Uma menor freqüência de isolamento no leite cru, quando comparado ao leite pasteurizado, também foi encontrada por Ahmed et al. (1983). Os autores encontraram nove (9%) e 35 (35%) das amostras de leite cru e pasteurizado, respectivamente, contaminadas pelo *Bacillus cereus* e sugerem uma possível contaminação pós-pasteurização do produto. As amostras de leite cru apresentaram populações que variavam de 10 a $1,0 \times 10^2$ UFC por mililitro, enquanto as de leite pasteurizado tiveram populações de *Bacillus cereus* entre 10 e $1,0 \times 10^3$ UFC por mililitro. A contaminação pós-pasteurização pode ter ocorrido pela ação dos biofilmes.

Os biofilmes formados nos equipamentos são um risco em potencial à qualidade do leite. De acordo com Peng et al. (2001), os esporos do *Bacillus cereus* têm uma pronunciada capacidade em se aderir às superfícies de aço inoxidável, material mais comumente utilizado na indústria de alimentos. Essa adesão, segundo os autores, é maior quando os microrganismos entram na fase estacionária de desenvolvimento. Embora tanto as células vegetativas quanto os esporos possuam capacidade de aderência ao aço inox, Peng et al. (2001) verificaram que a aderência dos esporos foi cerca de dez vezes maior do que a aderência das células vegetativas. Assim, quanto menor a quantidade de esporos no leite cru, menor a chance de formação de biofilmes.

Rangasamy et al. (1993) e Ahmed et al. (1983) não utilizaram enriquecimento prévio, fato que pode ter gerado uma menor freqüência de isolamento nas amostras analisadas em relação a este trabalho. Além disso, todos eles utilizaram, para isolamento, o ágar Kim e Goepfert. Van Netem e Kramer (1992) descrevem que essa divergência entre os resultados encontrados por diferentes autores pode estar relacionada, entre outros fatores, aos meios de isolamento utilizados.

Shinagawa (1993) analisou amostras de leite cru e de leite em pó na tentativa de isolar *Bacillus cereus*. Os autores verificaram que 7% das amostras de leite em cru estavam contaminadas, enquanto que 44% das amostras de leite em pó apresentavam a contaminação. Por outro lado, todas as cepas isoladas das amostras de leite cru foram enterotoxigênicas quando submetidas à aglutinação passiva em látex, enquanto apenas 56% das cepas isoladas das amostras de leite em pó foram enterotoxigênicas. De certa forma, esses resultados assemelham-se aos encontrados nesse trabalho.

Após a análise de 120 amostras de leite UAT, em condições semelhantes às do presente estudo, Rezende et al. (2000) encontraram 41 (34%) amostras contaminadas pelo *Bacillus cereus*. O número de amostras positivas para este tipo de leite foi maior do que o encontrado neste estudo, o que indica uma provável melhora nas qualidades de processamento do leite UAT nos últimos anos.

De acordo com Griffiths (1992), a qualidade do leite processado termicamente está diretamente relacionada com a redução dos níveis de contaminantes do leite cru. Esses contaminantes são, na sua maioria, bactérias psicrótróficas Gram negativas e, após a sua eliminação, a microbiota do leite processado passa a ser composta principalmente pelas bactérias Gram positivas que sobrevivem ao tratamento térmico. Os autores salientam que as bactérias de maior importância são as termorresistentes pertencentes ao gênero *Bacillus*, incluindo o *Bacillus cereus* que pode se multiplicar em temperaturas inferiores a 6°C e até mesmo produzir enterotoxinas em baixas temperaturas.

Assim, o fato do *Bacillus cereus* ter sido isolado mais freqüentemente em amostras processadas termicamente (com exceção do leite UAT) do que em amostras de leite cru, pode ser explicado pela diminuição da microbiota competitiva nas amostras processadas, fato que facilita o isolamento do *Bacillus cereus*. Salienta-se que neste trabalho houve uma grande dificuldade em se isolar o *Bacillus cereus* das amostras de leite cru, mesmo utilizando-se um meio seletivo para o isolamento, dado à alta contaminação por uma diversificada microbiota nas amostras analisadas.

Ainda observando-se os dados da Tabela 2 e analisando-se a Figura 3, verifica-se que várias cepas isoladas dos diferentes tipos de leite estudados apresentaram-se positivas para a produção de enterotoxinas quando foram testadas pela prova de aglutinação passiva em látex. Foram testadas, respectivamente, nove, 11, 13 e 10 cepas isoladas de leite em pó, leite cru, leite pasteurizado e leite longa vida. Destas, apresentaram-se positivas, respectivamente, três (33,3%), sete (63,6%), quatro (30,8%) e oito (80,0%) cepas. Neste caso, destacam-se as amostras de leite longa vida, que tiveram 80,0% de cepas produtoras de enterotoxinas quando testadas por essa técnica. Esse dado é alarmante, tendo em vista o fato do leite longa vida ser um dos tipos de leite mais consumidos pela população e, muitas vezes, sem nenhum tratamento térmico domiciliar.

É muito difícil explicar as diferenças encontradas, no que diz respeito à enterotoxigenicidade, entre os diferentes tipos de leite (Tabela 2). São desconhecidos trabalhos científicos que relatem essas diferenças. Talvez o tipo de tratamento térmico aplicado possa causar diferentes tipos de injúrias no *Bacillus cereus*, fazendo com que o microrganismo precise se restabelecer antes de produzir a enterotoxina. Isso talvez explique o motivo da freqüência de isolamento de cepas enterotoxigênicas ser maior no leite UAT do que nos demais tipos de leite, dado o fato do leite UAT ter um grande período de vida útil, além de permanecer estocado em temperatura ambiente, o que pode favorecer a recuperação e o posterior desenvolvimento do *Bacillus cereus*. Associa-se a isso a baixa competitividade encontrada pelo *Bacillus cereus* neste tipo de leite, já que o tratamento UAT é capaz de destruir a maioria dos microrganismos não esporulados presentes. Por outro lado, o leite pasteurizado permanece sob refrigeração, além de ter um período de vida útil bem menor do que o do leite UAT, características que podem prejudicar a recuperação do *Bacillus cereus* remanescente e a posterior produção de enterotoxinas pelas cepas enterotoxigênicas.

Embora o leite em pó também permaneça estocado em temperatura ambiente, a baixa atividade de água deste produto pode prejudicar a recuperação do *Bacillus cereus*.

Já as amostras de leite cru também apresentaram alta frequência de cepas enterotoxigênicas. Embora haja uma alta competição microbiana neste tipo de leite, o produto ainda não foi processado termicamente, ou seja, o *Bacillus cereus* não foi injuriado. Assim, quando as células são isoladas e cultivadas, podem facilmente produzir enterotoxinas.

Ao analisar 85 cepas isoladas de diferentes produtos lácteos pasteurizados, Granum et al. (1993a) encontraram 50 (59%) cepas enterotoxigênicas quando testadas pela técnica de *Western Blotting*. Os autores não encontraram diferenças significativas entre esta técnica e a técnica de aglutinação passiva em látex. Esses resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde 51,2% de todas as cepas testadas pela prova de aglutinação se mostraram enterotoxigênicas.

Pelos dados da Tabela 3 e Figura 4, pode-se observar que apenas o leite longa vida não apresentou cepas positivas para a produção de enterotoxinas pela técnica em alça ligada de coelho. Por outro lado, apresentaram-se positivas três (13,6%), uma (7,1%) e 10 (35,7%) cepas isoladas das amostras de leite em pó, leite cru e leite pasteurizado, respectivamente, totalizando 15,7% de cepas enterotoxigênicas.

Rezende et al. (2000) também não encontraram nenhuma das 44 cepas isoladas de amostras de leite UAT com capacidade enterotoxigênica, quando testadas pela técnica em alça ligada de coelho.

Tabela 3. Número de cepas de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.

Tipo de leite	No de cepas testadas	Cepas positivas ⁽¹⁾	
		Número	%
Pó	22	3	13,6
Cru	14	1	7,1
Pasteurizado	28	10	35,7
Longa Vida	25	-	-
Total	89	14	15,7

⁽¹⁾ relação volume/comprimento $\geq 0,5$

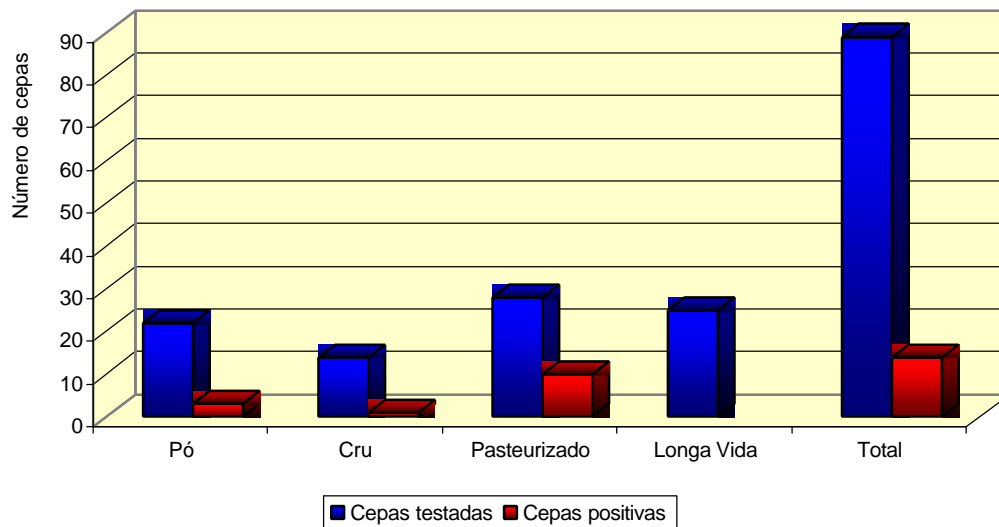


Figura 4. Número de cepas de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.

Os dados apresentados na Tabela 4 e na Figura 5 evidenciam que duas (9,1%) cepas isoladas de leite em pó, das 22 testadas, foram positivas para a produção de enterotoxinas pelo teste de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho. Para os demais tipos de leite, foram positivas uma (7,1%) das 14

cepas testadas de leite cru, uma (3,6%) das 28 de leite pasteurizado e uma (4,0%) das 25 de leite longa vida, caracterizando, no total, apenas 5,6% das cepas como enterotoxigênicas.

Tabela 4. Número de cepas de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo aumento de permeabilidade vascular em pele de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.

Tipo de leite	No de cepas testadas	Cepas positivas ⁽¹⁾	
		Número	%
Pó	22	2	9,1
Cru	14	1	7,1
Pasteurizado	28	1	3,6
Longa Vida	25	1	4,0
Total	89	5	5,6

⁽¹⁾ diâmetro da área azulada superior a 15 mm (GLATZ et al., 1974)

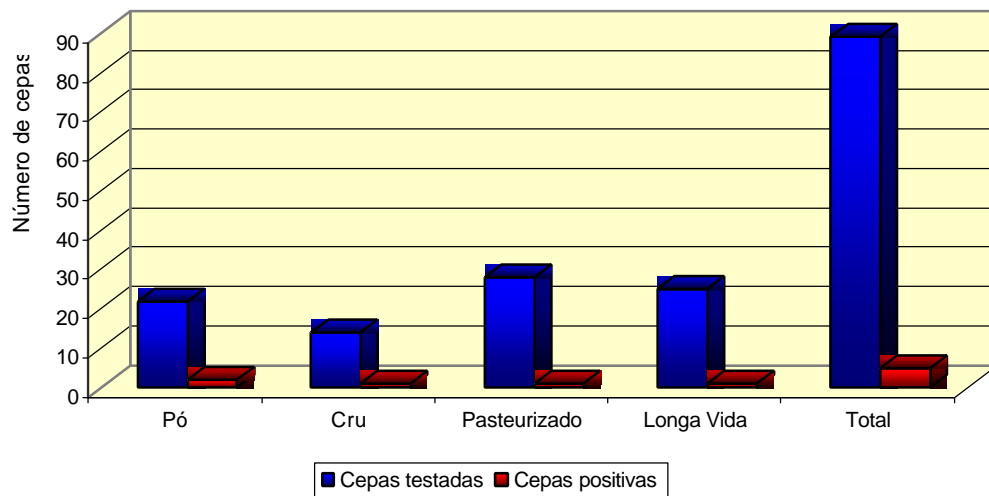


Figura 5. Número de cepas de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus* testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelo aumento de permeabilidade vascular em pele de coelhos, isoladas em diferentes tipos de leite.

A Tabela 5 e a Figura 6 mostram que a técnica de aglutinação passiva em látex para detecção da produção de enterotoxinas pela cepas de *Bacillus cereus* isoladas das diferentes amostras de leite foi a que revelou maior número de cepas positivas. Das 43 cepas testadas por essa técnica, 22 (51,2%) apresentaram capacidade enterotoxigênica. Comparando-se esse resultado com o número de cepas que se mostraram enterotoxigênicas pelas técnicas de acúmulo de fluido em alça intestinal e aumento de permeabilidade vascular dérmica, ambas em coelho, conclui-se que a técnica de aglutinação passiva em látex difere estatisticamente ($p < 0,05$), pelo teste do qui-quadrado, das demais técnicas utilizadas nesse experimento. Pelas técnicas de acúmulo de fluido em alça ligada e de aumento de permeabilidade vascular em coelhos, apresentaram-se positivas para a produção de enterotoxinas 15,7% e 5,6% das cepas testadas, respectivamente. Em relação ao número de cepas testadas pelas técnicas de aumento de permeabilidade vascular e de acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), pelo teste do qui-quadrado, entre essas duas técnicas “in vivo”, assim como encontrou Christianssom (1992).

Tabela 5. Número de cepas de *Bacillus cereus* testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelas diferentes técnicas usadas (alça intestinal ligada de coelho, aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho e aglutinação passiva em látex).

Técnica	No de cepas testadas	Cepas positivas	
		Número	%
Alça ligada	89	14a ⁽¹⁾	15,7
Pele	89	5a	5,6
Agglutinação	43	22b	51,2

⁽¹⁾ Na mesma coluna, valores com letras diferentes diferem entre si ao nível de 95% de probabilidade

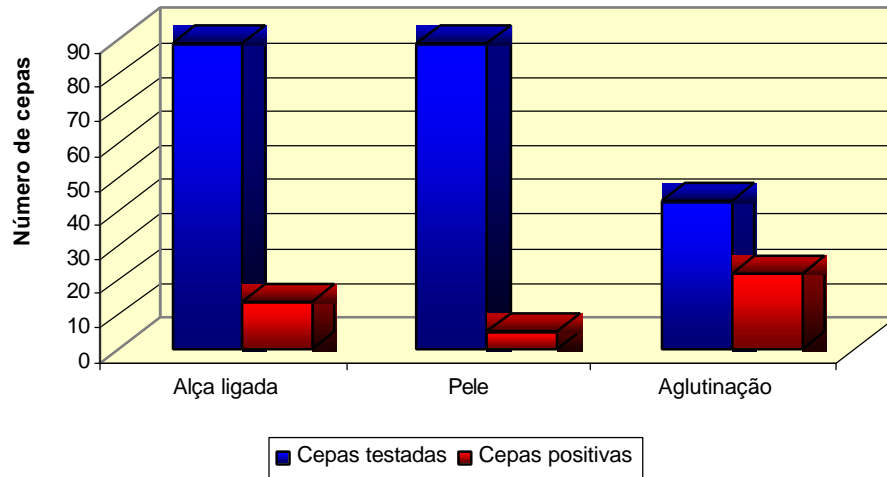


Figura 6. Número de cepas de *Bacillus cereus* testadas e de positivas para a produção de enterotoxinas detectadas pelas diferentes técnicas usadas (alça intestinal ligada de coelho, aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho e aglutinação passiva em látex).

A capacidade das técnicas “in vivo” para a detecção da produção de enterotoxinas foi comparada, separadamente, com a capacidade de detecção de enterotoxinas pela técnica “in vitro”. Para tal, as cepas de *Bacillus cereus* que puderam produzir enterotoxinas detectáveis pela técnica de aglutinação passiva em látex foram consideradas enterotoxigênicas. Praticamente todas essas cepas foram também submetidas à detecção da produção de enterotoxinas ou pela prova de acúmulo de fluido em alça ligada de coelho (Tabela 6), ou pela prova de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho (Tabela 7). Como pôde ser observado na Tabela 5, 43 cepas foram submetidas à prova de aglutinação em látex. No entanto, uma delas foi perdida quando essas cepas foram submetidas às provas “in vivo”, fato que gerou um total de 42 cepas comparadas pelas técnicas “in vitro” e “in vivo”.

Pelos dados da Tabela 6, pode-se observar que, das 42 cepas testadas em ambas as provas, foram positivas, pelo acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho, cinco das 22 cepas consideradas enterotoxigênicas. Das 20 cepas não enterotoxigênicas, foram negativas 15 cepas quando testadas pela técnica “in

vivo” (alça ligada). Houve uma grande proporção de resultados falso-negativos, já que das 22 cepas enterotoxigênicas, 17 foram consideradas negativas pela técnica de acúmulo de fluido em alça ligada de coelho.

Tabela 6. Número de cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas detectadas pela prova de aglutinação passiva em látex (“in vitro”) submetidas à prova de detecção de enterotoxinas pela técnica de acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho (“in vivo”).

TESTE ⁽¹⁾	Capacidade enterotoxigênica		TOTAL
	Sim ⁽²⁾	Não	
Positivo	5	5	10
Negativo	17	15	32
TOTAL	22	20	42

⁽¹⁾ acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho

⁽²⁾ cepas consideradas enterotoxigênicas pela técnica de aglutinação passiva em látex

Pelos resultados obtidos, a sensibilidade da técnica “in vivo”, quando comparada à técnica “in vitro”, é de apenas 23% (5/22). A especificidade, no entanto, apresenta-se em 75% (15/20). Porém, a concordância do método “in vivo” não apresentou-se satisfatória quando comparada à técnica “in vitro”, sendo de apenas 48%, neste experimento. Além dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância encontrados, foi calculado também o índice *kappa*, que, neste caso, foi de -0,02, indicando um índice de concordância ruim (PEREIRA, 2000).

O mesmo estudo comparativo foi feito utilizando-se, como técnica “in vivo”, a prova de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho. Pode-se observar, pelos dados da Tabela 7, que apenas uma, das 22 cepas enterotoxigênicas, produziu enterotoxinas detectáveis pela técnica “in vivo”. Neste caso, a sensibilidade desta técnica é de apenas 5% (1/22), quando comparada à técnica “in vitro” (aglutinação passiva em látex). Por outro lado, a técnica “in vivo” apresentou especificidade de 100%, já que todas as 20 cepas não enterotoxigênicas também não produziram toxinas detectáveis pela prova de aumento de permeabilidade vascular. No entanto, a concordância da técnica “in

vivo” também apresentou-se insatisfatória (50%) neste estudo. Além dos valores de sensibilidade, especificidade e concordância encontrados, foi calculado também o índice *kappa*, que, neste caso, foi de $-0,002$, indicando um índice de concordância ruim (PEREIRA, 2000), assim como o índice encontrado quando se comparou a técnica “in vitro” com a técnica de acúmulo de fluido em alça. De acordo com Shinagawa (1990), os testes biológicos para a detecção das enterotoxinas produzidas pelo *Bacillus cereus* (como as técnicas com o uso de coelhos), levam tempo, são dispendiosas e não são sensíveis, o que reforça os dados encontrados no presente estudo.

Tabela 7. Número de cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas detectadas pela prova de aglutinação passiva em látex (“in vitro”) submetidas à prova de detecção de enterotoxinas pela técnica de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho (“in vivo”).

TESTE ⁽¹⁾	Capacidade enterotoxigênica		TOTAL
	Sim ⁽²⁾	Não	
Positivo	1	-	1
Negativo	21	20	41
TOTAL	22	20	42

⁽¹⁾ aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho

⁽²⁾ cepas consideradas enterotoxigênicas pela técnica de aglutinação passiva em látex

Foram comparadas também as duas técnicas “in vivo” entre si (TABELA 8). Neste caso, a sensibilidade encontrada foi zero (0/14), mas a especificidade foi de 93% (70/75) e a concordância, 79%. Embora pareça ser uma concordância relativamente alta, como a relatada por Chistiansom (1992), o índice *kappa* encontrado foi de $-0,01$, indicando uma concordância ruim, ou devida ao acaso, como afirma Pereira (2000).

Tabela 8. Número de cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas detectadas pela prova de acúmulo de fluido em alça ligada de coelho submetidas à prova de detecção de enterotoxinas pela técnica de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho.

TESTE ⁽¹⁾	Capacidade enterotoxigênica		TOTAL
	Sim ⁽²⁾	Não	
Positivo	-	5	5
Negativo	14	70	84
TOTAL	14	75	89

⁽¹⁾ aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho

⁽²⁾ cepas consideradas enterotoxigênicas por terem provocado acúmulo de fluido em alça ligada de coelho

Apesar dos resultados por si só já indicarem que o uso de técnicas “in vivo” para este tipo de estudo não deve ser realizado, deve-se salientar ainda que o conselho de bioética determina, entre outras diretrizes, que o uso de animais de experimentação só deve ser feito em casos de extrema relevância, após uma análise estatística do número de animais necessários ao experimento. Mesmo assim, todas as vezes que o experimento “in vivo” puder ser substituído por técnicas “in vitro”, deve-se fazê-lo, com o intuito de se poupar vidas e sofrimento animal (RAYMUNDO, 2000).

Ressalta-se ainda que, apesar da baixa concordância encontrada entre as técnicas “in vivo” e “in vitro”, o uso de animais gerou uma alta porcentagem de resultados falso-negativos (77% para a técnica de alça ligada e 95% para a técnica de aumento de permeabilidade vascular em pele), subestimando-se o risco que tais cepas enterotoxigênicas representam à saúde pública. Além do mais, várias cepas tiveram que ser testadas inúmeras vezes, já que os controles positivos eventualmente forneciam resultados negativos, os controles negativos eventualmente forneciam resultados positivos e, ainda, os espaçamentos das alças intestinais onde não houve inoculação de toxinas apresentaram, algumas vezes, acúmulo de fluido, fatos que obrigaram o descarte do animal e a repetição do teste.

No uso da técnica “in vitro”, acidentes como falha nos controles positivos e negativos não ocorreram, não havendo descartes por falhas técnicas. Entretanto, tal técnica apresenta a desvantagem do custo. Ainda assim, a relação custo-benefício pode ser considerada vantajosa em relação às técnicas “in vivo”, já que a ausência de descartes e a menor demanda de tempo de trabalho, associadas aos resultados apresentados, indicam que o teste “in vitro” é mais vantajoso em relação às técnicas “in vivo”.

A proporção de amostras de leite contaminadas pelo *Bacillus cereus* foi bastante elevada (58,3%), além da alta porcentagem de cepas enterotoxigênicas encontradas nas amostras analisadas (51,2%). Isso faz com que os produtos analisados sejam potencialmente capazes de provocar casos de intoxicação alimentar, principalmente em jovens (até 19 anos de idade) e idosos com idade superior a 60 anos, como relata Granum (1997). O autor relata um surto ocorrido com atletas noruegueses, no ano de 1995, envolvendo 152 pessoas. Neste surto, os atletas jovens, de 16 a 19 anos de idade, apresentaram os sintomas mais severos, enquanto os técnicos e os juízes não foram acometidos.

Granum (1997) cita também que o número de casos de intoxicação alimentar por *Bacillus cereus* é bastante subestimado na literatura científica. A principal razão, segundo o autor, é que a síndrome diarréica causada pelo *Bacillus cereus* provoca sintomatologia de curta duração. Além disso, como existe variação na susceptibilidade entre as pessoas, poucos indivíduos de uma mesma família são acometidos, o que muitas vezes descarta, erroneamente, a suspeita de uma intoxicação alimentar. Um fator que pode estar relacionado à resistência ao *Bacillus cereus* é a imunidade adquirida pelo consumo freqüente de pequenas quantidade do microrganismo.

De acordo com Granum (1994), o número de células viáveis ou de esporos de *Bacillus cereus* capaz de provocar intoxicação alimentar varia de 10^5 a 10^8 UFC por grama ou mililitro de alimento. Esse valor é bem variável devido a capacidade individual das cepas em produzir a enterotoxina no intestino. Embora não tenha sido realizada a contagem da população de *Bacillus cereus* nas amostras de leite

deste trabalho, Barros et al. (2001) verificaram que 97% das amostras de leite em pó analisadas apresentavam contagens de *Bacillus cereus* abaixo dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde e, portanto, foram classificadas como aptas para o consumo. Por outro lado, quando tais amostras tiveram uma porção reconstituída e armazenada a 20°C por 24 horas, 92% apresentaram valores superiores aos permitidos, sendo potencialmente capazes de provocar intoxicação alimentar. Um outro dado alarmante revelado por Barros et al. (2001), é que das amostras de leite em pó reconstituídas que se apresentaram negativas para o *Bacillus cereus*, 72% demonstraram-se potencialmente capazes de causar intoxicação quando manipuladas e estocadas em condições inadequadas.

Assim, os alimentos prontos com um grande período de vida útil podem levar à sobrevivência, desenvolvimento e formação de toxinas pelo *Bacillus cereus*, mesmo que esses alimentos permaneçam estocados em temperatura de refrigeração, já que existem cepas psicotróficas de *Bacillus cereus* potencialmente enterotoxigênicas.

Apesar das diferenças encontradas nos resultados das técnicas de detecção de enterotoxinas produzidas pelas cepas de *Bacillus cereus* isoladas das amostras analisadas, fica clara a alta porcentagem de amostras que apresentavam-se contaminadas por este microrganismo, fato que não só causa prejuízos econômicos por diminuição da vida útil do produto, mas que coloca em risco a saúde pública.

Muito embora não se tenha pesquisado diretamente a presença da enterotoxina nas amostras de leite, a simples presença de cepas enterotoxigênicas nesse alimento faz com que ele seja um potencial causador de intoxicação alimentar, principalmente se essas cepas encontrarem condições ideais para a produção de toxinas.

A toxina diarréica é produzida pelo *Bacillus cereus* na fase exponencial do seu desenvolvimento (CHRISTIANSSON, 1992) e pode ser sintetizada até mesmo em condições de anaerobiose (GRANUM et al., 1993b). Dufrenne et al. (1994) testaram várias cepas de *Bacillus cereus* que apresentavam a característica de se

desenvolver em temperaturas iguais ou inferiores a 7°C e verificaram que todas foram capazes de produzir toxinas. Os autores relatam que os esporos, incluindo aqueles de cepas psicotróficas, são bastantes resistentes à temperatura de processamento térmico de muitos alimentos e que esses esporos podem facilmente germinar, mesmo em temperatura de refrigeração. A conclusão desses autores é que as cepas psicotróficas de *Bacillus cereus* podem produzir enterotoxinas na mesma proporção que as cepas mesofílicas o fazem.

Vários são os trabalhos que testaram o tempo de redução decimal para os esporos de *Bacillus cereus*. Diferentes binômios tempo-temperatura foram encontrados. Uma das conclusões encontradas comumente em vários trabalhos é que os esporos de cepas psicotróficas são mais termolábeis do que os esporos das cepas mesofílicas. Dufrenne et al. (1994) encontraram um valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ para cepas psicotróficas (que se desenvolveram em temperatura $\leq 7^{\circ}\text{C}$) variando entre 4,6 a 7,4 minutos. No mesmo trabalho, os autores encontraram o mesmo valor D variando de cinco a >200 minutos para as cepas que se desenvolveram em temperatura ao redor de 11°C.

Mazas et al. (1995) encontraram um curto intervalo de tempo, a 95°C, para a destruição dos esporos. Esse intervalo variou de 3,58 a 5,76 minutos. Quando essa temperatura foi aumentada para 100°C, o tempo necessário à destruição dos esporos passou a ser de 1,8 a 4,87 minutos para diferentes cepas testadas (GONZALES et al., 1995; MAZAS et al., 1995). Já a 121°C, Bradshaw et al. (1975) encontraram um intervalo de 0,03 a 2,35 minutos. Todas as cepas testadas pelos autores eram enterotoxigênicas.

Portanto, como é praticamente impossível destruir os esporos com um processamento térmico que não provoque alterações organolépticas nos produtos lácteos, a qualidade microbiológica do leite cru assume grande importância na prevenção de casos de intoxicação alimentar. De acordo com Brown (1994), nem mesmo o tratamento UAT é suficiente para garantir um produto livre de microrganismos.

As amostras de leite cru analisadas neste trabalho deixam a desejar quanto à qualidade microbiológica, visto que 50% delas estavam contaminadas com *Bacillus cereus* e que, das cepas isoladas, 63,6% foram enterotoxigênicas quando testadas “in vitro”. Recomenda-se, para a obtenção de leite cru de qualidade, que a ordenha seja feita apenas em vacas sabidamente saudáveis, após a correta limpeza e desinfecção do úbere, em local limpo, atentando-se para a qualidade da água utilizada em todo o processamento. Não se pode ignorar a correta higiene de utensílios e equipamentos, principalmente no que diz respeito à prevenção de formação de biofilmes. Além do que já foi exposto, é importante ressaltar que a saúde do ordenhador, assim como a sua conscientização, podem influenciar diretamente a qualidade do leite.

Em um trabalho realizado por Langsrud et al. (2000), desinfetantes à base de peróxidos em temperaturas e concentrações não corrosivas aos equipamentos podem ser usados com sucesso para a destruição dos esporos do *Bacillus cereus*. No entanto, as superfícies a serem desinfetadas devem primeiramente ser submetidas à limpeza com substâncias alcalinas. Essa medida pode minimizar a formação de biofilmes pelos esporos do *Bacillus cereus*. De acordo com Wong (1995), é necessário que se conheça profundamente as interações entre o microrganismo formador do biofilme, a sua superfície de ligação aos equipamentos e a ação dos agentes sanitizantes para que se tenha uma estratégia eficiente para a prevenção desse biofilme, assim como para a retirada do biofilme eventualmente formado.

Em relação ao leite beneficiado, alguns cuidados podem ser tomados para se evitar casos de intoxicação alimentar. Na indústria, é importante que se use leite cru de boa qualidade, que se evite a formação de biofilmes nos equipamentos, promovendo a sua correta higienização após o turno de trabalho e, ainda, que o leite já envasado permaneça sempre em baixas temperaturas (<4°C), o que faz com que o tempo de geração do *Bacillus cereus* aumente e, conseqüentemente, haja menor chance de produção de enterotoxinas. Ainda na

indústria, a análise periódica da eficiência da desinfecção de equipamentos pode auxiliar na detecção de possíveis falhas, corrigindo o problema em tempo hábil.

Gruetzmacher e Bradley Jr. (1999) citam que a empacotadeira é um importante ponto de contaminação para o leite pasteurizado. Os autores verificaram que o tempo de vida útil do leite pasteurizado, mas não envasado, foi 20 dias maior do que o tempo de vida útil do leite já envasado. Quando os possíveis meios de transmissão de microrganismos ao leite pasteurizado foram eliminados e medidas adequadas de higienização foram adotadas, o tempo de vida útil desse tipo de leite passou de nove para 34 dias. Os autores recomendam desinfetantes à base de ácidos peróxidoacético para a limpeza dos equipamentos.

Salienta-se também a importância da embalagem no processo de contaminação do leite beneficiado (GRUETZMACHER e BRADLEY JR, 1999). De acordo com Pirttijärvi et al. (1996), as embalagens são potenciais meios de transmissão de contaminantes para o leite após o processamento térmico.

Por outro lado, deve-se salientar que a conservação do produto final deve ser efetiva não só no comércio, mas também nos domicílios dos consumidores. Assim, pode-se garantir um produto não livre de microrganismos, mas com menor ou, talvez, insignificante chance de ser um veiculador de enfermidades.

O presente trabalho deixa clara a necessidade de se aprimorar as técnicas de processamento do leite, que ainda se mostram falhas em relação à destruição do *Bacillus cereus*. Também sugere-se um melhor manejo relacionado à obtenção do leite cru, para que se possa obter um produto de melhor qualidade e, conseqüentemente, diminuir os riscos do produto final veicular microrganismos patogênicos. O ideal seria que houvesse a implantação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) nas indústrias lácteas. Ainda destaca-se a necessidade de se produzir, através da indústria nacional, kits para a detecção “in vitro” da enterotoxina produzida pelo *Bacillus cereus*, diminuindo os custos de tal procedimento e excluindo-se totalmente o uso de animais de laboratório para esse fim.

6 Conclusões

Nas condições em que o trabalho foi realizado, baseando-se no número de amostras analisadas e nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- o leite cru ou processado (pasteurizado, em pó e longa vida) adquirido nas cidades de Ribeirão Preto/SP e Jaboticabal/SP apresentou qualidade microbiológica insatisfatória, visto que a maioria das amostras analisadas (58,3%) apresentou-se positiva para a presença de microrganismos do grupo do *Bacillus cereus*;
- a maioria das amostras analisadas apresentou-se potencialmente capaz de produzir toxinfecção alimentar, pois várias cepas (51,2%) de *Bacillus cereus* isoladas das diferentes amostras puderam produzir a enterotoxina “in vitro”;
- as técnicas “in vivo” não se mostraram tão eficientes quanto à capacidade de detecção das enterotoxinas produzidas pelo *Bacillus cereus*, quando comparadas com a técnica “in vitro”;
- embora tenha havido uma especificidade relativamente alta (75%) entre as técnicas de alça ligada e de aglutinação em látex para a detecção de enterotoxina produzida pelo *Bacillus cereus*, tanto a sensibilidade, quanto a concordância apresentaram resultados insatisfatórios (23% e 48%, respectivamente), sendo que o índice *kappa* classificou a concordância encontrada como “ruim”;
- quando a técnica “in vitro” foi comparada com a técnica de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho, a sensibilidade e a concordância foram insatisfatórias (5% e 50%, respectivamente), sendo que o índice *kappa*, também neste caso, classificou a concordância entre as técnicas como “ruim”, mesmo com a especificidade sendo de 100%;
- quando as duas técnicas “in vivo” foram comparadas entre si, o índice *kappa* também classificou a concordância entre elas como “ruim”, mesmo com uma

concordância ao redor de 80%; isto indica que esta concordância ocorreu meramente ao acaso;

- as técnicas “in vivo” se mostraram trabalhosas, podem provocar sofrimento animal, tiveram um alto índice de descarte por resultados duvidosos e, por isso, não devem ser utilizadas para verificar a capacidade enterotoxigênica do *Bacillus cereus*, devendo ser substituídas pela técnica “in vitro”;
- a qualidade microbiológica da matéria-prima é fundamental para a garantia do leite beneficiado, tendo em vista que as diferentes formas de processamento (leite UAT, leite pasteurizado e leite em pó) são insuficientes para evitar a presença de cepas enterotoxigênicas do referido microrganismo no leite termicamente processado;
- o consumidor está colocando em risco a sua saúde ao adquirir e consumir o leite beneficiado, já que o mesmo pode conter cepas de *Bacillus cereus* com capacidade enterotoxigênica.

7 Referências

ABDEL, K.A.; EL-SHERBINI, M. Prevalence of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in raw and pasteurized milk. **Veterinary Medicine Journal**, v.44, n.2A, p.157-161, 1996.

AHMED, A.H. et al. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **Jornal of Food Protection**, v.46, n.2, p.126-128, 1983.

AHMED, A.H. et al. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.3, p.636-640, 1995.

ANDERSSON, A. et al. What problems does the food industry have with the sporeforming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p.145-155, 1995.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

ARISPE, I.; WESTHOFF, D. Venezuelan white cheese: composition and quality. **Journal of Food Protection**, v.47, n.1, p.27-35, 1984.

ASH, C. et al. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, n.3, p.343-346, 1991.

ASHENAFI, M. Microbiological quality of ayib, a traditional ethiopian cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, n.3-4, p.263-268, 1990.

BAKER, J.M.; GRIFFITHS, M.W. Evidence for increased thermostability of *Bacillus cereus* enterotoxin in milk. **Journal of Food Protection**, v.58, n.4, p.443-445, 1995.

BARROS, V.R.M. et al. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na capital do estado de São Paulo, Brasil – 1987/1988. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v.4, f.1, p.45-51, 2001.

BEARD, B.M. et al. Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverages supplemented with nisin. **Journal of Food Protection**, v.62, n.5, p.484-491, 1999.

BECKER, H. et al. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal Food Microbiology**, v.23, n.1, p.1-15, 1994.

BEECHER, D.J.; MACMILLAN, J.D. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.58, n.7, p.2220-2227, 1990.

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

BEECHER, D.J.; WONG, A.C.L. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.62, n.3, p.980-985, 1994.

BEECHER, D.J.; WONG, A.C.L. Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. **Microbiology-UK**, v.146, p.1371-1380, 2000.

BEECHER, D.J. et al. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.63, n.11, p.4423-4428, 1995a.

BEECHER, D.J. et al. Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL. **Infection and Immunity**, v.63, n.2, p.632-639, 1995b.

BERQUÓ, E.S. et al. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1980. 325p.

BERGDOLL, M.S. Ileal loop fluid accumulation test for diarrheal toxins. **Methods in Enzimology**, v.165, p.306-323, 1988.

BEUCHAT, L.R. et al. Effects of nisin and temperature on survival, growth, and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p.1953-1958, 1997.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia: em suas aplicações à medicina e à higiene**. 16.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975. p.842-843.

BOLSTAD, T. Food poisoning caused by *Bacillus cereus* - chicken. **Norsk Veterinaertidsskrift**, v.102, n.1, p.39, 1990. **FSTA**, v.23, n.5, p.255, 1991 (5S176).

BRADSHAW, J.G. et al. Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. **Applied Microbiology**, Washington, v.30, n.6, p.943-5, 1975.

BROCK, T.D. et al. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 1984. p.798.

BROWN, K.L. Spore resistance and ultra heat treatment processes. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 76, p.67s, 80s, 1994.

BUCHANAN, R.E; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8.ed. Baltimore: The Williams e Wilkins, 1974. p. 529-575.

BUCHANAN, R.L.; SCHULTZ, F.J. Comparision of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, n.5, p.353-356, 1994.

BURROWS, W.; MUSTEIKIS, G.M. Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop. **Journal of Infection Disease**, v. 116, p. 183-190, 1966.

CARRETTO, E. et al. *Bacillus cereus* fatal bacteremia and apparent association with nosocomial transmission in an intensive care unit. **Scandinavian Journal of Infection Disease**, v.32, n.1, p.98-100, 2000.

CHEN, C.H. et al. Rapid identification of *Bacillus cereus* based on the detection of a 28.5-Kilodalton cell surface antigen. **Journal of Food Protection**, vol.64, n.3, p.348-354, 2001.

CHOPRA, P. et al. Occurrence of *Bacillus cereus* in milk and milk products. **Indian Journal of Dairy Science**, v.33, n.2, p. 248-252, 1980.

CHRISTIANSSON, A. The toxicology of *Bacillus cereus*. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.275, p.30-35, 1992.

CHRISTIANSSON, A. et al. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.2, p.305-314, 1999.

CRIELLY, E.M. et al. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, n.3, p.256–263, 1994.

DELAZARI, I. et al. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. **Boletim do Instituto Tecnológico de Alimentos**, n. 60, 1978.

DOYLE, M.P. *Bacillus cereus*. **Food Technology**, v. 42, n.4, p.199, 1988.

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

DROMIGNY, E. et al. *Bacillus cereus*. In: BOURGEOIS, C.M, MESCLE, J.F, ZUCCA, J. **Microbiología alimentaria**. Zaragoza: Acribia, 1994. p.107-111.

DUFRENNE, J. et al. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n.1, p.99-109, 1994.

FEHLHABER, K; JANETSCHKE, P. **Higiene Veterinaria de los Alimentos**. Zaragoza: Acriba, 1995. p.57-58.

FERMANIAN, C.; WONG, A.C.L. Improved in vitro detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 57, n.1-2, p.1-8, 2000.

FERMANIAN, C. et al. Diarrhoeal toxin production at low temperature by selected strains of *Bacillus cereus*. **Journal of Dairy Research**, v.64, n.4, p.551-559, 1997.

FERNANDEZ, A. et al. Application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. **Food Microbiology**, v.16, n.6, p.607-613, 1999.

FOEGEDING, P.M.; BERRY, E.D. Cold temperature growth of clinical and food isolates of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.60, p.1256-1258, 1997.

GIANNELLA, R.A.; BRASILE, L. A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by *Bacillus cereus*: Clinical, epidemiologic, and microbiologic studies. **Journal of Infection Disease**, v.139, n.3, p.366-70, 1979.

GILL, J.P.S. et al. Qualitative bacteriological survey of milk and milk products with special reference to *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Dairy Science**, v.47, n.8, p.680-682, 1994.

GLATZ, B.A.; GOEPFERT, J.M. Defined conditions for synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin by fermenter-grown cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.32, n.3, p.400-404, 1976.

GLATZ, B.A. et al. Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species. **Infection and Immunity**, v.10, n.2, p.229-303, 1974.

GOEPFERT, J.M. et al. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v.35, n.4, p.213-27, 1972.

GONZALEZ, I. et al. The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n.5, p.548-54, 1995.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology. Symposium Supplement**, v.76, n.23, p.61S-66S, 1994.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In Doyle, M.P. et al. **Food Microbiology: Fundamentals Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 327-336.

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

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

GRANUM, P.E. et al. Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.47, n.2, p.63-70, 1993b.

GRIFFITHS, M.W. Toxin production by psychotropic *Bacillus cereus* present in milk. Modern microbiological methods for dairy products. **International Dairy Federation Special Issue, n.8901**, p. 143-147, 1989.

GRIFFITHS, M.W. *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.275, p.36-39, 1992.

GRIFFITHS, M.W. *Bacillus cereus* in liquid milk. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.287, p.18, 1993.

GRUETZMACHER, T.J.; BRADLEY JR, R.L. Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk. **Journal of Food Protection**, v.62, n.6, p.625-631, 1999.

HARMON, S.M. et al. Comparison of selective plating media for enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**, v.47, p.65-67, 1984.

HARMON, S.M. et al. In: VANDERZART e SPLITTSTOESSER. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. *Bacillus cereus***. Washington, 1992. p.593-604.

HAUGE, S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming *Bacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.18, p. 591-595, 1955.

HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2627-2630, 2000.

HOLMES, J.R. et al. Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. **Archival of Internal Medicine**, v.141, n.6, p.766-7, 1981.

HSIEH, Y.M. et al. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *Bacillus cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, n.4, p.481-490, 1999.

JACKSON, S.G. et al. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, n. 2, p.103-105, 1995.

JEVON, G.P. et al. *Bacillus cereus* pneumonia in premature neonates: a report of two cases. **Pediatric Infection Disease Journal**, v.12, n.3, p.251-253, 1993.

JOHNSON, K.M. et al. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illness. **Journal of Food Science**, v.47, n.4, p.1268-71, 1982.

JONES, T.O.; TURNBULL, P.C.B. Bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. **The Veterinary Record**, v.108, n.13, p.271-274, 1981.

KAMAT, A.S. et al. *Bacillus cereus* in some Indian foods, incidence and antibiotic, heat and radiation resistance. **Journal of Food Safety**, v.10, p.31-41, 1989.

KONEMAM, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e Atlas color**. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p.664.

LAICINI, Z.M. et al. Avaliação dos laudos analíticos das amostras de alguns tipos de queijos recebidos pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.53, n.1-2, p.17-20, 1993.

LANGEVELD, L.P.M.; CUPERUS, F. Aspects regarding the application of a predictive model for growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 287, p.6-10, 1993.

LANGSRUD, S. et al. Potentiation of the lethal effect of peroxygen on *Bacillus cereus* spores by alkali and enzyme wash. **International Journal of Food Microbiology**, v.1, p. 81-86, 2000.

LEE, P.K. et al. Technical report: distribution of toxigenic *Bacillus cereus* in rice samples marketed in Hong Kong. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.11, n.6, p.696-698, 1995.

LITTLE, C.L; KNOCHEL, S. Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* in Brie stored at 4, 8 and 20°C. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, n.1-2, p.137-145, 1994.

LOGAN, N.A. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. **Journal of Medical Microbiology**, v.25, n.3, p.157-165, 1988.

LUBY, S. et al. A large outbreak of gastroenteritis caused by diarrheal toxin-producing *Bacillus cereus*. **Journal of Infection Disease**, v.167, n.5, p.1452-1455, 1993.

MacFADIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Willians e Willians Co, 1976. 312p.

- MAZAS, M. et al. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, v.30, n.1, p.71-8, 1995.
- McKNIGHT, I.C.S. et al. *Bacillus cereus* em macarrões industrializados. II. Ocorrência em produtos comerciais e sua multiplicação no alimento preparado para consumo. **Revista de Microbiologia**, v.21, n.3, p.268-275, 1990.
- MEER, R.R. et al. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection**, v.54, n.12, p.969-79, 1991.
- MIDURA, T. et al. Outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus*. **Public Health Reports**, v.85, n.1, p.45-8, 1970.
- MIJACEVIC, Z.; SAMARDZIJA, S. Heat treatment of milk. **Veterinarski Glasnik**, v.50, n.6, p.283-287, 1996.
- MOSSEL, D.A.A. et al. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.650-653, 1967.
- MUSA, M.O. et al. Fulminant septicaemic syndrome of *Bacillus cereus*: three case reports. **Journal of Infection**, v.39, n.2, p.154-156, 1999.
- OMBUI, J.N. et al. *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. **FEMS Microbiology Letters**, v.149, n.2, p.245-248, 1997.
- PENG, J.S. et al. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v.65, n.1-2, p.105-111, 2001.

PENNA, T.C.V.; MORAES, D.A. Research note: the influence of Nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.65, n.2, p.415-418, 2002.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 596p.

PETERZ, M. et al. Comparison of media for isolation of *Bacillus cereus* from foods. **Journal of Food Protection**, v.48, n.11, p.969-970, 1985.

PIRTTIJÄRVI, T.S.M. et al. Bacterial contaminants in liquid packaging boards: assessment of potential for food spoilage. **Journal of Applied Bacteriology**, V.81, N.4, P.445-458, 1996.

PRUSS, B.M. et al. The hemolytic HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, n.12, p.5436-5442, 1999.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE. Food poisoning associated with *Bacillus cereus*. **British Medical Journal**, v.1, p.189, 1972.

RAIMUNDO, S.M.C.; ROBBS, P.G. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* sp em alguns produtos de laticínios comercializados na cidade do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.11, n.1-2, p.69-76, 1988.

RANGASAMY, P.N. et al. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, n.2, p.93-95, 1993.

RAYMUNDO, M.M. **Os Deveres dos Pesquisadores para com os Animais de Experimentação: uma proposta de auto-regulamentação.** 2000. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/animprin.htm>>. Acesso em 22 out. 2002.

REZENDE, N.C.M. et al. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (Ultra-High-Temperature). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.3, p.162-166, 2000.

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

SALJI, J.P. et al. The yoghurt industry in the Central Province of Saudi Arabia. **Cultured Dairy Products Journal**, v.18, n.4, p.14-18, 1983.

SALLAM, S.S. et al. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some dairy products in Egypt. **Journal of Egyptian Veterinary Medical Association**, v.51, n.1-2, p.153-159, 1991.

SALZBERG, S.P. et al. A.M. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.13, n.1, p.26-30, 1982.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. et al. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite UAT. **Higiene Alimentar**, v.10, n.42, p.25-27, 1996.

SCHULTEN, S.M. et al. Evaluation of the ISO 7932 standard for the enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, n.1-2, p.53-61, 2000.

SETLOW, P. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v.76, p.49S-60S, 1994.

SHINAGAWA, K. Analytical methods of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.1, p.125-141, 1990.

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

SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus* – Induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. **Applied Microbiology**, v.24, n.3, p.341-348, 1972.

SPIRA, W.M.; SILVERMAN, G.J. Effects of glucose, pH, and dissolved oxygen tension on *Bacillus cereus* growth and permeability factor production in batch culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.1, p.109-116, 1979.

STADHOUDERS, J. Taxonomy of *Bacillus cereus*. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.275, p.4-8, 1992a.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *B. cereus*. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.275, p.15-18, 1992b.

SUTHERLAND, A.D. Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. **Journal of Dairy Research**, v.60, n.4, p.569-574, 1993.

SUTHERLAND, A.D.; LIMOND, A.M. Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*. **Journal of Dairy Research**, v.60, n.4, p.575-580, 1993.

TAN, A. et al. The use of *Bacillus* diarrhoeal enterotoxin (BDE) detection using an ELISA technique in the confirmation of the aetiology of *Bacillus*-mediated diarrhoea. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, n.6, p.677-682, 1997.

te GIFFEL, M.C. et al. Occurrence and characterization of (psychotropic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.49, n.213, p.125-138, 1995.

te GIFFEL, M.C. et al. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, n.3, p.307-318, 1996.

te GIFFEL, M.C. et al. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. **FEMS - Microbiology Letters**, v.146, n.1, p.47-51, 1997.

TODD, E.C.D. The first annual summary of food-borne disease in Canada. **Journal of Food Technology**, v.39, n.6, p.426-31, 1976.

TODD, E.C.D. Foodborne disease in six countries - a comparison. **Journal of Food Protection**, v.41, n.7, p.559-65, 1978.

TSEN, H.Y. et al. *Bacillus cereus* group strains, their hemolysin BL activity, and their detection in food using a 16S RNA and Hemolysin BL gene-targeted multiplex polymerase chain reaction system. **Journal of Food Protection**, v.63, n.11, p.1496-1502, 2000.

Van NETTEN, P.; KRAMER, J.M. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, n.2, p.85-99, 1992.

VARNAM, A.W.; EVANS, M.G. *Bacillus*. In: ____ **Foodborne Pathogens**. London: Mosby Year Book, 1991. p.267-288.

VASCONCELLOS, F.J.M.; RABINOVITCH, L. A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n.3, p.235-238, 1995.

WONG, A.C.L. Biofilms – implications for hygiene and quality in the dairy industry. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.302, p.54, 1995.

WONG, H.C. et al. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.3, p.699-702, 1988.